



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Larbi Tébessi - Tébessa-  
Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Appliquée  
Domaine des Sciences de la Nature et de la Vie



## Thèse

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat LMD

En : Sciences biologiques

Option : Toxicologie cellulaire

Par : **M<sup>elle</sup>. Toualbia Nadjiba**

**Intitulée :**

Étude de la toxicité mixte de chlorure de nickel et de chlorpyrifos sur les lapins  
*Oryctolagus cuniculus*

**Devant le jury :**

<b>M. Djabri Belgacem</b>	Prof	Université de Tébessa	Président
<b>M. Rouabhi Rachid</b>	Prof	Université de Tébessa	Rapporteur
<b>M. Mesli Lotfi</b>	Prof	Université de Tlemcen	Examineur
<b>M. Zellagui Ammar</b>	Prof	Université d' Oum El-Bouaghi	Examineur
<b>M. Menaceur Fouad</b>	MCA	Université de Tébessa	Examineur
<b>Mm. Boussekine Samira</b>	MCA	Université de Tébessa	Examinatrice

**Date de soutenance : 15/03/ 2018**

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

« وَفَوْقَ كُلِّ ذِي عِلْمٍ عَلِيمٌ »

صدق الله العظيم

• سورة يوسف •

آية 76

## *Remerciements*

Je remercie Dieu tout puissant de m'avoir donné la force et la capacité d'effectuer ce travail.

*Je voudrais tout d'abord remercier mon encadreur, Monsieur **ROUABHI Rachid** professeur à l'université de Tébessa de m'avoir donné la possibilité de réaliser ce travail, je vous remercie particulièrement de m'avoir procuré soutien et disponibilité permanente pour les séances de travail tout le long de ces trois années de thèse. Il n'a pas cessé de m'encourager en me faisant partager son expérience et ses connaissances scientifiques et surtout sa permanente bonne humeur au sein du laboratoire.*

Mes sincères remerciements vont à Monsieur **DJABRI Belgacem** Professeur à la Faculté des sciences de la Nature et de la Vie, Université Laarbi Tébessi à Tébessa de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury. Qu'elle trouve ma reconnaissance et mon respect les plus sincères.

Je tiens à remercier aussi Monsieur **MESLI Lotfi**, Professeur à l'université de Tlemcen, et Monsieur **ZELLAGUI Ammar**, Professeur à l'université de Oum El-Baouaghi, pour avoir accepté de juger ce travail, merci de vous être déplacés ainsi que pour vos remarques et conseils fructueux

Mes remerciements s'adressent également à Me **BOUSSEKINE Samira** maitre de conférences à l'université de Tébessa de m'avoir fait l'honneur de participer au jury. Et merci pour ses conseils, son orientation, sa générosité et son savoir qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Mes remerciements sincères et respectueux vont au Monsieur **MENACEUR Fouad** maitre de conférences à l'université de Tébessa pour avoir accepté de consacrer du temps à examiner et juger ce travail comme Examineur.

Je voudrais aussi remercier l'ensemble du personnel du laboratoire pour leur aide surtout pour tous les bons moments passés en leur compagnie : **Karima et Soued**

Il m'est agréable d'exprimer mes remerciements à tous mes amis qui m'ont aidé pour le bon achèvement de ce travail

J'adresse également mes sincères remerciements à tous les personnels enseignants du département de biologie appliquée et le département des êtres vivants de l'université Laarbi Tébessi à Tébessa et, à toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin tout au long de mes études

En fin, je ne peux terminer ces remerciements sans citer ma famille, à qui je dois tant. Sans son encouragement, son soutien et son affection, je n'aurais pu mener ce travail à bien.

# Dédicace

*Je dédie ce mémoire*

*A mon père, le soleil de ma vie, le bon cœur le meilleur  
père. Papa, merci*

*A ma très chère mère, Si tu savais combien je t'aime, tu  
comprendras que déjà sans toi les jours sont blêmes, sans toi  
il n'y a plus de joie. Ma fleur maman. Merci*

*A ma petite sœur, le symbole de l'innocence, de fidélité et  
d'optimisme ma chérie "Assia"*

*A mes frères: Ayoub, Mouslem, Oualid, Farouk, Kheireddine  
Mohamed -el Haddi*

*A l'homme de ma vie, mon fiancé : Azzedine pour son aide  
et son encouragement. Merci*

*A ma belle amie, le symbole de l'amitié, de fidélité, ma chère  
"Aya" et sa famille*

*A mes chers oncles*

*A mes tantes adorable*

*Mes cousins*

*Mes cousines*

*A toute la famille : Toualbia et Touahria*

*A tous ceux qui m'aiment*

*De près ou de loin*

ملخص :

إشكالية البحث تميل إلى تسليط الضوء على نوع من المعادن الثقيلة المتمثل في نيكل و نوع من المبيد الحشري كلور -بيريفوس و مزيجهما معا على نوع من ذكور الأرناب *Oryctolagus cuniculus* .  
أجريت هذه التجربة في المخبر على 35 أرناب مقسمة الى 07 مجموعات, المجموعة 01 تعتبر كشاهد , المجموعة 03/02 معالجة بالنيكيل نو تركيزين (250-500) ppm والمجموعة 05/04 معالجة بكلور بريفوس (375-750) ppm والمجموعتين الاخيرتان عولجت بالمزيج. المزيج 1(375+250) ppm والمزيج 2 (375+500) ppm عن طريق الفم لمدة 90 يوم من العلاج

نتائجنا تظهر أن التسمم بالنيكل والكلوربيريفوس ومزيجهما على ذكور الأرناب تسبب اثار الاكسدة واثار بيوكيميائية على مستوى الكبد ويمكن تلخيصها في النقاط التالية :

**الجانب الفيزيولوجي:** يظهران النيكل و الكلور بيريفوس ومزيجهما يسبب النقص في الوزن مع زيادة وزن الكبد و مقارنة مع شاهد

**الجانب الكيميائي :** يبين ان النيكل و كلور بيريفوس و مزيجهما أدى إلى تغيير القياسات البيوكيميائية و المؤشرات الحيوية من وظائف الكبد عن طريق زيادة تركيز الغلوكوز- اليوريا - كرياتين- البيلبيروبين و هذا يرافقه زيادة نشاط الانزيمي ASAT.ALAT.PAL

**الاكسدة الخلوية:** تأثير كل من النيكل و كلور بيريفوس ومزيجهما على نظام مضاد للاكسدة الخلوية الذي يتمثل التأثير الإنزيمي GSH.MDA.GST.GPx.CAT

**تأثير عصبي:** يتمثل في انخفاض مستوى الانزيم العصبي استيل كولين استراز **تأثير على ميتوكوندري:** يتجلى من خلال زيادة حجم و نفاذية الميتوكوندري مع انخفاض في التنفس و اضطراب المؤشرات الحيوية للأكسدة الميتوكوندري

---

**الكلمات المفتاحية:** كلور بيريفوس. نيكل. الاجهاد التاكسدي. المؤشرات البيوكيميائية التورم. تنفس. النفاذية *Oryctolagus cuniculus*

### Résumé

Notre problématique tend à mettre en évidence, simultanément, l'effet nocif de NiCl<sub>2</sub>, CPF et leurs mixtures sur les paramètres biochimiques, cytosolique et mitochondrial chez le lapin mâle *Oryctolagus cuniculus*.

L'étude expérimental menée au laboratoire sur 35 lapin male *Oryctolagus cuniculus* repartis en 07 lots, le premier lot sert de témoin, deux lots traités par le NiCl<sub>2</sub> à deux concentration (250 ppm et 500 ppm) deux autres lots traités par le CPF à deux concentration (375ppm et 750ppm) et les deux derniers sont traités par le mixture M1 (250ppm+375ppm) M2 (500ppm+750ppm) par voie oral pendant 90jours de traitement

Nos résultats montrent que l'intoxication du nickel, chlorpyrifos et leurs mixtures chez les lapins mâle *Oryctolagus cuniculus* provoque des effets oxydatifs, biochimiques et hépatotoxiques qu'on peut les résumés dans les points suivants :

- L'aspect physiologique montre que le nickel, CPF et leurs associations induisent un déficit pondéral avec une augmentation des poids relatifs du foie et une diminution de la consommation alimentaire par rapport au lot témoin.
- L'aspect biochimique montre que le nickel, CPF et leurs associations induisent une altération des paramètres biochimiques, biomarqueurs de la fonction hépatiques, augmentation de la concentration du glucose, de l'urée, de la créatinine et de bilirubine total et direct, ceci s'accompagné par une augmentation de l'activité enzymatique des marqueurs hépatiques ASAT, ALAT et ALP.
- Stress oxydatif cytosolique : L'effet oxydatif du nickel, CPF et leurs mixtures se manifestent par altération du système antioxydant cellulaire caractérisé par une action directe sur l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GSH-Px), de la catalase, de GST, le taux du glutathion hépatique (GSH) et le taux de MDA. Effet neurotoxique traduit par une diminution de l'activité de l'AchE
- Effet mitochondrial : se manifeste par une augmentation de gonflement et de perméabilité mitochondrial par contre une diminution de la respiration et perturbation des biomarqueurs oxydatif mitochondrial.

**Mots clés :** CPF, Nickel, *Oryctolagus cuniculus*, stress oxydant, paramètres biochimiques, perméabilité, gonflement, respiration.

**Abstract**

Our problematic tends to highlight, simultaneously, the harmful effect of NiCl<sub>2</sub>, CPF and their mixtures on the biochemical, cytosolic and mitochondrial parameters in the male rabbit *Oryctolagus cuniculus*.

The experimental study conducted in the laboratory on 35 male rabbits *Oryctolagus cuniculus* distributed in 07 batches, the first batch serves as a control, two batches treated with NiCl<sub>2</sub> at two concentrations (250 ppm and 500 ppm) two other batches treated with CPF at two concentrations (375ppm and 750ppm) and the last two are treated with the M1 (250ppm + 375ppm) M2 (500ppm + 750ppm) mixture orally for 90 days of treatment

Our results show that nickel, chlorpyrifos and their mixtures in the male rabbits *Oryctolagus cuniculus* causes oxidative, biochemical and hepatotoxic effects that can be summarized in the following points:

- The physiological aspect shows that nickel, CPF and their associations induce a weight deficit with an increase in relative liver weights and a decrease in food compared to the control group.
- The biochemical aspect shows that the nickel, CPF and their associations induce an alteration of the biochemical parameters, biomarkers of the liver function, increase of the concentration of glucose, urea, creatinine and total and direct bilirubin, this accompanied by an increase in the enzymatic activity of ASAT, ALAT and ALP liver markers.
- Cytosolic oxidative stress: The oxidative effect of nickel, CPF and their mixtures are manifested by alteration of the cellular antioxidant system characterized by a direct action on the enzymatic activity of glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase, GST, hepatic glutathione level (GSH) rate of MDA. Neurotoxic effect resulting in a decrease in AchE activity.
- Mitochondrial effect: manifested by an increase in swelling and mitochondrial permeability against a decrease in respiration and disruption of mitochondrial oxidative biomarkers

**Key words:** CPF, nickel, *Oryctolagus cuniculus*, oxidative stress, biochemical parameters, permeability, swelling, respiration.



Introduction générale.....	01
I-L'évaluation de risque lié à l'exposition aux xénobiotiques.....	04
I-1- Exposition aux pesticides.....	04
I.1.1- Exposition professionnelle.....	04
I.1.2. Exposition non professionnelle.....	04
I.1.3. Exposition de l'enfant.....	05
I -2-Effet des pesticides sur la santé et sur l'environnement.....	05
I.2.1. Effets sur la santé.....	05
I.2.1.a. Exposition.....	05
I.2.1.b. Toxicité aiguë.....	06
I.2.1.c. Toxicité chronique.....	06
I.2.2. Effets sur l'environnement.....	07
I-3- Aspects réglementaires des pesticides.....	08
I-3-1- Niveau international.....	08
I-3-2- Niveau national.....	09
I-4- Définition de chlorpyrifos.....	10
I-4-1- Propriétés physico-chimiques.....	10
I-4-2- Mécanisme d'action .....	11
I-4-3- Toxicité et devenir dans l'environnement .....	13
I-5- Exposition aux métaux lourds.....	14
I-5-1- Rappels généraux sur les métaux lourds.....	14
I-5-2- Exposition.....	15
I-5-3- Effets sur la santé.....	15
I-5-4- Devenir des métaux lourds dans l'environnement.....	16
I-5-5- Normes et réglementation.....	18
I-6- Définition du nickel.....	19
I-6-1- Propriétés physique.....	19

I-6-2- Propriétés chimiques.....	19
I-6-3-Utilisation .....	20
I-6-4- Source d'exposition.....	21
I-6-5- Mécanisme d'action du nickel.....	21
I-6-6- Toxicité du nickel.....	23
II- Matériel et méthodes.....	25
II-1-Matériel.....	25
II-1-1- Matériel biologique.....	25
II-1-2- Matériel chimique.....	26
II-2- Méthode.....	27
II-2-1- Description et élevage.....	27
II-2-2- Lotissement et traitement.....	27
II-2-3- Sacrifices et prélèvement des organes.....	27
II-2-4- Méthode de dosage des paramètres biochimiques.....	28
II-2-4-1- Urée.....	28
II-2-4-2- Créatinine.....	29
II-2-4-3- Bilirubine totale et directe.....	29
II-2-4-4- Aspartate aminotransférase AST.....	30
II-2-4-5- Alanine aminotransferase ALT.....	30
II-2-4-6- Phosphatase alcaline .....	31
II-2-4-7- Extraction et dosage des métabolites.....	31
II-2-4- 8- Dosage de Malondialdéhyde MDA.....	34
II-2-4-9- Mesure du Glutathion .....	35
II-2-4-10-Dosage de l'activité de GPx.....	36
II-2-4-11- Dosage de l'activité de Catalase.....	37
II-2-4-12-Dosage de l'activité de GST.....	38
II-2-4-13-Dosage de l'activité de l'AchE.....	39
II-2-5- Etude subcellulaire .....	41
II-2-5-1- Isolement des mitochondries.....	41

II-2-5-2- Estimation de la respiration mitochondriale.....	41
II-2-5-3- Estimation du gonflement des mitochondries.....	41
II-2-5-4- Estimation de la perméabilité mitochondriale.....	41
II-2-5-5- Mesure des paramètres mitochondriaux .....	42
II-3- Analyses statistique.....	42
III-Résultats.....	45
III-1- Etude physiologique.....	45
III-1-1- Effet sur gain du poids corporel.....	45
III-1-2-Effet sur le poids relatif du foie.....	45
III-2- Etude des paramètres biochimiques sanguins.....	46
III-2-1-Urée et créatinine.....	46
III-2-2-Transaminases.....	47
III-2-3- Phosphatase alcaline.....	48
III-2-4- Bilirubine totale et directe.....	49
III-3-Etude des paramètres biochimiques tissulaires.....	50
III-3-1- Effet sur le taux des protéines hépatiques.....	50
III-3-2-Effet sur le taux des glucides hépatiques.....	50
III-3-3-Effet sur le taux des lipides hépatiques.....	51
III-3-4- Effet sur le taux de GSH cytosolique.....	52
III-3-5- Effet sur l'activité de GST cytosolique.....	53
III-3-6- Effet sur le taux de MDA cytosolique.....	53
III-3-7- Effet sur l'activité de CAT cytosolique.....	53
III-3-8- Effet sur l'activité de GPx cytosolique.....	55
III-3-9- Effet sur l'activité de l'AchE.....	55
III-4- Etude des paramètres mitochondriaux.....	56
III-4-1-Mesure de la consommation d'oxygène. mitochondrial.....	56
III-4-2- Variation du volume des mitochondries .....	57
III-4-3-Variation de la perméabilité mitochondriale.....	58
III-4-4-Activité de Catalase mitochondrial.....	58

III-4-5-Activité de GST mitochondrial.....	<b>59</b>
III-4-6-Activité de GPx mitochondrial.....	<b>60</b>
III-4-7- Taux du MDA mitochondrial.....	<b>61</b>
III-4-8- Taux de GSH mitochondrial.....	<b>61</b>
III-4-9- Activité de cytochrome C mitochondrial.....	<b>62</b>
IV- Discussion.....	<b>63</b>
V- Conclusion et perspective.....	<b>78</b>
Références.....	<b>79</b>

**Liste des tableaux**

<b>N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>01</b>	Normes des métaux lourds	18
<b>02</b>	Propriétés physiques et chimiques du nickel	20
<b>03</b>	Classification du lapin domestique	25

## Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Structure chimique du chlorpyrifos	10
02	Inhibition des cholinestérasés par les organophosphorés	12
03	Mécanisme de phagocytose sélective et de dissolution plasmatique des ions Ni <sup>2+</sup> au noyau et réactifs lors de leur entrée dans le noyau	22
04	Extraction des glucides. Lipides et protéines	33
05	Schéma récapitulatif du protocole expérimental	44
06	Variations de gain du poids chez les lapins témoins et traités.	45
07	Variations de poids relatif de foie chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement	46
08	Variations de la concentration sérique en urée chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement	46
09	Variations de la concentration sérique en créatinine chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement	47
10	Variation de l'activité enzymatique de TGO chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement	47
11	Variation de l'activité enzymatique de TGP chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement	48
12	Variation de l'activité enzymatique de la PALc chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement	48
13	Variation du taux sérique de la bilirubine totale chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement	49
14	Variation du taux sérique de la bilirubine directe chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement	49

15	Taux des protéines totales chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement	50
16	Taux des glucides totales chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement	51
17	Taux des lipides totales chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement	51
18	Variation de la teneur en glutathion (GSH) cytosolique chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement	52
19	Variation l'activité enzymatique de la glutathion -S- transférase (GST) cytosolique chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement	53
20	Variation de la teneur en Malondialdéhyde (MDA) cytosolique chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement	54
21	Variation de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) cytosolique chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement	54
22	Variation de l'activité enzymatique de GPx cytosolique chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement	55
23	Variation de l'activité enzymatique de l'AchE chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement	56
24	Effet de NiCl <sub>2</sub> , CPF et leurs mixtures sur la respiration mitochondrial	57
25	Variations du volume des mitochondries isolées témoins et traitées par NiCl <sub>2</sub> , CPF et la mixture en fonction du temps	57

<b>26</b>	Effets de NiCl <sub>2</sub> , CPF et la mixture sur la perméabilité mitochondriale après l'addition du Ca <sup>2+</sup>	58
<b>27</b>	Variations de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale hépatique chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement	59
<b>28</b>	Variations de l'activité enzymatique de la GST mitochondriale hépatique chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement	59
<b>29</b>	Variations de l'activité enzymatique de la GPx mitochondriale hépatique chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement	60
<b>30</b>	Variations des taux du MDA mitochondriale hépatique chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement	61
<b>31</b>	Variations des taux de GSH mitochondriale hépatique chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement	61
<b>32</b>	Taux de cytochrome C chez les lots témoins et traités chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement	62



## Liste des abréviations

---

**NiCl<sub>2</sub>** : Chlorure de Nickel

**CPF** : Chlorpyrifos

**M** : Mixture

**μ mol** : Micromoles

**OH** : Radical hydroxyle

**1O<sub>2</sub>** : Oxygène singulet.

**4-HNE** : 4-hydroxy-2-nonéal.

**AchE** : Acétylcholinestérase

**Cytc** : Cytochrome C

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ATP** : Adenosine triphosphate

**CAT** : Catalase

**CDNB** : 1-Chloro-2, 4 di nitrobenzène

**DDE** : Dichlorodiphényldichloroéthylène

**DDT** : Dichlorodiphényltrichloroéthane

**DL50** : Dose létale 50

**DO** : Densité optique

**DTNB** : Acide 5,5- dithio-bis-2  
dinitrobenzoïque

**EDTA** : Acide Ethylène Diamine Tétra  
Acétique

**EM** : Eléments métalliques

**ERO** : Espèces réactives de l'oxygène

**GPx** : Glutathion peroxydase

**GSH** : Glutathion réduit

**GSSG** : Glutathion disulfure

**GST** : Glutathion-S- transférase

**OP** : Organophosphoré

---



---

## Introduction générale

### Introduction

Le problème de la pollution n'est pas un phénomène récent ou accidentel, mais compte en réalité parmi les plus antiques. La consommation domestique, l'activité professionnelle ou la production agricole et industrielle, libèrent des déchets qui sont à la fois un risque et une ressource. Éliminés sans précautions, ils risquent non seulement de dégrader les paysages mais aussi de polluer l'environnement et d'exposer l'homme à des nuisances et à de graves dangers. Quelle ait des conséquences sanitaires, écologiques, esthétiques, industrielles ou agricoles (et le plus souvent les cinq à la fois), la pollution est un phénomène qui a des répercussions économiques et sociales graves (**Gaujous, 1995**).

D'après Jamet (1983), notre environnement physique est assimilable au niveau de ces trois compartiments : l'air, le sol et l'eau. En raison des échanges permanents qui existent entre ces compartiments, un pesticide introduit dans l'un d'entre eux, peut contaminer les deux autres, comme le sol reçoit la plupart des traitements, il joue un rôle déterminant dans la dispersion des pesticides en particulier par le phénomène de lessivage. Ces dernières années on prend de plus en plus conscience que les pesticides n'agissent pas seulement contre la cible pour laquelle ils sont homologués, mais aussi sur l'ensemble de l'écosystème (**Calvet, 1983**).

De nombreuses substances toxiques générées par les activités humaines sont quotidiennement déversées dans l'environnement aquatique. Les pollutions d'origine chronique contribuent majoritairement à la détérioration des écosystèmes aquatiques. Les contaminants majeurs, dont certains sont également d'origine naturelle, sont regroupés en plusieurs familles : les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), les chlorophénols, les polychlorobiphényles (PCBs), les hexachlorohexanes, les hexachlorobenzènes, les dioxines, les organoétains, les pesticides organochlorés, les insecticides organophosphorés et carbamates et les métaux lourds tels que le cadmium, le mercure, l'argent, le nickel, le plomb, le zinc, le cuivre, le fer (**Amiard *et al.*, 1998**).

Des agents polluants, comme les plastiques, les métaux et certains pesticides, ne sont pas ou peu biodégradables : le processus d'autoépurations est alors inopérant et ces substances s'accumulent dans l'écosystème, intoxiquant les espèces vivantes qui les ingèrent. Certaines de ces substances, de surcroît, comme les métaux lourds ou les pesticides, s'accumulent dans les organismes, se concentrant dans certains tissus ou organes à des doses parfois bien supérieures à celles mesurées dans l'eau, un phénomène appelé " bio-accumulation ". Cette

accumulation, qui s'amplifie à chacun des maillons de la chaîne alimentaire, peut prendre parfois une ampleur inquiétante (**Ramade, 1995**).

Après la seconde guerre mondiale, les pesticides ont grandement contribué à l'amélioration de la santé publique en permettant, d'une part, d'éradiquer ou de limiter la propagation de maladies parasitaires et en garantissant, d'autre part, une production alimentaire de qualité et dans ce cas, ils ont constitué un progrès considérable dans la maîtrise des ressources alimentaires (**OPDCSET, 2009**).

Les produits phytosanitaires ou pesticides sont utilisés contre différents types d'agresseurs qui peuvent être des virus, des bactéries, des champignons, des plantes (mauvaises herbes), des invertébrés (exemple : insectes, acariens, nématodes) et des vertébrés (exemple : rongeurs, oiseaux). Les pesticides sont regroupés en trois grandes familles, les herbicides, les insecticides et enfin les fongicides (**Ehrmann, 2012**).

Les organophosphorés (OP) sont des toxiques létaux, à action systémique prédominante, dont le mécanisme d'action principal est de bloquer la dégradation de l'acétylcholine au niveau des synapses cholinergiques par inhibition irréversible des cholinestérases (**Buffat et al., 1989 ; Sidel and Borak, 1992**), d'autres mécanismes encore mal connus aggravant cette toxicité (**Blanchet et al., 1991**).

Le chlorpyrifos (CPF) est un insecticide OP que l'agence US de protection d'environnement a interdit certaines de ses utilisations intérieures en 2000 en raison de son effet neurotoxique, surtout chez les enfants puisque l'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE) est principalement impliquée dans la neurotoxicité induite par cet agent (**Mitra, 2008**). Malgré cette restriction, le CPF reste un insecticide populaire à travers le monde (**Brocardo et al., 2007; Prendergast et al., 2007**).

Dans notre environnement nous sommes exposés à un nombre des substances naturelles ou artificielles peuvent être causées des effets toxiques, et les métaux lourds parmi ces substances nocives (**Basketter et al., 1999**).

On appelle métaux lourds les éléments métalliques naturels dont la masse volumique dépasse  $5\text{g/cm}^3$ . Ceux-ci sont présents le plus souvent dans l'environnement sous forme de traces : mercure, plomb, cadmium, cuivre, arsenic, nickel, zinc, cobalt, manganèse. Les plus toxiques d'entre eux sont le plomb, le cadmium et le nickel (**Veyssyre et al., 2000**). On s'intéresse dans notre travail au nickel, qu'il est présente de nombreuses similitudes chimiques

et physiques avec le Cd et on le trouve dans la nature accompagné du Cd (**Bliefert et Perraud, 2001**).

Le nickel est un composant naturel du sol. On est exposé au nickel en inhalant de la poussière, en consommant des aliments et de l'eau, et en touchant certains objets, comme les pièces de monnaie, les piles rechargeables et les bijoux. C'est un polluant environnemental potentiellement carcinogène (**Poey et Philibert ; 2000**). L'exposition au nickel peut provoquer des effets toxiques sur de nombreux tissus en l'occurrence, les reins, le foie, les poumons, l'hématopoïèse, la reproduction et sur le développement. L'accumulation de ces corps toxique dans l'organisme est susceptible de déclencher une réaction de défense (**Chen et al., 2003; Chiffolleau ; 2001**).

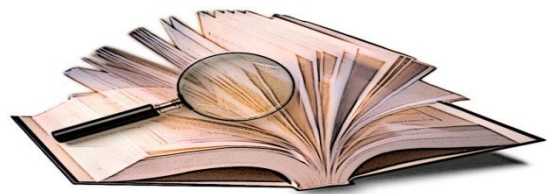
L'objectif principale de cette recherche est d'étudier les effets de CPF, NiCl<sub>2</sub> et leurs mixtures sur un modèle biologique (*Oryctolagus cuniculus*)

Ce travail comporte deux parties importantes :

Étude bibliographique qui présente quelques connaissances sur :

- chlorpyrifos : ses propriétés physicochimiques, sa toxicité du CPF et son mécanisme d'action.
- Le nickel : ses propriétés physicochimiques, sa toxicité du nickel et son mécanisme d'action.

Une partie expérimentale regroupe l'ensemble des résultats obtenus sur l'évaluation de la toxicité (croissance générale), l'étude de quelques paramètres biochimiques et enfin l'exploration du statut antioxydant des quelques bio marqueurs du stress oxydant ainsi que par l'étude subcellulaire (gonflement et perméabilité mitochondriale respiration cellulaire et dosage de quelques enzymes de stress oxydatif du tissu hépatique).



---

# Etude bibliographique

### **I-L'évaluation de risque lié à l'exposition aux xénobiotiques**

#### **I-1- Exposition aux pesticides**

Les pesticides sont utilisés, non seulement dans l'agriculture, mais aussi par divers autres acteurs (industries, collectivités territoriales) ainsi qu'en usage domestique et vétérinaire. Des problèmes de résidus dans les légumes, les fruits, les vins, etc., sont aussi mis en évidence.

L'exposition aux pesticides se caractérise donc par une multiplicité des voies d'exposition, ces substances pouvant pénétrer dans l'organisme par contact cutané, par ingestion et par inhalation. La grande variété des produits rend difficile l'évaluation des expositions des populations, qu'il s'agisse de la population exposée professionnellement (agriculteurs ou manipulateurs), ou de la population générale (**Jakubowski et Trzcinka-Ochocka, 2005**).

##### **I.1.1- 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 sentinelle pour l'observation d'éventuels effets des pesticides. 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**). En général, l'exposition est essentiellement cutanée, à moindre mesure aérienne et secondairement orale (repas, tabac, sur le lieu de travail). L'absorption des pesticides par la peau est révélée comme la voie d'exposition la plus significative en milieu agricole. Par ailleurs, bien que les équipements de protection individuelle (gants, masques, combinaisons) constituent les principales mesures de prévention mises en œuvre afin de réduire l'exposition des professionnels (**Jakubowski et Trzcinka-Ochocka, 2005**).

##### **I.1.2. 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.

### **I.1.3. Exposition de l'enfant**

L'exposition de l'enfant aux pesticides peut avoir lieu très tôt, *in utero* via le placenta suite à l'exposition de la mère (Saunders *et al.*, 2004), mais également après la naissance, soit directement par exposition aux contaminations domestiques (pesticides utilisés dans la maison ou le jardin ou habiter dans une zone agricole) (EEA and WHO, 2002) ou via le lait maternel (WHO, 2004; Jurewicz *et al.*, 2006) et l'alimentation (CEC, 2002; Jurewicz *et al.*, 2006), soit indirectement pour les enfants de parents professionnellement exposés (e.g, agriculteurs). Il est à noter que l'alimentation a été montrée comme une source d'exposition majeure des enfants aux pesticides organophosphorés (Lu *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2008). Quant aux pesticides organochlorés, ils seront essentiellement transmis via le lait maternel (Campoy *et al.*, 2001).

## **I-2-Effet des pesticides sur la santé et sur l'environnement**

### **I-2-1-Effets sur la santé**

L'usage des pesticides a permis des progrès agronomiques, mais il représente également un danger croissant pour la santé des populations. Bien que la connaissance des effets à court terme (toxicité aiguë) soit en progression, les risques à long terme (toxicité chronique) restent difficiles à apprécier. L'essentiel des travaux sur le sujet concerne les populations professionnellement exposées tels que les agriculteurs. Seules des études approfondies concernant généralement des enfants ont été réalisées sur l'exposition domestique. Par ailleurs, les experts spécifient d'emblée que les résultats des études réalisées auprès des populations à exposition professionnelle ne pourraient être extrapolés à la population générale du fait de l'importance et de la périodicité de ces expositions (Manuel, 2007).

#### ***I.2.1.a. Exposition***

L'exposition aux pesticides se caractérise par une multiplicité des voies d'exposition. En effet ces substances peuvent pénétrer dans l'organisme par contact cutané, par ingestion et par inhalation. Les études sur le risque sanitaire associé à l'exposition des populations humaines aux pesticides via l'atmosphère sont peu nombreuses. Les concentrations en pesticide dans l'air sont le plus souvent de l'ordre du ng.m-3, très inférieures aux concentrations exerçant une toxicité aiguë sur les



vertébrés (**Unsworth et al., 1999**). Il existe cependant des données sur la toxicité aiguë des substances actives par inhalation obtenues sur des rongeurs lors des tests de laboratoire. Mais, les effets chroniques à long terme ne sont pas documentés (**Aubertot et al., 2005**).

### ***1.2.1.b. Toxicité aiguë***

La toxicité aiguë est induite par une exposition ponctuelle à une dose importante de pesticide susceptible d'entraîner des effets immédiats ou rapprochés tels que la manipulation des produits non dilués (**ORSB, 2001**). La toxicité aiguë des substances chimiques est évaluée à l'aide de tests réglementaires réalisés sur des animaux de laboratoire. La notion retenue est celle de la dose létale 50 (DL50) correspondant à la quantité de matière active qui, administrée en une seule fois, par ingestion, inhalation ou voie cutanée, entraîne la mort de 50% des animaux traités. Les principales connaissances sur les effets aigus des pesticides chez l'homme sont issues d'observations rapportées en milieu professionnel et des cas d'intoxications documentés par les centres antipoison. L'exposition professionnelle se fait essentiellement par voie cutanée et respiratoire tandis que la voie orale concernerait davantage la population générale par ingestion accidentelle ou intentionnelle de pesticides. D'après le réseau de toxivigilance agricole, les produits les plus souvent incriminés sont par ordre décroissant les insecticides, les fongicides et les herbicides. Les troubles observés concernent les muqueuses et la peau dans 40% des cas. Enfin, les intoxications massives entraînant l'hospitalisation ou les décès qui peuvent être facilement repérées alors que les manifestations biochimiques sont plus difficilement identifiables (**ORSB, 2001**).

### ***1.2.1.c. Toxicité chronique***

La toxicité chronique est induite par une exposition prolongée à de petites quantités des substances incriminées et à leur accumulation dans l'organisme pouvant dépasser le seuil de concentration toxique. L'étude de la toxicité chronique est complexe car de nombreux paramètres sont à considérer. Bien souvent, le décalage entre l'exposition et la découverte d'une anomalie rend délicat l'établissement de la causalité. Cette toxicité est évaluée de façon normalisée par expérimentation sur des animaux de laboratoire. L'ensemble des tests réalisés permettent de fixer la dose journalière admissible (DJA). Les maladies potentiellement liées aux expositions à long terme aux pesticides sont essentiellement étudiées dans les populations professionnellement exposées (**ORSB, 2001**).

### I-2-2-Effets sur l'environnement

Depuis près de cinquante ans, les pesticides ont été mis en évidence dans tous les milieux : dans les eaux des rivières et des nappes phréatiques, dans l'air, dans les eaux de pluie et dans les sols. Les pesticides peuvent avoir des effets directs sur les écosystèmes des zones d'application. Ainsi, la fertilité des sols peut être ébranlée à travers la diminution voire la disparition de certaines populations comme celles des lombrics (**CPP, 2002**). Par ailleurs, les insecticides sont particulièrement nocifs pour les antagonistes des ravageurs cibles. Or, les arthropodes comme les coccinelles permettent souvent de limiter le recours aux insecticides et il a été clairement montré que les pyréthroïdes affectent ces insectes (**Grafton-Cardwell et Gu, 2003**). Le cas des populations d'oiseaux illustre la possibilité d'impacts indirects des pesticides, notamment via la raréfaction de la ressource alimentaire (**Aubertot et al., 2005**).

Des suivis menés dans des exploitations au Danemark sur 31 exploitations conduites en système conventionnel et 31 exploitations conduites en système biologique ont mis en évidence un déclin pour 15 des 35 espèces d'oiseaux communes observées, et ce proportionnellement à la quantité de pesticides utilisés (**Laughling et Mineau, 1995**). Une récente étude a montré que les pesticides peuvent altérer les écosystèmes aquatiques et ce à des niveaux de contamination parfois inférieurs aux seuils de risque déterminés dans des systèmes artificiels (**Schäfer et al., 2007**). Les impacts négatifs peuvent se répercuter tout au long d'une chaîne alimentaire. Ainsi, les propriétés phytotoxiques des pesticides peuvent entraîner la destruction du phytoplancton et briser la chaîne trophique, cette microflore étant essentielle au maintien de la fertilité du milieu (**Downing et al. 2008**). Toutefois, il est parfois délicat d'associer la présence de pesticides dans les milieux aquatiques avec des effets car d'autres facteurs peuvent aussi intervenir dans le déclin de certaines populations comme la modification des caractéristiques physiques des habitats (**Aubertot et al, 2005**). L'atmosphère est un important vecteur de dissémination des produits phytosanitaires. L'exposition via l'air concerne en principe les résidus secs et humides, ces derniers représentant probablement une voie majeure comparativement aux résidus secs (**Unsworth et al., 1999**). Il convient de rappeler ici que les concentrations en pesticides mesurées dans les eaux de pluie peuvent être de l'ordre du  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . En considérant une précipitation de 20 mm d'une pluie à  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ , la quantité redéposée à l'hectare est de 0,2 g de substance (**Unsworth et al., 1999**). À cette dose, des effets directs de ces résidus peuvent se manifester pour les substances les plus toxiques.

Par ailleurs, certains pesticides, particulièrement résistants comme les Polluants Organiques Persistants (POPs), se concentrent dans les régions froides du monde après avoir subi un transport atmosphérique. Ces composés s'accumulent dans l'épaisse couche de graisse indispensable à la survie de la faune autochtone (PNUE, 2005). C'est ainsi que l'on trouve parmi les populations de l'Arctique, les niveaux les plus élevés des POPs enregistrés. Pourtant, elles se trouvent à des milliers de kilomètres des endroits où ces pesticides ont été émis (PNUE, 2005). Van Straalen et Van Gestel (1999) relèvent un manque d'étude sur l'impact des pesticides sur ce type d'écosystèmes dont la vulnérabilité peut être différente de celle des régions proches des zones de traitements habituellement prises en compte dans les procédures d'évaluation du risque. Généralement, il est difficile d'identifier le ou les produits responsables d'effets néfastes et d'en expliquer le mécanisme. La difficulté réside également dans le fait qu'il faille prendre en compte des milliers d'espèces d'êtres vivants réagissant tous différemment à l'exposition au polluant (CPP, 2002). De plus, les effets d'interaction entre les différents composants d'une formulation ou la synergie possible résultant, par exemple, de traitements successifs effectués sur une même parcelle, ne sont pas pris en compte lors de l'homologation des substances actives (Van der Werf, 1996). Quant aux études réalisées, elles visent majoritairement à parer aux effets à court terme, en priorité sur les mammifères, en occultant les effets à plus long terme sur la dynamique des populations environnementales. Finalement, l'ensemble de la communauté scientifique s'accorde sur le danger et la nocivité des pesticides, cependant, les avis divergent quant à l'importance de leurs effets sur la santé et l'environnement (CPP, 2002).

### **I-3- Aspects réglementaires des pesticides**

#### ***I.3.1. Niveau international***

La législation internationale se préoccupe des produits chimiques toxiques incluant les pesticides qui sont devenus préoccupants d'un point de vue sanitaire et environnemental. Ces composés sont connus sous le nom de Polluants Organiques Persistants (POPs) (Protocole d'Aarhus, 1979). Ces polluants sont définis à partir de leur :

- Toxicité élevée,
- Persistance dans l'environnement,
- Bioaccumulation,

· Transport sur de longues distances pouvant entraîner un dépôt éloigné des lieux d'émission,

Au niveau mondial deux textes concernent la gestion des risques liés à ces composés :

- **La Convention de Stockholm**, signée en mai 2001 et entrée en vigueur le 17 mai 2004, dresse une liste de 12 Polluants Organiques Persistants dont neuf pesticides : Aldrine, Chlordane, DDT, Dieldrine, Endrine, Heptachlore, Mirex, Toxaphène et Hexachlorobenzène.

En 2005, deux insecticides (Chlordécone et Lindane) ont été ajoutés à la liste des pesticides de la convention (**PNUE, 2005a et 2005b**).

- **Le Protocole d'Aarhus**, signé en juin 1998 et entré en vigueur le 23 octobre 2003, est relatif aux Pollutions Transfrontalières Longue Distance. Les polluants visés par ce protocole sont les pesticides de la **Convention de Stockholm**, ainsi que les molécules de deux insecticides (Chlordécone et Lindane). L'inscription de l'insecticide Dicofol est en cours d'étude dans le protocole.

À noter que la réglementation européenne a interdit l'utilisation de tous les pesticides cités précédemment (**Règlement européen n°850/2004 du 29 avril 2004**).

### ***1.3.2. Niveau national***

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

En Algérie, ce contrôle a connu une évolution dans le temps, la promulgation de la loi n°87-17 de 01.08.1987 relative à la protection phytosanitaire a permis d'édicter les mesures relatives à la fabrication, l'étiquetage, l'entreposage, la distribution, la commercialisation et l'utilisation des produits phytosanitaires à usage agricole. Au terme de la loi, aucun produit phytosanitaire ne peut être commercialisé, importé ou fabriqué s'il n'a pas fait l'objet d'une homologation (**journal officiel Algérie**).

L'homologation des produits phytosanitaires a été instituée en Algérie par les décrets exécutifs suivants qui fixent les mesures applicables lors de l'importation et l'exportation des produits phytosanitaires à usage agricole :

- N°95-405 de 02 Décembre 1995
- N°10-69 de 31 Janvier 2010.

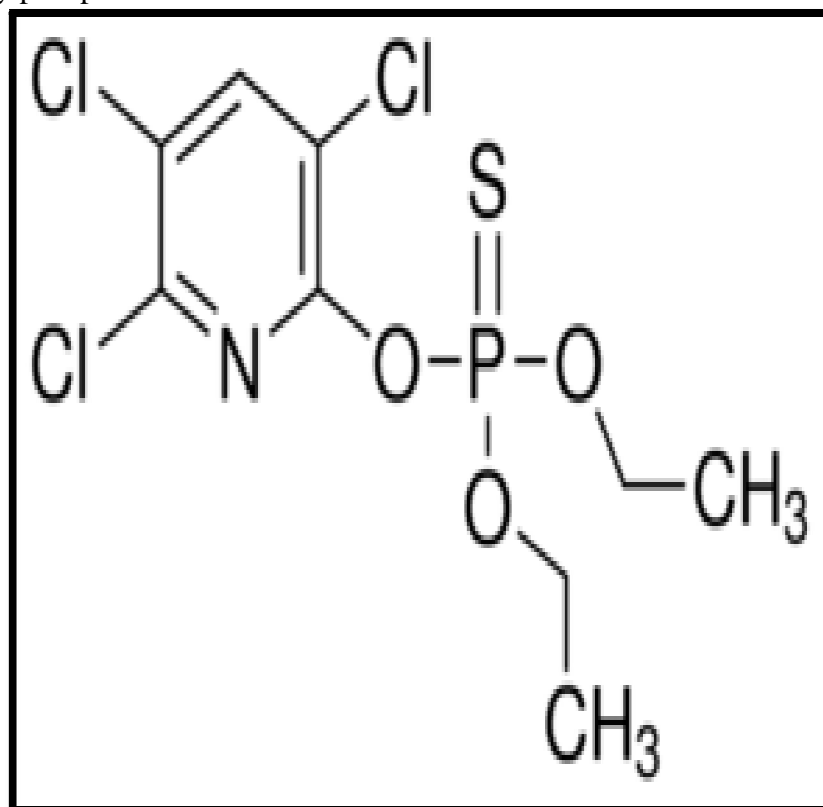
#### I-4- Définition de chlorpyrifos

Le chlorpyrifos a été introduit, en 1965, par la société Dow Chemical. Il est maintenant produit par cette même société, IndiaMedical Corp., Makhteshim-Agan (Israël) et Planter Product, Inc. Le chlorpyrifos entre dans la composition de plus de 30 produits homologués vendus sous diverses marques commerciales comme Dursban, Lorsban, Brodan, Detmol UA, Dowco 179 et Empire. Il est vendu sous forme de concentré émulsifiable, de poudre mouillable, de granules et de préparations microencapsulées (Eisler, 2000)

Le chlorpyrifos ( $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$  ou diethoxy-sulfanylidene-(3,5,6-trichloropyridin-2-yl) oxyphosphure) est un insecticide de la famille chimique des organo-phosphorés. Cette substance se présente sous forme de cristaux blancs et très peu solubles dans l'eau : 2 mg/l (ACTA, 2004).

##### I-4-1- Propriétés physico-chimiques

- ❖ **Formule moléculaire brute** :  $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$
- ❖ **Nom chimique** : (IUPAC) O, O-diéthyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridylphosphorothioate

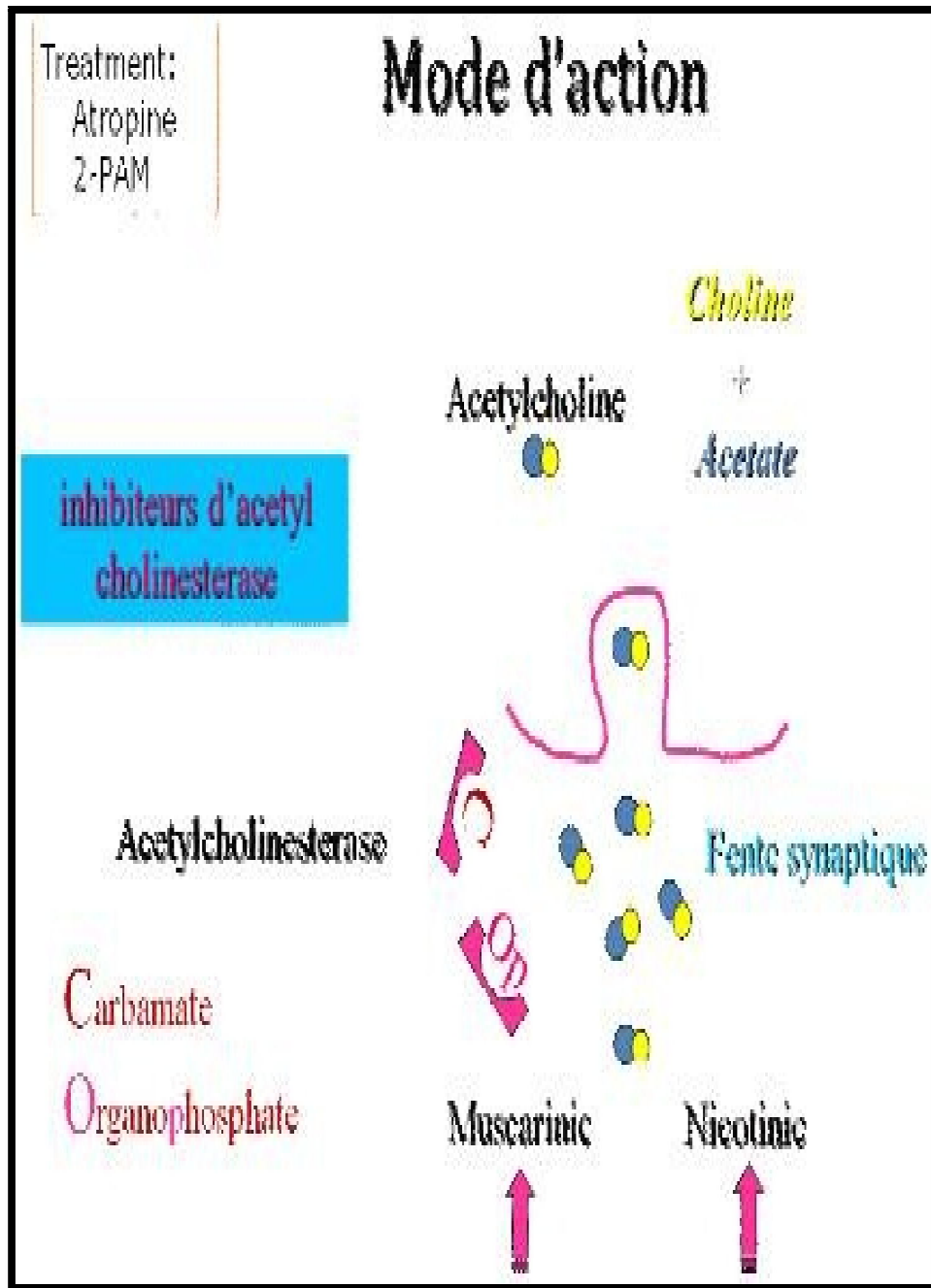


**Figure01** : Structure chimique du chlorpyrifos (Slotkin,2007)

- ❖ **Masse moléculaire** : 350,59.
- ❖ **Solubilité dans l'eau** : 0,002 g/l à 20 °C.
- ❖ **Point de fusion** : 41,5 °C.
- ❖ **La pression de vapeur du CPF** :  $2,49 \times 10^{-3}$  Pa à 25°C.
- ❖ **Logarithme de son coefficient de partage octanol-eau** : 4,82 à 5,11 (Élevé) (Howard *et al.*, 1995).

### I-4-2- Mécanisme d'action

Le mécanisme primaire de la toxicité des pesticides organophosphorés, tel le chlorpyrifos, est l'inhibition de la cholinestérase (ChE). L'inhibition de l'enzyme acétylcholinestérase (AChE) se traduit par une accumulation d'acétylcholine (ACh) au niveau des récepteurs de la choline, ce qui entraîne une stimulation nerveuse continue (Giesy *et al.*, 1999). Le chlorpyrifos est un inhibiteur de l'AChE assez faible comparé à son métabolite de type oxon (El-Merhibi *et al.*, 2004). La toxicité provient donc de la formation de chlorpyrifos-oxon par désulfuration oxydative (Giesy *et al.*, 1999 ; Eisler, 2000). Les facteurs qui influent sur la toxicité du chlorpyrifos d'une espèce et d'un groupe à l'autre comprennent le taux métabolique, le nombre de cibles disponibles pour le métabolisme du chlorpyrifos en chlorpyrifos-oxon (Chambers et Carr, 1995) la surface de l'organisme et son stade de vie (El-Merhibi *et al.*, 2004).



**Figure 02** : Inhibition des cholinestérases par les organophosphorés (Bismuth, 1993).

### I-4-3- Toxicité et devenir dans l'environnement

Après son application, le chlorpyrifos se retrouve à la fois dans les compartiments atmosphérique (Peck *et al.*, 2005 ; Hageman *et al.*, 2006 ; Yao *et al.*, 2008 ; Zhou *et al.*, 2010), aquatique (IFEN, 2002 ; Coupe et Blomquist, 2004) et dans les sols. Dans le sol, le chlorpyrifos se dégrade lentement, avec un temps de demi-vie estimée à 35 jours. Les pesticides organochlorés subissent une dégradation naturelle dans l'environnement, accentuée par la lumière et par la présence de métaux dissous, de substances humiques et de microorganismes (Dannenberg et Pehkonen, 1998 ; Pehkonen et Zhang, 2002 ; Kralj *et al.*, 2007 ; Theriot et Grunden, 2011) et, le produit d'oxydation du chlorpyrifos, le chlorpyrifos-oxon s'avère également être un puissant inhibiteur de l'acétylcholine estérase (Buchwalter *et al.*, 2004 ; Čolović *et al.*, 2011).

L'utilisation extensive des insecticides organochlorés dont le chlorpyrifos se traduit par une pollution environnementale et les organismes non-cibles en sont devenus victimes, en raison d'une pénétration dans l'organisme par inhalation, absorption cutanée via le contact avec l'eau et par empoisonnement secondaire (alimentation) (Griffin *et al.*, 1999 & 2000 ; Meuling *et al.*, 2005 ; Farahat *et al.*, 2010).

Chez les mammifères, ces insecticides inhibent non seulement l'acétylcholine estérase mais affectent également le système immunitaire, le pancréas, le foie, les systèmes hématologique et reproducteur (Thrasher *et al.*, 1993 ; Dam *et al.*, 1998 & 1999 ; Gomes *et al.*, 1999 ; Nandi *et al.*, 2011). En outre, le chlorpyrifos est génotoxique (Muscarella *et al.*, 1984 ; Jamil *et al.*, 2004 ; Sandal et Yilmaz, 2011) et il induit la formation d'espèces réactives de l'oxygène, générant un stress oxydatif dans différents tissus (Verma *et al.*, 2007 ; Mehta *et al.*, 2009 ; Lukaszewicz-Hussain, 2010 ; Demir *et al.*, 2011 ; Foxenberg *et al.*, 2011).

Les organismes aquatiques se révèlent particulièrement sensibles à l'action du chlorpyrifos. De nombreux travaux ont montré la toxicité de cet insecticide vis-à-vis du zooplancton dulçaquicole, (Hurlbert *et al.*, 1972 ; Papst et Boyer, 1980 ; Brock *et al.*, 1992) ,avec dans la plupart des cas une augmentation de la population phytoplanctonique : ces effets engendrent donc une modification de la structure des communautés. La toxicité du chlorpyrifos a également été rapportée pour des poissons



tels que *Aphaniusfasciatus* (Boumaiza *et al.*, 1979), *Tilapia Guineensis* (Chinah *et al.*, 2004), *Oreochomisniloticus* (Gul, 2005 ; Oruç, 2010), avec une perturbation du métabolisme de différents organes montrée chez *Heteropneustesfossilis* (Tripathi *et Shasmal*, 2011). En outre, dans un travail récent, Oruç (2010) met en évidence, que le chlorpyrifos, outre un stress oxydatif, agit comme un perturbateur endocrinien chez *Oreochomisniloticus* et tératogène chez *Xen Opuslaevis* (Bonfanti *et al.*, 2004).

### I-5- Exposition aux métaux lourds

#### I-5-1- Rappels généraux sur les métaux lourds

A la différence de la plupart des contaminants organiques, Les métaux lourds sont définis comme étant les éléments métalliques ayant une densité supérieure à 5 g/cm<sup>3</sup> : cadmium, mercure, plomb, cuivre, nickel, zinc, cobalt, manganèse, chrome... Ceux-ci sont présents le plus souvent dans l'environnement sous forme de traces. Ces éléments sont présents naturellement dans la croûte terrestre et dans tout organisme vivant, à des concentrations variables suivant les milieux et les organismes.

Dans la croûte terrestre, les métaux lourds sont présents sous forme de minerai, d'où ils peuvent être mobilisés par des phénomènes naturels comme l'érosion ou les éruptions volcaniques, mais également par des activités anthropiques. Ces dernières, sont dues aux rejets physiques liés aux activités métallurgiques et minières et aux rejets de produits en fin de vie tels que les piles et batteries. Les émissions atmosphériques constituent également une source importante de pollution par les métaux lourds. Alors que de nombreuses molécules organiques peuvent être dégradées, les métaux lourds ne le peuvent pas et leur concentration augmente régulièrement dans les sols et les eaux.

L'exposition excessive aux métaux lourds peut conduire à des effets très néfastes sur la santé humaine. Or les produits végétaux sont à la base de la chaîne alimentaire donc ils contribuent à l'imprégnation de l'homme par ces métaux lourds (Zorrig W, 2010).

### I-5-2- Exposition

Les hommes sont exposés par inhalation des polluants aériens, la consommation d'eau contaminée, l'exposition à des sols contaminés de déchets industriels.

Les métaux peuvent être absorbés sous la forme inorganique ou sous la forme organique. Pour certains éléments, comme l'arsenic et le cuivre, la forme inorganique est la plus toxique. Pour d'autres, comme Hg, Sn et Pb, les formes organiques sont les plus toxiques. La quantité de métaux absorbée par un homme influe directement sur sa santé. Elle peut présenter une toxicité aiguë (pic de pollution dans l'air ou l'eau), ou une toxicité due à un effet cumulatif (par une exposition continue au milieu pollué ou parce que l'homme est en bout de chaîne alimentaire). Les métaux lourds s'accumulent dans les organismes vivants et perturbent les équilibres et mécanismes biologiques, provoquant des effets toxiques. Ils peuvent affecter le système nerveux, les fonctions rénales, hépatiques, respiratoires, ...ect (**Ramade, 1979**).

### I-5-3- Effets sur la santé

En fait, le risque sur la santé humaine est d'abord associé aux propriétés des métaux lourds à polluer les eaux, l'atmosphère, les aliments et les sols. Et dépend également de l'état chimique de leur forme chimique, de leur concentration, du contexte environnemental, de la possibilité de passage dans la chaîne du vivant.

Quelques métaux lourds, comme Zn, Cu, Mn et Fe, sont indispensables à la croissance et au bien-être des organismes vivants. On peut néanmoins s'attendre à ce qu'ils aient des effets toxiques quand les organismes sont exposés à des niveaux de concentration supérieurs à ceux qu'ils requièrent normalement. D'autres éléments, comme Pb, Hg et Cd, ne sont pas indispensables aux activités métaboliques et manifestent des propriétés toxiques.

Les effets toxicologiques en matière de santé publique pour le cadmium, le mercure et le plomb ont été largement mis en évidence par des travaux antérieurs. En effet, la toxicité du plomb vis-à-vis du système nerveux et des reins a été soulignée en 1999 (**Roony et al., 1999**). Le saturnisme a été la première maladie professionnelle reconnue (**Derache, 1989**). La toxicité du cadmium résulte principalement de l'inhibition des enzymes thiols ainsi que de son affinité pour les hydroxydes et les carboxyles.

Il est également l'agent étiologique de la maladie qui se manifeste par des troubles osseux et l'augmentation du taux de phosphatase alcaline (**Nomiyama, 1973 ; Purves, 1977**). L'exposition chronique à de faibles doses en cadmium provoque des dommages aux tubules rénaux, suivis de protéinurie, lésions pulmonaires, hypertension artérielle (**Bertouille, 1978**). La transformation du mercure en un dérivé alkylé, le méthyl mercure, a été à l'origine de la catastrophe écologique de la baie de Minamata (**Ui et Kitamura, 1971**); la contamination par le mercure peut causer des pharyngites, des gastroentérites, des néphrites, des troubles de la circulation ou des dépôts au niveau des neurones.

La toxicité du nickel se manifeste plutôt lorsqu'il est administré par injection ou lorsqu'il est inhalé. Le carbonyle du nickel est le seul composé reconnu pour être systématiquement toxique vis à vis de l'homme. De nombreux cas d'empoisonnement par ce produit ayant été répertoriés chez les ouvriers de l'industrie du nickel. Les principales lésions sont une hémorragie et un œdème pulmonaire ainsi qu'une hémorragie cérébrale.

Le carbonyle de nickel d'autre part est reconnu comme étant un élément carcinogène touchant principalement les voies respiratoires (poumons, cavité nasale). Les normes européennes pour le nickel dans l'eau de consommation est fixée à 0,05 mg/L selon la directive du conseil des communautés européennes du 16 juin 1975 (**Belabed, 2010**).

### **I-5-4- Devenir des métaux lourds dans l'environnement**

#### ***1.5.4.a. Contamination des sols***

Tous les sols contiennent naturellement des éléments traces métalliques. On parle de contamination d'un sol lorsque sa teneur en élément trace est supérieure à la concentration naturelle, mais sans influence sur la qualité du sol. La concentration naturelle de l'élément trace dans le sol résulte de son évolution à partir de la roche initiale. On parle de pollution des sols par un élément trace lorsque l'élément trace est présent à une dose constituant une menace pour l'activité biologique ou les fonctions du sol. Les contaminations diffuses, qui affectent les niveaux superficiels des sols, résultent de phénomènes naturels tels que les retombées atmosphériques d'aérosols d'origine volcanique, ou d'actions anthropiques intentionnelles ou non : poussières et dépôts atmosphériques, fertilisants minéraux (cuivre contenu dans les phosphates), pesticides, lisiers et fumiers, boues de stations d'épuration, activités minières, déchets industriels (bâtiments) ou urbains, transports... etc (**Schuhmacher, 1995**).

### *1.5.4.b. Contamination de l'air*

Les métaux lourds se dispersent dans les hautes couches de l'atmosphère et retombent ailleurs, après un transport sur de très longues distances. On estime qu'une particule de mercure dans l'atmosphère reste un an dans celui-ci, avant de retomber.

Les métaux lourds dans l'air peuvent se trouver principalement sous deux formes :

- Soit sous forme gazeuse pour certains composés métalliques volatiles ou dont la pression de vapeur saturante est élevée ;
- Soit sous forme de composés métalliques solides, déposés sur les très fines particules ou poussières formées lors des phénomènes de combustion.

Les principales sources de métaux dans l'air sont des sources fixes.

Les métaux lourds sont transportés par des particules atmosphériques provenant de combustions à haute température, de fusions métallurgiques, véhicules. Les effets biologiques, physiques et chimiques de ces particules sont fonction de la taille des particules, de leur concentration et de leur composition, le paramètre le plus effectif sur l'environnement étant la taille de ces particules.

Dans l'air ambiant, on trouve de nombreux éléments, comme le plomb, le cadmium, le zinc, le cuivre, etc., dont la concentration est d'autant plus élevée que les particules sont fines (**Veeresh, 2003**).

### *1.5.4.c. Contamination de l'eau*

Les métaux présents dans l'eau peuvent exister sous forme de complexes, de particules ou en solutions.

Les principaux processus qui gouvernent la distribution et la répartition des métaux lourds sont la dilution, la dispersion, la sédimentation et l'adsorption/désorption.

Certains processus chimiques peuvent néanmoins intervenir également. C'est ainsi que la spéciation selon les diverses formes solubles est régie par les constantes d'instabilité des différents complexes, et par les propriétés physico-chimiques de l'eau (pH, ions dissous, et température).

Les métaux lourds subissent de nombreuses transformations : réduction par processus biochimique, méthylation, déméthylation et oxydation d'espèces de métaux isolées.

Des réactions redox peuvent aussi faciliter certaines transformations. Les processus biochimiques sont effectués par des micro-organismes et par des algues (**Gaujous, 1993**)

Les principales sources de contamination de l'eau sont les suivantes :

- Les eaux usées domestiques et industrielles
- La production agricole
- Les polluants atmosphériques
- Les anciennes décharges

### **I-5-5-Normes et réglementation**

Les normes sont des valeurs limites fixées par la loi et établies en vertu de compromis entre demandes concurrentes. L'établissement de normes des métaux lourds présente un intérêt particulier.

Ceci s'explique par le fait que leurs effets sur l'homme et l'environnement ne cessent d'être mis en lumière, voire prouvés pour certains.

Pour ce qui concerne la qualité des eaux, il existe deux types de normes : les normes de qualité des eaux, qui définissent les caractéristiques que doit présenter une masse d'eau selon son utilisation principale, et les normes concernant les effluents, qui fixent les charges polluantes limites qui peuvent être rejetées ponctuellement dans les eaux réceptrices (WHO. 2004).

**Tableau 01 : Normes des métaux lourds (WHO. 2004)**

<b>Composé toxique</b>	<b>Concentration Maximum</b>	<b>Rejets industriels</b>
<b>Mercure</b>	1 µg/l	-
<b>Argent</b>	10 µg/l	-
<b>Plomb</b>	50 µg/l	0.5 mg/l si rejet > 5 g/j
<b>Nickel</b>	50 µg/l	0.5 mg/l si rejet > 5 g/j
<b>Cuivre</b>	50 µg/l	0.5 mg/l si rejet > 5 g/j
<b>Zinc</b>	5 mg/l	2 mg/l si rejet > 20 g/j
<b>Arsenic</b>	50 µg/l	-

### I-6-Définition du Nickel

Le nickel est un métal lourd, blanc argenté et l'un des micronutriments essentiels pour la croissance et le développement des plantes et il est également un oligo-élément essentiel pour l'organisme, dont les carences sont graves. La dose quotidienne de nickel ingéré se situe idéalement entre 100 et 300 µg/jour, mais peut varier de 100 à 800 µg selon les habitudes alimentaires. C'est un allergène puissant, ubiquitaire et un carcinogène prouvé (**Stoltz *et al.*, 2003**).

#### I-6-1- Propriétés physiques

Le nickel peut se présenter sous la forme massive d'un métal blanc-bleuâtre, brillant, malléable et ductile ou sous la forme d'une poudre grise. C'est un bon conducteur électrique et thermique, doué de propriétés magnétiques. Il possède aussi la propriété de fixer les gaz et notamment l'hydrogène (**Robert, 1988**).

#### I-6-2-Propriétés chimiques

À température ordinaire, le nickel n'est pratiquement pas attaqué par l'oxygène ; à chaud, il se recouvre d'une pellicule de monoxyde de nickel, seul produit de la réaction entre 300 et 700°C. Le nickel en poudre obtenu par réduction de l'oxyde par l'hydrogène entre 250 et 350°C est pyrophorique ; le produit obtenu à 450°C s'oxyde à l'air à 50°C avec explosion. À froid et en absence d'humidité, le métal résiste bien aux halogènes ; en présence d'eau, il est attaqué en surface avec formation d'halogénures ; à chaud, les halogènes réagissent sans incandescence. Dans un courant d'oxyde de carbone, le nickel se volatilise entre 45 et 70°C pour donner du nickel carbonyle, réaction utilisée pour l'affinage du métal (**Bonnard *et al.*, 2009**).

**Tableau 02: Propriétés physiques et chimiques du nickel (Cotton et Wilkinson, 1988).**

<b>Symbole chimique</b>	Ni
<b>Numéro atomique</b>	28
<b>Masse atomique</b>	58,71
<b>Structure cristalline</b>	Cubique à face centrée (a=0,352 nm)
<b>Densité (à 20°C)</b>	8,902 g/cm <sup>3</sup>
<b>Température de fusion</b>	1452°C
<b>Température d'ébullition</b>	2732°C
<b>Résistivité électrique à 20°C</b>	6,9 μohm.cm
<b>Conductibilité thermique à 0-100°C</b>	90,9 W/ (m.K)
<b>Configuration électronique</b>	[2, 8, 8] 3d <sup>8</sup> 4s <sup>2</sup>
<b>Isotopes</b>	56 à 66

### **I-6-3- Utilisations**

Le nickel est utilisé dans la production d'aciers inoxydables et d'aciers spéciaux. Les autres formes d'utilisation sont les traitements de surfaces (10%), les batteries nickel cadmium et les catalyseurs nickel-aluminium (**Caplat, 2001**).

Ainsi, le nickel est utilisé pour la fabrication de plus de 300000 produits repartis entre les secteurs industriels, militaires, des transports, de la marine, de l'architecture et des produits destinés au public (**Caplat, 2001**).

Selon **Chiffolleau (2001)** le principal secteur d'utilisation du nickel correspond aux aciers inoxydables (62%). Il entre également dans la composition de nombreux alliages en raison de ses caractéristiques de dureté et de résistance à la corrosion (12%).

### I-6-4-Sources d'exposition

Le nickel est une substance que l'on retrouve dans le milieu naturel, essentiellement dans les minerais sulfurés extraits des sous-sols et dans les minéraux silicates se trouvant en surface. Dans l'environnement, le nickel est surtout combiné à l'oxygène (oxydes) et au soufre (sulfures). La croûte terrestre contient environ 0,009 % de nickel. De plus, le nickel est présent dans l'air, dans les particules en suspension, après avoir été rejeté par des activités humaines ou des phénomènes naturels, comme les éruptions volcaniques, les incendies de forêts et les météorites provenant de la haute atmosphère (**Brun, 1979; Echevarria et al., 2006**).

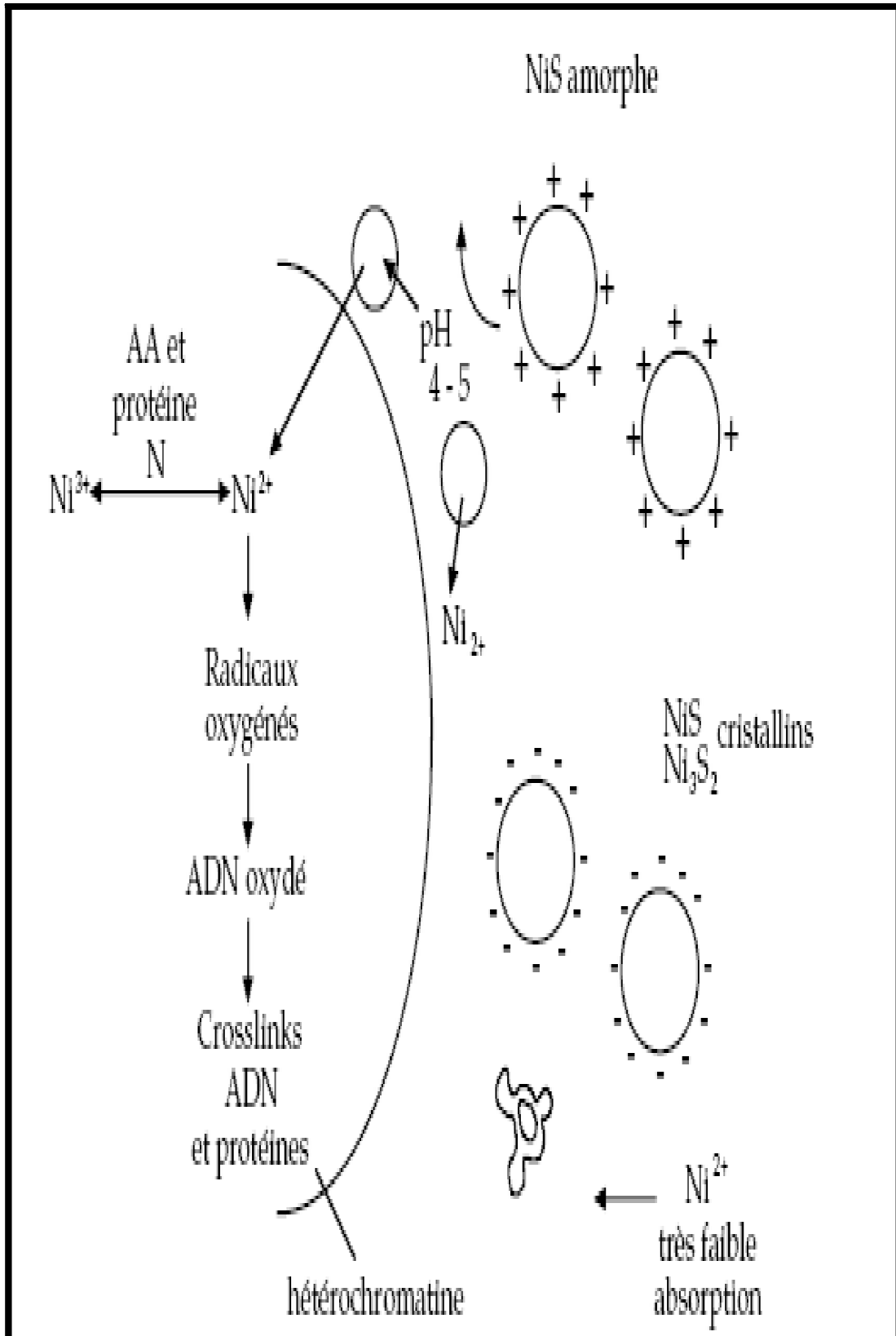
La présence de nickel dans la nourriture est due à deux facteurs principaux : l'absorption par les plantes et la contamination secondaire des aliments par l'utilisation d'ustensiles en acier inoxydable, pour leur préparation, cuisson, conservation, transformation et ce d'autant plus que ces derniers sont plus acides (**Schollhammer et al., 1994**).

### I-6-5-Mécanisme d'action du Nickel

Une fois entré dans la cellule, les effets du nickel dépendent de sa solubilisation et des doses présentes d'ions  $\text{Ni}^{2+}$  (**Hansen et Stern, 1984**). La capacité de captage par les cellules est directement corrélée à la capacité des dérivés du nickel à élever les taux intracellulaires. Les structures cristallines de NiS sont accumulées dans les vacuoles cytoplasmiques en périphérie du noyau où il se produit une acidification progressive avec dissolution puis relargage de  $\text{Ni}^{2+}$  à la périphérie du noyau où ont lieu des interactions préférentielles avec les régions hétéros chromatiques, Il se forme alors des complexes ADN- protéines et des cassures de brins (**Snow et costa, 1998**).

Une autre interaction est l'inhibition de la transcription des gènes suppresseurs de tumeurs consécutive à la méthylation de l'ADN et aux modifications structurales de la chromatine (**Lee et al., 1995**).





**Figure 03** : Mécanisme de phagocytose sélective et de dissolution plasmatique des ions  $Ni^{2+}$  au noyau et réactifs lors de leur entrée dans le noyau (Snow et Costa, 1998)

### I-6-6-Toxicité du Nickel

#### *I.6.6.a.Toxicité aiguë*

L'intoxication aiguë accidentelle par voie orale provoque essentiellement des troubles digestifs (nausées, vomissements, diarrhée, douleurs abdominales), des céphalées et une asthénie associée parfois à une bradycardie et à une légère hypothermie, ces signes cèdent souvent assez rapidement mais dans certains cas peuvent persister quelques jours.

Après l'inhalation d'une concentration estimée à plusieurs centaines de  $\text{mg/m}^3$  pendant une heure et demie, un salarié a présenté une détresse respiratoire sévère qui s'est avérée mortelle au bout de 13 jours. Plusieurs intoxications anciennes liées à l'inhalation de poussières de nickel sont rapportées, dont certaines mortelles. L'absorption cutanée est faible et aucun effet général n'est noté par cette voie, les contacts oculaires n'induisent pas de lésions notables en dehors d'un effet mécanique habituel aux poussières, le nickel et ses oxydes ne sont pas irritants pour la peau saine (**Bonnard et al, 2009**).

#### *I.6.6.b.Toxicité chronique*

Le nickel est connu depuis longtemps comme l'allergène le plus courant pour la peau. Une étude de 1979 indique que la prévalence de la sensibilisation au nickel dans la population générale est élevée, 9% chez la femme et 1% environ chez l'homme.

La sensibilisation est le plus souvent due au contact journalier avec des objets usuels (bijoux, boutons, pièces de monnaie, ustensiles divers...). 20% des allergies seraient liées à la seule exposition professionnelle. 40 à 50% des personnes sensibilisées au nickel développent, par contact répété avec le métal et ses composés, des dermatoses eczématiformes récidivantes (**Cavelier et Fousereau, 1996**).

L'inhalation de sels de nickel a provoqué des cas d'asthme, associés ou non à des rhinites et des urticaires, ces pathologies surviennent parfois chez des sujets présentant un eczéma. Les expositions au nickel ou ses oxydes sont rarement en cause ; on retrouve ces réactions dans le traitement de surface par nickelage électrolytique. Les crises, pouvant apparaître dans les minutes qui suivent l'exposition ou bien après plusieurs heures, n'ont pas de caractéristiques particulières, dans certaines opérations il faut noter l'exposition à d'autres allergènes respiratoires comme le chrome ou le cobalt. Les effets chroniques respiratoires du nickel ont été largement étudiés,

certaines études indiquent un excès de bronchites chroniques ou de perturbations des fonctions respiratoires (**Dupas, 2008**).



---

## Matériel et méthodes

## II- Matériel et méthodes

### II-1- Matériel

#### II-1-1- Matériel biologique

Pour notre expérimentation, nous avons choisi de travailler sur les lapins mâles de l'espèce (*Oryctolagus cuniculus*)

#### Revue bibliographique sur le modèle biologique

##### ❖ Classification du lapin

Le nom scientifique du lapin européen, *Oryctolagus cuniculus*, a été donné par Linnéen 1758. Ce petit mammifère placentaire fait partie de la sous-famille des Léporinés, qui comprend aussi les lièvres, et de la famille des Léporidés incluse dans l'ordre des lagomorphes, comme les pikas.

**Tableau 03** : Classification du lapin domestique (animaux.org/lapin-domestique).

<b>Règne</b>	<b>Animalia</b>
<b>Phylum</b>	Chordata
<b>Sous- phylum</b>	Vertebrata
<b>Super-classe</b>	Gnathostomata
<b>Super-Classe</b>	Tetrapoda
<b>Classe</b>	Mammalia Linnaeus, 1758
<b>Sous-Classe</b>	Theria
<b>Infra-classe</b>	Eutheria
<b>Ordre</b>	Lagomorpha
<b>Famille</b>	Leporidae
<b>Genre</b>	Oryctolagus
<b>Espèce</b>	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (Linnaeus, 1758)

### ❖ Rôle du lapin dans la recherche scientifique

Depuis la fin des années 1930, le lapin est souvent utilisé pour les tests de la toxicité et de la sécurité en recherche et dans l'industrie pharmaceutique, pour plusieurs raisons. Le lapin est un animal robuste avec une période de gestation courte. Comme il a été déjà mentionné, sa petite taille rend son élevage possible dans un espace restreint et minimise la quantité de réactif à tester mais en même temps il est assez grand pour pouvoir visualiser les premières irritations et observer les fœtus. Le lapin est hypersensible aux agents tératogènes et sa réponse à ces agents est très semblable à celle de l'homme contrairement à la souris (**Henck *et al.*, 1994**).

Le lapin a aussi été très utilisé pour étudier la physiopathologie et l'immunologie d'un grand nombre des maladies infectieuses d'origine virale [encéphalites provoquées par le virus Herpès Simplex (VHS) (**Weissenbock *et al.*, 1997**) ; virus de l'immunodéficience humaine (VIH) avec des lapins transgéniques exprimant la protéine CD4 humaine (Speck *et al.*, 1999), bactériologique [pour isoler des bactéries ne se multipliant pas sur milieu artificiel et tester les doses d'antibiotiques nécessaires, comme pour *Treponema pallidum*, responsable de la syphilis, ainsi que pour différents modèles d'infection du tractus digestif] ou mycosique (**Fox, 1994**).

### II-1-2- Produits chimique

Dans ce travail nous avons utilisé deux molécules le nickel comme métal lourd et le chlorpyrifos comme pesticide

- Le chlorure de nickel est nommé aussi dichlorure de nickel est un sel de nickel solide poudreux ou en cristaux, vert, inodore, la forme hexa hydratée ( $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) celle qui est utilisée dans notre étude (le  $\text{NiCl}_2$  est dilué dans l'eau sous forme solvant)
- Le chlorpyrifos-éthyl (CAS no 2921-88-2) a été utilisé sous sa formulation commerciale Dursban 4® (480 g/L) (Dow AgroSciences)

### II-2- Méthode

#### II-2-1- Description et élevage

Afin de réaliser notre expérience, nous avons manipulé sur 35 lapins de l'espèce *Oryctolagus cuniculus*. Tous les lapins étaient des mâles pesants entre 1.5Kg et 1.8Kg et possèdent une fourrure douce de couleur brun rousse, noire, blanc et gris. Ils ont logé individuellement dans des cages en métal. Ces lapins ont été divisés en 6 lots de 5 individus et nous avons gardé 5 lapins comme témoin. Les traitements n'ont commencé qu'après 15 jours de la date d'achat afin de permettre l'adaptation des lapins à leur nouvel environnement. L'alimentation des lapins était à base des salades et grande Mauve (*Malva sylvestris*) avec l'eau de robinet.

#### II-2-2- Lotissement et traitement

**II-2-2-1- Lotissement** : les 35 lapins ont été divisés en 07 lots de 05 lapin chacun :

- ❖ **Lots n°1** : contient 05 lapins comme témoins ne subit aucun traitement
- ❖ **Lots n°2** : contient 05 lapins traités par NiCl<sub>2</sub> en raison de 250ppm par voie orale pendant 90 jours
- ❖ **Lots n°03** : contient 05 lapins traités par NiCl<sub>2</sub> en raison de 500ppm par voie orale pendant 90 jours
- ❖ **Lots n°04** : contient 05 lapins traités par CPF en raison de 375ppm par voie orale pendant 90 jours
- ❖ **Lots n°05** : contient 05 lapins traités par CPF en raison de 750ppm par voie orale pendant 90 jours
- ❖ **Lots n°06** : contient 05 lapins traités par NiCl<sub>2</sub>/CPF en raison de 250ppm/375ppm par voie orale pendant 90 jours
- ❖ **Lots n°07** : contient 05 lapins traités par NiCl<sub>2</sub>/CPF en raison de 500ppm/750ppm par voie orale pendant 90 jours

#### II-2-3- Sacrifices et prélèvements d'organes

##### II-2-3-1- Prélèvement sanguin

Après 90 jours de traitement les 7 lots ont été sacrifiés le sang est immédiatement recueilli dans des tubes secs, ce dernier est centrifugé à 3000

tours/min pendant 10 minutes, le sérum obtenus ont été stockés au congélateur à – 20°C jusqu'à l'analyse.

### II-2-3-2- Prélèvement des organes

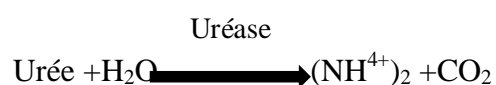
Après le sacrifice des animaux, le foie et le cerveau ont été rapidement prélevés et rincés dans une solution de chlorure de sodium (NaCl) a 0.9% puis pesé et conservé pour les dosages des différents paramètres.

### II-2-4- Méthode de dosage des paramètres biochimiques sanguin

#### II-2-4-1- Urée

Le dosage est réalisé sur le sérum par la méthode colorimétrique utilisant l'uréase selon la fiche technique Spinréact.

L'uréase hydrolyse l'urée en ammoniacque ( $\text{NH}_4^+$ ) et le dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ). Les ions  $\text{NH}_4^+$  réagissent avec le salicylate et l'hypochlorite ( $\text{NaClO}$ ), en présence de nitroprusside pour former l'indophénol de couleur verte (Kaplan, 1984), selon les réactions



Dans un tube sec 10µl d'échantillon sont additionnés à 1ml de réactif 1 [ uréase 30000 U/L dissoute dans un tampon phosphate pH=6.7 : 50mmol/l contenant (EDTA : 2mmol/l, salicylate de sodium : 400mmol/l, nitroprusside de sodium : 10mmol/l) ], agitation, incubation à 37°C pendant 5 minutes , ensuite 1ml de réactif 2 (hypochlorite de sodium : 140mmol/l,hydroxyde de sodium : 150 mmol/l) est ajouté au mélange, , agitation, incubation à 37°C pendant 5 minutes, lecture contre un blanc réactif à 580 nm avec utilisation d'un étalon.

$$[\text{Urée}](\text{mg/dl}) = \frac{(\text{A}) \text{ Échantillon}}{(\text{A}) \text{ Étalon}} \times 50 \text{ (concentration de l'étalon)}$$



### II-2-4-2- Créatinine

Ce dosage est basé sur la réaction de la créatinine avec l'acide picrique en milieu alcalin (NaOH) pour donner un composé coloré en jaune selon la réaction de Jaffé (**Murray, 1984**) et la fiche technique Spinreact

100 µl d'échantillon (sérum) sont ajoutés à 1ml de réactif de travail [V/V : R1 : 17.5 mmol/l d'acide picrique + R2 : 0.29 mmol/l d'hydroxyde de sodium], agitation, lecture de l'absorbance (A1) après 30 secondes et après 90 secondes (A2), à une longueur d'onde 492 nm.  $\Delta A = A2 - A1$

$$[\text{Créatinine}] (\text{mg/dl}) = \frac{\Delta A \text{ échantillon}}{\Delta A \text{ étalon}} \times 2 (\text{concentration de l'étalon})$$

### II-2-4-3-Bilirubine Totale et Directe

La bilirubine réagit avec l'acide sulfaniliquediazoté à pH acide pour produire l'azobilirubine.

Cette réaction est instantanée avec la bilirubine directe (la bilirubine conjuguée), par contre avec la bilirubine totale (bilirubine non conjuguée) elle est indirecte nécessite la solubilisation par le diméthylsulfoxyde (DMSO). (En absence de DMSO, seule la bilirubine directe réagit). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de la bilirubine dans l'échantillon (**Malloy et al., 1937 ; Kaplan et al., 1984**), selon la fiche technique Spinreact.

R1(BD) : 30mmol/l d'acide sulfanilique + 150 mmol/l d'acide hydrochlorique. R2 (BT) : 30mmol/l d'acide sulfanilique + 150 mmol/l d'acide hydrochlorique + 7mmol/l DMSO. R3 : 29 mmol/l de nitrite de sodium.

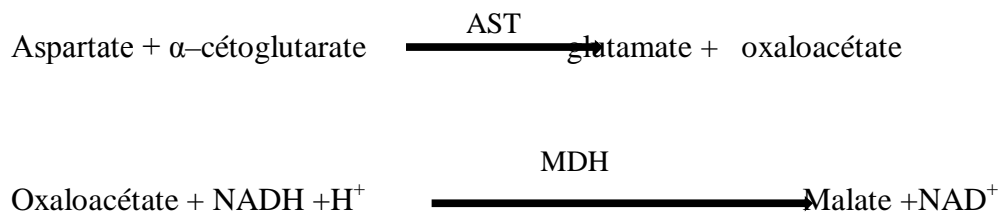
Pour les deux dosages la réaction se fait en présence d'un blanc échantillon contenant le réactif de travail (R1 ou R2) avec 100 µl d'échantillon. Alors que le tube essai contient en plus de réactif 1 ou 2 et échantillon (sérum) le R3 (50µl). Agitation, incubation pendant 05min à Température ambiante, lecture à une longueur d'onde  $\lambda = 555\text{nm}$ .

$$[\text{Bilirubine}](\text{mg/dl}) = \frac{(\text{A}) \text{ échantillon} - (\text{A}) \text{ blanc échantillon}}{(\text{A}) \text{ étalon} - (\text{A}) \text{ blanc étalon}} \times [\text{étalon}]$$

**Facteur de conversion :** mg/dl x 17.1 = μmol/L

#### II-2-4-4- Aspartate aminotransférase (AST)

Méthode cinétique de dosage des transaminases sériques selon la fiche technique Spinreact. L'aspartate aminotransférase (AST) appelée aussi Transaminase glutamate oxaloacétate (TGO) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'aspartate au α-cétoglutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate est réduit au malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH, H<sup>+</sup> (Murray, 1984):



Dans un tube sec 100μl d'échantillon (sérum) sont additionnés à 1ml de réactif de travail [R2 (NADH : 0.18mmol/lactate déshydrogénase :800 U/L, Malate déshydrogénase(MDH) : 600 U/L, α cétoglutarate : 12mmol/l) dissout dans le tampon ; R1(TRIS pH7.8 : 80 mmol/l, L- Aspartate : 200 mmol/l)], agitation, incubation pendant 01 minutes. Lecture de l'absorbance (A) à λ=340 nm chaque minute pendant 03 minutes

$$\Delta A/\text{min} \times 1750 = \text{U/L de TGO}$$

#### II-2-4-5-Alanine aminotransférase (ALT)

Méthode cinétique de dosage des transaminases sériques selon la fiche technique Spinreact. Alanine aminotransférase (ALT) ou Glutamate pyruvate transaminases (TGP) catalyse le transfert réversible de groupement aminé de l'alanine à l'α- cétoglutarate formant le glutamate et pyruvate. Ce dernier est réduit en lactate par l'enzyme lactate déshydrogénase. (LDH) et le NADH selon les réactions (Murray, 1984) :



Dans un tube sec 100µl d'échantillon (sérum) sont additionnés à 1ml de réactif de travail [R2 (NADH :0.18mmol/l, Lactatedeshydrogénase :1200 U/L, α cétoglutarate: 15 mmol/l) dissout dans le tampon ; R1(TRIS pH7.8 : 80 mmol/l, L- Alanine: 500 mmol/l)], agitation, incubation pendant 01 minutes. Lecture de l'absorbance (A) à λ=340 nm chaque minute pendant 03 minute

$$\Delta A/\text{min} \times 1750 = \text{U/L de TGP}$$

#### **II-2-4-6- Phosphatase alcaline**

La phosphatase alcaline (PAL) catalyse l'hydrolyse de p-nitrophenyl phosphate à pH 10.4, en libérant p-nitrophenol et le phosphate (**Wenger et al, 1984**), selon la réaction



La formation de p-nitrophénol est mesurée photométriquement, où elle est proportionnelle à l'activité catalytique de la phosphatase alcaline dans le sérum selon la fiche technique Spinreact

Dans un tube sec 20µl d'échantillon (sérum) sont additionnés à 1.2 ml de réactif de travail [R2 (α Nitrophénylphosphate : 10 mmol/l), dissout dans le tampon ; R1 (Diethanolamine pH10.4 : 1 mmol/l, Chloride se magnésium :0.5 mmol/l)], agitation, incubation pendant 01 minutes. Lecture de l'absorbance (A) à λ=405 nm chaque minute pendant 03 minutes.

$$\Delta A/\text{min} \times 3300 = \text{U/L de ALP}$$

#### **II-2-4-7-Extraction et dosage des métabolites**

Après la dissection, l'extraction (Figure 4) des différents métabolites (protéines totales, glucides totaux et lipides totaux) a été réalisée selon le procédé de **Schibko et al. (1976)** sur un fragment (100 mg) de foie prélevé et conservé dans 1ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 20 %. Tous les dosages ont été effectués sur des

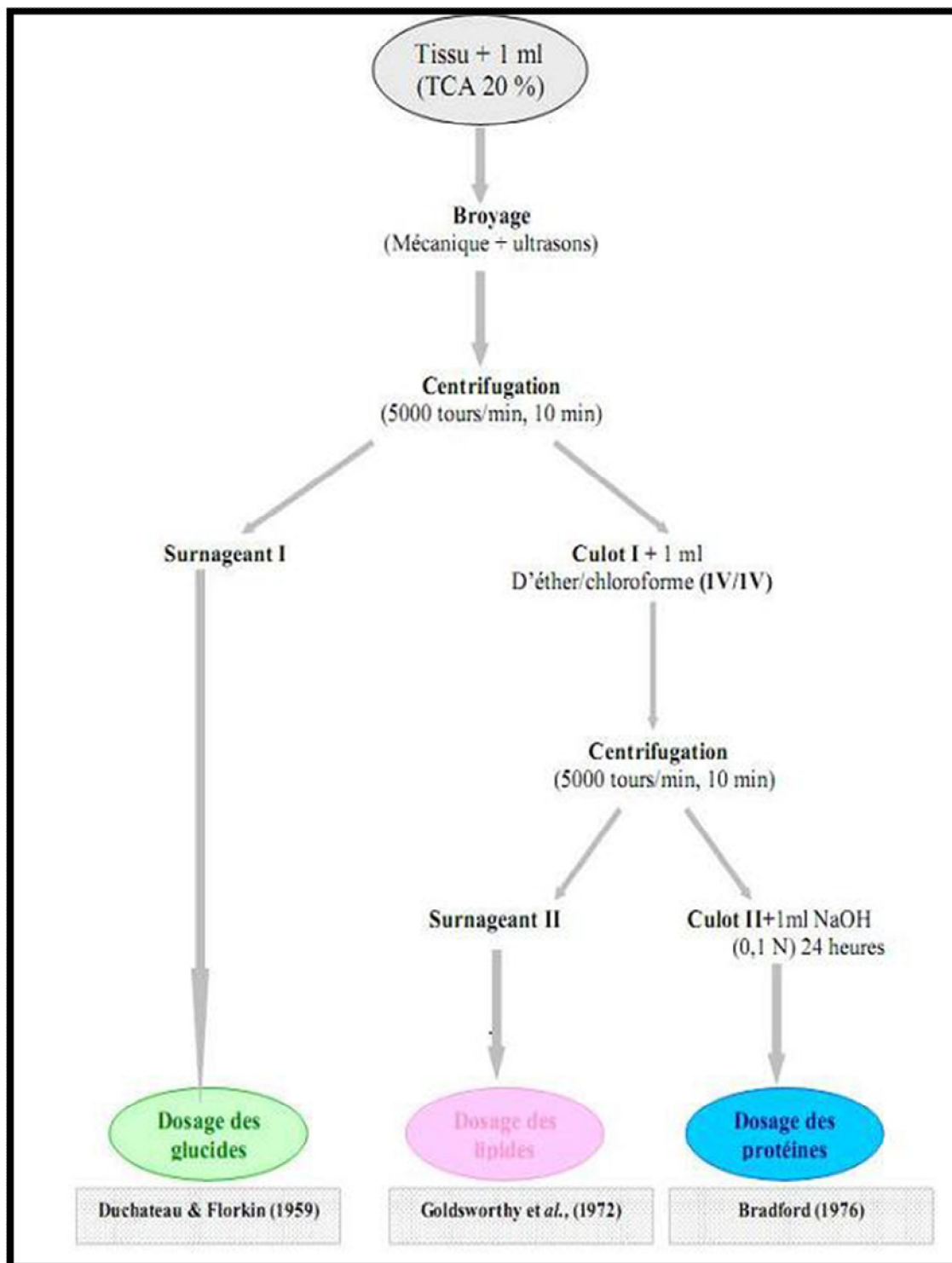
fractions aliquotes de 100  $\mu$ L. Tous les dosages sont exprimés en  $\mu$ g/mg de tissu analysé.

La teneur en protéines totales de foie a été quantifiée selon la méthode de **Bradford (1976)** qui utilise le bleu brillant de Coomassie (G250) comme réactif et l'albumine de sérum de bœuf comme standard. La lecture des absorbances est réalisée à une longueur d'onde de 595 nm.

Le dosage des glucides totaux de foie est réalisé selon **Duchateau & Florkin (1959)**. Cette méthode utilise l'anthrone comme réactif et une solution mère de glucose (1g/L) comme standard. La lecture des absorbances est réalisée à 620 nm.

Le dosage des lipides de foie est effectué selon la méthode de **Goldsworthy et al. (1972)** utilisant la vanilline comme réactif et une solution mère de lipides comme standard. Les absorbances sont obtenues, après 30 mn d'obscurité, à une longueur d'onde de 530 nm.

Tous les dosages ont été effectués sur des fractions aliquotes de 100  $\mu$ l et les taux des différents métabolites de foie ont été quantifiés grâce aux équations des droites de régression déterminées à partir des courbes de références.



**Figure 04** : Extraction des glucides. Lipides et protéines selon **Shibko et al. (1976)**.

#### II-2-4-8-Dosage de Malondialdéhyde (MDA)

Le malondialdéhyde (MDA), produit terminale de la peroxydation des lipides et dont la teneur est en relation étroite avec les dégradations de la membrane cellulaire, permet de montrer l'effet d'une pénétration d'un xénobiotique dans l'organisme. Ce paramètre constitue un indicateur précoce d'une agression toxique et par conséquent il peut être utilisé comme biomarqueur du stress oxydant (**Funes *et al.*, 2006 ; Ladhar-Chaabouni *et al.* 2007**).

##### a- Principe :

Le malondialdéhyde (MDA) est dosé selon la méthode de **Draper & Hadley (1990)** basée sur la mesure colorimétrique de la réaction entre l'acide thiobarbiturique (TBA) et le malondialdéhyde (MDA) donnant un produit rouge brun dont l'intensité de la coloration est mesurée à une longueur d'onde de 530 nm.

##### b- Mode opératoire :

Le protocole expérimental est le suivant :

- Prélever 375µl de l'homogénat (surnageant).
- Ajouter 150 µl de la solution TBS (tris 50mM, NaCl150mM pH7.4).
- Ajouter 375 µl de la solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%)
- Vortexer et centrifuger à 1000 tour/min pendant 10min.
- Prélever 400 µl du surnageant.
- Ajouter 80 µl du HCL 0.6 M.
- Ajouter 320 µl de la solution tris-TBA (tris 26mM, TBA120mM).
- Mélanger et incuber au bain marie à une température de 80°C pendant 10 minutes

##### c- Calcul de la concentration de MDA

L'absorbance est directement proportionnelle à la quantité de MDA formée donnant ainsi une évaluation précise de lipides peroxydés.

La concentration de MDA est calculée selon la loi de Beer-Lambert ( $DO = E.C.L$ ) :

$$DO. 10^6$$

$$[C] \text{ (umol/mg protéine) } = \frac{DO . 10^6}{\epsilon . L . X . Fd}$$

C : Concentration en nmoles/mg de protéines ; DO : Densité optique lue à 530nm

E : Coefficient d'extinction molaire du MDA =  $1.56 \times 10^5 M^{-1} cm^{-1}$

L : Longueur du trajet optique = 0.779 cm

X : Concentration de l'extrait en protéines (mg/ml)

Fd : Facteur de dilution : Fd = 0.2083

### II-2-4-9- Mesure du Glutathion (GSH et GSSG)

#### a- Principe

Le dosage du glutathion est réalisé selon le procédé de **Weckbeker et Cory (1988)**. Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance de l'acide 2-nitro-5-mercaptopurique. Ce dernier résulte de la réduction de l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (réactif d'Elleman) par les groupements (-SH) du glutathion. Une fois préparé, l'homogénat doit subir une déprotéinisation (par l'acide sulfosalicylique 0.25%) afin de protéger les groupements-SH du glutathion.

#### b- Mode opératoire

- Les échantillons (200mg de tissu) sont mis individuellement en présence de 8 ml de solution d'EDTA (Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique) à 0.2M. Le mélange mis dans des glaçons est broyé à l'aide d'un pilon en porcelaine.
- Une fois préparé, l'homogénat est déprotéinisé ; 0.8 ml de ce dernier auquel on ajoute 0.2ml d'une solution d'acide sulfosalicylique (SSA) à 0.25%.
- Agiter le mélange et laisser pendant 15 min dans un bain de glace.
- Centrifugé pendant 5min à 1000 t/min.
- Prélever 0.5 ml du surnageant.
- Ajouter 1 ml de tampon tris-HCL+EDTA (0.02M), PH=9.6.
- Mélanger et ajouter 0.025 ml de l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à 0.01M dissous dans le méthanol absolu.
- Laisser pendant 5min à température ambiante.
- Mesurer l'absorbance (A) à 412nm

### c-Calcul de la concentration de GSH

La concentration en GSH est obtenue par la formule suivante :

$$[\text{GSH}] = \frac{\text{DOX1X1.525}}{13100 \times 0.8 \times 0.5 \text{ mg de ptoteine}}$$

DO : Densité<sup>1</sup> optique.

1 : Volume total des solutions utilisées de la déprotéinisation. (0.8 ml homogénat +0.2ml SSA).

1.525 : Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0.5 ml surnageant+1 ml Tris-EDTA+0.025 ml DTNB).

13100 : Coefficient d absorbance (contenant le groupement-SH à412 nm).

0.8 : Volume de l'homogénat après déprotéinisation trouvé dans 1 ml.

0.5 : Volume du surnageant trouvé dans un 1.525 ml

### II-2-4-10- Dosage de l'activité de Glutathion Peroxydase

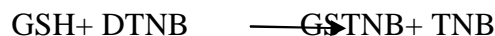
#### a- Principe

L'activité de GSH-Px est mesurée par la technique de **Flock et Gunzler (1984)** modifiée utilisant le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comme substrat. La formation de GSH peut être détectée indirectement grâce à l'ajout de l'acide 5,5- dithio-bis-2-dinitrobenzoïque (DTNB), le groupe sulfhydryl (-SH) du glutathion réagit spontanément avec le DTNB et forme un composé jaune, l'acide 5-thio-2- nitrobenzoïque (TNB)

La glutathion réductase catalyse la réaction suivante :



La formation de GSH peut être détectée indirectement grâce à l'ajout de 5,5- dithio-bis-2-dinitrobenzoïque (DTNB) :



Le TNB absorbe à 412 nm et permet de quantifier l'activité de glutathion réductase. Ainsi, pour chaque molécule de GSH formée, il y aura formation d'une molécule de TNB.

#### b- Mode opératoire

- L'extraction de l'enzyme : homogénéisation par le tampon phosphate) pH7.8.
- Centrifugation 10 min a 3000t/min.
- Récupération de surnageant (extrait enzymatique).



- 0.2 ml de surnageant +0.4 ml de GSH (glutathion forme réduite) a0.1 MM (réaction enzymatique) + 0.2 ml TP a 0.067M (tampon d'extraction pH7.8).
- Préparer un blanc avec 0.4 ml de GSH +0.2 de TP (réaction non enzymatique), Incubation au bain marie à 25°C pendant 05 min.
- 0.2 ml d'H2O2 (1.3MM) pour initier la réaction.
- Laisser agir 10 min.
- Arrêter la réaction par addition de 1 ml de TCA 1%(acide tri chloro-acétique).
- Mettre le mélange dans la glace pendant 30 min.
- Centrifuger durant 10 min a 3000t/min.
- 0.48 ml de surnageant et place dans une cuve+2.2 ml de Na2HPO4 (0.32M) +0.32 ml de DNTB (1MM).
- Formation d'un composé colore, mesurer la densité optique à 412 nm dans le 05 min.

### C- calcul de l'activité de GPx

La détermination (calcul) de l'activité de la GPx se fait de la façon suivante :

- Activité de GSH consommée / min / gr de protéine
- Blanc = 0.04 micro mole de GSH réduit : DO<sub>b</sub>
- Extrait = 0.04 micro mole de GSH réduit : DO<sub>e</sub>

Donc la concentration de GSH réduit qui sera oxydée (disparue) = DO<sub>e</sub> -DO<sub>b</sub>

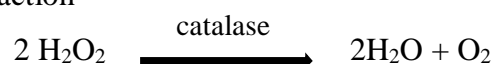
$$X = \frac{(DO_e - DO_b) \times 0.04}{DO_b} = \text{quantité de GSH réduite disparue (oxydée)}.$$

$$\text{L'activité de la GPx} = \text{La quantité de GSH réduit disparue} \times \frac{5}{\text{La concentration de protéine}}$$

### II-2-4-11- Dosage de l'activité de Catalase

#### a- principe :

La catalase est une enzyme qui participe à la défense contre les dérivés toxiques de l'oxygène en dégradant le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en eau et en dioxygène suivant la réaction



La disparition du peroxyde de l'hydrogène peut être mesurée en spectrophotométrie

#### b- Mode opératoire :

L'activité de la catalase (CAT) est mesuré a 240 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible par la variation de la densité optique consécutive à la

dismutation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pendant 1 min à un intervalle de 15 seconde, en faisant réagir dans 780 µl (100 mM) de tampon phosphate pH 7.4, 200 µl d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500mM) sur 20 µl de l'homogénat selon (**Cakmak et Horst 1991**)

### C- Calcule de l'activité de la Catalase :

L'activité de la catalase est exprimée en umol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hydrolysées /min/mg de protéine

$$\text{Activité de Catalase} = \frac{\Delta A \cdot V_t}{\epsilon \cdot \Delta t \cdot L \cdot V_e \cdot P}$$

$\epsilon$  : Coefficient d'extinction linéique molaire en.  $\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

$\Delta A$  : pente de la droite de régression (variation de la densité optique en fonction du temps).

$V_t$  : Volume total du mélange réactionnel en ml.

$V_e$  : Volume de l'extrait enzymatique en ml.

$L$  : Largeur de la cuve de mesure en cm.

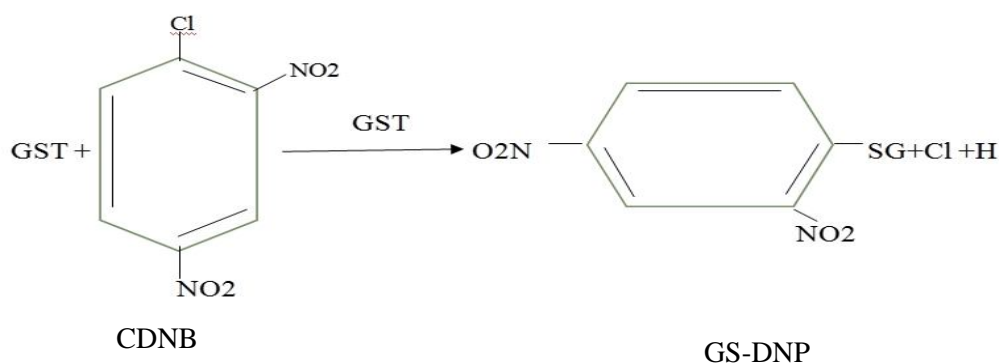
$P$  : Teneur en protéines en mg

$T$  : temps de lecture en min.

## II-2-4-12- Dosage de l'activité de Glutathion-S-Transférase

### a- Principe :

La mesure de l'activité de glutathion S-Transférase (GST) est déterminée selon la méthode de **Habig et al. (1974)**, Elle est basée sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat, le CDNB (1-Chloro2, 4 di nitrobenzène) en d'un cofacteur le glutathion (GST), la conjugaison entraine la formation d'une molécule nouvelle ; 1-S-Glutathionyle 2-4Di nitrobenzène permettant de mesurer l'activité de GST selon la réaction suivante :



### b- Mode opératoire

La valeur de la densité optique mesurée est directement proportionnelle à la quantité de conjugué formé elle-même liée à l'intensité de l'activité GST. Les échantillons sont homogénéisés dans 1 ml de tampon phosphate (0.1M, pH6). L'homogénat est centrifugé à 14000 t/min pendant 30 min et le surnageant récupéré servira comme source d'enzymes. Le dosage consiste à faire réagir 200µl du surnageant avec 1.2 ml du mélange CDNB (1mM), GSH (5mM) [20.26 mg CDNB, 153.65mg GSH, 1 ml éthanol, 100 ml tampon phosphate (0.1M, Ph 6)]. La lecture des absorbances est effectuée pendant une minute et chaque 15 secondes à une longueur d'onde de 340 nm contre un blanc contenant 200 µl d'eau distillée remplaçant la quantité de surnageant.

### C- Calcule de l'activité de GST

La concentration de la GST est obtenue par la formule suivante :

$$\text{GST (umol/min/mg de proteine)} = \frac{(\text{DO échant/ min} - \text{DO blanc/min})}{9.6 \times \text{mg de protéine}}$$

- Do : Densité optique de l'échantillon /min.
- Do/min blanc : Densité optique du blanc /min
- 9.6 : Coefficient d'extinction du GSH-CDNB exprimé en mM. Cm

### II-2-4-13- Dosage de l'activité de l'AchE

Dans les jonctions inter-neuronales ou neuro-musculaires, la terminaison nerveuse libère un médiateur chimique, l'acétylcholine, qui permet la transmission de l'influx nerveux. Libéré dans l'espace synaptique, ce neurotransmetteur se fixe sur les récepteurs cholinergiques au niveau de la membrane post-synaptique. L'interaction de l'acétylcholine avec le récepteur entraîne une dépolarisation membranaire à l'origine du potentiel d'action.

L'acétylcholinestérase est l'enzyme qui dégrade par hydrolyse ce médiateur chimique afin de stopper rapidement la stimulation du récepteur (**Bocquené *et al.*, 1998**).

Les pesticides et les métaux lourds sont les principaux contaminants de l'environnement qui inhibent l'activité acétylcholinestérase (**Reinecke *et al.*, 2007**).

### a- Principe

Le dosage de l'activité AChE a été mené selon la méthode **d'Ellman *et al.* (1961)** qui consiste à fournir à l'enzyme (AChE) un substrat artificiel analogue, l'acétylthiocholine, qui sera hydrolysé en acide acétique et thiocholine. Cette dernière en présence de DTNB (acide 5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque) donne un produit jaune le TNB (acide 5-thio-2 nitrobenzoïque) que l'on dose à une longueur d'onde de 412 nm.

### b- Mode opératoire

Les cerveaux sont homogénéisés dans 1ml de solution détergente à l'aide d'un broyeur ultra-turrax à 12 000 tours/ min pendant une à deux minutes et cinq répétitions sont réalisées. L'homogénat est centrifugé à une vitesse de 5 000 g pendant 5mn. Le surnageant est récupéré pour servir comme source d'enzyme.

Le dosage de l'activité AChE est réalisé sur une fraction aliquote de 100 µl auquel on ajoute 100 µl de DTNB et 1 ml de tampon Tris (0.1 M, pH 7). Après 3 à 5 minutes, et afin d'épuiser la réaction spontanée, 100 µl de substrat acétylthiocholine<sup>3</sup> sont ajoutés. La lecture des absorbances a lieu toutes les 4 mn pendant 20 mn à une longueur d'onde de 412 nm contre un blanc, où 100 µl de solution détergente remplacent la source d'enzyme

### c- Calcule de l'activité de l'AChE

L'activité AChE est calculée selon la formule suivante :

$$x = \frac{\Delta DO/\text{min}}{13600} \times \frac{Vt}{Vh} / \text{mg prot}$$

x: micromoles de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines

$\Delta DO$  : pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat

$1.36 \times 10^4$  : coefficient d'extinction molaire du DTNB ( $\mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )

$V_h$  : volume de l'homogénat (100 µL)

$V_t$  : volume totale de la cuve (1 300 µL)

mg de prot : quantité de protéines exprimée en mg.

## II-2-5- Étude subcellulaire

### II-2-5-1- Isolement des mitochondries du foie

#### a. Principe

La procédure d'isolement des mitochondries a été effectuée selon la méthode de **Kristal *et al.* (1996)**. elle est basé sur préparation d'un homogénat hépatique suivie d'une centrifugation différentielle

#### b. Protocole

- Préparer l'homogénat à partir de 500 mg de tissu dans 4 ml de tampon d'isolement.
- Transférer l'homogénat dans un tube à centrifuger de plusieurs centrifugations différentielles à 4°C.
- Jeter le surnageant et récupérer le culot qui contient essentiellement les mitochondries pures.
- Laver les mitochondries deux fois par le tampon de respiration.
- Remettre le culot dans 1 ml de tampon d'isolation.
- Ensuite la lecture spectrophotométrique à la longueur d'onde 540 nm.

### II-2-5-2- Estimation de la respiration mitochondriale

#### a- Principe :

La respiration a été estimée en utilisant un Oxygraph (Hansatech) à l'aide d'une électrode à oxygène selon la méthode décrite par **Rouabhi *et al.* (2006, 2009)**.

#### b. Protocole

Les mesures de consommation d'oxygène des mitochondries isolées ont été réalisées par simple addition d'organelles (0,2 mg / ml mitochondries).

### II-2-5-3- Estimation du gonflement des mitochondries

Les mesures du gonflement des mitochondries sont effectuées à 25 ° C avec un spectrophotomètre (Jenway, modèle UV6300) à la longueur d'ondes  $\lambda = 540$  nm. La réaction est déclenchée par l'addition de mitochondries (0,2 à 0,5 mg de protéines pour un volume final de 3 ml).

### II-2-5-4- Estimation de la perméabilité mitochondriale

Selon la méthode de **Kristal *et al.* (1996)**, nous avons procédé à l'estimation de la perméabilité mitochondriale basée sur le taux de traverser de  $\text{Ca}^{++}$  suivi par une

augmentation de la taille des mitochondries détectées à la longueur d'onde de 540 nm durant 2 min et chaque 15 secondes.

### II-2-5-5- Mesure des paramètres mitochondriales

#### a) Détermination de GSH

Le dosage du glutathion est réalisé selon la méthode de **Weekbeker & Cory (1988)**. Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5mercapturique qui résulte de la réduction de l'acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion

#### b) Détermination de GPx

L'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) a été mesurée par la méthode de **Flohe et Gunzler (1984)**. Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la GPx

#### c) Détermination de GST

La mesure de l'activité de la glutathion-S- transférase (GST) est déterminée selon la méthode de **Habig et al (1974)**. Elle est basée sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat, le CDNB (1-Chloro-2,4 di nitrobenzène) en présence d'un cofacteur le glutathion (GSH), la conjugaison entraîne la formation d'une molécule nouvelle ; 1-S-Glutathionyl 2-4 Di nitrobenzène permettant de mesurer l'activité de GST

#### d) Détermination de CAT

L'activité de CAT est déterminée selon la méthode spectrophotométrique de **Cakmak et Horst (1991)**. L'activité de la catalase (CAT) est mesurée à 240 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible par la variation de la densité optique

#### e) Détermination de MDA

Le MDA détectée par une réaction colorimétrique avec l'acide thiobarbiturique (TBA). Le MDA est analysé selon la méthode **d'Esterbauer et al. (1992)**.

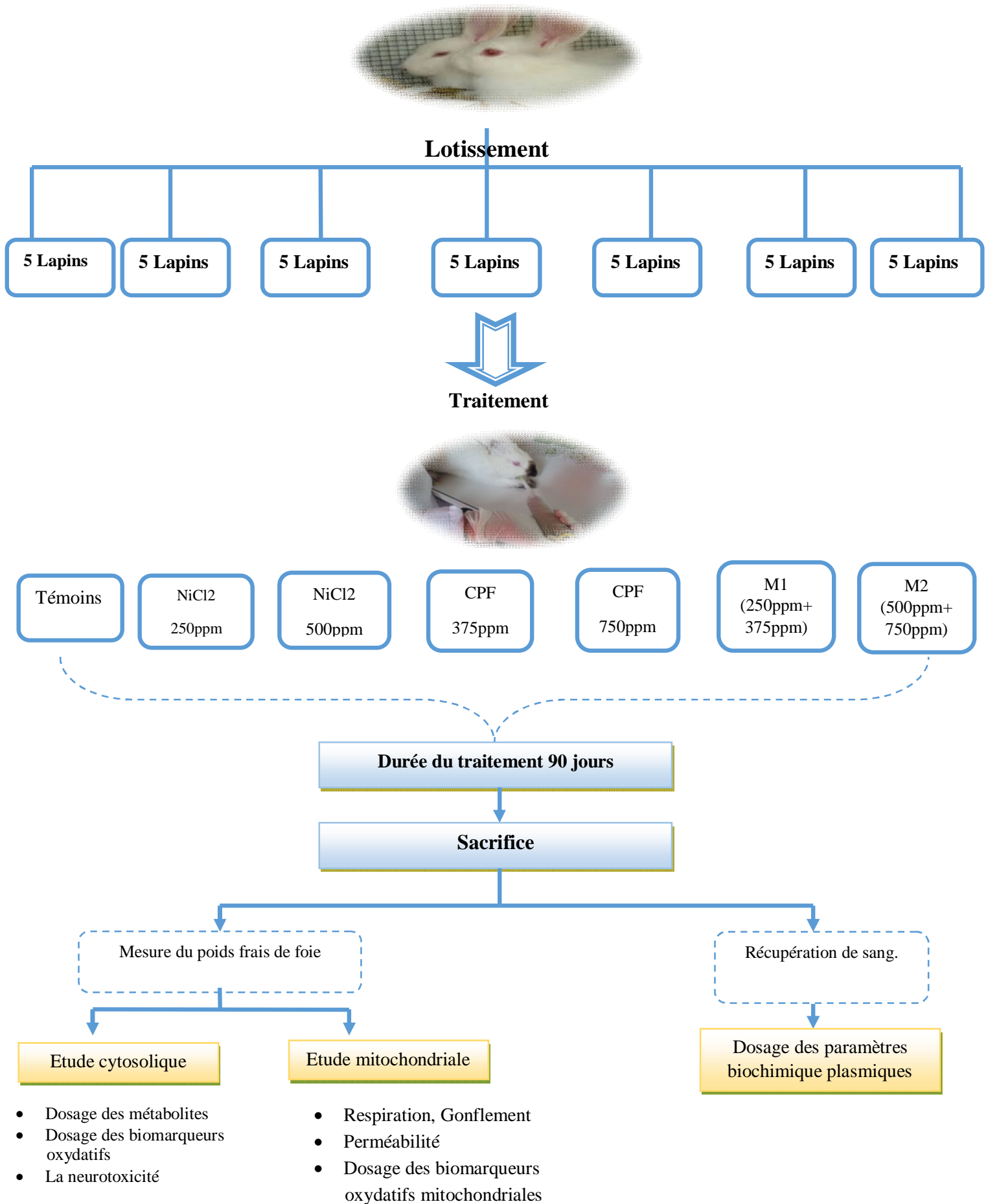
#### f) Dosage du cytochrome c oxydase

L'activité du cytochrome c oxydase est mesurée selon la méthode de (**Wharton et Tzagoloff, 1967**). Le cytochrome c oxydase, enzyme de la membrane interne mitochondriale assure le transfert d'électrons du ferrocyclochrome c aux molécules d'O<sub>2</sub>. On peut suivre :

- L'activité enzymatique peut être suivie par la mesure de l'oxydation du cytochrome C réduit à une longueur d'onde  $\lambda = 550$  nm car seule la forme réduite absorbe à cette longueur d'onde.
- Le cytochrome c réduit est préparé dans du tampon phosphate ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  7,5mM/ $\text{KH}_2\text{PO}_4$  7,5 mM pH 7,4) à une concentration finale de 3 mM ;
- Une pointe de spatule de sodium dithionite est ajoutée de manière à réduire le cytochrome C.
- Pour chaque échantillon on ajoute, 950  $\mu\text{l}$  de tampon phosphate et 20  $\mu\text{l}$  de la fraction à doser sont bien agités et pré-incubés 2 min à 25°C (les mitochondries éclatent ainsi dans ce milieu très hypotonique).
- L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde  $\lambda = 550$  nm.

### II-3- Analyses statistique

Les résultats obtenus ont été exprimés par la moyenne de cinq répétitions ( $\pm$  l'écart type), et pour mieux visualiser les résultats obtenus la représentation graphique choisie est celle des histogrammes à barres en utilisant l'office Excel 2017. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide de l'Office Excel version 2017, et le minitab® 17.



**Figure 05 :** Schéma récapitulatif du protocole expérimental





---

# Résultats

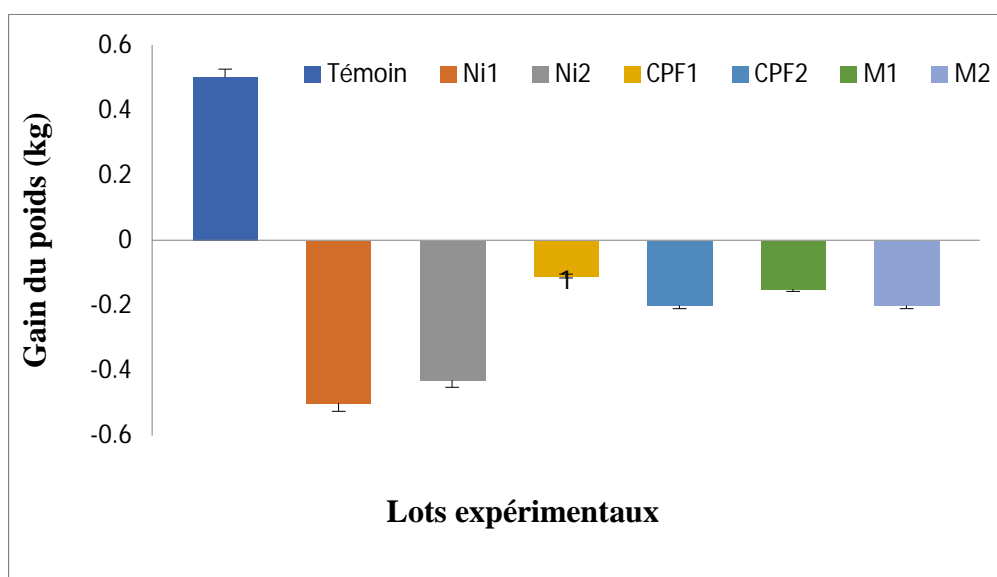


### III- Résultats

#### III-1-Etude physiologique

##### III-1-1-Effet sur gain du poids corporel

La figure 06 illustre l'évolution du gain du poids corporel chez les lapins témoins et traités par le NiCl<sub>2</sub> à (250ppm et 500ppm), CPF à (375ppm et 750ppm) et la mixture.

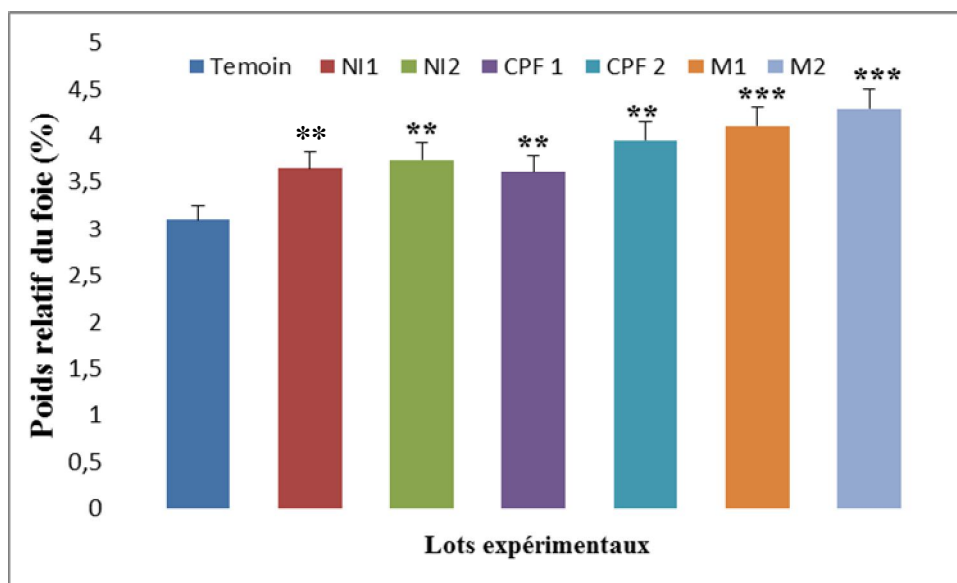


**Figure 06 :** Variations du gain du poids corporel chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement

Nous remarquons une diminution du gain du poids corporel de façon dose dépendante chez les lapins traités par le NiCl<sub>2</sub> (250ppm et 500ppm) et dose indépendante pour les autres traitées à différentes concentrations par rapport aux témoins.

##### III-1-2-Effet sur le poids relatif du foie

La figure 07 illustre les variations du poids relatif de foie en présence de NiCl<sub>2</sub>, CPF et leurs associations



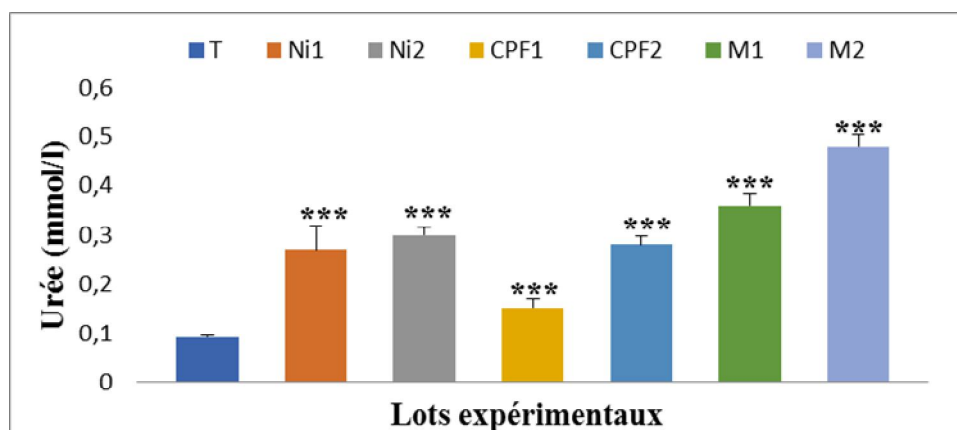
**Figure 07 :** Variations de poids relatif de foie chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement

Le poids relatif de foie augmente d'une façon hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) chez les lapins traités par le NiCl<sub>2</sub> et le CPF à deux concentrations par rapport aux témoins. Les M1 et M2 augmentent d'une façon très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ).

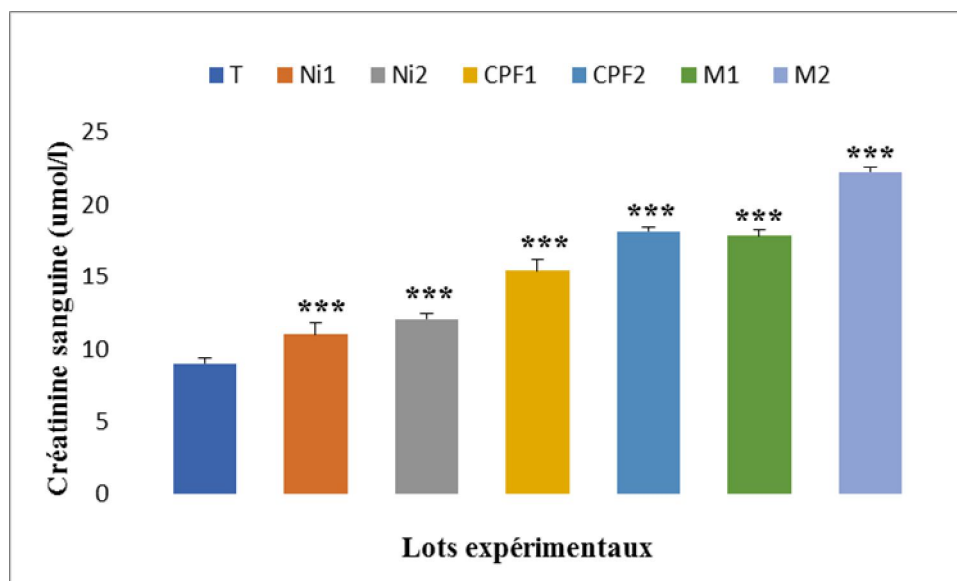
### III-2- Étude des paramètres biochimiques sanguins

#### III-2-1-Urée et créatinine

Les figures 08, 09 mettent en évidence les variations de la concentration sérique en urée et en créatinine chez le lot témoin et les lots traités



**Figure 08 :** Variations de la concentration sérique en urée chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement

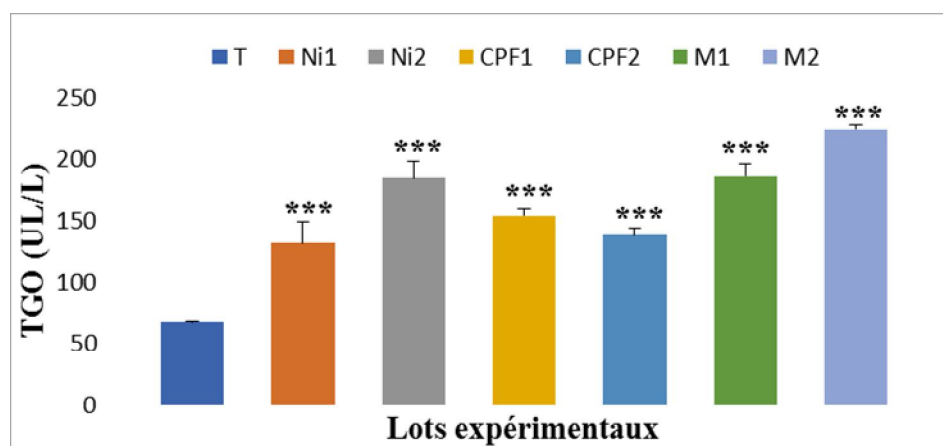


**Figure 09 :** Variations de la concentration sérique en créatinine chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement

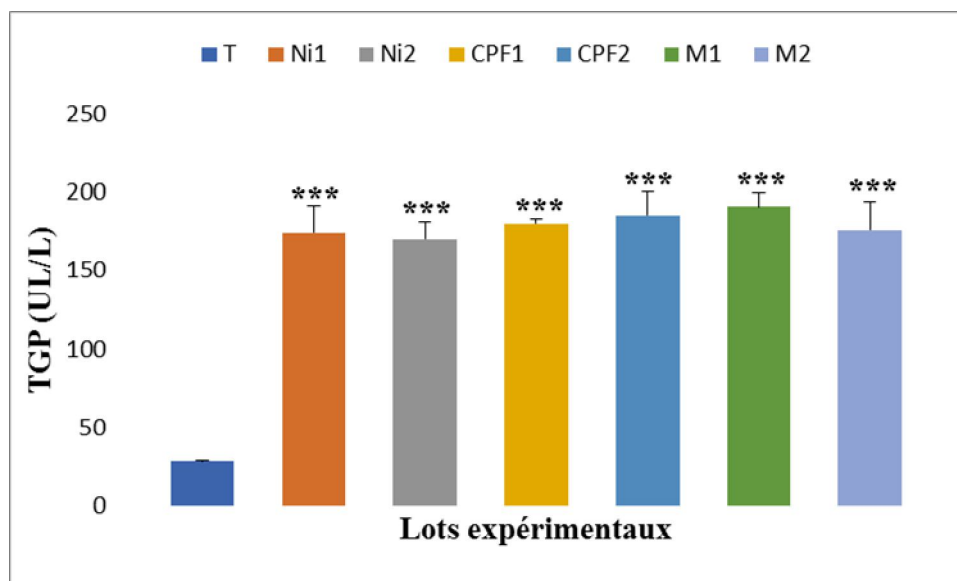
Nos résultats montrent une augmentation dose dépendante et très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) des paramètres de la fonction rénale (urée, créatinine) chez les lots traités par rapport au témoin.

### III-2-2-Transaminases

Les figures 10, 11 mettent en évidence les variations de l'activité sérique en TGO et en TGP chez le lot témoin et les lots traités



**Figure 10 :** Variation de l'activité enzymatique de TGO chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement

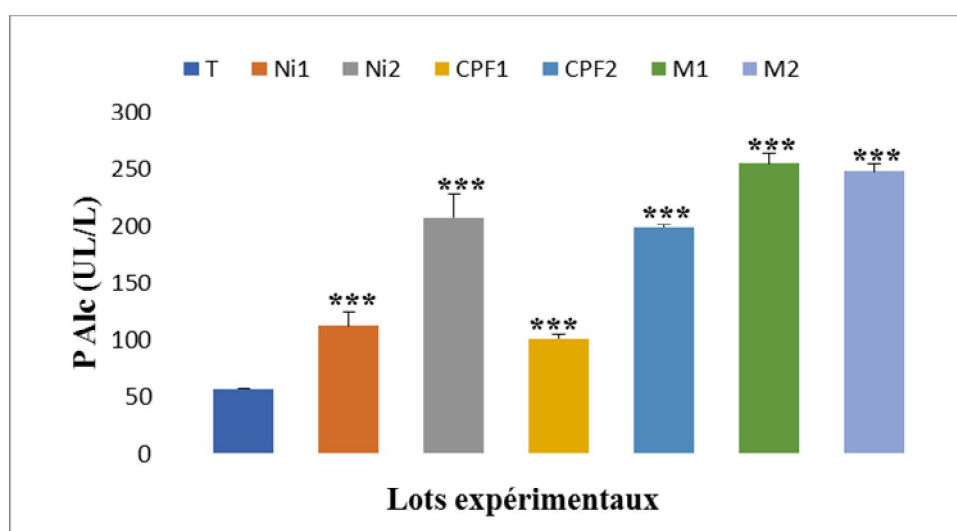


**Figure 11 :** Variation de l'activité enzymatique de TGP chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement

Les résultats obtenus révèlent une augmentation des transaminases (TGO, TGP) avec une différence très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) comparés aux témoins.

### III-2-3-Phosphatase alcaline

La figure 12 représente l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline chez les différents lots.

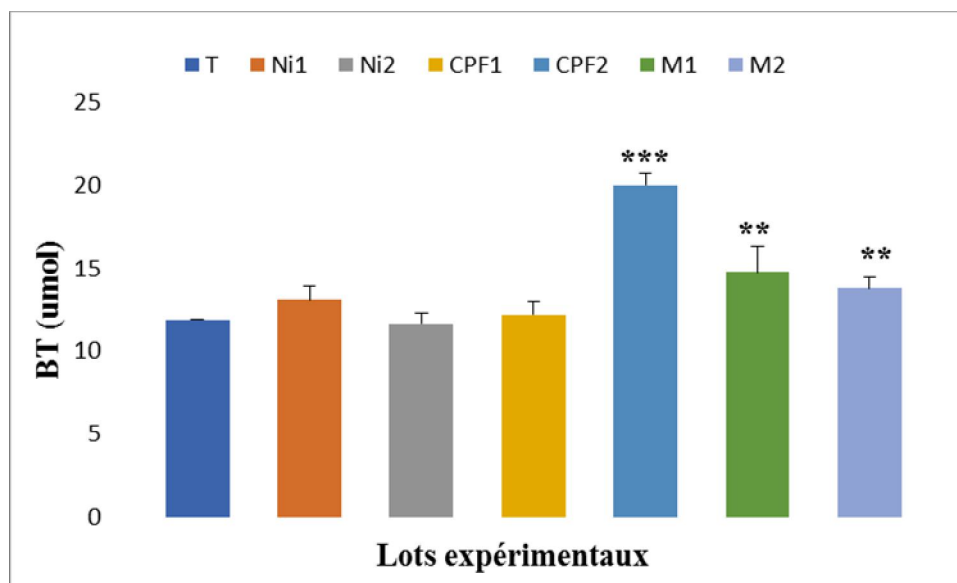


**Figure 12 :** Variation de l'activité enzymatique de la PAlc chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement

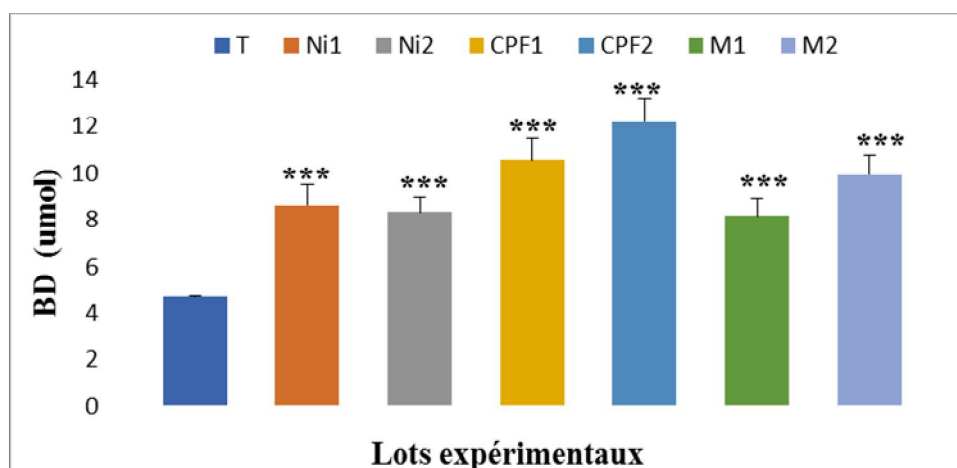
Une augmentation de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline avec une différence très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ), a été enregistrée chez les lots traités par rapport aux témoins.

### III-2-4-Bilirubine totale et directe

Les figures 13 et 14 représentent les variations du taux sérique de la bilirubine totale et directe chez les lapins témoins et traités.



**Figure 13 :** Variation du taux sérique de la bilirubine totale chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement



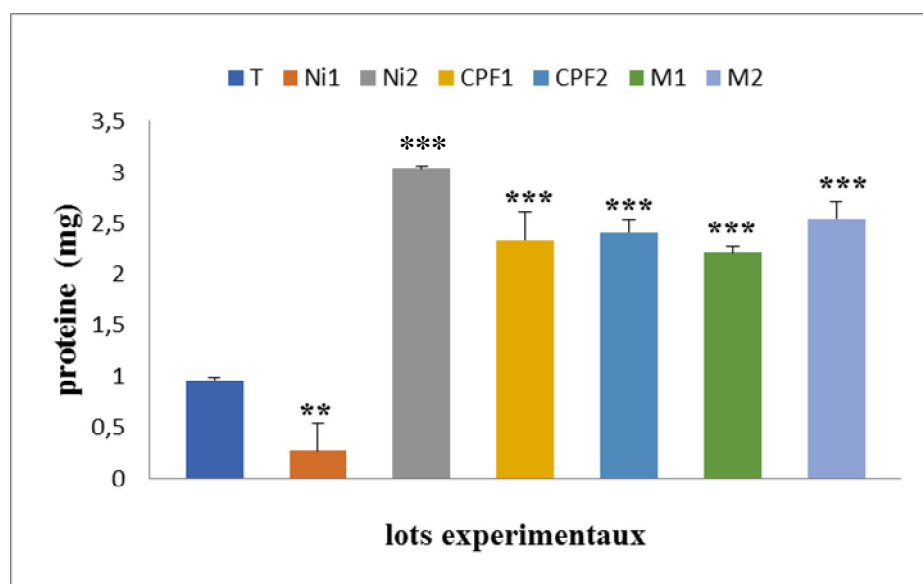
**Figure 14 :** Variation du taux sérique de la bilirubine directe chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement

Augmentation du taux de la bilirubine totale avec une différence hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) chez les lots traités par la mixture et très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) chez le lot traité par CPF à 750 ppm tandis qu'il y a une différence non significative pour les autres lots, néanmoins une différence hautement significative pour la bilirubine directe chez les lots traités par rapport aux témoins.

### III-3-Étude des paramètres biochimiques tissulaire

#### III-3-1-Effet sur le taux des protéines hépatiques

La figure 15 montre l'effet de NiCl<sub>2</sub>, CPF et de leurs mixtures sur le taux de protéine chez les lapins témoins et traités.

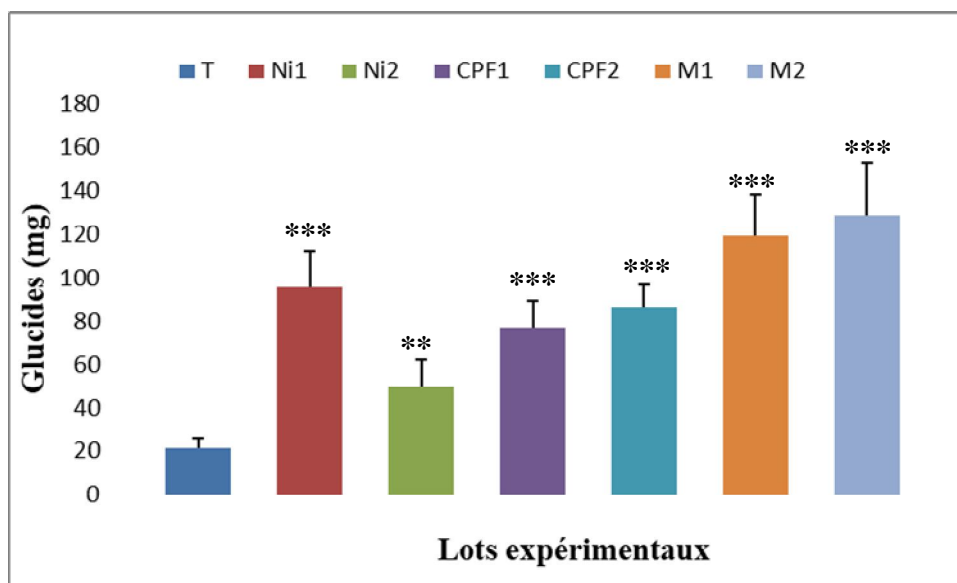


**Figure 15 :** taux des protéines totales chez les lots traités et témoins après 90 jours de traitement

Nos résultats montrent une augmentation très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) chez les lapins traités sauf qu'à la présence de NiCl<sub>2</sub> (250 ppm), nous remarquons qu'il y a une diminution hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) par rapport aux témoins.

#### III-3-2-Effet sur le taux des glucides hépatiques

La figure 16 représente les variations du taux des glucides hépatique chez les lapins traités et témoins

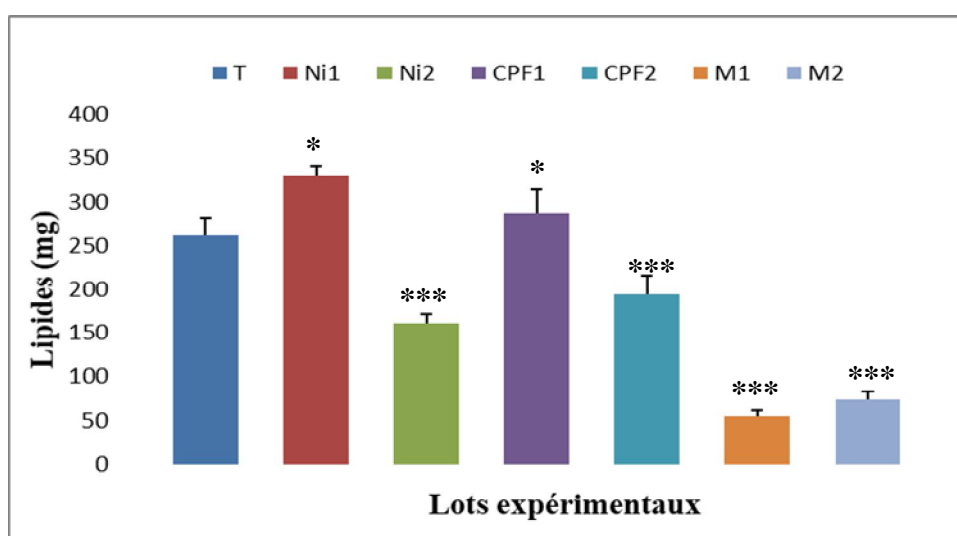


**Figure 16 :** taux des glucides totales chez les lots traités et témoins après 90 jours de traitement

Nous constatons que le taux de glucide augmente d'une manière très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) chez les lapins traités sauf qu'à la présence de  $\text{NiCl}_2$  (500 ppm), nous remarquons qu'il y a une augmentation hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) par rapport aux témoins.

### III-3-3- Effet sur le taux des lipides hépatiques

La figure 17 illustre les variations de taux des lipides hépatique chez les lapins traités et témoins



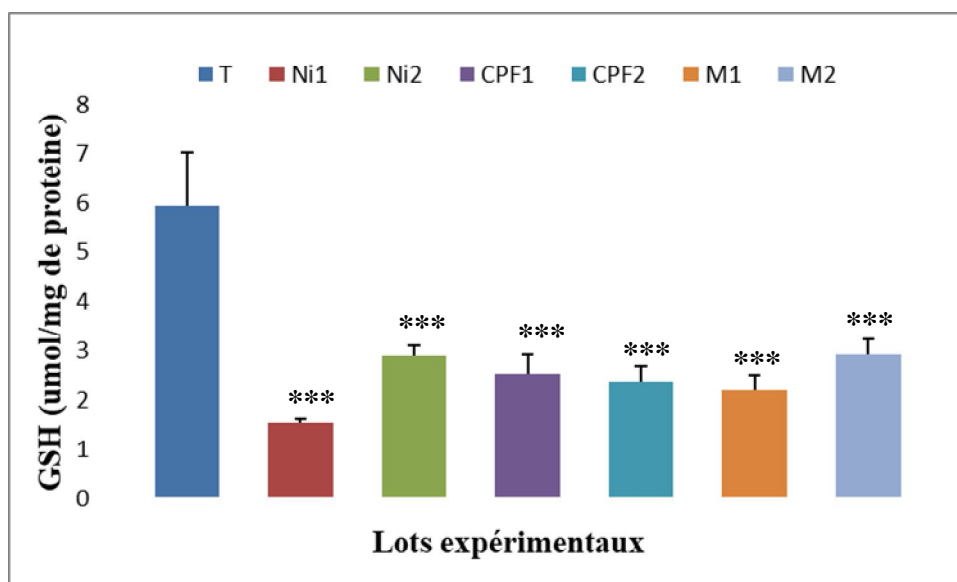
**Figure 17 :** Taux des lipides totaux chez les lots traités et témoins après 90 jours de traitement



Nous remarquons une augmentation significative ( $p \leq 0.05$ ) pour les lots traités par NiCl<sub>2</sub> à 250 ppm et CPF à 375 ppm. Cependant une diminution très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) pour les autres lots par rapport au lot témoin.

### III-3-4- Effet sur le taux de GSH cytosolique

La figure 18 montre les variations de taux de GSH chez les lapins témoins et traités.

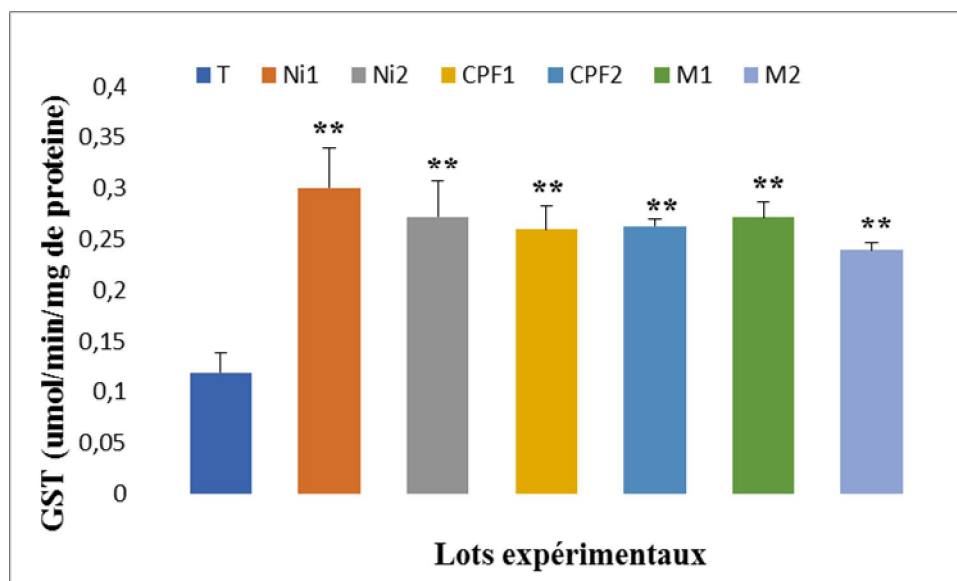


**Figure 18 :** Variation de la teneur en glutathion (GSH) cytosolique chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement.

Les résultats obtenus montrent une diminution de la teneur hépatique en glutathion avec une différence très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ), chez les lots traités comparé au témoin

### III-3-5- Effet sur l'activité de GST cytosolique

L'activité de GST cytosolique chez les lapins traités par NiCl<sub>2</sub>, CPF et leurs mixtures est illustrée dans la figure 19.

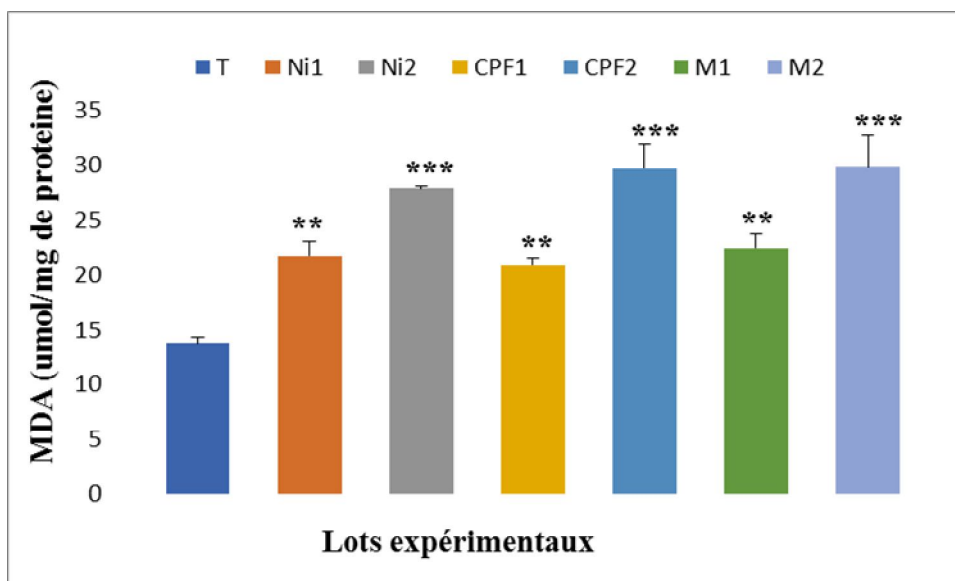


**Figure 19 :** Variation l’activité enzymatique de la glutathion -S- transférase (GST) cytosolique chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement

Le tissu hépatique montre une augmentation de l’activité enzymatique de la GST chez les lots traités avec une différence hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) par rapport aux témoins.

### III-3-6-Effet sur le taux de MDA cytosolique

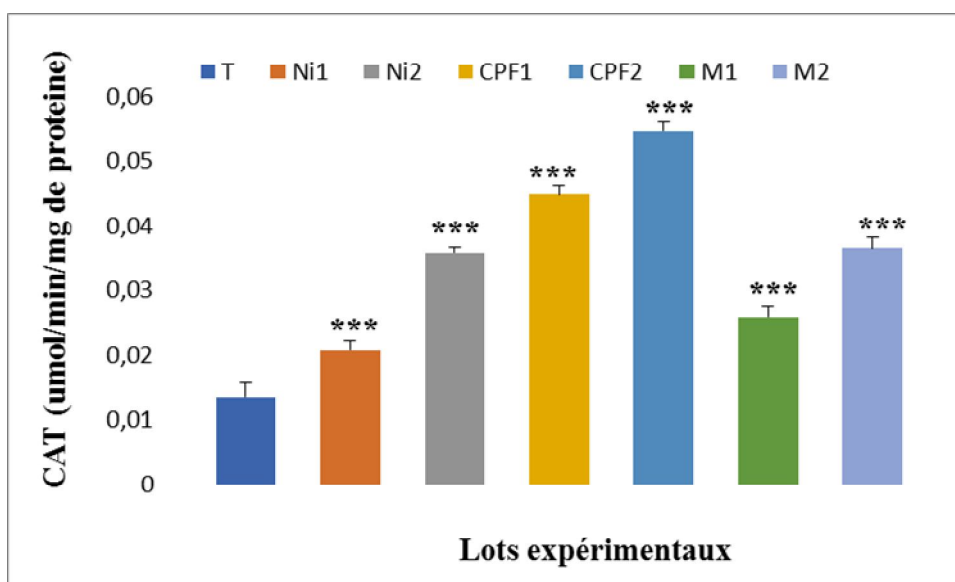
D’après les résultats obtenus (figure 20), on observe une augmentation avec une différence hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) du taux de MDA cytosolique chez lots traités par le NiCl<sub>2</sub> à 250 ppm , CPF à 375 ppm et mixture à (250/375) ppm par rapport aux témoins et très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) pour les lots traités par forte dose .cette augmentation de façon dose-dépendante.



**Figure 20 :** Variation de la teneur en Malondialdéhyde (MDA) cytosolique chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement

### III-3-7- Effet sur l'activité de CAT cytosolique

L'évolution de l'activité de catalase chez les lots témoins et traités par de deux concentrations croissantes de NiCL<sub>2</sub>, CPF et leurs mixtures sont illustrée dans la figure 21.



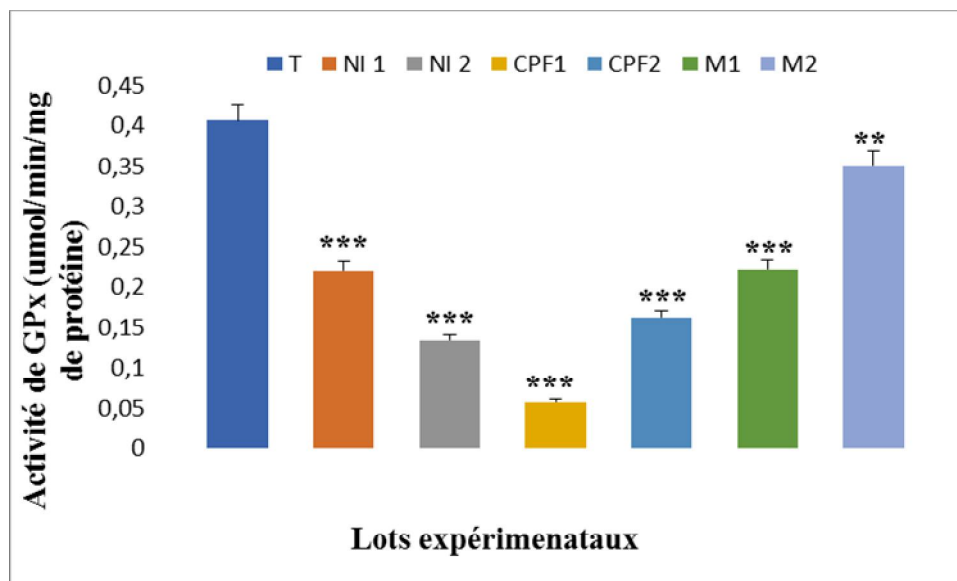
**Figure 21 :** Variation de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) cytosolique chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement

Nos résultats révèlent une augmentation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique chez les lots traités par deux concentrations de NiCL<sub>2</sub>, CPF et

leurs mixtures avec une différence très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) par rapport aux témoins.

### III-3-8- Effet sur l'activité de GPx cytosolique

La figure 22 représente l'activité enzymatique de GPx chez les lapins témoins et traités.

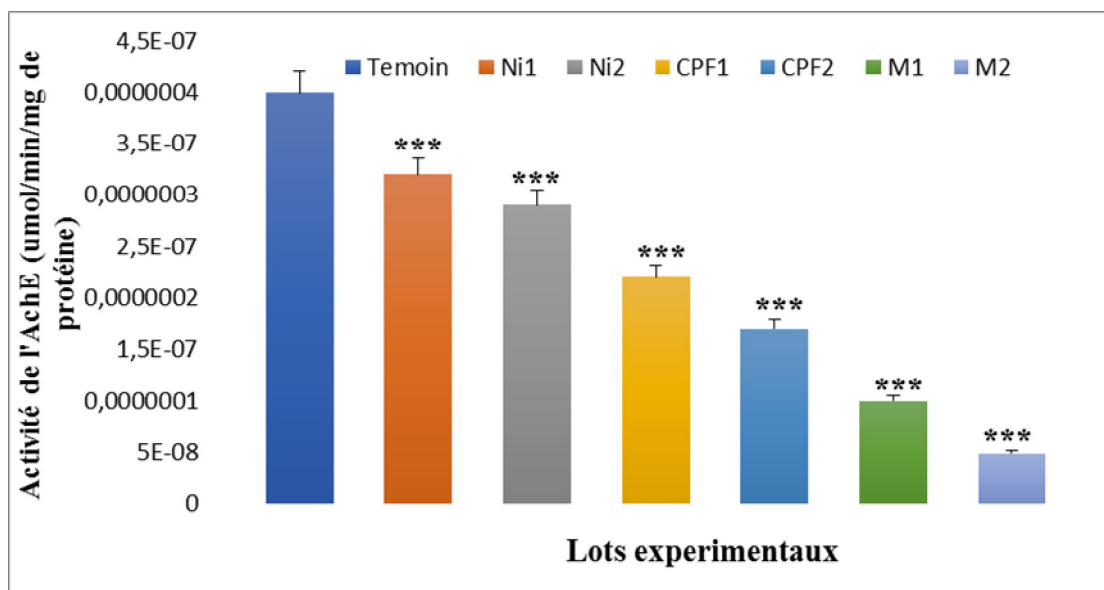


**Figure 22 :** Variation de l'activité enzymatique de GPx cytosolique chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement

Nos résultats montrent une diminution très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) chez les lapins traités sauf la mixture à forte dose, nous remarquons qu'il y a une diminution hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) par rapport aux témoins.

### III-3-9- Effet sur l'activité de l'AchE

La figure 23 met en évidence l'activité enzymatique de l'AchE chez les lapins témoins et traités.



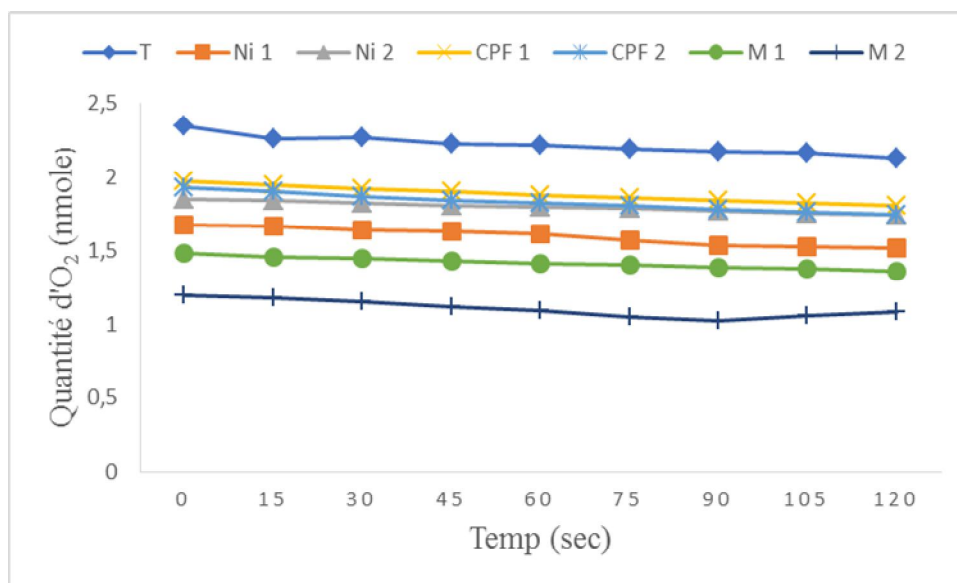
**Figure 23 :** Variation de l'activité enzymatique de l'AchE chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement

Nos résultats montrent une diminution très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) et dose dépendante chez les lapins traités par rapport aux témoins.

### III-4-Étude des paramètres mitochondriaux

#### III-4-1-mesure de la consommation d'oxygène mitochondrial

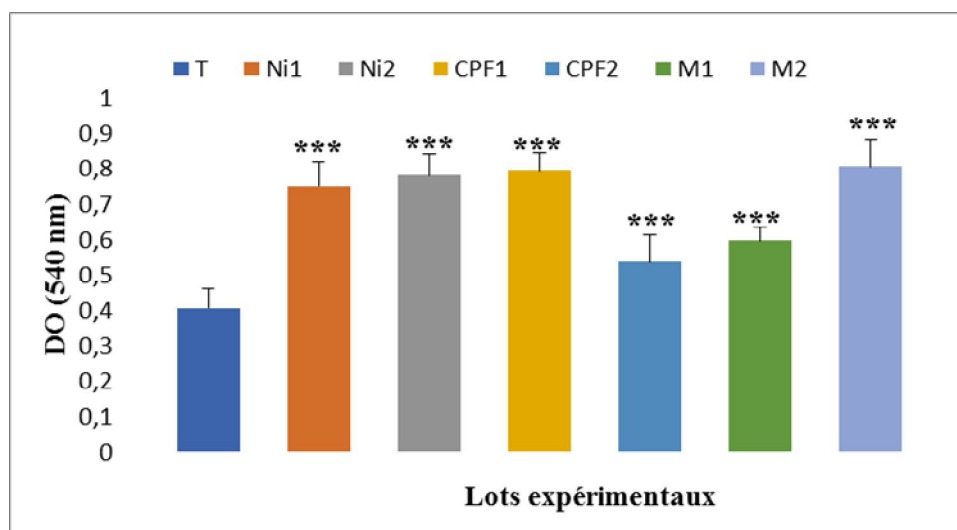
La figure 24 illustre les effets des deux concentrations croissantes de NiCl<sub>2</sub>, CPF et leurs mixtures sur la respiration mitochondriale. Nous remarquerons que les lapins témoins consomment l'oxygène d'une manière régulière et continue, par contre chez les lapins traités, la consommation d'oxygène est diminuée d'une manière dose-dépendante.



**Figure 24:** Effet de NiCl<sub>2</sub>, CPF et leurs mixtures sur la respiration mitochondrial chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement

### III-4-2-Variation du volume des mitochondries traitées par NiCl<sub>2</sub>, CPF et leurs mixtures

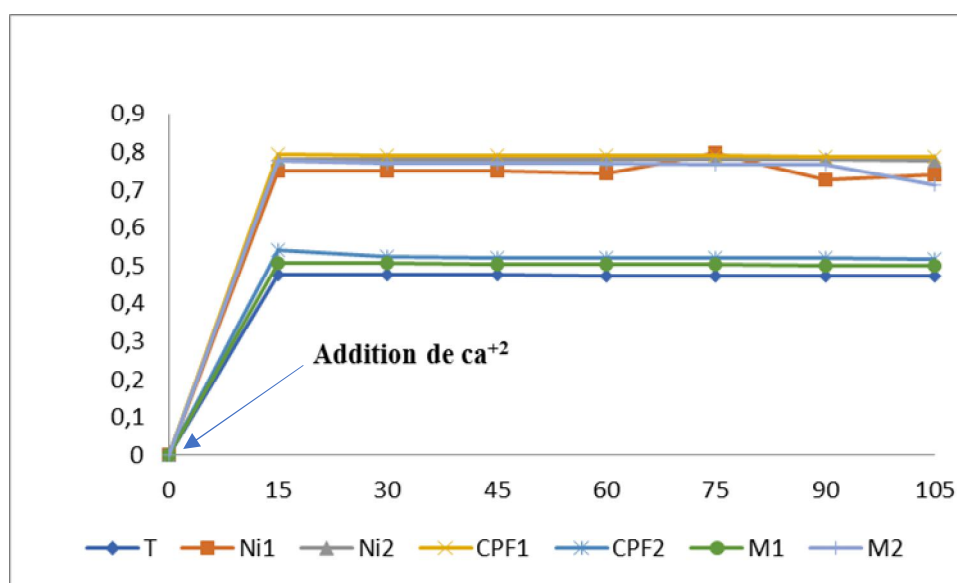
La figure 25 illustre les changements de volumes des mitochondries en présence de deux polluants (NiCl<sub>2</sub>, CPF) et la mixture en fonction du temps. Ces valeurs de l'absorbance traduisant ainsi une augmentation du volume des mitochondries traitées par rapport aux témoins. Cette augmentation est très hautement significative ( $P \leq 0,001$ )



**Figure 25 :** Variations du volume des mitochondries isolées témoins et traitées par NiCl<sub>2</sub>, CPF et la mixture en fonction du temps après 90 jours de traitement

### III-4-3-Variation de la perméabilité mitochondriale lors de l'injection du Ca<sup>2+</sup>

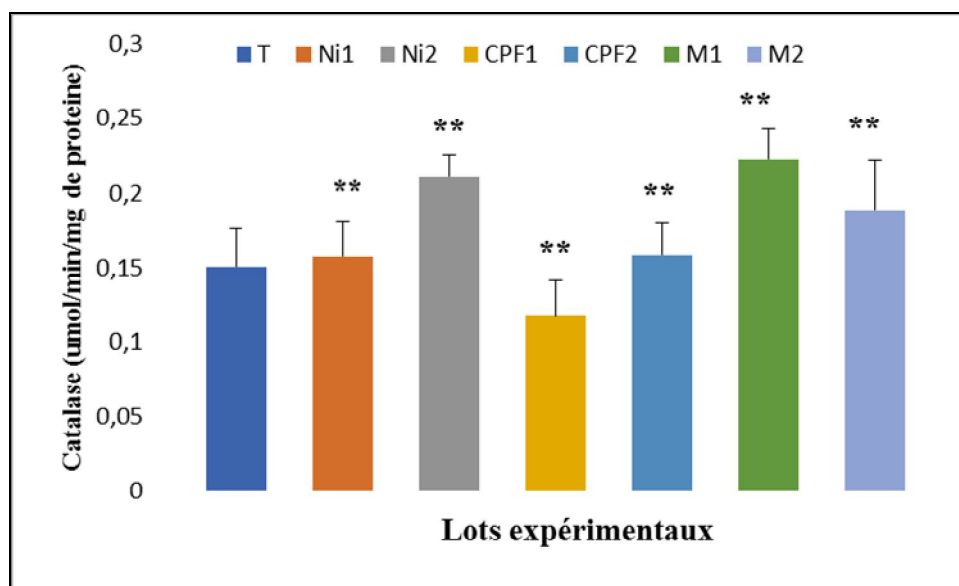
La figure 26 illustre l'effet de NiCl<sub>2</sub>, CPF et la mixture sur l'évolution de la perméabilité des mitochondries chez lapins. Nous constatons une augmentation de la taille des mitochondries traitées ce qui signifie une grande perméabilité. Après 15 secondes on remarque une stabilité de volume de mitochondrie chez les différents lots



**Figure 26 :** Effets de NiCl<sub>2</sub>, CPF et la mixture sur la perméabilité mitochondriale après l'addition du Ca<sup>2+</sup>

### III-4-4- Activité de Catalase mitochondrial

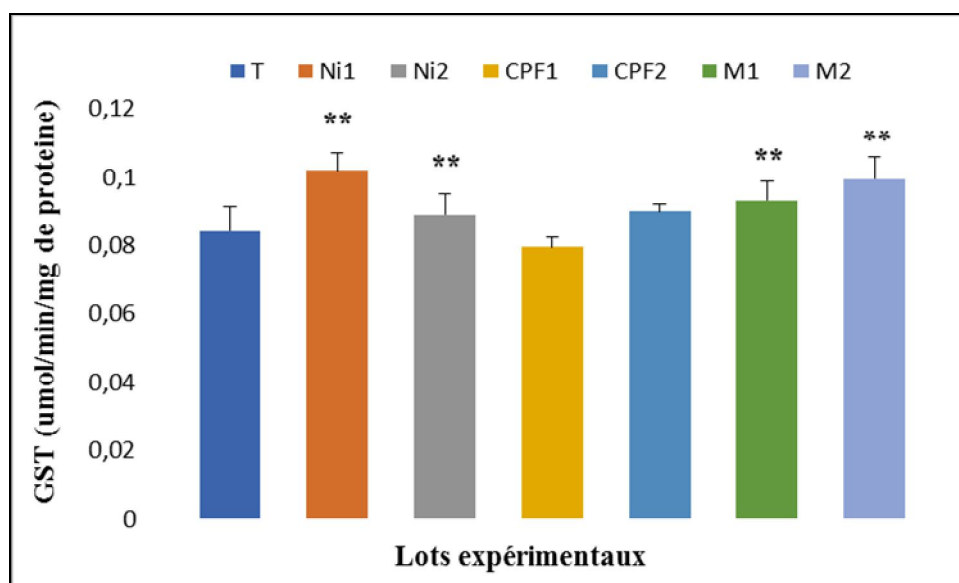
La figure 27 représente l'activité de Catalase mitochondrial chez les lapins témoins et traités. Nous remarquons au niveau mitochondrial une augmentation de manière dose dépendante et hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) chez les lapins traités par rapport aux témoins sauf qu'à la présence de CPF (375ppm -750ppm) nous constatons qu'il y'a une diminution hautement significative



**Figure 27:** Variations de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale hépatique chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement

### III-4-5 - Activité de GST mitochondrial

La figure 28 montre l'activité de GST hépatique mitochondrial chez les différents lots. Le traitement des lapins par NiCl<sub>2</sub> et la mixture pendant 3 mois conduit à une augmentation hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) de l'activité de GST de façon dose dépendante.

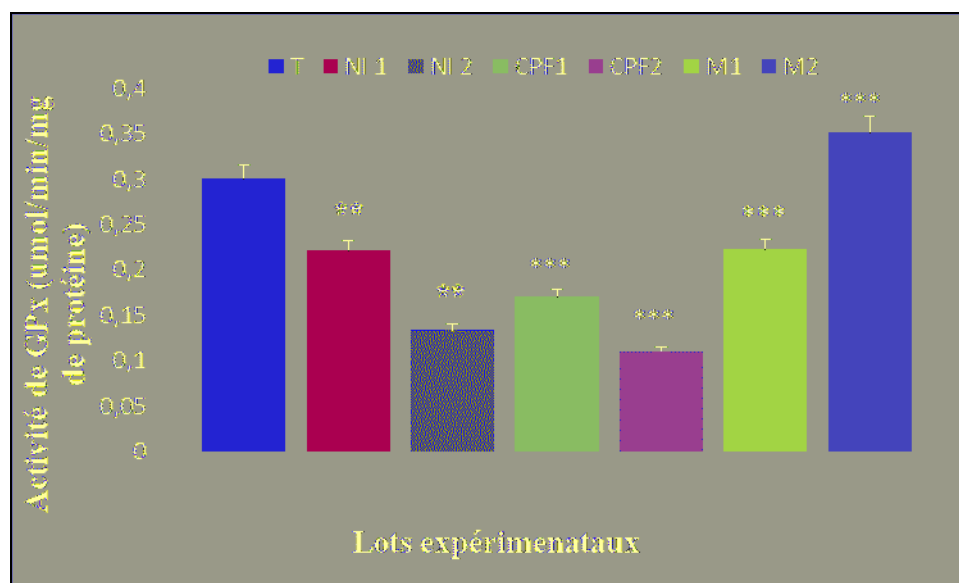


**Figure 28 :** Variations de l'activité enzymatique de la GST mitochondriale hépatique chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement



### III-4-6 - Activité de GPx mitochondriale

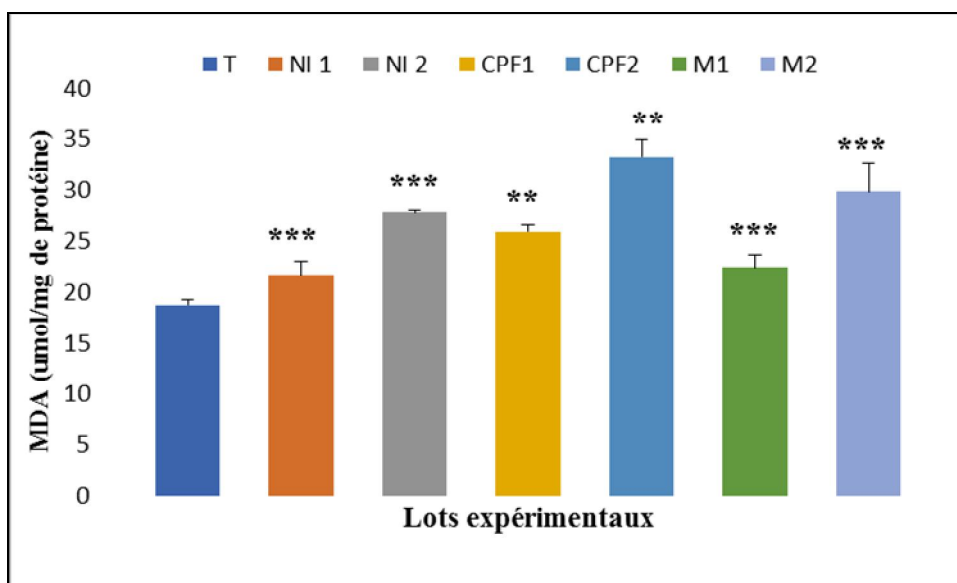
La figure 29 montre l'activité de GPx mitochondrial du tissu hépatique chez les différents lots. Nous constatons une diminution hautement significative ( $P \leq 0,01$ ) chez les lapins traités par NiCl<sub>2</sub> à (250ppm et 500ppm) par rapport aux témoins. Tandis qu'une diminution très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) chez les lapins traités par CPF (375ppm et 750ppm) et la mixture par rapport aux témoins.



**Figure 29** : Variations de l'activité enzymatique de la GPx mitochondriale hépatique chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement

### III-4-7 - Taux du MDA mitochondrial

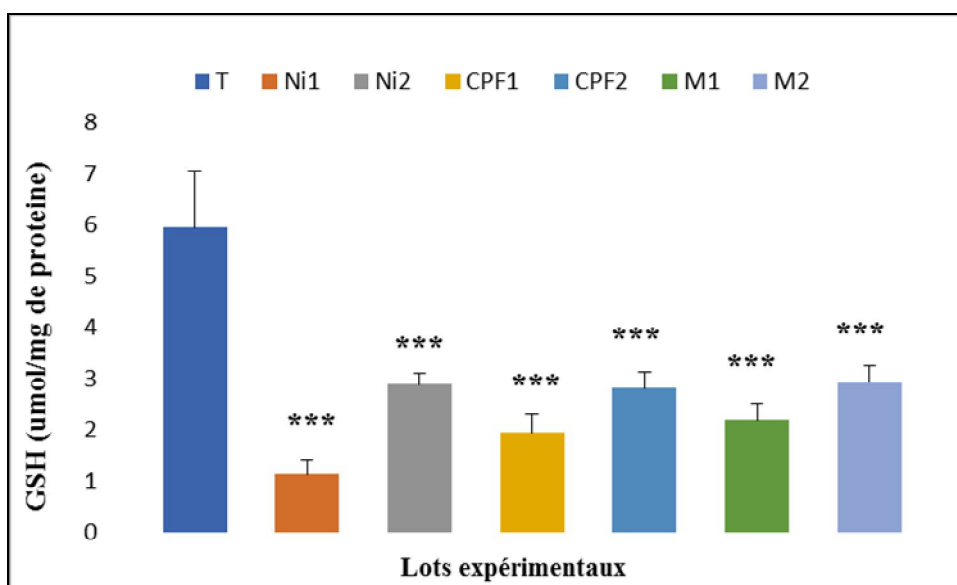
La figure 30 représente les variations du taux de MDA observées chez les lapins traités et témoins. Nous remarquons que ce taux tend à augmenter d'une manière très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) pour les lots traités par NiCl<sub>2</sub> et la mixture par contre une augmentation très significative des lots traités par CPF a deux concentrations par rapport aux témoins.



**Figure 30** : Variations des taux du MDA mitochondriale hépatique chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement

### III-4-8-Taux de GSH mitochondrial

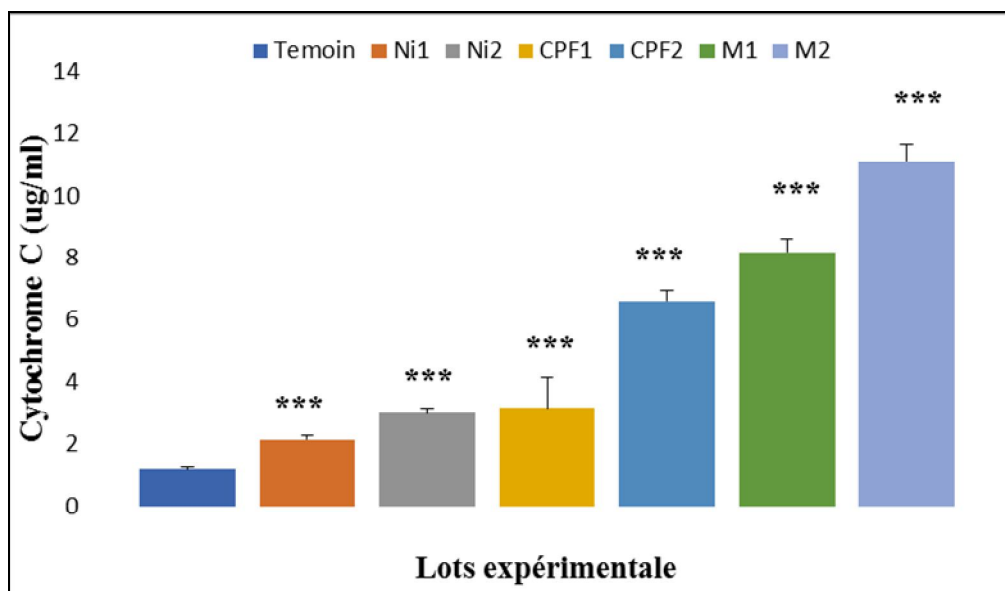
La figure 31 représente les variations de taux de GSH chez les lapins témoins et traités. Nos résultats mettent en évidence une diminution très hautement significative du taux de GSH chez les lapins traités par NiCl<sub>2</sub>, CPF et la mixture par rapport aux témoins de façon dose dépendante.



**Figure 31** : Variations des taux de GSH mitochondriale hépatique chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement

### III-4-9 -Taux de cytochrome C mitochondrial

La figure 32 représente l'évolution de l'activité de cytochrome C sous l'effet de deux polluants (NiCl<sub>2</sub>, CPF) et la mixture. Nous remarquons que cette activité tend à augmenter de manière dose dépendante et très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) par rapport aux témoins pour les différents lots traités



**Figure 32** : Taux de cytochrome C chez le lot témoin et les lots traités après 90 jours de traitement

---

# Discussion

## Discussion

Cette étude visait à évaluer les effets toxiques d'une exposition subchronique des lapins adultes au chlorure de nickel, Chlorpyrifos et leurs mixtures sur les paramètres biochimique et les tissus hépatiques (étude cytosolique et mitochondriale)

### 1- Poids corporels et poids relatif de foie

Dans notre étude nous avons enregistré une diminution dose -dépendante du poids corporel et du gain de poids. Cette diminution du poids corporel est due, selon (OCDE ,2000) à la perte des réserves graisseuses et à une fonte musculaire chez l'animal lors d'une souffrance (Gtpwoaufsp, 2008)

La réduction du poids corporel est utilisée comme un indicateur général de l'état de santé du lapin. Dans des conditions expérimentales, l'administration intrapéritonéale du sulfate de nickel, pendant 21 jours chez le rat Wistar males a provoqué une diminution très hautement significative du poids corporel par rapport aux rats témoins. Cette réduction peut être due à la faible consommation de la nourriture, un déséquilibre hormonal et la réduction des taux de protéines (Smialowicz *et al*, 1987;Pardeep *et al*, 2004)

Cet effet peut être aussi expliqué par l'action des polluants sur le transport des éléments nutritifs (les acides aminés, le glucose et les minéraux essentiels comme le zinc, le magnésium, le fer...) par le sang et par conséquent, ils peuvent induire une mauvaise assimilation des aliments par le corps. (Dieter *et al*, 1988 ;Cempel *et Janicka*, 2002) ont signalé que la baisse du gain de poids corporel peut-être dû à la dégradation augmentée de lipides et de protéines par suite de toxicité du nickel. Notre étude est concomitante à celle de (Mandava *et al*, 2009). Plusieurs études ont évalué l'effet des métaux et des pesticides sur le poids corporel par voie orale chez les animaux. Une étude de Gray *et al*, 1982 ont démontré chez les rats une réduction en gain de poids corporel mais seulement à doses très élevées .les auteurs d'une autre étude notent une diminution en gain du poids corporel après une exposition répétée des rats au deux pesticides (NTP ,1995). Cette diminution est peut être due à l'effet du chlorure de nickel, chlorpyrifos et leur mixture sur le tractus gastro-intestinal entraînant une perte d'appétit ou un mal d'absorption des aliments provoquant ainsi

une réduction dans la consommation d'aliment et d'eau chez les lapins. (**Borzelleca et al., 1989**) ont constaté des effets sur la croissance et sur le poids des organes des rats *spargue-Dawley* mâles ayant ingéré des doses de Cd environ 1.1 à 14 mg/kg pendant 10 jours, dans leur eau de boisson, et avec 15 à 65 mg/kg, le poids des organes était également modifié chez les rats.

Nos résultats sont en accord avec les données bibliographiques (**Morgan et al., 1961**) qui ont montré que l'administration de métribuzine réduit la consommation d'eau et des aliments, avec la perdre du poids corporel des femelles lapins au cours de la période de traitement. De plus, des études précédentes ont montré que la perte du poids corporel peut être expliquée par l'augmentation de catabolisme des lipides et des protéines de l'organisme sous l'effet toxique (**Boulila et al., 2014**)

En ce concerne les effets sur le poids relatif de fois nous avons remarqué une augmentation significative. L'augmentation de poids relatif peut être due à l'hypertrophie tissulaire de cet organe causé par ces xénobiotique (métal et pesticide), ces résultats est en accord avec les travaux des **Misra et al., 1990;Novelli et al., 1998** Ceci est expliqué, d'une part, par l'hypertrophie tissulaire de cet organe causé par ces polluants et d'autre part, par l'accumulation intense de Nickel et chlorpyrifos dans cet organe cible. Ce résultat est en accord avec les travaux de **Djabali, 2008**. De plus, les polluants peuvent conduire à la mort cellulaire par apoptose de certaines lignées cellulaires, due à l'accumulation de dérivés lipidiques toxiques comme les céramides (**Wang et al., 2000;Rudolf & Cervinka, 2010**).Ces dérivés lipidiques toxiques induisent une hypertrophie cellulaire de l'organe cible (**Hannun et al., 1996 ; Lee et al., 2011**).Cette anomalie du foie est un phénomène signalé par de nombreux auteurs à la suite de l'agression par des substances chimique (**Huangetal., 2012**)

### 2- Paramètres biochimiques sanguins

Nos résultats montrent que les lapins recevant le NiCl<sub>2</sub>, CPF et leurs mixtures présentent une augmentation des teneurs sériques en créatinine et en urée comparés à leurs témoins respectifs. L'augmentation des taux sériques en urée et en créatinine chez les lapins traités au chlorure de nickel, chlorpyrifos et leurs mixtures, est considérée comme un bio marqueur du dysfonctionnement rénal et les dommages rénaux. L'urée et la créatinine ce sont des paramètres essentiels pour évaluer la fonction rénale et la filtration glomérulaire (**Cempel, 2004**)

De plus, l'augmentation de l'urée dans le sérum est corrélée avec l'augmentation du catabolisme protéique, les protéines peuvent être dégradées en acides aminés puis en urée et créatinine (L'urée est le produit final de dégradation des protéines). Ceci est confirmé par la diminution des protéines totales dans le sérum. Donc l'augmentation de l'urée et la créatinine chez les lapins traités est due à l'effet néphrotoxique du nickel (**Sunderman *et al.*, 1990 ; Obone *et al.*, 1999**). La créatinine est le meilleur marqueur de la fonction rénale. Elle est formée dans l'organisme par déshydratation non enzymatique de la créatine synthétisée par le foie et stockée dans le muscle. Un taux sérique élevé en créatinine (associé à un taux élevé en urée) traduit une diminution de la filtration glomérulaire. Nos résultats sont en accord avec plusieurs études. **Domingues *et al.*, 2008** ont testé par voie orale l'effet du diuron [3 - (3,4-dichlorophényl) -1,1diméthylurée], un herbicide sur des rats mâles Wistar, ce qui a entraîné une hypercréatinémie et une augmentation du taux sériques en urée. Les mêmes résultats sont obtenus par (**Yousef *et al.*, 2006; Saafi-bensalah *et al.*, 2012**) et (**Cetin *et al.*, 2010**). Il ressort que la Métribuzine et le Mancozèbe provoquent chez les rats mâles et femelles une toxicité dose-dépendante de la fonction rénale.

En ce qui concerne les enzymes hépatiques (TGO et TGP), nous avons remarqué une augmentation significative de leur activité sérique chez les lapins traités par NiCl<sub>2</sub>, CPF et leurs mélanges.

En général, l'activité d'ALAT et d'ASAT est considérablement augmentée après l'administration de divers composés hépatotoxiques, qui conduisent à des lésions hépatocellulaires aiguës ou des obstructions extra-hépatiques probablement due à une cholestase. (**Abou El-Zahab *et al.*, 1997**) rapportent que des agents toxiques provoquent des dommages aux tissus du foie et provoquent une augmentation significative du taux d'ALAT, ASAT et de l'activité de la phosphatase alcaline dans le sérum des rats. Une étude a montré que les xénobiotiques peuvent se transformer au niveau du foie en radicaux libres, ces derniers ont le pouvoir d'induire une hyperactivité cellulaire (**Dimmeler *et al.*, 1997**)

L'augmentation des pesticides et des métaux lourds dans le foie est accompagnée d'une augmentation significative des taux d'ALAT et d'ASAT sériques. Selon (**Williamson *et al.*, 1995**) des niveaux élevés d'aspartates d'alanine aminotransférases sont des paramètres fiables pour détecter des dommages

hépatiques. En règle générale, ces résultats peuvent indiquer des changements dégénératifs et nécrotiques dans le foie (**El-Nekeety et al., 2009**)

Les enzymes sériques TGO, TGP, PAL, sont des enzymes synthétisés au niveau du cytoplasme de la cellule et déchargées dans la circulation en cas de cellules endommagées (**Singh et al., 1998 ; Ozturk et al., 2009**). Ces derniers sont considérés comme de bons indicateurs de la cytolyse hépatique. Ainsi, des taux élevés des enzymes du foie, notamment TGO et TGP, sont fréquemment attribués aux effets métaboliques et/ou toxiques de différentes drogues comme les psychotropes (**Himmerich et al., 2005**), l'alcool (**Liappas et al., 2006**) et les agents polluants tels que les résidus de l'industrie (**Michailova et al., 1998**)

De plus l'augmentation des transaminases est expliquée par l'accumulation des acides aminés comme l'alanine et l'acide glutamique dans le sang provenant de la dégradation des protéines du corps. Ainsi ces acides aminés peuvent se transformés sous l'action des transaminases en composés carboxyliques tel que l'acide  $\alpha$  céto-glutamique et l'acide pyruvique puis en glucose, ce qui traduit la forte activité enzymatique des transaminases. L'augmentation de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline chez les lots traités par les deux polluants et leurs mixtures confirme l'atteinte du tissu hépatique. Cette augmentation peut être dû principalement à la fuite de cette enzyme du cytosol du foie dans la circulation sanguine (**Navarro et al., 2005**)

L'augmentation sérique des aminotransférases est liée à l'effet hépatotoxique des xénobiotiques et leurs associations. Nos résultats sont cohérents avec les résultats de (**Misra et al., 1990**) après le traitement des rats male par  $107\mu\text{mol/kg}$  d'acétate de nickel.

L'élévation observée de la concentration sérique de la bilirubine totale et directe chez les lapins traités par le chlorure de nickel, chlorpyrifos et leurs associations est aussi compatible avec la présence de lésions hépatiques qui est un indicateur de la présence d'une hyperbilirubinémie est clairement démontré par (**Leelavinothan and Kasinathan, 2011**).

L'augmentation de la Bilirubine plasmatique (Totale et Directe) indique le dysfonctionnement dans le foie. Nos résultats montrent une augmentation en bilirubine chez les lapins traités. Ces observations sont en accord avec d'autres études



(Yousef *et al.*, 2008 ; Yousef, 2004 ; Ben Amara *et al.*, 2011). En ce qui concerne les autres métabolites biochimiques : glucide, lipide et protéine ils semblent être affectés par les inducteurs toxiques (NiCl<sub>2</sub>, CPF) et leurs mixtures

Le taux des glucides chez les lapins traités montre une augmentation significative. En fait, il n'existe pas vraiment de règle générale qui permet d'expliquer ou de prédire la toxicité associée à un mélange donné de produits chimique mais peut être expliqué par plusieurs hypothèses comme l'augmentation des réserves énergétiques, ou par des changements structuraux ou de perméabilité des membranes cellulaires (Carp *et al.*, 2000). Des études ont confirmé que le nickel et ses composés peuvent augmenter le taux de glucose dans les tissus animal (Gupta *et al.*, 2012). Des recherches similaires réalisées sur le poisson masculin rouge, ont montré que l'élévation du taux du glucose, peut être le résultat de la dégradation du glycogène par le glucagon sous l'intoxication de nickel. Aussi, le nickel peut induire le métabolisme des réserves de glycogène musculaire (glycogénolyse) par les glucocorticoïdes, conduisant ainsi à l'hyperglycémie plasmatique (Kubrak *et al.*, 2012)

L'augmentation de taux des glucides hépatiques chez les lapins traités expliqué par l'effet inhibiteur des agents polluants sur l'activité enzymatique, lactate déshydrogénase iso enzyme, succinate déshydrogénase et Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase et l'interférence avec la chaîne de transport énergétique résultant une accumulation endocellulaire des glucides (Kramer, 1986) (Ahmadsahib *et al.*, 1989) (Karthikeyan and Bavani, 2009)

Plusieurs études récentes ont ainsi fortement suggéré une association entre exposition aux pesticides et trouble de la glycémie, dont (Codru *et al.*, 2007) qui a rapporté une association entre exposition aux agents organochlorés et troubles de la glycorégulation. Une étude conduite sur plus de 30 000 applicateurs professionnels de pesticides, a montré que sur les 50 pesticides étudiés, 7 produits phytosanitaires (aldrine, chlordane, heptachlore, dichlorvos, trichlorfon, alachlore et cyanazine) ont augmenté le risque de développer un diabète chez les participants à l'étude.

Plusieurs investigations sur les effets des polluants organiques sur le métabolisme énergétique ont été menées. La diminution des réserves de glycogène est une réponse notée chez plusieurs animaux exposés à des insecticides OPs et

carbamate, notamment *Biomphalaria alexandrina*, *Bulinustrincatus* (Sharaf *et al.*, 1974) et *L. acuminata* (Singh et Agarwal., 1989). Chez *L. palustris* exposée à l'hexachlorobenzène en mésocosme, (Baturu *et al.*, 1995) observent une stimulation de l'activité enzymatique d'hydrolyse des polysaccharides et une réduction de la teneur en glycogène dans le manteau et la masse viscérale. Pour la même espèce exposée à des alkyl phénols en mésocosme, Jumel *et al.*, 2002 rapportent une augmentation de la demande énergétique des animaux qui se traduit par une mobilisation rapide des réserves de glycogène du manteau et une diminution de la teneur en protéine et de la masse de la glande à albumen

Une perturbation des taux de lipides. Plusieurs études expérimentales intéressées aux effets des pesticides sur le profil lipidique. L'administration de pesticide, induit chez le rat une hépatotoxicité et une modification de profil lipidique qui se manifeste par une augmentation du taux de Cholestérol et des Triglycérides plasmatiques, et selon (Bouziane, 2002) l'altération du profil lipidique peut être due à une modification sur l'activité des enzymes qui jouent un rôle dans le métabolisme des lipides.

Dans notre travail nous avons mis en évidence une augmentation du taux de protéines chez les lapins traités par le NiCl<sub>2</sub>, CPF et la mixture sauf le NiCl<sub>2</sub> à 250 ppm. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de (Peccini *et al.*, 1994 ; Masaya *et al.*, 2002) qui ont mis en évidence une augmentation significative du taux de protéines totales sous l'effet d'un stress chimique chez des modèles biologiques différents (têtards, protistes ciliés, lapins). Aussi ces résultats sont confirmés par (Redhouane-Salah, 2004) (Rouabhi *et al.* 2006) qui ont mis en évidence une corrélation entre la perturbation du taux de protéines totales et la toxicité par les xénobiotiques. Cet effet est expliqué d'une part par l'induction de la synthèse des protéines de stress en rapport avec le phénomène de bio activation/biotransformation et d'autre part par la peroxydation lipidique générée par les ROS. D'ailleurs, les mêmes constatations ont été faites auparavant par Lagadic *et al.*, 1997 sous l'effet des contaminants chez les invertébrés. Padmaja et Rao, 1994 ont suggéré que la diminution des lipides et des protéines tissulaires chez l'escargot *dissimilis* (Müller) après exposition aux pesticides peut être due à plusieurs mécanismes, parmi lesquels l'utilisation directe des protéines par les cellules pour subvenir aux besoins énergétiques.

### 3- Stress oxydatif

Le stress oxydant se définit classiquement comme un déséquilibre de la balance entre les systèmes de défenses antioxydants et la production des ROS, en faveur de ces dernières (**Favier, 2003**)

Le foie étant le principal organe de l'élimination de déchets toxiques de l'organisme, car elle contient un système enzymatique impliqué dans le processus de détoxification, qui permet de neutraliser toutes les substances toxiques (**Lecluyse et al., 2012**)

Les paramètres biochimiques et enzymatiques chez les organismes exposés aux contaminants toxiques ont été utilisés comme biomarqueurs et peuvent constituer un important outil de diagnostic pour évaluer l'exposition et les effets des xénobiotiques (**Forbes et al., 1997**)

Dans notre étude l'administration du chlorure de nickel, Chlorpyrifos et leurs mixtures chez les lapins a provoqué des dommages oxydatifs. Le nickel avec le cadmium et le chlore, sont considérés comme des stress oxydatifs (**Frenkel et al., 1994**). Le stress oxydant dans la cellule peut être induit soit par une production accrue de ROS ou l'inhibition du système de défense antioxydant. Cet équilibre entre la production et le catabolisme des oxydants est essentiel pour le maintien de l'intégrité biologique des tissus (**Fatima et Mahmoud., 2007**)

Dans notre travail, nous avons mis en évidence une diminution de forme dose-dépendante du GSH en présence de NiCl<sub>2</sub>, CPF et leurs mixtures. Ce résultat a été confirmé par **Vadde & Rama, 2008**. Le glutathion est l'antioxydant non enzymatique majeur dans les cellules animales : c'est le composé réducteur soufré le plus abondant dans le compartiment intracellulaire, impliqué dans le métabolisme, les procédés de transport et dans la protection des cellules contre les effets toxiques des composés endogènes et exogènes, compris les espèces réactives de l'oxygène et les métaux lourds(**Dickinson et Forman, 2002**). De plus le taux de GSH est diminué en raison du taux élevé de superoxyde et les radicaux libres le GSH est convertit en GSSG (glutathion oxydé) (**Bedwal, 1983;Loven et al., 1986**)

GSH est un élément crucial du mécanisme de défense antioxydant, fonctionne comme un capteur de radicaux libres réactifs direct (**Romão *et al.*,2006**). Dans nos conditions expérimentales, nous remarquons une diminution statistiquement significative du taux de GSH cette diminution peut s'expliquer par une réponse adaptative au stress oxydant

La baisse de GSH peut être expliquée par plusieurs hypothèses : Premièrement, Le GSH joue un rôle clé dans la détoxification des radicaux libres (**Hultberg *et al.*,2001**) , dans le cas de nickel, ce dernier interagit directement avec une forte affinité aux groupements thiols (-SH) du GSH, deuxièmes, le glutathion peut aussi interagir avec les radicaux libres générés par ce métalloïde (**Whanger, 1973**).(Ito *et al.*,1998) (**Anicka et Cempei, 2001**). Troisièmes, l'xénobiotique inhibe la glutathion synthétase, et la glutathion réductase (**James *et al.*, 2006**), donc peu de GSH est produit.

La GPx est une enzyme antioxydante clé qui règle le niveau des ROS, elle est fortement dépendante de la concentration en glutathion, l'équilibre de ce système enzymatique peut être essentiel d'éliminer anion superoxyde et peroxydes générés dans les tissus (**Bray et Taylor, 1993; Jung et Henke, 1996**). GPx est capable de non seulement de réduire le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau, mais aussi les hydroperoxydes résultants de l'oxydation des acides gras insaturés, et donc protège les cellules contre les dégâts générés par les polluants (**Pardeep *et al.*, 2004; Leelavinothan et Kasinathan, 2011**)

Nos résultats montrent une diminution de l'activité de GPx chez les lapins traités. La baisse du taux de glutathion réduit est en concordance avec la diminution de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase GPx (première enzyme dans le cycle d'oxydoréduction du glutathion). Ceci est probablement dû à l'apparition d'une grande quantité de peroxydes sous l'influence des xénobiotiques. La capacité du glutathion réduit à réduire les hydroperoxydes formés lors du métabolisme de l'alphaméthrine, sous l'action de la glutathion peroxydase, conduit à l'oxydation massive du glutathion en glutathion oxydé menant à un déséquilibre du rapport GSH/GSSG. La diminution de l'activité de cette enzyme (GPx) montre que les cellules du foie peuvent probablement contenir une forte concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et d'hydro peroxydes organiques (**Little et O'Brien,1968**) (**Hu *et al.*,1988**)

L'effet de NiCl<sub>2</sub>, CPF et leurs mixtures sur la concentration du GSH hépatique et les activités des enzymes antioxydants (GPx, GST) s'accompagne d'une augmentation des radicaux libres ROS. Ces derniers ont initié la peroxydation lipidique (**Upadhyay et al.,2009**)

Concernant la glutathion S-transférase (GST), enzymes catalysant la conjugaison du glutathion (possède un groupement nucléophile -SH) à une grande variété de composés (porteurs de groupements électrophiles) et également impliquée dans le transport et l'élimination de composés réactifs qui effectuent d'autres fonctions antioxydants, L'activité de la GST a également été largement utilisé comme un biomarqueur de stress (**Fitzpatrick et al.,1997**)

Nos résultats ont montré que, l'exposition des lapins au NiCl<sub>2</sub>, CPF et leurs mixtures a induit une augmentation très hautement significative de l'activité GST. L'augmentation de l'activité de GST est hautement corrélée avec la diminution du taux de GSH, et une forme de défense qui traduit la détoxification des xénobiotiques dans l'organisme pour permettre son élimination, et une réponse physiologique pour compenser les altérations qui sont dues aux radicaux libres et qui suggère que le xénobiotique conjugué par le GSH est catalysé par la GST pour réduire son effet toxique, ces résultats sont confirmés par les études de (**Ognjanović et al.,2008**). Des études similaires ont révélé une induction de la GST chez le rat (**Hultberg et al., 2001**). L'induction de cette enzyme a été aussi rapportée chez Mollusques Bivalves tels que *Perna viridis* exposé à différentes doses du cadmium (**Kamel et al.,2012**). La réponse de l'activité de la GST dépend de plusieurs facteurs comme le type de xénobiotique, la concentration, le temps d'exposition et de l'espèce (**Oruç & Üner, 2000**)

Concernant la glutathion S-transférase (GST), cette enzyme joue un rôle important dans la désintoxication des xénobiotiques et elle a une grande capacité à réduire les peroxydes lipidiques (**Griffith,1999;Iscan et al., 2002**)

D'après nos résultats on observe une augmentation très hautement significative de l'activité de CAT dans le foie chez les lapins traités au NiCl<sub>2</sub>, CPF et leurs mixtures comparativement au lot témoin. Catalase joue un rôle important dans la protection de l'organisme contre les dommages du stress oxydant (**Cakmak et Horst, 1991**). Elle consiste en une transformation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en eau et en oxygène moléculaire (O<sub>2</sub>). Or la production de peroxyde d'hydrogène est induite par la présence de composés exogènes à l'organisme, comme c'est

notamment le cas pour les métaux (Casalino *et al.*, 2004). Ainsi Azzouz, 2012 a mis en évidence une forte induction de l'activité CAT chez *Paramecium tetraurelia*, traitées avec deux pesticides : AmistarXtra et le Glyphosate, il en est de même pour les travaux de Benbouzid, 2012 qui a aussi démontré une induction de l'activité Catalase chez ce même modèle biologique suite à un traitement avec des phényl phosphoramidates. Ainsi, nos travaux confirment ceux cités ci-dessus puisque nous avons également mis en évidence une augmentation de l'activité Catalase chez les lapins traités. Selon les résultats obtenus dans notre étude, nous avons marqué une augmentation significative dans le taux de MDA hépatique chez tous les lapins traités.

Dans ce travail, nous avons mis en évidence une augmentation de MDA en présence des deux xénobiotiques testés et leurs mixtures cette augmentation est dose-dépendante. Nos résultats confirment ceux de Recknagel et Turocy (1977) qui a démontré que les produits dérivés d'une fonction oxydative microsomale, sont très toxiques pour les cellules de *Paramecium multimicronucleatum*., Sbartai (2013) et Djekounet *al* (2012) ont mis en évidence une augmentation du taux de MDA chez respectivement *Paramecium* sp et *Sacharomyces cerevisiae*. Il en est de même concernant les travaux de Grara (2011) sur les gastéropodes *Helix aspersa* ou encore Zaouani (2010) qui a mis en évidence une augmentation du taux de MDA chez des rats traités par des pesticides

Dans notre étude, nous avons montré que les paramètres liés au stress oxydants étaient tous élevés tels que la production du malonyldialdéhyde (MDA) et la quantité de protéines sériques et surtout la fraction ayant des groupements thiols. L'augmentation observée du taux de MDA un marqueur clé du stress oxydant et de la peroxydation lipidique est en accord avec plusieurs études sur des modèles animaux qui ont constaté une augmentation de MDA dans le sang (Baynes, 1991). L'augmentation de la concentration du MDA suggère une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Kakkaret *al.*, 1997) qui attaquent les acides gras polyinsaturés de la membrane cellulaire et provoque la peroxydation lipidique (Battacharya *et al.*, 1997). L'augmentation des ROS pourrait être due, soit à l'augmentation de leur production suite à l'état inflammatoire observé, soit à une réduction de leur élimination suite à l'épuisement des systèmes antioxydants piègeurs tel que rapportent Cho *et al.* (2002). Ces produits de la peroxydation lipidique sont nocifs pour les cellules de l'organisme et sont associés à l'athérosclérose, les

dommages des reins ainsi que plusieurs autres dommages tissulaires (**Kakkaret et al., 1997**)

#### 4- L'activité spécifique de l'AChE

L'AChE est une enzyme clé du système nerveux central des insectes ; cet enzyme de neurotoxicité découverte par **Naschmanshn (1938)**, joue un rôle crucial dans la neurotransmission cholinergique par l'hydrolyse rapide du médiateur chimique, l'acétylcholine (**Guèdes et al., 1997 ; Jensen, 1998 ; Rebeiro et al., 1999 ; Charpentier et al., 2000 ; Ischaaya, 2001**). L'hydrolyse de l'acétylcholine par l'AChE permet la fermeture des canaux associés aux récepteurs du neurotransmetteur ; si l'action de cette enzyme est bloquée, la membrane post synaptique reste continuellement excitée ce qui conduit à l'accumulation dans la région synaptique provoquant une hyperexcitation causant la mort de l'insecte (**Haubruge et Amichot, 1998**).

Dans notre travail, l'activité de l'AChE diminue progressivement suite à l'exposition des lapins au NiCl<sub>2</sub>, CPF et de la mixture. Des travaux appuient nos résultats, notamment ceux de **Bouaricha, (2013); Salama et al., (2005)**. Des études *in vitro* et *in vivo* menées sur des mammifères, des poissons ou des invertébrés ont signalé une inhibition de l'AChE par des métaux, parmi lesquels le cadmium (**Schmidt & Ibrahim, 1994**). Selon **Coeurdassier et al. (2001)** ont également démontré que l'activité AChE est inhibée après l'exposition des escargots *Helix aspersa* au diméthoate.

Des effets neurotoxiques de substances organiques non-molluscicides ont été évalués, notamment par **Rorke et al. (1974)** qui observent une inhibition de 90% de l'activité des cholinestérases dans l'hémolymphe de *Helix aspersa* provoquée *in vitro* par une solution de 10-4g/L fenitro-oxon (OPs) ou de physostigmine (carbamate)

#### 5- Étude subcellulaire

La mitochondrie est les cibles intracellulaires clés pour différents facteurs de stress généré par le Cd mais les mécanismes de dommages-mitochondriale induite par ce métal ne sont pas entièrement compris. Des études antérieures ont indiqué que le traitement des cellules avec des Cd entraîné des altérations mitochondriales spécifiques, démontrée dans les hépatocytes de rat. Par conséquent la fonction

respiratoire est devenue enflée et arrondie, et la mitochondrie diminuée avec le temps (**Giuseppe et al.,2009**)

Dans notre étude,l'analyse des résultats obtenus montre une augmentation de gonflement mitochondrialchez les lapins traitéspar NiCl<sub>2</sub>,CPF et leurs mixtures par rapport aux témoins(**Giuseppe et al.,2009**) ont montré que le gonflement mitochondrial accompagné à l'acidification moyenne anormale due à la production de lactate, et d'une manière générale les xénobiotiques agissent principalement sur le compartiment mitochondriale en induisant un stress cellulaire oxydatif, modulant homéostasie intracellulaire d'oxydo-réduction et la peroxydation des lipides, la mutation ADNmt, à altérer l'expression des gènes et causer finalement l'apoptose,

D'autre part, le gonflement mitochondriales est un mécanisme s'accompagnant de profonds remaniements, on commencer par l'augmentation de la production de ROS par les xénobiotiques entraine l'ouverture des pores de transition de perméabilité (PTPM), l'ouverture de ces pores provoque un déséquilibre osmotique entre la matrice et l'espace intermembranaire se crée, ayant pour conséquence le gonflement de la matrice et la fragmentation de la membrane externe, alors la mitochondries est dégradé ensuite les protéines pro-apoptotiques tels que le cytochrome c, AIF (Apoptose Inducting factor) et les caspases qui séquestrées dans l'espace intermembranaire sont libérées dans le cytosol initiant une cascade de réaction qui aboutit à l'apoptose ( la mort cellulaire), traduit par un nécrose hépatique (**Skulachev,1996**)

Dans un premier temps, nous avons suivi la consommation d'oxygène chez les mitochondries isoléeNous avons mis en évidence une diminution de consommation d'O<sub>2</sub> chez les lapins traités par NiCl<sub>2</sub>, CPF et leurs mixtures car les inhibiteurs de la chaîne respiratoire sont des éléments chimiques qui par leur liaison avec l'enzyme ralentissent la vitesse de réaction enzymatique du complexe cible (la cytochrome oxydase ou complexe IV pour le cyanure). Leur action de poison très spécifique apermis d'élucider de nombreux mécanismes du fonctionnement de la chaîne respiratoire in vitro. (**Djebar et Moreau,1990**). En effet, certaine métabolite réactif se fixe de façon covalente à plusieurs protéines mitochondriales, ce qui pourrait non seulement faciliter l'ouverture des PTPM mais également entraîner d'autres dysfonctionnements mitochondriaux conduisant à une réduction de la production d'énergie ( **Masubuchi et al .,2005, Ruepp et al.,2002**).Quel que soit le mécanisme



impliqué, la conséquence principale de l'ouverture des PTPM est la mort cellulaire par apoptose, ou par nécrose, en fonction du nombre de mitochondries impliquées. **Chagra et al., (2009)** ont observé un gonflement mitochondrial suite au traitement par le Cadmium chez les mitochondries isolées de pommes de terre

Dans notre travail, nous avons observé les effets du NiCl<sub>2</sub>, CPF et leurs mélanges sur la perméabilité et la respiration de mitochondries isolées des lapins. Des études ont prouvé qu'en cas de surdosage au médicament, la respiration mitochondriale des hépatocytes de rat est inhibée en raison d'une forte diminution des taux d'ATP (**Bernuau et al., 1986**). **Kon et al (2004)** expliquent que le mécanisme de transition de perméabilité mitochondriale pourrait être un des mécanismes fondamentaux impliqués dans les altérations de la chaîne respiratoire en condition d'intoxication au médicament. **Jasso-Chavez et al(2010)** ont mis en évidence une forte inhibition de la respiration des mitochondries isolées à partir d'*Euglena gracilis* traitées avec du chrome (Cr). Les auteurs constatent que la cytotoxicité du Cr entraîne à la fois la diminution de la respiration, de la glycolyse et par conséquent, une baisse de l'ATP cellulaire

La chaîne respiratoire mitochondriale produit en permanence des espèces oxygénées réactives à partir d'une fuite d'électrons en amont du complexe IV. Ces électrons s'associent à l'oxygène pour constituer des superoxydes puis secondairement du Peroxyde d'hydrogène. Le GSH, la SOD et la GPX et la CAT se chargent de piéger ces espèces oxygénées réactives au sein de la mitochondrie. En effet l'atteinte de la chaîne respiratoire mitochondriale engendre une hyperproduction d'espèces oxygénées réactives, (**Chagra et al., 2009**)

Le MDA est l'aldéhyde actif principal de la peroxydation des acides gras poly insaturés des membranes, c'est également un sous-produit de la biosynthèse de la prostaglandine (**Coeurdassier, 2001**), Notre intérêt s'est porté sur l'évolution du taux de MDA, car ces molécules lorsqu'elles sont abondantes dans le milieu intracellulaire rendent compte d'une toxicité spécifiques aux radicaux libres. En effet, selon (**Bebianno et al., 2005**) et (**Al-Mutairi et al., 2007**), l'augmentation du taux de Malondialdéhyde indique une peroxydation lipidique, cette dernière est suivie de changements et d'une dégradation des structures membranaires, Il s'ensuit une perte des récepteurs et des enzymes de la membrane (**Pampanin et al., 2005**)

Dans notre travail, nous avons mis en évidence une augmentation de MDA en présence de NiCl<sub>2</sub>, CPF et leurs mélanges cette augmentation est dose-dépendante. Nos résultats confirment ceux de **(Recknagel et Turocy, 1977)** qui a démontré que les produits dérivés d'une fonction oxydative microsomale, sont très toxiques pour les cellules de *Parameciummultimicronucleatum*.**(Zaouani, 2010)** qui a mis en évidence une augmentation du taux de MDA chez des rats traités par des pesticides

Nos résultats ont montré une forte activité enzymatique antioxydante reflétée par une augmentation des activités de catalase et de GST connues pour leur rôle dans la détoxification des radicaux libres, parallèlement à la diminution de GSH qui est également un excellent biomarqueur de toxicité. et une diminution de l'activité GPx

Une baisse du taux de GSH peut être considérée comme un indicateur de toxicité via la génération d'un stress oxydant. La voie de biosynthèse du GSH est constituée de deux étapes principales : la liaison du glutamate à la cystéine est catalysée par la  $\gamma$ -glutamylcystéine synthase (GCS), puis la liaison entre la glutamylcystéine et la glycine est catalysée par la glutathion synthétase (GS). Il intervient notamment dans la détoxification des xénobiotiques en neutralisant divers produits du stress oxydant grâce à son potentiel réducteur mais également dans la prolifération cellulaire et la régulation de l'apoptose **(Sies, 1999 ; Dringen, 2000)**. Une déficience en GSH expose les cellules à un risque de dommage oxydatif **(Droge, 2002)**.

Nos résultats ont confirmé que le traitement par NiCl<sub>2</sub>, CPF et leurs mélanges induit des taux élevés de Cyt-c suivis d'une apoptose, ce qui est confirmé par une quantité élevée de perméabilité et de gonflement mitochondrial. Lors de l'exposition à un pesticide, le chemin d'induction de l'apoptose prédominant qui dépend des mitochondries<sup>43</sup>. Ce schéma nécessite la libération dans le cytosol de protéines apoptogènes contenues dans l'espace inter-membranaire des mitochondries telles que l'AIF ou Cyt-c. Ce dernier, une fois ré-expansé dans le cytoplasme, résultant dans le recrutement Apaf-1 et proCas-9. Ce trimère, nommé apoptosome, conduit à l'activation de Cas-9, initiateur de la voie mitochondriale. Ce dernier conduit à l'activation de Caspase. Différents mécanismes controversés réalisent encore la libération de protéines apoptogènes de la mitochondrie au cytosol**(Jevtić et al., 2016)**. Le pore de transition de perméabilité (PT du pore) serait associé à la réduction de la membrane mitochondriale potentielle ( $\Delta\psi_m$ ). La chute du potentiel conduit à une entrée massive d'eau et d'ions provoquant un gonflement et finalement

une perturbation physique de la membrane externe mitochondriale responsable de la libération des protéines apoptogènes (Fromenty, 2010) (Ming-Yuan *et al.*, 2015)

En outre, le Cyt-c synthétisé comme un précurseur apo-cyt-c, il est ensuite transporté dans la mitochondrie, où il est converti en protéine globulaire appelée holoCyt-c qui permet le transport d'électrons entre le complexe III et IV de la respiration mitochondriale<sup>49</sup>. le Cyt-c peut être transloqué à partir des mitochondries dans le cytoplasme de la cellule. Dans la plupart des cas, la libération de Cyt-c dépend de l'activité de Cas (Dayal *et al.*, 2001) (DiMauro, & Schon, 2008). Heiskanen *et al.* (1999) ont montré que la libération de Cyt-c et la chute de  $\Delta\Psi_m$  ont eu lieu en même temps

Les espèces réactives de l'oxygène et le cytochrome c sont alors rejetés de la mitochondrie vers le cytosol où ils activent les caspases qui à leur tour vont conduire à l'apoptose. De plus, les ERO relâchées vont dégrader des protéines cellulaires. Dans le cas d'une diminution sévère de l'ATP, une nécrose cellulaire survient, alors que dans le cas d'une diminution modérée, la cellule va tenter de stabiliser tant que possible la dégradation des protéines. Suite à cet effet, des mécanismes cellulaires vont être perturbés et d'autres vont se mettre en place pour essayer d'atténuer la toxicité des polluants (ex : surexpression de certains gènes de détoxification ou de compensation) (Pinot *et al.*, 2000). Des études *in vitro* de fibroblastes-foetal de poumons humains ont montré que les ERO générés par les métaux conduisent à une dépolarisation membranaire de la mitochondrie, à une altération dans le transfert d'électrons de la chaîne respiratoire et à une diminution de l'ATP suite à une inhibition de l'ATP synthase et à l'oxydation de l'ADN mitochondrial (Freeman et Crapo, 1982; Doelman *et al.*, 1990; Yang *et al.*, 1997). Le Cd est aussi capable de déplacer le zinc des MT (Dallinger *et al.*, 1997), or une augmentation en ion libre de zinc dans les mitochondries peut conduire à un blocage de la respiration mitochondriale, qui en conséquence va conduire à une ouverture du pore de transition de la perméabilité membranaire, puis un rejet du cytochrome c, la génération de ERO (Bossy-Wetzel *et al.*, 2004) et à l'apoptose



---

## Conclusion et perspectives

### Conclusion

Le principal objectif de notre travail de thèse était d'étudier les effets de deux xénobiotiques, le chlorure de nickel ( $\text{NiCl}_2$ ), le chlorpyrifos (CPF) et de leurs mixtures appliquées par voie orale, à deux concentrations, sur les lapins *Oryctolagus Cuniculus* utilisés comme modèle indicateur. Les expérimentations ont été menées sur les paramètres morphologique, la biochimie plasmiq ue et tissulaire de foie, la mesure de quelques biomarqueurs du stress oxydant (AChE, GST, CAT, MDA et GPx) cytosolique et mitochondrial.

Les xénobiotiques testés et leurs mixtures entraînent une réduction significative des paramètres physiologiques tels que le poids corporels, gain du poids et une augmentation des poids relatif de foie

D'un autre coté le paramètre biochimique est également affecté par les différents traitements avec une forte perturbation des différents métabolites cellulaire dont les protéines les glucides et les lipides

Une action neurotoxique est exercée par les différentes traitement se traduisant par une inhibition de l'activité de l'AChE. les deux polluants et leurs mixtures induisent également les systèmes de détoxification par les baie d'une augmentation des activités de GST.GPX et une diminution des taux de GSH, de MDA

L'effet de CPF,  $\text{NiCl}_2$  et leurs mixtures sur la mitochondrie montre un effet toxique à travers l'inhibition de la quantité d' $\text{O}_2$ , l'induction de la perméabilité et le gonflement mitochondriale de plus nous avons également mis en évidence une perturbation de l'activité enzymatique et non enzymatique

### Perspectives

En perspectives, il serait intéressant de développer cette recherche de point de vue opérationnel par approfondissement de la connaissance sur :

- Dosage des caspases et autres protéines de l'apoptose
- Étude histopathologique
- Dosage de SOD.LDH
- Étude au niveau lysosomique
- Utilisation des extraits médicinales pour améliorer cette toxicité



---

## Références bibliographiques

### A

- **Abou, El., Zahab, HS., El Khyat, ZA., Awadallah, R. 1997.**Physiological effects of some synthetic food coloring additives on rats. *Boll Chim Farm*; 136 (10): 615-627.
- **ACTA. 2004.**Association de Coordination Technique Agricole.Index phytosanitaire, 40<sup>ème</sup> édition.804p.
- Ahammadsahib, K.I., Jinna, R.R. and Desai, D. 1989.** Protection against cadmium toxicity and enzyme inhibition by dithiotheritol. *Cell. Biochem. Funct.*, 7, 185-192.
- **Al-Mutairi, D. A., Craik, J. D., Batinic-Haberle, I., Benov, L. T.2007.** Induction of oxidative cell damage by photo-treatment with zinc metal N-methylpyridylporphyrin. *Free radical research*, 41, 89-96.
- Amiard, J-C., Caquet, T and Lagadic, L. 1998.**Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement. In Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. *Paris. Lavoisier, Technique et Documentation.* pp. XXI-XXXI
- Anicka, K., Cempei, M.2001.**Lipid peroxidation and selected antioxidants in rat liver after oral exposure to nickel (II) chloride Bromate. *Chem. Toksykol.* 34 (4). p : 291
- Aubertot, J.N., Barbier, J.M., Carpentier, A., Gril, J.J., Guichard, L., Lucas, P., Savary, S., Savini, I., Voltz, M. .2005.**Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux. Rapport d'expertise scientifique collective, *INRA et Cemagref (France).*
- Azouz, A. 2012.**Effet des poussièresmétalliques d'origine industrielles sur un organisme animal bio indicateur de pollution ;*Helix aspersa*.Thèse Doctorat.Universite Badji Mokhtar .Annaba.45p

### B

- Bartolini, A., 2014.**Astronomical calibration of the Toarcian Stage: Implications for sequence stratigraphy and duration of the early Toarcian OAE. *Earth Planet. Sci. Lett.* 386, 98–111.

- Basketter, D.F., Gerberick, I, Illis, C.1999.**Toxicology of contact dermatitis: Allergy and urticaria .Ed. *Current toxicology series*. P180
- Battacharya, SK., Satyan, KS., Ghosal, S.1997.** Antioxidant activity of glycowithanolides from *Withania somnifera*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 35 : 236 - 239.
- **Baturo, W., Lagadic, L., Caquet, T., 1995.** Growth, fecundity and glycogen utilization in *Lymnaea palustris* exposed to atrazine and hexachlorobenzene in freshwater mesocosms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14 (3), 503-511.
- **Baynes, J.W. 1991.** Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*, 40. 405-412
- Bebianno, M.J., Company, R., Serafim, A., Cosson, R.P., Fiala-Medoni, A., 2005.** Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathy-modiolus azoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Aquat. Toxicol*, 75. 354–373.
- **Bedwal, R.S., Bahuguna, A. 1994.** Zinc, copper and selenium in reproduction. *Experientia*, 50. 626-640.
- Belabed, Bourhane – Eddine. 2010.** La pollution par les métaux lourds dans la région d'Annaba « Sources de contamination des écosystèmes aquatiques. Thèse de doctorat. Université d'Annaba. p 15
- **Ben Amara, I., Troudi, A., Garoui, E.M., Hakim, A., Boudawara, T., Zeghal, K.M., Zeghal, N. 2011.** Protective effects of selenium on methimazole nephrotoxicity in adult rats and their offspring. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 63. 553-561
- Benbouzid, H.2012.**Evaluation et étude de la toxicité d'une famille d'acaricide sur des protistes ciliés. Thèse Doctorat. Université Badji Mokhtar. Annaba. 87p
- Bertouille, S. 1978.** Absorption et localisation du cadmium chez le soja. Mémoire de doctorat. Université de France. 458p
- **Bismuth, C. 1993.** Armes chimiques, description et risques toxiques. *Reanim Urg* .2:625-33
- **Blanchet, G., Carpentier, P., Lallement, G. 1991.** Vulnérabilité du système nerveux central vis-à-vis des neurotoxiques organophosphorés. *Méd Armées*. 19 . 403-7



- **Bliefert, C., Perraud, R. 2003.** Chimie de l'environnement Air-Eau-Sols, sols – déchets. Ed. *ADEME*. PP : 369-387
- **Bocquené, G., Galgani, F., Walker, C.H.1997.** Les cholinestérasés, biomarqueurs de neurotoxicité. In: Biomarqueurs en Ecotoxicologie: Aspects Fondamentaux. Masson, Paris. pp. 209-240
- **Bonfanti, P., Colombo, A., Orsi, F., Nizzetto, I., Andrioletti, M., Bachetta, R., Mantecca, P., Fascio, U., Vailati, G. and Vismara, C. 2004.** Comparative teratogenicity of chlorpyrifos and malathion on *Xenopus laevis* development. *Aquatic Toxicology*. 70. 189-200
- Bonnard, N., Brondeau, M.T., Facly, M., Serre, P. 2009.** Nickel et ses oxydes. *Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS)*. P : 07
- Bonnard, N., Brondeau, M.T., Pillière, F., Proois, J. C., Schneider, O., Serre, P. 2002.** Sélénium et compos. *Toxicologie* .150 .1-8
- **Borzelleca, J.F., Clarke E.C. et Condie L.W. 1989.** « Short-term Toxicity (1 and 10 days) of Cadmium Chloride in Male and Female Rats : Gavage and Drinking Water », *J. Am. Coll. Toxicol.*, 8. 377-404.
- Bouaricha, H.2013.** **Évaluation** du stress oxydatif induit par Prolamine : Essai comparatif sur deux modèles biologiques. Thèse Doctorat. Université Badji Mokhtar. Annaba. 55p
- **Boulila, S., Galbrun, B., Huret, E., Hinnov, L. A., Rouget, I., Gardin, S., Bartolini, A.2014.** Astronomical calibration of the Toarcian Stage: Implications for sequence stratigraphy and duration of the early Toarcian OAE. *Earth Planet. Sci. Lett.* 386. 98–111.
- Boumaiza, M., Ktari, M.H and Vitiello, P.1979.** Toxicity of several pesticides used in Tunisia, for *Aphanius fasciatus* Nardo, 1827 (Pisces, Cyprinodontidae). *Arch. Inst. Pasteur, Tunis* 56 (3) : 307-342
- Bouziane, M. 2002.** Caractérisation structurale de quelques molécules organiques dans la plante : *Cotula cinerea* de la région d'Ouargla. Université Ouargla. P53
- Bossy-Wetzel, E., Talantova, M.V., Lee, W.D., Schölzke, M.N., Harrop, A., Mathews, E., Götz, T., Han, J., Ellisman, M.H., Perkins, G.A., Lipton, S.A., 2004.** Crosstalk between Nitric Oxide and Zinc Pathways to Neuronal Cell Death Involving Mitochondrial Dysfunction and p38-Activated K<sup>+</sup> Channels. *Neuron* 41. 351-365

- Bradford, M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72. 248-254
- Bray, T.M. et Taylor, C.G. 1993.** Tissue glutathione, nutrition, and oxidative stress. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 71. 746-751
- **Brocardo, PS., Assini, F., Franco, JL., Pandolfo, P., Müller, YM., Takahashi,RN.2007.** Zinc attenuates malathion-induced depressant-like behavior and confers neuroprotection in the rat brain. *Toxicol Sci.* 97. 140–48.
- **Brock, T.C.M., Van den, B., Bos, A.R., Van, B. S.W.F., Reiche R., Terwoert, J., Suykerbuyk, R.E.M. and Roijackers, R.M.M. 1992.** Fate and effects of the insecticide Dursban 4e in indoor Elodea-dominated and macrophyte-free freshwater model ecosystems: I. Secondary effects on community structure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 23. 391-409.
- **Brun, R. 1979.** Nickel dans les aliments et eczéma de contact. *Dermatological.* 159: 365-70.
- **Buchwalter, D.B., Sandahl, J.F., Jenkins, J.J. and Curtis, L.R. 2004.** Roles of uptake, biotransformation, and target site sensitivity in fourth instar Chironomus riparius (Meigen). *Aquatic Toxicology.* 66 .149-157.
- **Buffat, JJ., Bonsignour, JP., Ricordel, I., Diraison, Y. 1989.**Toxicité des " gaz " de combat. In : JEPU, éd. La réanimation respiratoire pré hospitalière. Paris : *Arnette*. p. 67-91.

## C

- Cakmak, E.T., Horst.1991.** Effects of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia plantarum.* 83. 463-468
- **Calvet, R .1983.** Absorption of organic chemicals in soils. *Environmental Health Perspectives.* 85. 145-177
- Campoy, C., Jimenez, M., Olea-Serrano, M.F., Moreno Frias, M., Canabate, F., Olea, N., Bayés, R. and Molina-Font, J.A., 2001.** Analysis of organochlorine pesticides in human milk: preliminary results. *Early Hum dev.* 65 Suppl; S 183-190

- children. *Environ Health Perspect.* 116(4); 537-542.
- Caplat, C. 2001.**Caractérisation géochimique de sédiments fins du littoral du Calvados (Baie de Seine) – Comparaison de matériaux portuaires contaminés à des matériaux non contaminés de la baie des Veys, Université de Caen, Th.Univ. Sciences de la Terre et de l'Univers, 182p
- Carpy, SA., Kobel, W., Doe, J. 2000.** Health risk of low-dose pesticide mixtures: a review of the 1985–1998 literature on combination toxicology and health risk assessment. *J Toxicol Environ Health B* 3. 1–25.
- Casalino, E., Sblano, C., Landriscina, V., Calzaretti, G. 2004.** Rat glutathion hépatique S- activité de transférase après stimulation cadmium aiguë ou une intoxication au manganèse. *Toxicologie*200. 29-38.
- Cavelier, C., Foussereau, J.1996.** Allergie de contact aux métaux et à leurs sels. Fiche d'allergologie-dermatologie professionnelle TA 57. Documents pour le médecin du travail. Paris (*INRS*). P 44
- **Cempel, M., Janicka, K. 2002.** Distribution of nickel, zinc, and copper in rat organs after oral administration of nickel (II) chloride.*Biol. Trace Elem. Res.* 90(1-3). 215-226.
- Cempel, M. 2004.** Effect of nickel (II) chloride on iron content in rat organs after oral administration. *In Biol Trace Elem Res., vol. 102, no. 1-3.* 189-98.
- **Cetin, E., Kanbur, M., Silici, S., Eraslan, G. 2010.**Prometaphase-induced changes in haematological and biochemical parameters of female rats: protective role of propolis. *Food Chem Toxicol.* 48(7). 1806-1810.
- **Chagra, A., Djebbar, M. R., Rouabhi R. and Berrebbah H. 2009.** Cadmium Induced Changes in Metabolic Function of Mitochondrial Isolated from Potato Tissue (*Solanum tuberosum L.*). *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 5 (1). 35-39.
- Chambers, J.E. and Carrie, R.L.1995.** Biochemical mechanisms contributing to species differences in insecticidal toxicity. *Toxicology* 105. 291-304
- **Charpentier, A., Menozzi, P., Marcel, V., Villatte, F.,Fournier, D. 2000.** A method to estimate acetylcholinesterase-active sites and turnover in insects. *Ann. Biochem.* 285. 76-81

- **Chen, Y., Knösel, T., Kristiansen, G., Pietas, A., Garber, M., Matsushashi, S. 2003.** Loss of PDCD4 expression in human lung cancer correlates with tumor progression and prognosis. *J Pathol*, 200. 640–646
- **Chiffolleau, JC.2001.** La contamination métallique, Ifremer. Région Haute Normandie's. *Programme scientifique Seine-Aval*. 8 - 39
- **Chiffolleau, Y., Dreyfus, F., Touzard, J-M. 2001.** « Chercheurs et viticulteurs partenaires pour l'innovation : interactions, institutions et apprentissages », *Natures, Sciences et Sociétés*. 3. 29-36
- **Chindah, A.C., Sikoki, F.D. and Vincent-Akpu, I. 2004.** Toxicity of an organophosphate pesticide (chlorpyrifos) on a common Niger Delta wetland fish *Tilapia Guineensis* (Blecker 1862). *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*. 8 .11-17.
- **Cho, SY., Park, JY., Park, EM., Choi, MS., Lee, MK., Jeon, SM., Jang, MK., Kim, Mj., Park, YB. 2002.** Alternation of hepatic antioxidant enzyme activities and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats by supplementation of dandelion water extract. *Clinica Chimica Acta*, 317. 109 – 117
- **Coeurdassier, M.2001.**Utilisation de mollusques gastéropodes pulmonés terrestre (*Helix aspersa*)et aquatiques (*lymia stagnalis*)comme indicateurs de pollution par les élémentsmétalliques et les xénobiotiques .Thèse de doctorat.Université de France.*J Biol Chem*. 236. 262-268
- **Codru, N., Schymura, MJ., Negoita, S., Rej, R., Carpenter, DO. 2007.** Diabetes in relation to serum levels of polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides in adult Native Americans. *Environ Health Perspect*. 115. 1442–1447
- **Čolović, M.B., Krstić, D.Z., Ušćumlić, G.S. and Vasić, V.M. 2011.** Single and simultaneous exposure of acetylcholinesterase to diazinon, chlorpyrifos and their photodegradation products. *Pesticide Biochemistry and Physiology*.100. 16-22
- **Colville, A., Jones, P., Pablo, F., Hose, G. and Lim, R.2008.** Effects of chlorpyrifos on macroinvertebrate communities in coastal stream mesocosms. *Ecotoxicology*. 17. 173-180.
- **Cotton, FA., Wilkinson, G. 1988.** Advanced Inorganic ChemistryAComprehensiveText Wiley-Interscience. New York JohnWileyandSons. 783-798.

- **Coupe, R.H and Blomquist, J.D. 2004.** Water-soluble pesticides in finished water of community water supplies. *J. AWWA.* 96 . 56-58.

-**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>

### D

-**Dallinger, R., Egg, M., Köck, G., Hofer, R., 1997.** The role of metallothionein in cadmium accumulation of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) from high alpine lakes. *Aquatic Toxicology* 38. 47-66.

- **Dam, K., Garcia, S.J., Seidler, F.J. and Slotkin, T.A., 1999.** Neonatal chlorpyrifos exposure alters synaptic development and neuronal activity in cholinergic and catecholaminergic pathways. *Developmental Brain Research.* 116. 9-20

- **Dannenberg, A and Pehkonen, S.O.1998.** Investigation of the heterogeneously catalyzed hydrolysis of organophosphorus pesticides. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 46. 325-334

- **Dayal, M. et al.2001.** Induction of Rat Brain Cytochrome P450s by Deltamethrin: Regional Specificity and Correlation with Neurobehavioral Toxicity. *Neurotox. Res.* 3. 351-357.

- **Demir, F., Uzun, F.G., Durak, D and Kalender, Y. 2011.** Subacute chlorpyrifos-induced oxidative stress in rat erythrocytes and the protective effects of catechin and quercetin. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 99. 77-81

-**Derache, R. 1989.**Toxicologie et sécurité des aliments. Paris : *Tech Doc-Lavoisier*, 159-78documentation, *Ed Lavoisier*, Paris. 55p

-**Dickinson, DA., Forman, HJ. 2002.** Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol.*64 .1019-26

- **Dieter, M.P., Jameson, C.W., Tucker, A.N. et al. 1988.** Evaluation of tissue disposition, myelopoietic, and immunologic responses in mice after long-term exposure to nickel sulfate in the drinking water. *J. Toxicol. Environ. Health.* 24(3). 357-72

- **Dimauro, S., Schon, E. A. 2008.** Mitochondrial disorders in the nervous system. *Ann. Rev. Neurosci.* 31. 91-123.
- **Dimmeler, S., Hermann, C., Galle, J. and Zeiher, A. M. 1999.** "Upregulation of superoxide dismutase and nitric oxide synthase mediates the apoptosis suppressive effects of shear stress on endothelial cells." *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology* 19(3). 656-64.
- **Djebali, N. 2008.** Etude des mécanismes de résistance de la plante modèle *Medicago truncatula* vis-à-vis de deux agents pathogènes majeurs des légumineuses cultivées: *Phoma medicaginis* et *Aphanomyces euteiches*. Thèse de doctorat. Université de Toulouse. 209 P
- **Djebar, H., Djebar, M.R., 2000.** Bioénergétique, Les mitochondries végétales. Revue des sciences et technologie ; Synthèse 2000. Université d'Annaba. *Edition Végarol* . 103P
- **Djekoun, M., Djebar, M.R., Zaoui, L., Bensoltane, S., Djebar, H. 2012.** Biochemical, Enzymatic and Energy Alteration observed in *Saccharomyces cerevisiae* subjected to oxidative stress. *AEJTS*:2 (1).36 P
- **Doelman, C.J.A., Leurs, R., Oosterom, W.C., Bast, A. 1990.** Mineral dust exposure and free radical-mediated lung damage. *Experimental Lung Research* 16. 41-55.
- **Dominguez, T., Dunkel-Schetter, C., Glynn, L., Hobel, C., Sandman, C. 2008.** Racial differences in birth outcomes: the role of general, pregnancy, and racism stress. *Health Psychology*, 27(2). 194-203
- **Downing, A.L., Devanna, K.M., Rubeck-Schurtz, C.N., Tuhela, L., Grunkemeyer, H. 2008.** Community and ecosystem responses to a pulsed pesticide disturbance in freshwater ecosystems. *Ecotoxicology*, 17, 539-548.
- **Dupas D. 2008.** Allergie respiratoire professionnelle au nickel. Fiche d'allergologie-pneumologie professionnelle TR 41. Documents pour le médecin du travail. Paris. *INRS*. P6
- **Draper, H.H., Hadley, M. 1990.** Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* 186. 241-431.
- **Dringen R., 2000.** Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology* 62. 649-671

-**Droge W., 2002.** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*, 82. 47- 95

-**Duchateau, G., Florkin. 1959.** For *trehalosemie* of insects and its signification. *Arch. Insect. Physiol. Biochem*, 67. 306-314.

### E

- **Echevarria, G., Massoura, S.T., Sterckeman, T. et al. 2006.** Assessment and control of the bioavailability of nickel in soils. *Environ. Toxicol. Chem.* 25(3). 643-51

-**Eel. A., WHO, E. 2002.** Children's Health and Environment: A review of evidence

- **Ehrmann, DA .2012.** Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med.* 352. 1223- 1236.

- **Eisler, R. 2000.** Handbook of Chemical Risk Assessment. Health Hazards to Humans, Plants, and Animals. Volume 2: *Organics.* Lewis Publishers, Washington, D.C. Chapter 14. pp 883-902

-**El Hraiki, A., Kessabi, M., Sabhi, Y., Bernard, P., Buhler, D.R. 1992.** Contamination par le cadmium, le chrome, le mercure et le plomb des produits de la pêche marocaine prélevés en mer Méditerranée. *Rev Med Vet.*143 : 49-56.

- **Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M. 1961.** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemistry and Pharmacology*7. 88-95

- **El-Merhibi, A., Kumar, A. and Smeaton, T. 2004.** Role of piperonyl butoxide in the toxicity of chlorpyrifos to *Ceriodaphnia dubia* and *Xenopus laevis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57. 202-212

- **El-Nekeety, A.A., El-Kady, A.A., Soliman, M.S., Hassan, N.S., Abdel-Wahhab, M.A., 2009.** Protective effect of *Aquilegia vulgaris* (L.) against lead acetate-induced oxidative stress in rats. *Food Chem. Toxicol.* 47. 2209–2215

### F

- **Farahat, F.M., Fenske, R.A., Olson, J.R., Galvin, K., Bonner, M.R., Rohlman, D.S., Farahat, T.M., Lein, P.J. and Anger, W.K. 2010.** Chlorpyrifos exposures in egyptian cotton field workers. *NeuroToxicology*, 31. 297-304

- Fatima, S., Mahmood, R. 2007.** Vitamin C attenuates potassium dichromate-induced nephrotoxicity and alterations in renal brush border membrane enzymes and phosphate transport in rats. *Clin Chim Acta*.386(1.2). 94-9
- Favier, A. 2003.** Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. Mécanismes biochimiques. *L'actualité Chimique*,.108-115
- Fitzpatrick, P.J., O'Halloran, J., Sheehan, D., Walsh A.R. 1997.** Assessment of a glutathione S-transferase and related proteins in the gill and digestive gland of *Mytilus edulis*(L.) as potential organic pollution biomarkers. *Biomarkers*, 2: 51–56
- **Forbes, V.A., Forbes, T.L., Riviere, J.L. 1997.** Ecotoxicologie: theorie et applications. *Editions Quae*, Paris.200-210
- Fox, J.L. 1994.** Snow leopard conservation in the wild - a comprehensive perspective on a low density and highly fragmented population. *Clin Chim Acta*.3-15
- **Foxenberg, R.J., Ellison, C.A., Knaak, J.B., Olson, J.R. 2011.**Cytochrome P450specific human PBPK/PD models for the organophosphorus pesticides: chlorpyrifos and parathion. *Toxicology*, 285 : 57-66
- Freedman, J.H., Slice, L.W., Dixon, D., Fire, A., Rubin, C.S., 1993.** The novel metallothionein genes of *Caenorhabditis elegans*. Structural organization and inducible, cell-specific expression. *Journal of Biological Chemistry* 268. 2554-2564
- Frenkel, K., Karkozska, J., Cohen, B., BarnaskI, B., Jakubouskim, Cosmag, Taiolie., Toniolo ,P.1994.**Occupational exposures to Cd, Ni, and Cr modulate titers of antioxidantized DNA base autoantibodies. *Environ. Health. Perspect.* 102 (3). 221-25
- Funes, V., Alhama, J., Navas, J.I., Lopez-Barea, J., Peinado, J.2006.** Ecotoxicological effects of metal pollution in two mollus species from the Spanish South Atlantic littoral. *Environ Pollut*139: 214-223
- **Fromenty, B. 2010.**Toxicité mitochondriale et métabolique des médicaments. *Réanimation* 19,*Toxicologie*. 552-567

## G

- **Gaujous, D.1995.** La pollution des milieux aquatiques : aide-mémoire. 2ème édition. *Edition TEC et DOC* :59-62-125-140



- Gaujous, D. 1993.**La pollution des milieux aquatiques : aide-mémoire.Technique et Documentation, *Ed Lavoisier*, Paris.10p
- Giesy, J.P., Solomon, K.R., Coates, J.R., Doxon, K. R., Giddings, J.M. and Kenaga, E.E.1999.**Chlorpyrifos: Ecological risk assessment in North American environments. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 160:1-130
- Giuseppe, C., Elisa, F., Claudio, L., Anna, M.R. 2009.**Cadmium and mitochondria. *Mitochondrion* 9 : 377–384.
- **Gomes, J., Dawodu, A.H., Lloyd, O., Rewitt, D.M. and Anilal, S.V.1999.** Hepatic injury and disturbed amino acid metabolism in mice following prolonged exposure to organophosphorus pesticides. *Human Experimental Toxicology*,18 : 33-37
- Grafton-Cardwell, E.E., Gu, P.2003.** Conserving vedalia beetle, *Rodolia cardinalis* (Mulsant) (Coleoptera: Coccinellidae), in citrus: a continuing challenge as new insecticide gain registration. *J. Econ.Entomol.* 96, 1388.
- **Grara, N. 2011.** Evaluation de la toxicité de certains polluants industriels sur un animal bioaccumulateur (*gasteropode Helix aspersa*): Cas des métaux .Thèse de doctorat de Université d'Annaba. P 91.
- **Griffin, P., Mason, H., Heywood, K. and Cocker, J., 1999.** Oral and dermal absorption of chlorpyrifos: a human volunteer study. *Occupational and Environmental. Medecine*, 56 : 10-13
- **Griffin, P., Payne., Mason, H., Frelander, E., Curran, A.D. and Cocker, J. 2000.** The in vitro percutaneous penetration of chlorpyrifos. *Human and Experimental Toxicology*,19: 104-107
- **Griffith, O.W. 1999.** Biological and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biol. Med.* 27: 922-935
- **GTPWOAUFSP (Guidelines to Promote the Wellbeing of Animals Used for Scientific Purposes) .2008.** planning, conducting and reviewing research protocols to maximize wellbeing and minimize pain and distress in animals. Australian Government. 41p.
- **Guedes, R. N. C., Zbu, K. Y., Kambhampti, S., Dover, B. A. 1997.** An altered acetylcholinesterase conferring negative cross insensitivity to different insecticidal inhibitors in organophosphate-resistant lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*. *Pest. Biochem. Physiol.* 58: 55-62.

- **Gul, A. 2005.** Investigation of acute toxicity of chlorpyrifos on Nile tilapia *Oreochromis niloticus* larvae. *Chemosphere*, 59: 163-166.
- **Gupta, V., Razdan, V.K., Ranbir, S. 2012.** Evaluation of fungicides and antibiotics against soil borne pathogens of brinjal. *Journal of Mycopathological Research*, 50 (2): 229-233
- **Goldsworthy, G.J., Mordue, W., Guthkelch, J. 1972.** Studies on insect adipokinetic hormones. *Gen. Comp. Endocrinol*, 18 (3), 545

## H

- **Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. 1974.** Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*. 249: 7130-7139
- **Hageman, K.J., Simonich, S.L., Campbell, D.H., Wilson, G.R., Landers D.H. 2006.** Atmospheric deposition of current-use and historic-use pesticides in snow at national parks in the Western United States. *Environmental Science and Technology*, 40: 3174-3180
- **Hannun, Y. A. 1996.** Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* 274, 1855–1859.
- **Hansen, B.H., Romma, S., Garmo, O.A., Olsvik, P.O., Andersen, R.A. 2006 .** Antioxidative stress proteins and their gene expression in brown trout (*Salmo trutta*) from three rivers with different heavy metal levels. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* 143. 263–274.
- **Haubruge, E., Amichot, M. 1998.** Compréhension des mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les Insectes et les Acariens. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, resistance to malathion in *Tribolium castaneum*. *J. Econ. Entomol.*, 91: 935-945
- **Heiskanen, K. et al. 1999.** Mitochondrial depolarization accompanies cytochrome c release during apoptosis. *Biol. Chem.* 274, 5654-5658.
- **Himmerich, H., Kaufmann, C., Schuld, A., Pollmacher, T. 2005.** Elevation of liver enzyme levels during psychopharmacological treatment is associated with weight gain, *Journal of Psychiatric Research*. 39: 35-42

- Henck, JW., Traxler Frahm, D., Pelton, R., Anderson, JA.1994.** Validation of an automated activity monitor system using d-amphetamine and phenobarbital. *Neurotoxicol Teratol* 16:324
- Howard, AS., Bucelli, R., Jett, D.A., Bruun, D., Yang, D., Lein, PJ. 2005.**Chlorpyrifos exerts opposing effects on axonal and dendritic growth in primary neuronal cultures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207:112–124
- **Hu ,M.L., Dillard, C.J., Tappel, A.L. 1988.** Aurothio-glucose effect on sulfhydryls and glutathione-metabolising enzymes: in vivo inhibition of selenium-dependent glutathione peroxidase. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 59: 147-16
- **Huang, J. L., Curran, P. G., Keeney, J., Puposki, E. M., Deshon, R. P. 2012.** Detecting and deterring insufficient effort respond to surveys. *Journal of Business and Psychology* 27. 99–114
- Hultberg, B., Anderson, A., Isakson, A. 2001.** Interactions of metals and thiols in cell damage and glutathione distribution: potential of mercury toxicity by dithiothreitol. *Toxicology.* 56, 93–100
- Hultberg, B., Anderson, A., Isakson, A. 2001.** Interactions of metals and thiols in cell damage and glutathione distribution: potential of mercury toxicity by dithiothreitol. *Toxicology.* 56, 93–100
- **Hurlbert, S.H., Mulla, M.S., Wilson, H.R. 1972.** Effect of an organo-phosphorus insecticide on the phytoplankton, *zooplankton* and insect populations of fresh-water ponds. *Ecological Monographs*, 42 : 269-299

### I

- **IFEN. 2002.** Les pesticides dans les eaux : bilan annuel 2002. Études et travaux IFEN no 36, 25 p. (<http://www.ifen.fr/publications/ET/pdf/et36.pdf>)
- **Iscan, M., Ada, A.O., Coban, T. 2002.** Combined Effects of Cadmium and Nickel on Testicular Xenobiotic Metabolizing Enzymes in Rats, *Biological Trace Element Research.* 89: 178-190
- **Ishaaya, L. 2001.** Biochemical sites of insecticide action and resistance. *SpringerVerlag Berlin Heidelberg.* pp. 293-321.

-**Ito, H., Okamoto, K., Kato, K.1998.** Enhancement of expression of stress proteins by agents that lower the levels of glutathione in cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1397, 223–230

### J

-**Jakubowski, M., Trzcinka-Ochocka, M. 2005.** Biological monitoring of exposure: trends and key developments. *J Occup Health.* 47(1); 22-48.

-**James, C.W., Lamaa, Sh.T., Simon, K.F., Chanc, M. H.W., Lam, M. M., Paul. K.S .2006.**Nickel-seleniinteraction-time dependentbiochemical alterations and metal decorporation IN RATS *Lam Environmental Pollution* 144 790\_801

- **Jamet, P.1983.** Le Comportement des Produits Agro pharmaceutiques dans le Sol. *Phytiatrie-Phytopharmacie.* 28: 87-122

- **Jamil, K., Shaik, A.P., Mahboob, M., Krishna D., 2004.** Effect of organophosphorus and organochlorine pesticides (monochrotophos, chlorpyrifos, dimethoate, and endosulfan) on human lymphocytes in-vitro. *Drug and Chemical Toxicology* 27 : 133-144

- **Jasso-Chavez, R. et al. 2010.**Toxic effects of Cr(VI) and Cr(III) on energy metabolism of heterotrophic *Euglena gracilis*.*Aqua.Toxicol.* **100**, 329–338.

- **Jevtić, G. et al. 2016.** Mitochondrial impairment, apoptosis Antioxidant Response to Phenol Exposure and autophagy in a rat brain as immediate and long-term effects of perinatal phencyclidine treatment in fluence of restraint stress. *Prog Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 66, 87-96

- **Jumel, A., Coutellec, M.-A., Cravedi, J.-P., Lagadic, L. 2002.**Nonylphenol polyethoxylate adjuvant mitigates the reproductive toxicity of fomesafen on the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* in outdoor experimental ponds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 1876-1888

- **Jung, K., Henke, W. 1996.** Developmental changes of antioxidant enzymes in kidney and liver from rats. *Free Radic. Biol. Med.* 20: 613-617

-**Jurewicz, J., Hanke, W., Johansson, C., Lundqvist, C., Ceccatelli, S., van den Hazel, P.,Saunders, M.,Zetterstrom, R., 2006.** Adverse health effects of children's exposuroto pesticides: what do we really know and what can be done about it. *Acta PaediatrSuppl.* 95(453); 71-80.

K

- Kamel, N., Jebali, J., Banni, M., Ben Khedher, S., Chouba, L., Boussetta H. 2012. Biochemical responses and metals levels in *Ruditapes decussates* after exposure to treated municipal effluents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 82: 40-46
- Kakkar, R., Mantha, S.V., Radhi, J., Prasad, K., Kalra, J. 1997. Antioxidant defense system in diabetic kidney: A time course study. *Life Science*, 60, 667-679
- Kaplan, A. 1984. Urea. *Clin Chem* The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton; 1257-1260 and 437 -418
- Kaplan, A. 1984. Bilirubin. *Clin Chem*. The C.V. mosby Co. Si louis.Tronto. Princeton; 1238-1241
- Karthikeyan, J., Bavani, G. 2009. Effect of cadmium on lactate dehydrogenase isoenzyme, succinate dehydrogenase and  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  in liver tissue of rat. *Journal of Environmental Biology*. 30(5) 895-898
- Kon, K., Kim, J.S., Jaeschke, H et al. 2004. Mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced necrosis and apoptosis of cultured mouse hepatocytes. *Hepatology*. 40(5):1170. P09
- Kubrak, O.I., Husak, V.V., Rovenko, B.M., Poigner, H., Mazepa, M.A., Kriews, M., Abele, D., Lushchak, V.I. 2012. Tissue specificity in nickel uptake and induction of oxidative stress in kidney and spleen of *goldfish Carassius auratus*, exposed to waterborne nickel. *Aquat. Toxicol*. 118–119, 88–96.
- Kralj, M.B., Franko, M., Trebše, P. 2007. Photodegradation of organophosphorus insecticides. Investigations of products and their toxicity using gas chromatography-mass spectrometry and AchE-thermal lens spectrometry bioassay. *Chemosphere*, 67 : 99-107
- Kramer, H.J., Gonick, H.C., Lu, E. 1986. In vitro inhibition of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  by trace metals: Relation to renal and cardiovascular damage. *Nephron*. 44, 329-336.
- Kristal, B.S., Park, B.K., Yu, B.P. 1996. 4-hydroxynonéal est un puissant inducteur de la transition de perméabilité mitochondriale. *J. Biol. Chem.* 271, 6033-6038

### L

- Ladhar, C., Geffroy, B., Cambier, S., Treguer-Delapierre, M., Durand, E., Brèthes, D., Bourdineaud, JP. 2014. Impact Of Dietary Cadmium Sulphide Nanoparticles On Danioreriozebrafish At Very Low Contamination Pressure. *Nanotoxicology*: 8: 676-85.
- Laughling, M., Mineau, P. 1995. The impact of agricultural practices on biodiversity, *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 55, 201. Licenciés en sciences botaniques, Université catholique de Louvain, 68 p.
- Lee, Y., Klein, C., Kargalin, B. 1995. Carcinogenic nickel silences gene expression by chromatin condensation and DNA methylation. A new model for epigenetic carcinogens. *Mol. Cell. Biol.* (14):2547-2557
- Lee, YJ., Wang, S., Slone, SR., Yacoubian, TA., Witt, SN. 2011. Defects in very long chain fatty acid synthesis enhance alpha-synuclein toxicity in a yeast model of Parkinson's disease. *PLoS One*. 6:e15946
- Leelavinothan, P et Kasinathan, A. 2011. Hepatoprotective role of naringin on nickel induced toxicity in male Wistar rats. *Eur J Pharmacol*. 650: 364-370.
- Lecluyse, EL et al .2012. Organotypic liver culture models: Meeting current challenges in toxicity testing. *Crit Rev Toxicol* 42(6):501-548
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie : principes and définitions. In: Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux. Masson, Londres, Paris, New York, pp. 1-9
- Liappas, I., Piperi, C., Malitas, P.N., Tzavellas, E.O., Zisaki, A., Liappas, A.I., Kalofoutis, C.A., Boufidou, F., Bagos, P., Rabavilas, A., Kalofoutis, A. 2006. Interrelationship of hepatic function, thyroid activity and mood status in alcohol-dependent individuals In vivo. *Toxicology*. 20: 293- 300
- Little, C., O'Brien, PJ. 1968. An intracellular GSH-peroxidase with a lipid peroxide substrate. *Biochem Biophys Res Commun*. 31: 145-150
- Lohe, L., Gunzler, W.A. 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 105, 114-121
- Loven, D., Schedl, H., Wilson, H., Daabees, T.T., Stegink, L.D., Diekus, M and Oberley, L. 1986. Effect of insulin and oral glutathione on glutathione levels and

superoxide dismutase activities in organs of rats with streptozotocin induced diabetes. *Diabetes*; 35, 503-50

-**Lu, C., Barr, D. B., Pearson, M. A., Waller, L. A., 2008.** Dietary intake and its contribution to longitudinal organophosphorus pesticide exposure in urban/suburban children. *Environ Health Perspect.* 116(4); 537-542

-**Lu, C., Toepel, K., Irish, R., Fenske, R. A., Barr, D. B., and Bravo, R., 2006.** Organic diets significantly lower children's dietary exposure to organophosphorus pesticides. *Environ Health Perspect.* 114(2); 260-263.

- **Lukaszewicz-Hussain, A. 2010.** Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity. *Short review. Pesticide Biochemistry and Physiology*, 98 : 145-150.

## M

-**Malloy, H.T. 1937.** The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. *J. Biol Chem.* 112, (2): 481-491

- **Mandava, V.R., Sunita, L.C., Seema, R.S. 2009.** Protective role of vitamin E on nickel and/or chromium induced oxidative stress in the mouse ovary. *Food and Chemical Toxicology.* 47: 1368-1371

- **Masaya, M., Yoshinobu, H., Ai, Y., Maki, K., Yasuo, O. 2002.** Determination of cellular levels of nonprotein thiols in phytoplankton and their correlation with susceptibility to mercury. *Journal of Phycology* 38(5), 983

- **Masubuchi, Y., Suda, C., Horie, T. 2005.** Involvement of mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced liver injury in mice. *J Hepatol*: 42. P06

- **Mehta, A., Verma, R.S., Srivastava, N., 2009.** Chlorpyrifos induced alterations in the levels of hydrogen peroxide, nitrate and nitrite in rat brain and liver. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 94 : 55-59

- **Meuling, W.J.A., Ravensberg, L.C., Roza, L. and van Hemmen, J.J. 2005.** Dermal absorption of chlorpyrifos in human volunteers. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 78 : 44-5

- **Michailova, A., Kuneva, T., Popov, T.A. 1998.** Comparative assessment of liver function in workers in the petroleum industry, *International Archives of Occupational and Environmental Health*. 71: 46-49.
- **Ming-Yuan, X. et al. 2015.** Redox status in liver of rats following subchronic exposure to the combination of low dose dichlorvos and Deltamethrin. *Pest. Biochem. Physiol.* 124, 60-65.
- **Misra, M., Rodriguez, R.E. et Kasprzak, K.S. 1990.** Nickel induced lipid peroxidation in the rat: correlation with nickel effect on antioxidant defense systems. *Toxicol.* 64: 1-17
- **Mitra, NK., Siong, H.H., Nadarajah, V.D. 2008.** Evaluation of neurotoxicity of repeated dermal application of chlorpyrifos on hippocampus of adult mice. *Ann Agric Environ Med.* 15:211–16
- Murray, R.L. 1984.** Creatinine. *Clin Chem* The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton . 1261-1266 and 418
- Murray, R. 1984.** Alanine aminotransferase. *Clin chem.* The C.V. Mosby Co. Si lousis. Tronto. Princeton. 1088-1090.
- **Murray, R. 1984.** Aspartate aminotransferase .*Clin chem.* The C.V. Mosby Co. Si lousis. Tronto. Princeton. 1112-1116.

## N

- **Nandi, S., Gupta, P.S.P., Roy, S.C., Selvaraju, S. and Ravindra, J.P., 2011.** Chlorpyrifos and endosulfan affect Buffalo oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro directly and through cumulus cells. *Environmental Toxicology*, 26 : 57-67
- Navarro,M., Cubero,I., Chen,A.S., Chen, H.Y., Knapp, D.J., Breese, G.R., Marsh, D.J., Thiele, T.E. 2005.**Effects of Melanocortin Receptor Activation and Blockade on Ethanol Intake: A Possible Role for the Melanocortin-4 Receptor. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research.* 29:949–957
- Nomiyama, K. 1973.**Toxicity of cadmium mechanism and diagnosis. Proceeding of theinternational conference Health. Nashville (Tennessee) *Pergamon Press*, 15-23.



- **Novelli, E.L.B., Hernandes, R.T., Novelli Filho, J.L.V.B. et Barbosa, L.L. 1998.** Differential/combined effect of water contamination with cadmium and nickel on tissues. *J. Biol. Chem.*, 236, 262

### O

-**Obone, E., Chakrabarti, S. K., Bai, C. 1999.** Toxicity and bioaccumulation of nickel sulfate in Sprague-Dawley rats following 13 weeks of subchronic exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A* 57(6):379-401

- **OCDE: Organisation for Economic Co-operation and Development .2000.** Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Human Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment. N° 19

-**Ognjanović, B.I., Marković, S.D., Pavlović, S.Z., Zikic, R.V., Stajn, A.S., Saicić, Z.S . 2008.** Effet de l'exposition chronique de cadmium sur le système de défense antioxydant dans certains tissus de rats : effet protecteur du sélénium. *Physiol Res.* 57 (3) : 403-11

-**OPDCSET (Office Parlementaire D'évaluation Des Choix Scientifiques et Technologiques) .2009.** Les effets des pesticides sur la santé humaine .Bulletin d'une Audition publique. 18p.

-**ORSB : Observatoire Régional de Santé de Bretagne. 2001.** Effets chroniques des pesticides sur la santé : état actuel des connaissances. <http://www.observatoirepesticides.gouv.fr/index.php?pageid=244>

-**Oruç, E.Ö., Üner, N. 2000.** Combined effects of 2, 4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol. C.*, 127: 291–296.

- **Oruç, E.O. 2010.** Oxidative stress, steroid hormone concentrations and acetylcholinesterase activity in *Oreochromis niloticus* exposed to chlorpyrifos. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 96 : 160-166

- **Ozturk, S., Koksel, H., Ng, P.K.W.2009.** Characterization of resistant starch samples prepared from two high-amylose maize starches through debranching and heat treatments. *Cereal Chemistry* 86, 503–510

### P

- **Padmaja, JR., Rao, M.B .1994.** Effect of an organochlorine and three organophosphate pesticides on glucose, glycogen, lipid and protein contents in tissues of the freshwater snail, *Bellammyadissimillis* (Müller). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53:142-148.
- Pampanin, D.M., Camus, L., Gomiero, A., Marangon, I., Volpato, E., Nasi, C., .2005.** Susceptibility to oxidative stress of mussels (*Mytilusgalloprovincialis*) in the Venice Lagoon (Italy). *Mar. Pollut. Bull*, 50, 1548–1557.
- **Papst, M.H., Boyer, M.G. 1980.** Effects of two organophosphorus insecticides on the chlorophyll a and phaeopigment concentrations of standing ponds. *Hydrobiologia*, 69 : 245-250
- Pardeep, S., Garg, M.L., Dhawan, D.K. 2004.** Protective role of zinc in nickel induced hepatotoxicity in rats. *Chemico-Biological Interactions.* 150: 199-209.
- Peccini, E., Staudenmann, W., Albergoni, V., Gabriel, R.D., James, P. 1994.** Purification and primary structure of metallothioneins induced by Cadmium in the protests *Tetrahymena pigmentosa* and *Tetrahymena pyriformis*.*Europeanjournal of Biochemistry* 226, 853-859
- **Peck, A.M., Hornbuckle, K.C. 2005.** Gas-phase concentrations of current-use pesticides in Iowa. *Environmental Science and Technology*, 39: 2952-2959
- **Pehkonen, S.O., Zhang, Q. 2002.**The degradation of organophosphorus pesticides in natural waters: a critical review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 32: 17-72
- **Pinot, F., Kreps, S.E., Bachelet, M., Hainaut, P., Bakonyi, M., Polla, B.S. 2000.** Cadmium in the environment: Sources, mechanisms of biotoxicity, and biomarkers. *Reviews on Environmental Health* 15, 299-323
- **Poey, J., Philibert, C. 2000.** Toxicité des métaux.*Revue Française des Laboratoire*, 35-43.
- **PNUE, Programme des Nations Unies pour l'Environnement, 2005.** Débarrasser le monde des pops : visite guidée de la convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants.<http://chm.pops.int/>.

- Prendergast, M.A., Self, R.L., Smith, K.J., Ghayoumi, L., Mullins, M.M., Butler, T.R, et al. 2007. Microtubule-associated targets in chlorpyrifos oxon hippocampal neurotoxicity. *Neuroscience*. 146:330–9

-Purves, D. 1977. Trace element contamination of the environment. Amsterdam; Oxford;New York: *Elsevier*. 170-82

### R

- Ramade, F. 1995.Éléments d'écologie, écologie appliquée.5ème édition. *Ediscience International*. pp:183-231

-Ramade, F. 1979. Ecotoxicologie. (2ème édition). *Ediscience International*. Masson, Paris.305p

-Recknagel, R.O., Turocy, Y. 1977. Fatal susceptibility of a free-swimming paramecium to peroxidizing rat liver microsomes. *Exp Mol Pathol*. 1977 Aug;27(1):93–105

-Redhouane-Salah, S. 2004. Effets des rejets métalliques des aciéries du complexe sidérurgique d'Elhadjar d'annaba sur un modèle cellulaire marin : *tetra selmis suecica*. Science et technologie. Pp : 121-124

-Reinecke, S.A., Reinecke, A.J. 2007. Biomarker response and biomass change of earthworms exposed to chlorpyrifos in microcosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 66: 92-101

- Ribeiro, S., Guilbermino, L., Sousa, J. P., Soares, A. M. 1999. Novel Bioassay based on acetylcholinesterase and lactate dehydrogenase activities to evaluate the toxicity of chemicals to soil isopods. *Ecotox. Environm. Safety*.44: 287-293

-Robert, C. 1988. Nickel .CRC. Handbook of *Chemistry and Physics*. (7): 23-33

-Romão1-Tovar, J., Fonseca, S.G., Moraes, R.H., Cruz, A.K., Hothersall, J.S., Noronha-Dutra, A.A., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q. 2006. Glutathione and the redox control system trypanothione /trypanothione reductase are involved in the protection of *Leishmania* spp. against nitrosothiol-induced cytotoxicity *Braz J Med Biol Res*; 39(3) : 355-363

- Rooney, C.P., McLaren, R.G., Cresswel, R.J. 1999. Distribution and phytoavailability of lead in soil contaminated with lead shot. *Water Air and Soil*. 116: 535-48.

- **Rouabhi, R., Djebbar, H., Djebbar, M.R. 2009.** Toxic Effects of Combined Molecule from Novaluron and Diflubenzuron on *Paramecium caudatum*. *Am-Euras. J. Toxicol. Sci.*1(2), 74-80
- Rouabhi, R., Djebbar, H., Djebbar, M.R. 2006.** Toxicity evaluation of flucyclozuron and diflubenzuron on the cellular model, *Paramecium sp.**Afr. J. Biotechnol.*5(1), 045-048.
- Rouabhi, R., Djebbar-Berrebah, H., Djebbar, M.R. 2006.** Toxic. Effect of a pesticide, dislubenzuron on fresh water microinvertebrate (*Tetrahymena Pyriformis*). *Chin.J.Appel.environ.biol.*12 : 514-517
- Rudolf,E., Cervinka,M., 2010.** Zinc pyrithione induces cellular stress signalling and apoptosis in Hep-2 cervical tumor cells: the role of mitochondria and lysosomes. *Biometals*23, 339–354
- **Ruepp, S.U., Tonge, R.P., Shaw, J., Wallis, N., Pognan, F., 2002.** Genomics and proteomics analysis of acetaminophen toxicity in mouse liver. *Toxicology Sci.* 65:135. p50.

## S

- **Saafi-Ben Salah, E.B., El Arem ,A., Louedi, M., Saoudi, M., Elfeki, A., Zakhama, A., Najjar, M.F., Hammami, M., Achour, L .2012.** Antioxidant-rich date palm fruit extract inhibits oxidative stress and nephrotoxicity induced by dimethoate in rat. *J Physiol Biochem.* 68(1): 47-58
- Salama, P., Osman, K.A., Saber, N.A., Soliman, S.A.2005.** Oxidative stress induced by different pesticides in the land snail, *Helix aspersa*. *Pakistan. journal of biological sciences.*8:92-96
- **Sandal, S., Yilmaz, B.2011.** Genotoxic effects of chlorpyrifos, cypermethrin, endosulfan and 2,4-D on human peripheral lymphocytes cultured from smokers and non-smokers. *Environmental Toxicology*, 26 : 433-442
- Saunders, M., Fox, D., Salisbury, C., Strokes, V., Palmer, A., Preece, A., 2004.** Placental transfer and fetal uptake of pesticides. *Toxicology and applied pharmacology.* 197(341).
- **Sbartai, I., Berrebah, H., Rouabhi, R., Sbartai, H., Smaghe, G., Djebbar, M.R., 2009.** Behavior of *Paramecium sp.* treated with bifentazate with special

emphasis on respiratory metabolism, protein and generation time. *American-Eurasian J. Toxicol. Sci*: 1. p13-18

- Schäfer, R.B., Caquet, T., Siimes, K., Mueller, R., Lagadic, L., Liess, M. 2007. Effects of pesticides on community structure and ecosystem functions in agricultural streams of three biogeographical regions in Europe. *Sci. Total Environ.*, 382, 272.

-Schmidt, G.H., Ibrahim, N.M.1994. Heavy metalscontent (Hg.Cd.Pb) in various body parts:impact on cholinesterase activity and binding glycoproteins in the gasshopper .*Aiolopus thalassinus* adultes.*Ecotoxicology and environmental safety*.29:149-164

- Schollhammer, M., Guillet, M.H., Guillet, G. 1994.Nickel et peau.*Ann Dermatol Venereol*. 121: 338-45

-Schuhmacher, M., Granero, S., Bellés, M., Lobet, J., Domingo, J L. 1995. Levels of metalsin soils and vegetation in the vicinity of a municipal solid waste incinerator.

-Sharaf, E., Haroun, E., Ishaac, Z., El Shewy, T., Nassef, A. 1974. The effect of some beta-adrenergic blockers on human intraocular pressure. *Experimental Eye Research*, 19, 223-225.

-Shibko, S., Koivistoinen, P., Tratyneek, C. A., Newhall, A.R., Freidman, L. 1966. A method for sequential quantitative separation and determination of protein, RNA, DNA, Lipid and Glycogen from a single rat liver homogenate or from a subcellular fraction. *Analytic Biochemistry*. 19: 415-429

- Sidell, F.R., Borak, J. 1992. Chemical warfare agent: nerves agents. *Ann Emerg Med* 21 : 865-71

-Sies, H. 1999. Glutathione and role in cellular functions. *Free Radical Biology & Medicine*. 27: 916- 921

- Simon, D., Holliwell, S., Robertson D.1995. The impact of chlorpyrifos on an enclosure system in a shallow billabong. *Australian Journal of Ecotoxicology*, 1: 137-142

- Singh, D.K., Agarwal, R.A.1984. Correlation of the anticholinesterase and molluscicidal activity of the latex of *Euphorbia royleana* on the snail *Lymnaea acuminata*. *Journal of Natural Products* 47(4): 702–705

- **Singh, J., Singh, N., 2003.** Studies on the morphological and rheological properties of granular cold water-soluble corn and potato starches. *Food Hydrocolloids* 17, 63–72
- Skulachev, V.P. 1996.** Why are mitochondria involved in apoptotic? Permeability transition pores and apoptotic as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. *FEBS lett.* 397: 7-10
- **Slotkin, Ta., Seidler, Fj., Fumagalli, F. 2007.**Exposure to organophosphates reduces the expression of neurotrophic factors in neonatal rat brain regions: similarities and differences in the effects of chlorpyrifos and diazinon on the fibroblast growth factor superfamily. *Environ Health Prospect*,115: 909-916
- **Smialowicz, R.J., Rogers, R.R., Rowe, D.G. 1987.** The effects of nickel on immune function in the rat. *Toxicology.* 44: 271-281.
- Snow, E.T., Costa, M. 1998.** Nickel toxicity and carcinogenesis. Environmental and occupational medicine. ROM.W.N. *Lippincott-Raven. Philadelphia. USA.* (15): 1057-1064
- **Speck, R. F., Esser, U., Penn, M. L., Eckstein, D. A., Pulliam, L., Chan, S. Y.,Goldsmith, M. A .1999.** "A trans-receptor mechanism for infection of CD4-negative cells by human immunodeficiency virus type 1." *Curr Biol* 9(10): 547-50
- **Stoltz, A., Sauvage, C., Lamblin, C et al. 2003.** Urticaire chronique par allergie alimentaire au nickel. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique.* 43 : 492-496.
- Sunderman, F.W.Jr., Hopfer, S.M., Plowman, M.C., Knight, J.A .1990.** Carcinogenesis bioassays of nickel oxides and nickel-copper oxides by intramuscular administration to Fischer-344 rats. *Res. Commun. Chem. pathol. pharmacol.*70 (1), 103

## T

- **Theriot, C.M., Grunden, A.M. 2011.** Hydrolysis of organophosphorus compounds by microbial enzymes. *Applied Microbiology of Biotechnology*, 89: 35-43
- **Thrasher, J.D., Madison, R., Broughton, A. 1993.** Immunologic abnormalities in human exposed to chlorpyrifos: preliminary observations. *Archives of Environmental Health*, 48: 89-93

- **Tripathi, G., Shasmal, J. 2011.** Concentration related responses of chlorpyrifos in antioxidant, anaerobic and protein synthesizing machinery of the freshwater fish, *Heteropneustes fossilis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99: 215-220

### U

- **Ui, J., Kitamura, S. 1971.** Mercury in the Adriatic. *Mar Pollut Bull*; 2: 56-8

- **Unsworth, J.B., Wauchope, R.D., Klein, A.W., Dorn, E., Zeeh, E., Yeh, S.M., Akerblom, M., Racke, K.D., Rubin, B.1999.** Significance of the long-range transport of pesticides in the atmosphere. *Pure Appl. Chem.*, 71, 1359.

-**Upadhyay, A.K., Mathur, R., Bhadauria, M., Nirala, S.K.2009.** Therapeutic influence of Zinc and ascorbic acid against lead induced biochemical alterations. *Therapie* ;44(6): 383-388

### V

-**Vadde, R., Rama, J .2008.** Oxidative stress in non-insulindependent diabetes mellitus (NIDDM) patients. *Acta Diabetol*; 45(1): 41–46

-**Van Der Werf, H.M.G.1996.** Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 60,81.

-**Veeresh, H. 2003.** Sorption and distribution of adsorbed metals in the soils of india *applied geochemistry*, 18, 1723-1731

-**Verma, R.S., Mehta, A., Srivastava, N. 2007.** In vivo chlorpyrifos induced oxidative stress: attenuation by antioxidant vitamins. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 191-196

-**Veysseyre ,A., Moutard, K., Ferrari, C., Van de Velde, K., Barbante, C., Cozzi, G et al. 2001.** Heavy metals in fresh snow collected at different altitudes in the Chamonix and Maurienne valleys, French Alps : initial results. *Atmospheric Environment*; 35:415 – 25.

### W

- **Weckbecker, G., Cory, J.G. 1988.** Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L 1210 cells in vitro. *Cancer Letters*. 40: 257 264.

- Weissenbock, H., Hainfellner, J. A., Berger, J., Kasper I., Budka, H. 1997. Naturally occurring herpes simplex encephalitis in a domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Veterinary Pathology*, 34, 44–47.
- Wenger, C. 1984. Alkaline phosphatase. *Clin chem*. The C.V. Mosby Co. Si louis. Tronto. Princeton; 1094-1098
- Whanger, P.D. 1973. Effects of dietary nickel on enzyme activities and mineral content in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*;25: 323-31
- Wharton, D.C., Tzagoloff, A. 1967. Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. *Methods Enzymol*.10:245–250
- WHO.2004. Guidelines for drinking-water quality, third edition – Chemical fact Sheets.312p
- Williamson, C. E. 1995. Impact of UV-B radiation on pelagic freshwater ecosystems. *Ergeb. Limnol*. 43. 226 p
- Wong, C.K., Cheung, R.Y., Wong, M.H. 2000. Heavy metal concentrations in green-lipped mussels collected from Tool Harbor and markets in Hong Kong and Shenzhen. *Environ. Pollut*. 109, 165–171

## Y

- Yang, C.F., Shen, H.M., Shen, Y., Zhuang, Z.X., Ong, C.N. 1997. Cadmium-induced oxidative cellular damage in human fetal lung fibroblasts (MRC-5 cells). *Environmental Health Perspectives*. 105, 712-716
- Yao, Y., Harner, T., Blanchard, P., Tuduri, L., Waite, D., Poissant, L., Murphy, C., Belzer, W., Aulagnier, F., Sverko, E. 2008. Pesticides in the atmosphere across canadian agricultural regions. *Environmental Science and Technology*, 42: 5931-5937.
- Yousef, M.I. 2004. Aluminium-induced changes in hemato-biochemical parameters, lipid peroxidation and enzyme activities of male rabbits: protective role of ascorbic acid. *Toxicology*. 199: 47-57.
- Yousef, M.I., Demerdash, F.M., Kamei, K.I., Salhen, K.S. 2003. Changes in some hematological and biochemical indices of rabbits induced by isoflavones and cypermethrin. *Toxicology*. 189: 223-234.



- **Yousef, M.I., Awad, T.I., Mohamed, E.H. 2006.** Deltamethrin-intuited oxidative damage and biochemical alterations in rat and its attenuation by vitamine E. *Toxicologie*. 227 (3): 240-247.

### Z

- **Zaouani, M. 2010.** Contribution à l'évaluation de la toxicité aigüe et subchronique d'un produit phytosanitaire (Proclaim) chez le rat wistar. Thèse de Doctorat. Université Annaba. p47-48.

- **Zhou, Q., Sun, X., Gao, R., Zhang, Q., Wang, W. 2010.** Mechanism study on OH-initiated atmospheric degradation of the organophosphorus pesticide chlorpyrifos. *Journal of Molecular Structure:THEOCHEM*. 952: 8-15

-**Zorrig, W. 2010.** Recherche et caractérisation de déterminants contrôlant l'accumulation de cadmium chez la laitue "*Lactuca sativa*". Thèse de doctorat. Faculté des Sciences de Tunis. p 15

---

# Annexes

### Annexe 1 : Tableaux de la réalisation de la gamme d'étalonnage

#### Annexe 1a : Tableau de réalisation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines

Tubes	1	2	3	4	5	6
Quantité d'albumine ( $\mu\text{g}$ )	0	20	40	60	80	100
Eau distillée ( $\mu\text{l}$ )	100	80	60	40	20	0
BBC (ml)	4	4	4	4	4	4

#### Annexe 1b : Tableau de réalisation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des glucides

Tubes	1	2	3	4	5	6
glucose ( $\mu\text{l}$ )	0	20	40	60	80	100
Eau distillée ( $\mu\text{l}$ )	100	80	60	40	20	0
Anthrone (ml)	4	4	4	4	4	4

#### Annexe 1c : Tableau de réalisation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des lipides

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution mère de lipides ( $\mu\text{l}$ )	100	80	60	40	20	0
Solvant chloroforme/méthanol ( $\mu\text{l}$ )	4	4	4	4	4	4

## Annexe 2 : Production scientifique

### Communications internationales

**Toualbia N., Rouabhi R., Salmi A., Chnikher H., Taib C et Guesmi S.** Evaluation d'hépatotoxicité subcellulaire : le nickel sur un modèle indicateur de la pollution (*Oryctolagus cuniculus*). Journées internationales de biotechnologie (JIB 2016) Tunisie. Sousse 18-22 Décembre 2016.

**Toualbia N., Rouabhi R., Salmi A., Chnikher H., Taib C et Guesmi S.** 6<sup>ème</sup> Journées scientifiques de l'association tunisienne de toxicologie Tunisie. Tabarka 21-23 Janvier 2017.

**Toualbia N., Rouabhi R., Salmi A., Chnikher H., Taib C et Boussekine S.** Hématotoxicité vis-à-vis une pollution par un pesticide le chlorpyrifos chez les lapins (ATSB) Tunisie. Hammamet 21-24 Mars 2017.

**Toualbia N., Rouabhi R., Salmi A., Chnikher H., Taib C et Guesmi S.** Etude de la toxicité de chlorure de nickel sur les lapins. Le premier colloque international en « Toxicologie et santé ». Guelma 28-29 Novembre 2016.

**Toualbia N., Salmi A et Rouabhi R.** Study of the toxicity of Nickel chloride in rabbits *Oryctolagus cuniculus* . The 1<sup>st</sup> Euro- Mediterranean Conference for Environmental Integration (EMCEI). Sousse. Tunisia. 22-25 Novembre 2017.

### Communications nationales

**Toualbia N., Rouabhi R., Salmi A., Chnikher H., Taib C et Guesmi S.** Etude de la toxicité de chlorpyrifos sur les lapins. Le premier séminaire national de Biologie, Santé et Stress Oxydant. Tebessa 09-10 Novembre 2016.

**Annexe 3 : Taux des métabolites hépatiques chez les lapins témoins et traités après 90 jours**

<b>Taux des métabolites</b>	<b>Temoin</b>	<b>Ni1</b>	<b>Ni2</b>	<b>CPF1</b>	<b>CPF2</b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>
<b>Protéine</b>	1,9657± 0,06787	1,9805± 0,69865	2,03938± 0,05455	2,33202± 0,62830	2,40594± 0,29534	2,2119± 0,12205	2,5471± 0,37266
<b>Glucides</b>	21,5810± 9,5807195	95,32061± 38,6379	49,87552± 26,32779	76,8474± 26,20254	85,87400± 24,0224	119,0047± 41,5441	128,8127± 53,1849
<b>Lipides</b>	261,4745± 47,2619435	330,2645± 23,7678	160,7941± 24,71978	315,5893± 106,1351	174,2094± 82,1638	74,04317± 44,4380	72,9344± 23,4599

**Annexe 4 : Les paramètres de stress oxydant chez les lapins témoins et  
traités après 90 jours**

<b>Taux des paramètres de stress oxydant</b>	<b>Temoin</b>	<b>Ni1</b>	<b>Ni2</b>	<b>CPF1</b>	<b>CPF2</b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>
<b>GSH</b>	5,9379± 1,1	1,541± 0,091	2,885± 0,23	2,54± 0,37	2,3793± 0,32	2,185± 0,32	2,9233± 0,32
<b>MDA</b>	23,71812± 1,18415	21,7111± 1,3	27,8731± 0,23	20,9± 0,63	29,68± 2,2	22,4188± 1,3	29,8451± 2,9
<b>GST</b>	0,1791± 0,02	0,3004± 0,039	0,2729± 0,034	0,2594± 0,024	0,263± 0,0076	0,2723± 0,015	0,23939± 0,0076
<b>CAT</b>	0,03397± 0,0022	0,00408± 0,0015	0,00284± 0,00082	0,00589± 0,0013	0,00466± 0,0015	0,01596± 0,0016	0,02651± 0,0018
<b>GPx</b>	0,02966± 0,023	0,06882± 0,015	0,651079± 0,015	0,612682± 0,026	0,261966± 0,012	0,057562± 0,016	0,133662± 0,077

# Evaluation of Cytochrome c Level and Mitochondrial Dysfunction Biomarkers of *Oryctolagus cuniculus* Liver Exposed to Chlorpyrifos

Nadjiba Toualbia<sup>1</sup>, Rachid Rouabhi<sup>1</sup> & Aya Salmi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Applied Biology department, Tebessa University, 12000, Tebessa, Algeria

Correspondence and requests for materials should be addressed to R. Rouabhi (r\_rouabhi@yahoo.fr)

Received 18 August 2017 / Received in revised form 17 October 2017

Accepted 29 November 2017

DOI 10.1007/s13530-017-0338-9

©The Korean Society of Environmental Risk Assessment and Health Science and Springer 2017

plSSN : 2005-9752 / elSSN : 2233-7784

Toxicol. Environ. Health. Sci. Vol. 9(5), 325-331, 2017

## Abstract

Organophosphate insecticides are increasingly used as substitutes for organochlorine and carbamate insecticides because of their high efficacy and lower persistence in the environment. Chlorpyrifos (CPF) (O,O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate), an organophosphate considered as one of the most widely used insecticides in agriculture worldwide. The aim of this work is to analyze oxidative stress after a chronic exposure *per Os* to two doses of CPF (375 ppm, 750 ppm) and the effect on mitochondrial swelling and respiration and cytoplasmic Cyt c amount. Our results showed a little increase in the activity of mitochondrial GST, level of MDA and a decrease in GPx and CAT activity confirmed by the lack of O<sub>2</sub> (respiration inhibition), GSH level in mitochondria. we found an increase in mitochondrial swelling with a significant decrease in respiratory level. The amount of escaped Cytochrome c from mitochondria was significantly increased in treated groups according to the control in doses-dependent manner. Finally, our study showed that Chlorpyrifos caused general mitochondrial dysfunction accompanied with elevated oxidative stress amount in rabbit's liver.

**Keywords:** Cytochrome c, Mitochondrial swelling, Respiration, Chlorpyrifos, *Oryctolagus cuniculus*, Oxidative stress, GST, CAT, GPx, MDA, GSH

## Introduction

In agriculture, pesticide have been used to enhance food production by eradicating unwanted insects and controlling disease vectors<sup>1</sup>.

Pesticides are found as common contaminants in soil, air, water and on non-target organisms in our urban landscapes. Once there, they can harm plants and animals ranging from beneficial soil microorganisms and insects, non-target plants, fish, birds, and other wildlife. Chlorpyrifos, a common contaminant of urban streams<sup>2</sup>, is highly toxic to fish, and has caused fish kills in waterways near treated fields or buildings<sup>3</sup>. OPs were the first pesticide recognized in 1854<sup>4</sup>. Although, the greatest risk of OPs but they are the most used in the world<sup>5</sup>.

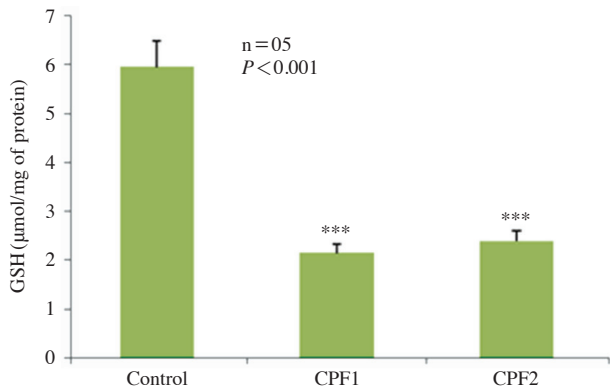
The chronic exposure of OPs on the farm workers provokes a neuropsychological disorders<sup>6</sup>.

Chlorpyrifos (CAS Registry Number 2921-88-2) is an organophosphate insecticide, acaricide, and nematocide. Its chemical formula is C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>PSC<sub>13</sub> and its chemical name is O,O-diethyl O-(3,5,6-trichloro-2-pyridyl) phosphorothioate. Chlorpyrifos is an amber to white, crystalline solid with a molecular weight of 350.6<sup>7</sup>. The health effects caused by occupational and no occupational exposure to CPF are enormous<sup>8</sup>. Chlorpyrifos is prepared commercially by several methods<sup>9</sup>. In a preferred method, the final step in the synthesis is reacting 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) and O,O-diethyl phosphorochloridothioate under basic conditions in dimethylformamide<sup>10</sup>. Chlorpyrifos is an organophosphate insecticide. Investigations of this family of chemicals began during World War II when chemists studied their use as nerve gases<sup>11</sup>.

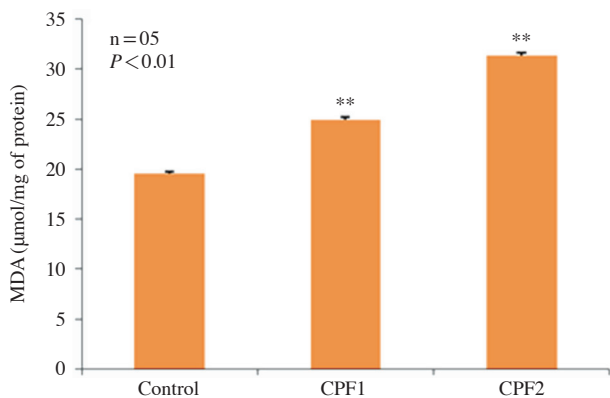
Chlorpyrifos has an effect on mechanisms of cholinesterase<sup>12</sup> this toxicity has been observed at doses that did not inhibit the enzyme<sup>13,14</sup>. Liver intoxications are the most faced problem in the pesticides toxicity, this work aimed to investigate the response of mitochondrial biomarkers and cytochrome c level after an exposure to CPF.

## Results

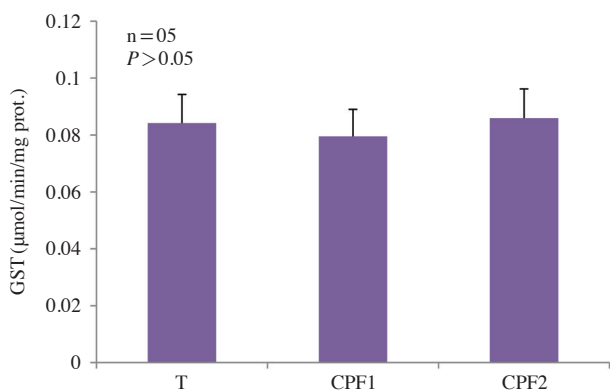
The results are expressed by the mean ± (standard



**Figure 1.** Variation of stromal GSH level (µM/mg prot.) in the control and treated animals after 90 days of treatment.

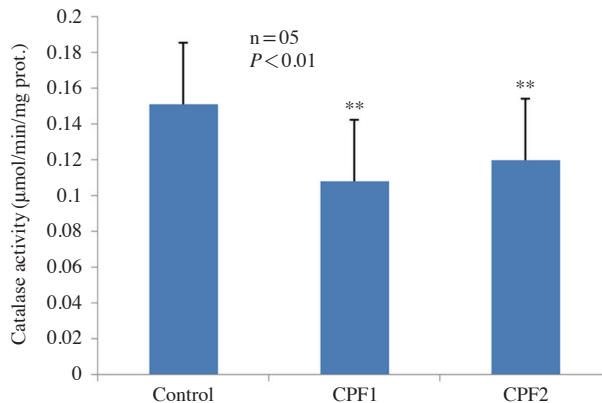


**Figure 2.** Variation of stromal MDA amount (µM/mg prot.) in the control and treated rabbits after 90 days of treatment.

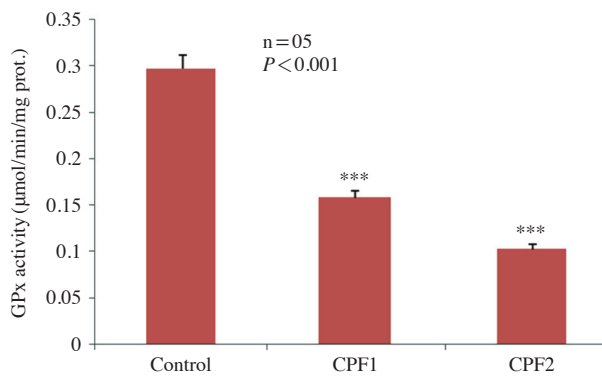


**Figure 3.** Effect of CPF on the variation of stromal GST activity (µmol/min/mg prot.) after 90 days of treatment.

deviation) of n experiments. The differences are considered: significant when  $P \leq 0.05$ , very highly significant when  $P \leq 0.001$ , highly significant when  $P \leq 0.01$ .



**Figure 4.** Effect of CPF on the variation of stromal CAT (µmol/min/mg prot.) after 90 days of treatment.



**Figure 5.** Effect of CPF on the variation of stromal GPx (µmol/min/mg prot.) after 90 days of treatment.

A very highly significant increase in the concentration of cytochrome-c is recorded in the livers of treated rabbits compared to control, confirmed by the swelling of mitochondria and inhibition of respiration. (Table 1).

## Discussion

Oxidative stress is unstable status which in where oxidation exceeds the antioxidant and lead to loss of the balance between them.” Free radicals are usually unstable and highly reactive because the unpaired electrons tend to form pairs with other electrons. An oxygen molecule (O<sub>2</sub>) undergoes four-electron reduction when it is metabolized *in vivo*<sup>15</sup>. Metabolic reaction of oxygen resulting is highly more reactive than the original molecule of oxygen, and called active oxygen species<sup>16</sup>. Chlorpyrifos (CPF) is a broad spectrum chlorinated OP insecticide, used extensively in



**Table 1.** Swelling, respiration, permeability and cytochrome c in the livers of control and treated rabbits after 03 months of treatment.

	Groups		
	Control	CPF 375 ppm	CPF 750 ppm
Mitochondrial swelling	0.492 ± 0.0140	0.815 ± 0.0190***	0.983 ± 0.0170***
Mitochondrial respiration	+++++	++++*	+++**
Mitochondrial permeability	+	+++*	+++++***
Cytochrome c (µg/mL)	1.176 ± 0.00065	3.149 ± 0.0006***	6.601 ± 0.00050***

$P < 0.05$ : significant (\*);  $P < 0.01$ : very significant (\*\*); ( $P \leq 0.001$ ): very highly significant (\*\*\*).

agriculture and residential pest control throughout the world<sup>17-19</sup>. The goal of this work is to evaluate the oxidative stress status and mitochondrial dysfunction biomarkers after a chronic exposure to two doses of CPF; compared to the research of<sup>20,21</sup> where they have isolated rat hepatocyte. On this study, the exposure to two doses (375 ppm and 750 ppm) of *Oryctolagus cuniculus* caused considerable perturbation on enzymatic, redox status and mitochondrial parameters, with a significant increase in cytochrome-c level.

Oxidative damage to proteins associated with elevated in carbonyl residues number, which can be assayed by the stable hydrazone derivatives formed with 2,4-dinitrophenyl hydrazine<sup>22</sup>. The protein carbonyl assay has provided useful information about protein damage during aging and ischemia-reperfusion in the brains of gerbils<sup>23</sup>. In some other studies using CPF treatment resulted in increased oxidative stress of the body as evidenced by enhanced levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), accompanied by concomitant decrease in the levels of superoxide scavenging enzymes, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in serum, liver, kidney and spleen<sup>24-28</sup>, which showed a significant increase in total protein content under the effect of a chemical stress in different biological models (tadpoles, ciliated protists, rabbits). One of the most sensitive biomarkers of oxidative stress was observed in our study as a consequence of significant effects of two concentrated catalase<sup>29</sup>. The GSH a tripeptide antioxidant represents 90% of the non-protein thiols intracellular and neutralizes the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> and lipid hydroperoxides by its functional group-SH<sup>30</sup>. Treatment by these two doses decreased significantly the amount of mitochondrial GSH concordant to the results of<sup>31</sup>. Mitochondria is the primary sub-cellular target of the organophosphorous compounds, that inhibits the enzymatic activity and the ATP generation, causing structural alterations of the matrix and mitochondrial swelling<sup>32,33</sup>. Boulassel *et al.* (2014)<sup>34</sup> showed that the rate of oxidation of Succinate in isolated mitochondria is inhibited by the effect of both xenobiotics. Our study

showed that chronic exposure resulting in increases of MDA level accompanied by a decrease in glutathione activity in hepatic mitochondria, these results are in concordance with the results of<sup>35,36</sup>. The increase in malondialdehyde indicates lipid peroxidation according to (Bebiano *et al.*, 2005)<sup>37</sup>. Oxidative stress in exposed animals is translated by increased concentration of blood malonaldehyde and TBARS, changes in antioxidant status and altered activities of cellular enzymes<sup>38</sup>. Through this work, we showed an increase of GST in the presence of two doses of CPF, these results confirmed by recent works<sup>35</sup>. The antioxidant enzymes, SOD, CAT and GSH-Px have been shown to be significantly affected by pesticides including CPF<sup>25,26</sup>.

Chlorpyrifos has also been reported to induce oxidative stress in different parts of the brain, liver through increased levels of reactive oxygen species (ROS), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), nitrate (NO<sup>3-</sup>) and nitrite (NO<sup>2-</sup>)<sup>19</sup>. This work demonstrated an inhibition of cellular respiration in the presence of CPF resulting a perturbation of the mitochondrial respiratory chain. The mitochondrial electron transport chain can also produce significant quantities of ROS, primarily due to the presence of the ubisemiquinone radical which can transfer a single electron to oxygen and produce superoxide<sup>39</sup>. Many other researches also showed that mitochondria are the preferential sub-cellular target of the organophosphorus insecticides and also a generating source of free radicals<sup>32,40</sup>. In the metabolism of some xenobiotics they could interact with the mitochondrial respiratory chain. In this way superoxide could be generated by the blockade of electron transport chain or they may accept an electron from a respiratory carrier and transfer it to molecular oxygen stimulating superoxide formation<sup>41,42</sup> demonstrated a strong inhibition of mitochondrial respiration of *Euglena gracilis* treated with chromium Our results fully compatible with this work.

Our results confirmed that treatment with CPF induced high levels of Cyt-c followed by apoptosis this is confirmed by a high swelling and mitochondrial permeability amount. Upon exposure to a pesticide, the

induction path of the predominant apoptosis that is dependent on mitochondria<sup>43</sup>. This scheme requires the release into the cytosol of apoptogenic proteins contained in the inter-membrane space of mitochondria such the AIF or Cyt-c. The latter, once re-expanded in the cytoplasm, resulting in the Apaf-1 recruitment and proCas-9. This trimer, named apoptosome leads to activation of Cas-9, the initiator of the mitochondrial pathway. The latter leads to the activation of Cas-3<sup>44</sup>. Different mechanisms controversial still realize the release of apoptogenic proteins of the mitochondrion to the cytosol<sup>45</sup>, the permeability transition port (pore PT) would be associated with the reduction in potential mitochondrial membrane ( $\Delta\psi_m$ ). The fall of potential lead to a massive entry of water and ions causing swelling and ultimately a physical disruption of mitochondrial outer membrane responsible for the release of apoptogenic proteins<sup>46-48</sup>.

In addition, The Cyt-c synthesized as a precursor apo-cyt-c, this is then transported into the mitochondria, where it is converted into globular protein called holo-Cyt-c that allows the transport of electrons between the complex III and IV of the mitochondrial respiratory<sup>49</sup>. In response to a stimulus, the Cyt-c can be translocated from the mitochondria into the cell cytoplasm. In most cases, the release of Cyt-c is dependent on Cas activity but its release mechanism raises controversy<sup>50-52</sup>. Heiskanen *et al.* (1999)<sup>53</sup> have shown that Cyt-c release and  $\Delta\psi_m$  fall took place at the same time.

## Conclusion

In this work, we are interested in the effect of CPF on the subcellular scale. We have also demonstrated an inhibition of mitochondrial antioxidant enzymes activities in the presence of two concentrations of CPF, the cytochrome-c amount in cytoplasm confirm the apoptotic phenomenon produced by this pesticide. All these perturbations are due to the accumulation of ROS that inhibit the most of enzymes.

## Materials and Methods

### Chemical Product

Chlorpyrifos (CPF) [O,O-diethyl O3-5-6-tricloro-2-pyridinol phosphorothionate CPF] commercial formulation CHLOROFOS EC 480 g/L chlorpyrifos Ethyl.

### Animals

For our experiments, we chose to work on rabbits *Oryctolagus cuniculus*. All rabbits were males weighing between 1.5-1.8 kg. Animals were kept under con-

stant conditions of temperature environ  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  and humidity  $35 \pm 5\%$ . The total body weight was daily recorded before and during the experiments. There was a gain in body weight and increase of food consumption indicating the good conditions of laboratory.

### Experimental Design

We have handled 15 rabbits. These rabbits were divided on 2 lots of 5 rabbits and we kept five rabbits as control. The treatments began at the 15<sup>th</sup> day (adaptation period of rabbits) all treatments are *per Os* (p.o) as follows:

Group 1: controls no treatments.

Group 2: was treated with CPF at 375 ppm for 90 days.

Group 3: was treated with CPF at 750 ppm for 90 days.

After 90 days of treatment the rabbits were sacrificed and the livers were collected; the mitochondrial extraction were proceeding. some parameters of oxidative stress in the livers mitochondria (GSH, GST, MDA, GPx, CAT) was investigated crowned by the estimation of swelling and respiration parameters. Cytochrome c level also was estimated in the cytoplasm to know the impact on apoptotic pathway.

### Determination of Cytochrome c Level

Determination of cytochrome c level in liver tissue was performed using commercial kit the Cytochrome c Assay Kit (CYTOCOX1), uses an optimized colorimetric assay based on observation of the decrease in absorbance of ferrocytochrome c measured at 550 nm (Sigma®).

### Extraction of Mitochondria

All operations were carried on ice. cells were placed into buffer A containing 50 mM tris, 1 mM EGTA, 70 mM Sucrose, 210 mM Mannitol, pH 7.4 at  $+4^\circ\text{C}$ . Then, the homogenate was centrifuged at 1,300 g for 3 min,  $4^\circ\text{C}$ . The supernatant was centrifuged at 10,000 g for 10 min,  $4^\circ\text{C}$  to sediment mitochondria. Finally, the mitochondrial pellet was washed twice and then suspended in 50 mM Tris, 70 mM sucrose, 210 mM mannitol, pH 7.4 at  $+4^\circ\text{C}$ . Protein content was routinely assayed with a Bradford assay using bovine serum albumin as a standard<sup>54</sup>. Mitochondria were kept on ice and used within 4 h.

### Mitochondrial Respiration and Swelling Assay

According to the method of <sup>55</sup> we carried out the estimation of the mitochondrial permeability based on the rate of traverse of  $\text{Ca}^{++}$  followed by an increase in

mitochondrial size detected at 540 nm wavelength for 3 minutes and each 30 second. Respiration was estimated using an Oxygraph (Hansatech) according to the method described by Rouabhi *et al.* (2006, 2009)<sup>56,57</sup>.

#### Determination of Glutathione (GSH)

The determination of glutathione realized by<sup>58</sup>. The principle of this determination is based on measuring the absorbance of 2nitro-5-mercapturique.

#### Determination of Glutathione Peroxidase (GPx) Activity

The enzymatic activity of GPx was measured by the method of<sup>59</sup> using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as substrate.

#### Determination of Glutathione S-Transferase Activity (GST)

The measuring of glutathione s transferase activity has been estimated by the method of<sup>60</sup> It is based on the conjugation reaction between GST and a substrate.

#### Determination of Catalase (CAT) Activity

The spectrophotometric determination of catalase (CAT) activity is carried out according to the method of<sup>61</sup>.

#### Statistical Analysis

The significant differences between the control and the treated groups were determined by the Student's t test. Statistical calculations were carried out using Minitab 17.1 statistical package and the Excel 16.0 (Microsoft, Inc.).

### Acknowledgements

First of all, my thanks are addressed to DGRSDT of Algeria and Prof. Said FEKRA the rector of Tebessa university for their support. This work was achieved in the laboratory of toxicology at applied biology department, Tebessa university which I address my gratitude to all personals.

### Funding

All funding is personal.

### Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

### Ethical approval

All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of Rabbits were followed.

### References

1. Parakasam, A., Sethupathy, S. & Latitha, S. Plasma and RBCs antioxidant status in occupational mal pesticide sprayers. *Clin. Chim. Acta.* **310**, 107-112 (2001).
2. Geological, U. S. The quality of our nation's waters - nutrients and pesticides, <https://pubs.usgs.gov/circ/1999/1225/report.pdf> (1999).
3. US EPA. Reregistration eligibility science chapter for chlorpyrifos. Fate and environmental risk assessment chapter (Revised June), <http://www.epa.gov/pesticides/op/chlorpyrifos/efedrral.pdf> (2000).
4. Minton, N. A. & Murray, V. S. G. A. Review of Organophosphate Poisoning. *Med. Toxicol. Adverse Drug. Exp.* **03**, 350-375 (1988).
5. Casida, J. E. & Quistad, G. B. Organophosphate toxicity: Safety aspects of non-acetylcholinesterase secondary targets. *Chem. Res. Tox.* **17**, 983-998 (2004).
6. Muñoz-Quezada, M. T. *et al.* Chronic exposure to organophosphate (OP) pesticides and neuropsychological functioning in farm workers: a review. *Int. J. Occup. Environ. Health. Apr.* **29**, 1-12 (2016).
7. Mackay, D. & Shiu, W.-Y. in *Physical-chemical Properties and Environmental Fate Handbook* (CRC Press LLC., U.S.A., 1999).
8. Khan, S. M. & Kour, G. Subacute oral toxicity of chlorpyrifos and the protective effect of green tea extract. *Pest. Biochem. Phys.* **89**, 118-123 (2007).
9. Rigterink, R. H. & Kenaga, E. E. Synthesis and Insecticidal Activity of Some O,O-Dialkyl 0-3,5,6-Trihalo-2-pyridyl Phosphates and Phosphorothioates. *J. Agric. Food Chem.* **14**, 304-306 (1966).
10. Sittig, M. in *Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens* 2nd Edn (eds Park Ridge N. J.) 581-582 (Noyes Publications, England and Wales, 1966).
11. Cremllyn, R. J., Dewhurst, B. B., Wakeford, D. H. & Raja, R. A. Studies of organophosphorochloridates. VI. Reactions of steroid phosphorochloridates with amines and some alcohols. *J. Chem. Soc. Perkin.* **19**, 1171-1179 (1972).
12. Slotkin, T. A., MacKillop, E. A., Ryde, I. T. & Seidler, F. J. Ameliorating the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: a mechanisms-based approach in PC12 cells. *Environ. Health Perspect.* **115**, 1306-1313 (2007).
13. Slotkin, T. A. Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **198**, 132-151 (2004).
14. Slotkin, T. A., Levin, E. D. & Seidler, F. J. Compara-

- tive developmental neurotoxicity of organophosphate insecticides: Effects on brain development are separable from systemic toxicity. *Environ. Health. Perspect.* **114**, 746-751 (2006).
15. Yoshikawa, T. & Naito, Y. What is oxidative stress? *J. Japan Med. Assoc.* **45**, 271-276 (2002)
  16. Yoshikawa, T. in *Science of Free Radicals* (Koudan Sha Saientifikku, Japan, 1997).
  17. Cox, C. Chlorpyrifos, Part 2: human exposure. *J. Pest. Ref.* **15**, 14-20 (1995).
  18. Mitra, N. K., Siong, H. H. & Nadarajah, V. D. Evaluation of neurotoxicity of repeated dermal application of chlorpyrifos on hippocampus of adult mice. *Ann. Agric. Env. Med.* **15**, 211-216 (2008).
  19. Mehta, A., Verma, R. S. & Srivastava, N. Chlorpyrifos-induced alterations in the levels of hydrogen peroxide nitrate and nitrite in rat brain and liver. *Pest. Biochem. Phys.* **94**, 55-59 (2009).
  20. Gultekin, F., Patat, S., Akca, M. & Akdogan, M. Melatonin can suppress the cytotoxic effect of chlorpyrifos on human Hep G2 cell lines. *Hum. Exp. Tox.* **35**, 47-55 (2006).
  21. El-Shenawy, N. S. Effect of insecticides fenitrothion, endosulfan and abamectin on antioxidant parameters of isolated rat hepatocytes. *In vitro Toxicol.* **24**, 1148-1157 (2010).
  22. Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. R. & Shacter, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* **233**, 346-357 (1994).
  23. Stadtman, E. R. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Ann. Rev. Biochem.* **62**, 797-821 (1993).
  24. Bebe, F. N. & Panemanogalore, M. Exposure of low doses of endosulfan and chlorpyrifos modifies endogenous antioxidants in tissues of rats. *J. Env. Sci. Health.* **38**, 349-363 (2003).
  25. Verma, R. S., Mehta, A. & Srivastava, N. *In vivo* chlorpyrifos induced oxidative stress: attenuated by antioxidant vitamins. *Pest. Biochem. Phys.* **88**, 191-196 (2007).
  26. Mansour, S. A. & Mossa, A. H. Oxidative damage, biochemical and histological alterations in rats exposed to chlorpyrifos and the antioxidant role of zinc. *Pest. Biochem. Physiol.* **96**, 14-23 (2010).
  27. Peccini, E., Staudenmann, W., Albergoni, V., Gabriel, R. D. & James, P. Purification and primary structure of metallothioneins induced by Cadmium in the protests *Tetrahymena pigmentosa* and *Tetrahymena pyriformis*. *European J. Biochem.* **226**, 853-859 (1994).
  28. Masaya, M., Yoshinobu, H., Ai, Y., Maki, K. & Yasuo, O. Determination of cellular levels of nonprotein thiols in phytoplankton and their correlation with susceptibility to mercury. *J. Phycol.* **38**, 983 (2002).
  29. Hopkin, S. P. in *Handbook of ecotoxicology* (eds Calow P) 397-427 (Blackwell, U.K., 1993).
  30. Franco, J. L. *et al.* Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 449-457 (2009).
  31. Rouabhi, R., Gasmi, S., Boussekine, S. & Kebieche, M. Hepatic Oxidative Stress Induced by Zinc and Opposite Effect of Selenium in *Oryctolagus cuniculus*. *J. Environ. Anal. Toxicol.* **05**, 289 (2015).
  32. Carlson, K. & Ehrlich, M. Organophosphorus compound-induced modification of SH-SY5Y human neuroblastoma mitochondrial transmembrane potential. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **160**, 33-42 (1999).
  33. Tos-Luty, S. *et al.* Dermal and oral toxicity of Malathion in rats. *Ann. Agric. Environ. Med.* **10**, 101-106 (2003).
  34. Boulassel, A. Evaluation of the toxicity of two drugs: Paracetamol and Ibuprofen, on a cellular model: *Paramecium tetraurelia*. Test on the subcellular scale. Doctorate thesis. Universite Badji Mokhtar de Annaba (2014).
  35. Gasmi, S., Rouabhi, R. & Kebieche, M. Deltamethrine induced neurodegeneration and behavioral effect by dysfunction cytosolic antioxidant system in rats' brain. *Algerian J. Nat. Sci.* **1**, 14-22 (2016).
  36. Taib, C. *et al.* Toxicity of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles on oxidative stress status stromal enzymes and mitochondrial respiration and swelling of *Oryctolagus cuniculus* brain cortex. *Toxicol. Environ. Health. Sci.* **8**, 349-355 (2016).
  37. Bebianno, M. J., Company, R., Serafim, A., Cosson, R. P. & Fiala-Medoni, A. Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathy-modiolus azoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Aquat. Toxicol.* **75**, 354-373 (2005).
  38. Lopez, J. *et al.* Oxidative stress markers in surgically treated patients with refractory epilepsy. *Clin. Biochem.* **40**, 292-298 (2007).
  39. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet.* **8391**, 1396-1397 (1984).
  40. Beal, M. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Biochem. Biophys. Acta.* **1366**, 211-223 (1998).
  41. Turner, K. J. *et al.* Altered gene expression during rat Wolffian duct development in response to in utero exposure to the antiandrogen linuron. *Toxicol. Sci.* **74**, 114-128 (2003).
  42. Rouabhi, R., Djebar-Berrebah, H. & Djebar, M. R. Impact of Flufenoxuron, an IGR pesticide on *Gallus domesticus* embryonic development *in ovo*. *J. Cell Anim. Biol.* **2**, 087-091 (2008).
  43. Gu, Z. T. *et al.* Heat stress induced apoptosis is triggered by transcription-independent p53, Ca<sup>2+</sup> dyshomeostasis and the subsequent Bax mitochondrial translocation. *Sci. Rep.* **5**, doi:10.1038/srep11497 (2015).
  44. Zou, H., Li, Y., Liu, X. & Wang, X. An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* **274**, 11549-11556 (1999).
  45. Jevtić, G. *et al.* Mitochondrial impairment, apoptosis

- and autophagy in a rat brain as immediate and long-term effects of perinatal phencyclidine treatment in fluence of restraint stress. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. **66**, 87-96 (2016).
46. Fromenty, B. Toxicité mitochondriale et métabolique des médicaments. *Réanimation* **19**, 552-567 (2010).
  47. Rachid, R., Houria, D. B. & Mohammed-R. D. Impact of Flufenoxuron, an IGR pesticide on *Gallus domesticus* embryonic development *in ovo*. *J. Cell Animal Biol.* **2**, 087-091 (2008).
  48. Ming-Yuan, X. *et al.* Redox status in liver of rats following subchronic exposure to the combination of low dose dichlorvos and Deltamethrin. *Pest. Biochem. Physiol.* **124**, 60-65 (2015).
  49. Ravagnan, L., Roumier, T. & Kroemer, G. Mitochondria the killer organelles and their weapons. *J. Cell. Physiol.* **192**, 131-137 (2002).
  50. Dayal, M. *et al.* Induction of Rat Brain Cytochrome P450s by Deltamethrin: Regional Specificity and Correlation with Neurobehavioral Toxicity. *Neurotox. Res.* **3**, 351-357 (2001).
  51. Yousef, M., Awad, T. & Mohamed, E. Deltamethrin-induced oxidative damage and biochemical alterations in rat and its attenuation by Vitamin E. *Toxicol.* **227**, 240-247 (2001).
  52. DiMauro, S. & Schon, E. A. Mitochondrial disorders in the nervous system. *Ann. Rev. Neurosci.* **31**, 91-123 (2008).
  53. Heiskanen, K. *et al.* Mitochondrial depolarization accompanies cytochrome c release during apoptosis. *Biol. Chem.* **274**, 5654-5658 (1999).
  54. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).
  55. Kristal, B. S., Park, B. K. & Yu, B. P. 4-hydroxynonéal est un puissant inducteur de la transition de perméabilité mitochondriale. *J. Biol. Chem.* **271**, 6033-6038 (1996).
  56. Rouabhi, R., Djebar-Berrebbah, H. & Djebar, M. R. Toxic Effect of a Pesticide, Diflubenzuron on Freshwater Microinvertebrate (*Tetrahymena pyriformis*). *Chin. J. Appl. Environ. Biol.* **12**, 514-517 (2006).
  57. Rouabhi, R., Djebar, H. & Djebar, M. R. Toxic Effects of Combined Molecule from Novaluron and Diflubenzuron on *Paramecium caudatum*. *Am-Euras. J. Toxicol.* **1**, 74-80 (2009).
  58. Weckbker, G. & Cory, J. G. Ribonucleotide reductase activity and growth of Glutathione depleted mouse leukemia L1210 cells *in vitro*. *Cancer Lett.* **40**, 257-264 (1988).
  59. Flohe, L. & Gunzler, W. A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* **105**, 114-121 (1984).
  60. Habig, H., Pabst, M. J. & Jokoby, W. B. Glutathione-S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130-7139 (1974).
  61. Cakmak, I. & Horst, W. J. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plantarum.* **83**, 463-468 (1991).