

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

ECOLE DOCTORALE « INGINIERIE & ENVIRONNEMENT »



MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de MAGISTER
En : Biotechnologie de l'Environnement

Par : madame **Lamia AIT SAID** épouse **NAIT CHERIF**

THEME

Contribution à l'étude de la cytotoxicité induite par les pesticides sur culture cellulaire

Soutenu publiquement le 18/12/2011, à l'E.N.P devant le jury :

Mr. Mameri Nabil	Professeur E.N.P	Président
Mr. Lounici Hakim	Professeur E.N.P	Directeur de Thèse
Mme. Abdi Nadia	Professeur E.N.P	Examinatrice
Mr. Khelifi Lakhdar	Professeur I.N.A	Examineur

Année universitaire 2010-2011

REMERCIEMENTS

A la mémoire de mon père, dieu seul sait combien tu me manques ! Je regrette de ne pas t'avoir parmi nous en ce moment tant attendu. J'espère que tu sois fière de moi là où tu es.

A ma très chère mère, qui m'a toujours entourée de son amour, et tellement plus encore, et qui a toujours été présente à mes côtés.

A mon très cher et tendre époux, pour m'avoir offert la possibilité d'arriver jusqu'ici, et pour avoir su gérer mes périodes de doute et de découragement.

A tout les gens que j'aime.....

Remerciements

Je voudrais vivement remercier les membres du jury pour le jugement de mon travail, et particulièrement Professeur Mameri Nabil, président du jury. A qui j'adresse mon profond respect, pour sa rigueur et son esprit scientifique qui seront toujours ma référence, je le remercie également pour les cours prodigués durant mon année théorique et pour m'avoir encore plus fait aimer la recherche.

Je souhaite sincèrement remercier Professeur Khelifi Lakhdar de m'avoir fait l'honneur d'être membre du jury. Et d'examiner et de juger mon travail.

Je souhaite sincèrement remercier Professeur Abdi Nadia, pour avoir accepté d'examiner et de juger mon travail je la remercie également pour les cours prodigués durant mon année théorique.

Mes premiers remerciements vont à mon directeur de mémoire, le Professeur Lounici Hakim, pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser ce projet, pour ses encouragements et ses conseils judicieux, et pour la grande liberté qu'il m'a accordée quant à l'accomplissement de mon projet.

Tous mes remerciements également à toute l'équipe du Service Immunologie de l'Institut Pasteur d'Alger. D'abord à Mr Abadi, je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance pour la confiance qu'il m'a témoignée en m'accueillant dans son laboratoire, et d'avoir mit à ma disposition le matériel ainsi que les réactifs. Je tiens également à remercier Raache Rachida pour sa gentillesse, aussi mes plus vifs remerciements vont au Docteur Salah Sofiane, responsable de l'unité d'auto-immunité à l'institut Pasteur, pour son indulgence et sa compréhension, durant la réalisation de ce mémoire.

Je tiens à remercier sincèrement mon amie FOUZIA GUESTINI, pour son soutien, et d'avoir toujours été là pour moi, surtout aux moments où j'avais le plus besoin d'elle. Merci pour ta compréhension, surtout pour ta patience Fouzia car sans toi je n'aurai jamais pu tenir et finaliser ce travail. Merci, pour avoir été pour moi la petite sœur que je n'ai pas eu.

Un GRAND merci à AHLEM MOKRANI, pour son amitié, sa gentillesse, et pour son soutien et sa présence dans les moments difficiles de ma vie. Que dieu me la garde et me la protège.

En outre je remercie chaleureusement toutes mes sœurs ainsi que mes frères, mes belles-sœurs ; particulièrement GHANIA, ainsi que mes beaux-frères, sans oublié mes nièces et mes neveux.

Sommaire

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION..... 1

CHAPITRE I. Généralités

1. Définition des pesticides.....	3
1.1. Classification des pesticides.....	4
1.2. Evaluation du risque d'un produit phytosanitaire.....	4
2. Les molécules phytosanitaires épandues.....	6
2.1. Les insecticides.....	7
2.1.1 Les organophosphorés.....	7
2.1.2. Les pyréthrinoides.....	8
2.1.3. Les néonicotinoïdes.....	8
2.2. Les fongicides.....	9
2.3. Les herbicides.....	10
3. Devenir des produits phytosanitaires dans l'environnement.....	10
3.1. Contamination des sols.....	11
3.2. Contamination des eaux.....	11
3.3. Contamination de l'air.....	12
3.3.1. Air extérieur.....	12
3.3.2. Air intérieur.....	12
4. Les possibles modes d'expositions de l'homme aux pesticides.....	13
4.1 Exposition professionnelle.....	13
4.2 Exposition non professionnelle.....	14
4.3 Exposition de l'enfant.....	14
5. Effets des pesticides sur la santé chez l'homme.....	15
5.1. Effets cancérogènes.....	15
5.1.1. Cancers chez l'adulte.....	15
5.1.2. Cancers chez l'enfant.....	15
5.2. Effets sur le système endocrinien et la reproduction.....	15
5.3. Effets neurologiques et neurocomportementaux.....	16
5.4. Effets sur l'immunité.....	18
5.5. Stress oxydant induit par les pesticides (xénobiotiques).....	19
6. Le stress oxydant.....	19
6.1. Les espèces réactives de l'oxygène.....	19
6.2. Conséquences du Stress oxydant.....	19
6.2.1. Oxydation des protéines et protéolyse.....	19
6.2.2. Attaque radicalaire de l'ADN.....	20
6.2.3. Peroxydation lipidique.....	21

Sommaire

7. Les systèmes antioxydants.....	21
7.1. Système de défense Non-enzymatique.....	22
7.1.1. Le glutathion.....	22
7.1.2. Autres molécules anti-oxydantes.....	24
7.2. Système de détoxification enzymatique.....	24
7.2.1. Fonction de détoxification des glutathion S-transférases.....	25
7.2.2. Les glutathion peroxydases.....	25
7.2.3. La glutathion réductase.....	26
7.2.4. La thioredoxine réductase	26
7.2.5. Les superoxyde dismutases.....	26
7.2.6. Les catalases.....	26
CHAPITRE II. Matériel et Méthodes	
I. Matériel.....	28
I.1. Matériel biologique.....	28
I.2. Choix des modèles d'études.....	28
I.3. Réactifs et produits chimiques.....	28
II. Méthodes.....	29
II.1. Etude de l'effet des pesticides sur la viabilité cellulaire	29
II.1.1. Entretien des cellules Vero.....	29
II.1.2. Dénombrement des cellules viables.....	30
II.1.3. Evaluation de la cytotoxicité des pesticides sur la lignée Vero.....	32
II.2. Etude de l'effet des pesticides sur la balance oxydative.....	33
II.2.1. Dosage du malondialdéhyde.....	33
II.2.1. Dosage du glutathion.....	34
II.3. Etude de l'effet des pesticides sur les protéines.....	35
II.4. Détection de la fragmentation de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose.....	36
II.4.1. Extraction d'ADN par la technique phénol/chloroforme.....	36
II.4.2. Dosage et contrôle de la qualité de l'ADN.....	37
CHAPITRE III. Résultats et Discussion	
III.1. Etude de l'effet cytotoxique des pesticides sur les cellules vero.....	39
III.2. Effet des pesticides sur la balance oxydative.....	41
III.2.1. Effet des pesticides sur la peroxydation lipidique.....	41
III.2.2. Etude de l'effet des pesticides sur le système antioxydant (glutathion).....	44
III.3. Etude de l'effet des pesticides sur les protéines.....	46
III.4. Etude des altérations de l'ADN induites par les pesticides.....	47
III.5. Discussion générale.....	49
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	54
BIBLIOGRAPHIE	56

Liste des Abréviations

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide Desoxyribo Nucleique.
AOEL: Admissible Operator Effect Level.
BSA: Bovine Serum Albumin.
B.T : Bleu de trypan.
C.N.T : Centre National de Toxicologie.
CAT : Catalase.
ChE : Cholinestérase.
Cpp : Le Comité de la prévention et de la précaution
DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane.
DJA: Dose Journalière Admissible.
DMEM : Milieu Minimum Essentiel d'Eagle modifié par Dulbecco.
DMSO : Dimethyl Sulfoxyde.
DTNB : 5,5'-dithiobis (2- acide nitrobenzoïque,)
EDTA : Ethylène Diamine Tétracétate.
ERO : Espèces réactives oxygénées.
GPx : Glutathion Peroxydase.
GR : Glutathion Réductase.
GSH : Glutathion.
GSSG : Glutathion Oxydé.
GST : Glutathion S-Transférase.
HNE : Hydroxynonanal.
IFEN : Institut Français de l'environnement
I.N.P.V : Institut National de la Protection des Végétaux.
I.P.A : Institut Pasteur d'Alger.
IC₅₀ : Concentration d'inhibition à 50%
Ineris : Institut national de l'environnement industriel et des risques.
LMR : Limites Maximales de Résidus.
MDA: Malondialdehyde
NOAEL: No-Observed Adverse Effect Level
PBS: Phosphate Buffer Saline
SOD : Superoxyde Dismutase
SVF : Sérum de Veaux Fetal
TBA: Acide Thiobarbiturique
TMB: 3-3, 5-5' Tetramethyl Benzidine
TNB : Acide 2-Nitro-5-Thiobenzoïque
TTE : Triton X-100, Tris-HCl, EDTA
UI : Unité Internationale
UV : Ultra Violet

INTRODUCTION

Introduction

Les produits phytosanitaires de protection des cultures – plus communément appelés pesticides – sont un des piliers de la production végétale d'une agriculture intensive. : se sont des substances chimiques minérales ou organiques, de synthèse ou naturelles qui sont utilisés depuis longtemps, destinés à assurer la destruction, ou à prévenir l'action des animaux, végétaux, micro-organismes dits nuisibles. Ils sont classés selon deux critères, leur cible : en insecticides, fongicides, rodenticides et herbicides ; et leur appartenance chimique : en organochlorés, organophosphorés, carbamates, pyréthriinoïdes, triazines et les urées substituées (Moeys, 2007).

Les pesticides sont soupçonnés de présenter un risque pour la santé de l'homme et pour son environnement. Ils sont fréquemment impliqués dans la réduction de la biodiversité terrestre et ils sont retrouvés dans l'air, le sol, les lacs et les rivières ainsi que dans les eaux douces souterraines et les eaux côtières (Sun et Hardy, 2000 ; Moore et *al.*, 2001 ; Hasheesh et *al* 2011). En effet, les atteintes structurales et fonctionnelles engendrées par les pesticides sur la composante biologique de la biodiversité aquatique (Paul-Pont, 2010).

Par ailleurs, outre leur caractère fortement mutagène et cancérigène, les pesticides peuvent entraîner à l'échelle de l'organisme d'importantes perturbations du système nerveux, cardiovasculaire, immunitaire, gastro-intestinal, endocrinien, hépatique, rénal, respiratoire et reproducteur. Plusieurs études ont également montré l'influence de l'environnement extérieur et intérieur sur le développement et l'entretien des allergies (Sailaja et *al.*, 2006 ; Atreya, 2008 ; Balaazi, 2009 ; Landau-Ossondo et *al.*, 2009).

Néanmoins, les événements cellulaires et moléculaires occasionnés sous l'effet des pesticides sont encore mal connus et font l'objet d'une forte mobilisation scientifique.

C'est dans ce contexte que s'inscrit le travail de ce mémoire présenté dans ce manuscrit. L'objectif modeste est d'apporter notre contribution à la compréhension des mécanismes intrinsèques impliqués dans le phénomène de cytotoxicité induit par différents pesticides afin d'évaluer les risques réels encourus par l'homme.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés particulièrement à l'étude des effets cytotoxiques de six pesticides comptant parmi les plus utilisés en Algérie. Trois insecticides : le chlorpyrifos (organophosphoré), la cyperméthrine (pyréthriinoïde) et l'acétamipride

(néonicotinoïde) également utilisés dans la lutte anti vectorielle. Deux fongicides : le mancozèbe (carbamate) qui fait l'objet d'un retrait définitif pour lequel l'iprodione correspond à son produit de substitution. Et enfin, un herbicide la métribuzine (triazine)

Pour ce fait, une approche expérimentale faite *in vitro*, par la culture d'une lignée cellulaire épithéliale, notamment des cellules rénales de reins de singe vert d'Afrique (Lignée Vero) afin d'évaluer la cytotoxicité et de déterminer les intervalles cytotoxiques à 20, 50 et 80%, par l'étude de l'effet des concentrations croissantes des pesticides pendant 24 heures, et ceci par le test du rouge neutre.

D'autre part, notre travail a été complété par l'étude biochimique du métabolisme cellulaire en analysant la perturbation de la balance oxydative occasionnée par les pesticides. Dans ce contexte, le dosage du malondialdéhyde, un marqueur de la peroxydation lipidique a été effectué dans les surnageants de cultures cellulaires. L'étude des systèmes de défense non-enzymatique a également été abordée par le dosage du glutathion impliqué dans la détoxification cellulaire.

Par ailleurs, des expériences complémentaires visant à élucider l'effet des pesticides sur les macromolécules cellulaires comme les protéines ont été faites par le dosage des protéines totales par la méthode de Lowry.

Enfin, l'effet des pesticides sur l'intégrité de la structure de l'ADN cellulaire a été analysé par l'utilisation d'un test qualitatif par électrophorèse sur gel d'agarose.

ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE

1. Définition des pesticides

Le terme "**pesticides**" est une appellation générique couvrant toutes les substances (molécules) ou produits (formulations) qui éliminent les organismes nuisibles, qu'ils soient utilisés dans le secteur agricole ou dans d'autres applications. La substance ou le microorganisme qui détruit ou empêche les organismes nuisibles de s'installer sur les végétaux, parties de végétaux ou produits végétaux est dénommée substance active (anciennement dénommée matière active), à laquelle sont associés dans la préparation un certain nombre de «formulants» (mouillants, solvants, anti-mousses, ...) qui la rendent utilisable par l'agriculteur (ACTA, 2005).

Les pesticides à usage agricole peuvent être désignés de différentes façons : produits phytosanitaires pour les firmes qui les fabriquent et les vendent, produits phytopharmaceutiques pour la réglementation et produits agro-pharmaceutiques pour les scientifiques agronomes.

- **Les produits phytopharmaceutiques** : ils sont utilisés principalement pour la protection des végétaux en agriculture contre les attaques de champignons parasites, d'insectes, d'acariens, de rongeurs ou encore pour lutter contre les adventices ou "mauvaises herbes". Leurs utilisations peuvent s'élargir à d'autres secteurs ; aménagement des paysages et entretien des abords d'axes de transport.

- **Les produits phytosanitaires** « les substances actives et les préparations contenant un ou plusieurs substances actives qui sont présentes sous la forme dans laquelle elles sont livrées à l'utilisateur et destinées à :

- Protéger les végétaux ou les produits végétaux contre tous les organismes nuisibles ou à prévenir leur action ;

- Exercer une action sur les processus vitaux des végétaux, pour autant qu'il ne s'agisse pas de substances nutritives;

- Assurer la conservation des produits végétaux, pour autant que les substances ou produits ne fassent pas l'objet de dispositions particulières du Conseil ou de la Commission concernant les agents conservateurs ;

- Détruire les végétaux indésirables;

- Détruire des parties de végétaux, freiner ou prévenir une croissance indésirable des végétaux » (INERIS 2005)

- **Les biocides:** Ce sont des préparations contenant une ou plusieurs substances actives destinées à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à en prévenir l'action ou les combattre de toute autre manière par une action chimique ou biologique. Les biocides sont destinés à des usages domestiques, par exemple dans des applications comme la protection du bois contre les champignons ou les termites, les insecticides ménagers, les produits antiparasitaires (anti-acariens, antipuces).

1.1. Classification des pesticides

Les pesticides disponibles aujourd'hui sur le marché sont caractérisés par une telle variété de structure chimique, de groupes fonctionnels et d'activité que leur classification est complexe. D'une manière générale, ils peuvent être classés en fonction de la nature de l'espèce à combattre mais aussi en fonction de la nature chimique de la principale substance active qui les compose. Selon l'index de l'ACTA qui référence les principaux produits autorisés et commercialisés.

- **Le premier système de classification** repose sur le type de parasites à contrôler. Il existe principalement trois grandes familles de produits phytosanitaires selon la nature des cibles visées: les herbicides, les fongicides et les insecticides.

- **Le deuxième système de classification** tient compte de la nature chimique de la substance active majoritaire qui compose les produits phytosanitaires. Les principaux groupes chimiques comprennent les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates, les pyréthriinoïdes, les triazines et les urées substituées.

1.2. Evaluation du risque d'un produit phytosanitaire

L'évaluation du risque d'un produit phytosanitaire pour l'homme est constituée d'une batterie de tests; tests de toxicité (aiguë, à court et à moyen terme), de mutagénèse, de cancérogénèse, et de tests de toxicité pour la reproduction (non faits en Algérie).

a. Les tests de toxicité : Les tests de toxicité aiguë DL_{50} orale, DL_{50} cutanée et CL_{50} inhalatoire chez le rat, irritation cutanée et oculaire chez le lapin, sensibilisation cutanée chez

le cobaye, permettent d'estimer la dose létale ainsi que les effets irritants ou sensibilisants d'un produit, ils durent en général 28 jours.

b. Les tests de mutagénèse et de génotoxicité : Les tests de mutagénèse sont réalisés chez les procaryotes et sur des cellules de mammifères. L'étude de génotoxicité se fait via la réalisation des tests d'aberrations chromosomiques tels que des tests de clastogénèse sur des cellules de mammifères in vitro.

c. Les tests de cancérogénèse : Sont conduits sur deux espèces animales exposées par voie orale (2 ans chez le rat et 18 mois chez la souris).

d. Les tests de toxicité pour la reproduction : Ces tests correspondent à des études réalisées sur plusieurs générations chez les rongeurs, et concernent les effets sur la fertilité et la gamétogénèse chez les parents ainsi que le développement pré/post-natal, la mortalité et la croissance des petits. De plus, les effets tératogènes ou les effets sur l'organogénèse suite à des expositions pendant des périodes critiques du développement seront également examinés chez la rate (J6-J15-J17) ou la lapine (J6-J18).

L'ensemble de ces tests va permettre de définir les seuils toxicologiques de référence dans le but d'assurer la sécurité de l'opérateur et du consommateur.

- **AOEL** (Admissible Operator Effect Level) qui, en définition, fixe le niveau de danger acceptable pour l'opérateur (ou les professionnels). Cette dose (exprimée en mg substance/kg de poids corporel/j) est calculée à partir de la dose NOAEL obtenue chez l'animal le plus sensible (souvent rat) et selon le type d'exposition. NOAEL : No-Observed Adverse Effect Level ou Dose Sans Effet Nocif Observé (DSENO) pour chaque espèce.

- **DJA** (Dose Journalière Admissible ou Admissible Daily Intake ; ADI) qui est définie comme un seuil de sécurité sanitaire à long terme et représente la quantité de produit qui peut être ingérée par un individu quotidiennement et pendant toute une vie sans risque pour la santé. La DJA, exprimée en mg/kg de poids corporel/j, est fondée sur la valeur NOAEL obtenue après des tests à long terme chez l'espèce animale la plus sensible (rat ou souris).

- **LMR** (Limites Maximales de Résidus) qui sont définies pour les cultures autorisées au traitement. Les LMR (mg de substance/kg de produit agricole) sont établies par les autorités en fonction de l'évaluation des résidus trouvés au cours d'essais aux champs. L'ensemble des

LMR fixées pour les denrées végétales, les denrées animales et l'eau doit conduire au respect de la DJA et de chaque substance évaluée afin d'éviter tout risque inacceptable de toxicité aiguë ou chronique. Contrairement aux aliments courants, les aliments infantiles sont soumis provisoirement à une LMR unique de 0,01 mg/kg dans le produit fini. (INERIS)

2. Les molécules phytosanitaires épandues

Après la seconde guerre mondiale, l'intensification de l'agriculture a initié puis généralisé l'utilisation de produits phytosanitaires (Guimont, 2005). Et aucun secteur n'échappe à cette utilisation de pesticides, qui répond depuis plusieurs années à un besoin de productivité et de qualité des cultures.

Ils permettent en effet la lutte contre les adventices (herbicides), contre les insectes ravageurs (insecticides) ou les maladies fongiques (fongicides). Cependant, le monde agricole, poussé par la recherche scientifique, a pris conscience des effets néfastes de ces pesticides pour l'environnement et a quelque peu modifié ses pratiques culturales.

L'épandage intensif de produits phytosanitaires est désormais banni : les doses appliquées ont été revues à la baisse depuis plusieurs années et les molécules jugées trop nocives ont été retirées du marché. Toutefois, même si l'agriculture est plus raisonnée de nos jours, l'usage de pesticides reste courant et nécessaire dans bien des cas pour rester compétitif.

Les molécules épandues s'avèrent être très généralement utilisées dans la lutte anti-acridienne, la lutte anti-vectorielle, en viticulture, dans la culture de pomme de terre, ainsi que dans la culture des agrumes en Algérie. Les molécules suivies dans le cadre de notre étude ont été choisies en fonction de leur disponibilité, ainsi que leur fréquence d'application en territoire national.

La cyperméthrine, le chlorpyrifos, ainsi que l'acétamipride, figurent sur la liste des insecticides les plus utilisés en Algérie de part leur utilisation dans le domaine agricole, et aussi dans la lutte anti-acridienne (Ref. M.A.D.R 2009) Le mancozèbe fongicide très utilisé sur tout le territoire national, dans la lutte contre le mildiou (culture de la vigne, la tomate et la pomme de terre), pendant de longue période, est en ce moment en voie de retrait du marché, et remplacée par l'iprodione, fongicide quatre saisons à large spectre efficace contre la fusariose, la plaque brune, la brûlure en plaques, la tache de la feuille, lutte contre la

moniliose (pêcher, abricotier). Présentement en Algérie, la métribuzine figure parmi les désherbants les plus utilisés sur les cultures de tomate, de pomme de terre, et des poivrons.

2.1. Les insecticides

Afin de s'affranchir des insectes nuisibles et ravageurs des cultures, la stratégie «insecticide» choisie actuellement, obéit aux techniques les plus utilisées en protection des cultures, il s'agit d'un épandage alternatif d'un insecticide organophosphoré et d'un pyréthriinoïde de synthèse. La lutte contre les ravageurs s'avère indispensable. Les insectes nuisibles sont en effet responsables des pertes de rendement et d'une baisse de qualité des productions (Kreiter et *al.*, 2008).

2.1.1. Les organophosphorés

Les organophosphorés sont des pesticides qui ont en commun leur mode d'action sur le système nerveux des ravageurs. Ces insecticides ont en général une toxicité aiguë plus élevée que les organochlorés, mais ils se dégradent beaucoup plus rapidement.

- **Le chlorpyrifos** ($C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$) de poids moléculaire 350.62g/mole, est un insecticide organophosphoré utilisé pour lutter contre les moustiques, les mouches, divers nuisibles dans les cultures par épandage sur le sol ou le feuillage, les nuisibles de maison et les larves aquatiques. Il sert aussi à lutter contre les ectoparasites chez les ovins et les bêtes à cornes. Le chlorpyrifos agit par contact, ingestion et inhalation sur un grand nombre d'insectes néfastes, il inhibe l'activité catalytique des cholinestérasés.

La cholinestérase (ChE), est une enzyme qui régule la transmission de l'influx nerveux entre cellules nerveuses au niveau de la synapse. Elle a pour fonction de catalyser l'hydrolyse de ce neuromédiateur de façon à ce que la stimulation du récepteur cesse, ce qui libère la synapse pour une transmission ultérieure. Le chlorpyrifos, en tant qu'inhibiteur se fixe de manière irréversible sur la ChE à la place de l'acétylcholine et empêche ainsi l'arrêt de la transmission de l'influx nerveux ; l'insecte est alors victime d'une tétanie neuro-musculaire entraînant sa mort (Charpentier et *al.*, 2000).

Chez l'homme, le chlorpyrifos est facilement absorbé par le tube digestif et sa métabolisation est rapide. Les métabolites sont excrétés principalement dans les urines et, à un degré moindre, dans les fèces; les principaux métabolites sont le phosphate de trichloro-

3,5,6 pyridyle-2 et le trichloro-3,5,6 pyridinol-2. On a décelé de petites quantités de chlorpyrifos non métabolisé dans le sang, le cerveau et le foie après ingestion accidentelle par les humains (Lores et *al.*, 1978)

Le chlorpyrifos est fortement absorbé par le sol; on ne prévoit donc pas qu'il ait beaucoup tendance à la lixiviation. Il persiste dans le sol pendant des périodes allant de 60 à 120 jours (Worthing., 1983). Sa dégradation est principalement attribuable à l'action microbienne. Ses produits de dégradation comprennent le trichloro-3,5,6 pyridinol-2, qui est ensuite scindé en composés organochlorés et en dioxyde de carbone.

2.1.2. Les pyréthrinoïdes

Les pyréthrinoïdes, sont le fruit de synthèses chimiques complexes, reproduisant la structure et l'action biologique de molécules naturellement présentes dans une variété de chrysanthème. Les pyréthrinoïdes représentent plus de 30% du marché mondial des insecticides, outre leurs applications agricoles et industrielles (traitement des denrées stockées), ils sont très utilisés en santé publique, surtout dans la lutte anti-vectorielle.

- **La cyperméthrine** ($C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$), de poids moléculaire 416.31 g/mole, est un pyréthrinoïde photostable, à large spectre d'activité, présentant une persistance d'action prolongée et des propriétés de biodégradabilité. Pour ces raisons, la cyperméthrine a été très largement utilisée à travers le monde pour la protection d'une grande variété de cultures.

Sa demi-vie dans les sols varie de 30 jours, Ce paramètre, représente le potentiel de dégradation de cette substance active, et sa vitesse de dégradation dans le sol.

La cyperméthrine, module l'activité du canal ionique sodium. Action toxique au niveau des axones par interférence avec le fonctionnement du canal sodium au niveau du système nerveux central et du système nerveux parasympathique, par stimulation de décharges nerveuses à répétition causant la paralysie (Cassida et *al* 1983).

2.1.3. Les néo-nicotinoïdes

Classe d'insecticides neurotoxique, tel que l'imidaclopride, présent sur le marché de l'agrochimie depuis 1994. Regroupe des insecticides accusés de provoquer la disparition des abeilles comme le Gaucho. Les néonicotinoïdes fonctionnent comme l'acétylcholine un

neurotransmetteur, et se fixent sur son récepteur au sein des synapses des cellules nerveuses modifiant ainsi l'influx nerveux.

- **L'acétamipride** ($C_{10}H_{11}ClN_4$) de poids moléculaire 222.67 g/mole, appartient à la famille des néonicotinoïdes, dernière génération des insecticides biocides. L'acétamipride est très stable au pH, aux UV ce qui permet aux formulations qui la contiennent d'assurer une protection longue durée. Cette matière active présente un très bon profil éco-toxicologique. L'acétamipride agit sur la région post-synaptique des insectes en bloquant les récepteurs d'acétylcholine ce qui entraîne une élimination rapide des insectes. Cette molécule agit surtout par ingestion, et par contact (Iwasa et *al* 2004).

2.2. Les fongicides

Les fongicides sont des agents phytosanitaires destinés à combattre les champignons pathogènes des plantes cultivées. En effet, ces champignons, en s'attaquant aux tissus des plantes, causent des pertes de rendement très importantes et abîment les cultures.

- **Le mancozèbe** de poids moléculaire 271.3 g/mole, est un fongicide appartenant à la famille des di-thiocarbamates. Ce sont des composés peu volatils, peu ou pas hydrosolubles et dépourvus d'activité anticholinestérasique.

Ils représentent la classe d'anticryptogamiques la plus employée actuellement en raison de son efficacité (inhibition de la germination des spores fongiques), de sa polyvalence, de sa faible rémanence et de sa faible toxicité. L'exposition de la population générale, provient des résidus alimentaires (épinards, salades, légumes).

- **L'iprodione** dont la formule brute est: $C_{13}H_{13}Cl_2N_3O_3$, et de masse molaire : 330.2 g/mole, est un fongicide de contact qui appartient au groupe chimique des dicarboximides (Orth et *al.*, 1992 ; Ronis et *al.*, 1995 ; Choi et *al.*, 1996).

L'iprodione inhibe la germination des spores et bloque le développement de nombreux champignons à l'origine des pourritures. Il est employé sur des légumes, des fruits à pépins, des cultures de racines, coton, et des tournesols, et peut également être employé comme fongicide après la moisson et comme traitement de graine (Pomer and Lorenz., 1987).

2.3. Les herbicides

Les herbicides sont destinés à éliminer les mauvaises herbes en agriculture pour prévenir ainsi les phénomènes de concurrence vis-à-vis de la plante et limiter le développement des ravageurs et des maladies par le microclimat créé.

Même si les herbicides sont conçus pour cibler les végétaux, ils peuvent être toxiques pour l'être humain et la faune. L'impact des herbicides sur l'environnement varie considérablement, en particulier leur toxicité et leur persistance dans l'environnement.

- **La métribuzine** ($C_8H_{14}N_4OS$) de poids moléculaire 214.29 g/mole, est un herbicide de la famille des triazines, employé en prélevée et en post-levée pour lutter contre les mauvaises herbes qui parasitent diverses cultures agricoles.

La dégradation microbienne est la principale voie d'élimination de la métribuzine du sol. Elle serait rapidement détoxifiée par désamination via un champignon du sol *Cunninghamella echinulata*. Le degré de lixiviation de la métribuzine dans la nappe phréatique est fonction inverse de la teneur du sol en matières organiques. Sa demi-vie dans les sols varie de deux à quatre mois, et dans les eaux stagnantes, elle est d'environ sept jours (Pritchard, 1986).

L'apport maximal de métribuzine absorbée avec les aliments est, en théorie, de 0,12 mg/jour, lorsque le calcul est fondé sur les limites maximales de résidus tolérées.

3. Devenir des produits phytosanitaires dans l'environnement

Malgré un souci croissant de protection de l'environnement, lors de l'utilisation des produits phytosanitaires, une certaine quantité de ces substances se retrouve dans l'environnement, principalement dans l'air par dérive sous forme de gouttelettes ou sur le sol (Pimentel, 1995). Ils peuvent alors être soumis à différents processus, notamment la photo-dégradation (Marcheterre *et al.*, 1988) ; la dégradation par le phénomène d'hydrolyse aqueuse (Wolfe *et al.*, 1990) ou de biodégradation grâce aux micro-organismes présents dans le sol (Colin, 2000) ; la rétention dans le sol jusqu'à la formation de résidus liés (adsorption) (par exemple l'accumulation des fongicides à base de cuivre dans les sols) ; le transport vers d'autres compartiments environnementaux par des processus physicochimiques (volatilisation) ou via un vecteur, l'eau par lixiviation ou ruissellement ou les particules de sol (désorption) (Van Der Werf, 1996) (**Figure 1**).

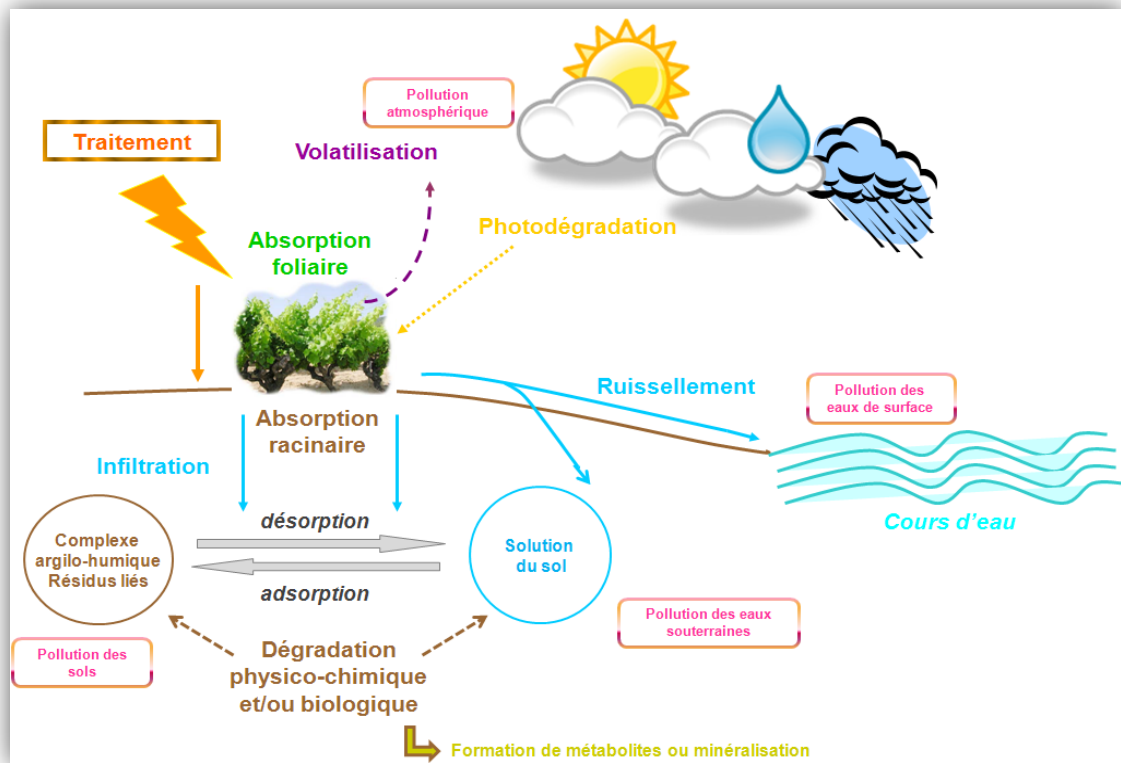


Figure 1 : Devenir des pesticides dans l'environnement après application (Schreck, 2005)

3.1. Contamination des sols

Les pesticides dans les sols peuvent provenir des activités agricoles mais également des activités d'entretien des espaces verts et jardins ou de désherbage des réseaux routiers et ferrés. La vitesse d'infiltration des pesticides dans le sol dépend du sol (humidité, taux de matière organique, pH) et du pesticide. Il est connu que les insecticides organochlorés sont assez persistants dans l'environnement et certains, bien qu'interdits d'usage, peuvent rester présents dans le sol pendant plusieurs années (lindane, alpha-HCH). A l'heure actuelle les insecticides utilisés (organophosphorés, pyréthriinoïdes, carbamates et autres) se dégradent rapidement, par contre les herbicides sont assez persistants dans les sols et leurs produits de dégradation sont souvent stables. D'autres sources de contamination des sols proviennent des industries produisant et/ou procédant au stockage des substances phytosanitaires.

3.2. Contamination des eaux

Une des conséquences environnementales majeures de l'agriculture intensive actuelle est la dégradation de la qualité des eaux. Cette dégradation se traduit, pour les eaux de surface

comme pour les eaux souterraines, par une pollution liée à la dissémination des intrants agricoles que sont les produits phytosanitaires, les engrais minéraux azotés et phosphatés ou encore les effluents d'élevage (IFEN, 2007). Les pesticides peuvent facilement pénétrer dans le sol et les sources d'eau (Lennartz *et al.*, 1997; Louchard *et al.*, 2001).

La contamination par les pesticides est le plus souvent un phénomène irrégulier. Il est à noter que des pics de concentration sont fréquemment observés dans les quelques heures qui suivent les épisodes pluvieux (Schulz, 2001; Neumann *et al.*, 2003) et que la contamination des eaux de surface est d'autant plus élevée que la surface des bassins versants est faible (Schulz, 2004). Par ailleurs, dans certaines régions, une part significative de la contamination des eaux peut parfois provenir du dépôt de substances transportées par voie aérienne (Blanchoud *et al.*, 2002) ou beaucoup plus fréquemment découler d'usages autres qu'agricoles, qu'il s'agisse du désherbage des infrastructures de transport ou industrielles, des parcs et jardins ou bien d'utilisations domestiques (Gerecke *et al.*, 2002; Revitt *et al.*, 2002; Schiff *et al.*, 2002; Blanchoud *et al.*, 2004).

3. 3. Contamination de l'air

a. Air extérieur

La présence de pesticides est observée dans toutes les phases atmosphériques en concentrations variables dans le temps (avec parfois un caractère saisonnier, en lien avec les périodes d'application) et dans l'espace (selon la proximité des sources). L'air et l'eau pouvaient être contaminés, de manière locale, mais aussi à distance des lieux de traitement. Cette contamination est chronique. Des composés peu volatils ou interdits ont parfois été observés. Dans le cas spécifique de traitements en serre, des concentrations élevées ont pu être observées juste après l'application et malgré une décroissance, ces concentrations peuvent rester à un niveau significatif pendant plusieurs jours après le traitement (INERIS, 2005).

b. Air intérieur

Les pesticides peuvent contaminer l'air intérieur non seulement suite à leur application ou leur stockage dans les logements, mais également du fait du transport des produits utilisés à l'extérieur (agriculture, jardins, parcs) par l'intermédiaire des chaussures, des vêtements, des animaux domestiques ou par l'air (INERIS, 2005).

4. Les possibles modes d'expositions de l'homme 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, 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 de 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 (**Figure 2**).

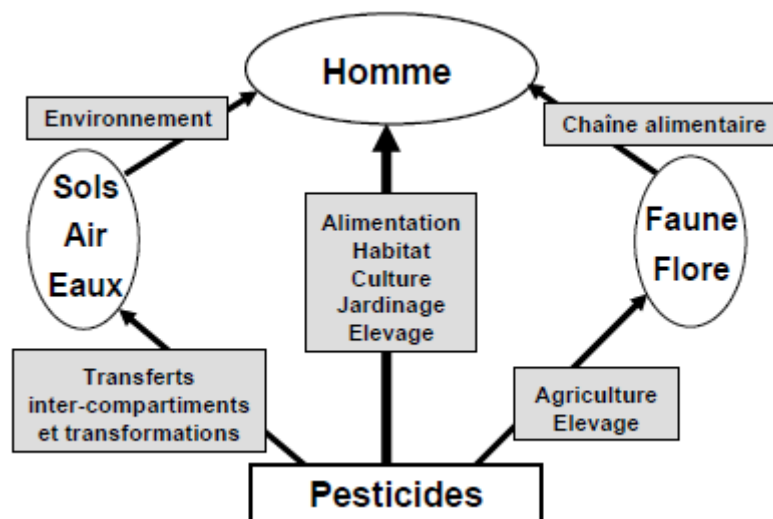


Figure 2 : Modes d'exposition de l'homme et des milieux par les pesticides (CPP, 2002)

4.1. 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. Cependant, les données des bilans de surveillance ne portent souvent que sur des manifestations toxiques aiguës ou subaiguës. Dès lors, d'une part, une partie non négligeable de la population exposée (exploitants non salariés, saisonniers, etc.) n'est pas prise en compte et, d'autre part, les effets chroniques ne peuvent être relevés systématiquement. De plus, l'exposition professionnelle aux pesticides des agriculteurs est très variable et complexe selon les exploitations agricoles.

Elle est le plus souvent saisonnière et correspond à une succession de journées d'utilisation de produits chimiquement différents au cours de la saison et souvent également au cours d'une même journée (CPP, 2002).

L'absorption des pesticides par la peau est révélée comme la voie d'exposition la plus significative en milieu agricole (Jakubowski and Trzcinka-Ochocka, 2005). 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.

4.2. 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.

4.3. 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 (Jurewicz *et al.*, 2006) et l'alimentation (CEC, 2002; Jurewicz *et al.*, 2006), soit indirectement pour les enfants de parents professionnellement exposés. 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; 2008). Quant aux pesticides organochlorés, ils seront essentiellement transmis via le lait maternel (Campoy *et al.*, 2001).

5. Effets des pesticides sur la santé de l'homme

5.1. Effets cancérigènes

5.1.1. Cancers chez l'adulte (Exposition professionnelle)

Chez les agriculteurs, malgré une espérance de vie plutôt supérieure à la moyenne du fait d'une sous-mortalité par maladies cardiovasculaires et par cancer en général, la mortalité et l'incidence de certains types de cancers sont augmentées par rapport à la population générale (Romieu *et al.*, 2000; Wolff *et al.*, 2000). Bien que de nombreuses études épidémiologiques suggèrent que cette augmentation serait corrélée avec l'exposition aux pesticides, cette relation reste toujours confuse et non conclusive.

Globalement, ces études ont montré une augmentation de la fréquence des dommages à l'ADN (Lebailly *et al.*, 1998; Garaj-Vrhovac and Zeljezic, 2000; Simoniello *et al.*, 2008), des aberrations chromosomiques (cassures, translocations) (Lander *et al.*, 2000; Roulland *et al.*, 2004; Sailaja *et al.*, 2006; Muniz *et al.*, 2008) de la présence de micronoyaux (Gomez-Arroyo *et al.*, 2000; Bolognesi *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2006), d'adduits à l'ADN (Le Goff *et al.*, 2005) dans les lymphocytes du sang périphérique ainsi qu'une augmentation des bases oxydées de type 8-OH-dG dans le plasma (Muniz *et al.*, 2008). Ces études confortent l'hypothèse selon laquelle les pesticides pourraient être au moins en partie à l'origine de certains cancers.

5.1.2. Cancers chez l'enfant

Les cancers constituent la deuxième cause de mortalité chez les enfants après les accidents domestiques (Savitz, 2001; Damstra, 2002; Nasterlack, 2007). Les leucémies représentent le groupe de cancers le plus fréquent chez l'enfant, suivies par les tumeurs cérébrales puis les lymphomes. Plusieurs facteurs peuvent être impliqués dans l'étiologie de ces cancers tels que l'exposition aux polluants environnementaux et en particulier les pesticides (Nasterlack, 2007).

5.2. Effets sur le système endocrinien et la reproduction

Plusieurs pesticides, parmi lesquels des insecticides (DDT, Endosulfan, Dieldrine, Methoxychlore, Dicofol, Toxaphène) des nématocides (Aldicarbe) des herbicides (Alachlore, Atrazine, Nitrofène, 2,4D) des fongicides (Mancozèbe, Vinchlozoline) figurent sur la liste des perturbateurs endocriniens. Certaines de ces molécules sont aujourd'hui interdites en Europe

mais peuvent néanmoins toujours être présentes dans notre environnement (Cravedi *et al.*, 2007).

Plusieurs études se sont intéressées aux effets des pesticides sur la reproduction, en particulier sur la fertilité masculine. Les pesticides peuvent agir au niveau de la spermatogénèse via des altérations des hormones ou des effets génotoxiques (Toppari *et al.*, 1996). Par exemple une étude a montré une baisse significative du nombre et de la qualité des spermatozoïdes chez des ouvriers exposés au Chlordécone (Taylor *et al.*, 1978), un pesticide xéno-oestrogène (Shelby *et al.*, 1996). D'autres études ont souligné l'effet des métabolites d'un fongicide, la Vinchlozoline, sur la reproduction sur les rats (Anway *et al.*, 2005).

Par ailleurs, une étude réalisée auprès d'agriculteurs travaillant en serre au Danemark, a montré une relation inverse entre la concentration de spermatozoïdes, d'une part, et l'intensité de l'exposition ou le nombre d'années d'activité en serre, d'autre part (Abell *et al.*, 2000).

5.3. Effets neurologiques et neurocomportementaux

Pour certains pesticides, la neurotoxicité est le mécanisme même de leur mode d'action (organophosphorés et inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase). Les effets aigus survenant à doses importantes chez les utilisateurs (surtout les agriculteurs) sont maintenant assez bien documentés notamment en raison des intoxications accidentelles (ou volontaires) (Kamel et Hoppin, 2004). Ces effets informent sur la neurotoxicité potentielle de certains produits, principalement les organophosphorés et les carbamates, mais également les pyréthrinoïdes qui sont capables d'induire des paresthésies et des convulsions à des doses massives, et les dérivés de l'urée qui sont associés à différentes altérations tels que des troubles neurologiques centraux, une polyneuropathie, ainsi que les anciens organochlorés (comme DDT) qui peuvent entraîner des convulsions épileptiformes.

Quant aux effets chroniques, les principales données disponibles concernent l'exposition aux pesticides avec une implication importante des herbicides et des insecticides et en particulier les organochlorés, organophosphorés et carbamates et les troubles neurocomportementaux (Baldi *et al.*, 2001) et neurodégénératifs (Baldi *et al.*, 2003b) (tels que la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer) mais également des troubles du système nerveux périphérique (troubles neuromoteurs et neurosensoriels) (Stokes *et al.*, 1995; Cole *et al.*, 1998 ; Priyadarshi *et al.*, 2000; Ritz and Yu, 2000; Priyadarshi *et al.*, 2001; Baldi *et al.*,

2003a; Ascherio *et al.*, 2006; Brown *et al.*, 2006 ; Elbaz and Tranchant, 2007 ; Hancock *et al.*, 2008).

En revanche, il existe peu d'études épidémiologiques concernant les conséquences de l'exposition aux pesticides sur le développement neuronal chez l'enfant. Néanmoins selon certains auteurs, l'exposition *in utero* aux pesticides organochlorés pourrait entraîner des altérations au niveau cognitif (Jacobson and Jacobson, 1996) comme des retards au niveau psychomoteur (Ribas-Fito *et al.*, 2003). D'autres études ont montré que l'exposition chronique aux pesticides serait potentiellement associée à un retard dans le développement des enfants (surtout la coordination motrice et l'effet sur la mémoire) (Keifer *et al.*, 1996).

Le Chlorpyrifos a montré des effets délétères sur le développement du système cholinergique cérébral chez des enfants exposés *in utero* et ceci même à très faibles doses considérées sans aucun effet sur la santé (Qiao *et al.*, 2003).

Par ailleurs, certains pesticides comme les carbamates et les organophosphorés provoquent une inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase au niveau du système nerveux périphérique ou central entraînant une hyperexcitabilité des cellules neuronales et des effets potentiellement neurotoxiques (Moser, 2007). Une inhibition de la neurotransmission provoquée par la diminution de l'activité de l'acétylcholinestérase cérébrale a également été liée à une suppression de la sécrétion d'hormones stimulant les gonades (hormone de stimulation folliculaire (FSH) et hormone lutéinisante (LH)) pouvant entraîner des effets sur la fertilité (Lyons, 2000).

5.4. Effets sur l'immunité

Les pesticides sont capables d'agir sur le système immunitaire selon différents mécanismes entraînant des pathologies immunitaires plus fréquentes chez l'enfant que chez l'adulte. Cependant, les résultats des études épidémiologiques sont contradictoires. Certaines études ont montré que l'exposition chronique aux pesticides peut jouer un rôle dans le développement de certaines pathologies respiratoires comme l'asthme et la bronchite chronique (Salameh *et al.*, 2006a; Salameh *et al.*, 2006b). D'autre part, l'exposition de l'enfant aux pesticides organochlorés (en particulier le DDE) a été associée à des altérations d'ordre immunologique, comme par exemple une augmentation des immunoglobulines IgE, et un développement d'otites chroniques et d'asthmes bronchiques (Karmaus *et al.*, 2001). Ces

effets ont été observés essentiellement à la suite d'une exposition *in utero* ou via le lait maternel (p,p'-DDE et dieldrin) (Dewailly et al., 2000). De plus, certaines études ont montré des perturbations de la production des cytokines (Phillips, 2000).

5.5. Stress oxydant induit par les pesticides (xénobiotiques)

Plusieurs études expérimentales *in vitro* ont permis de montrer que certains pesticides (l'Endosulfan, la Roténone, et des organophosphorés/Chlorpyrifos), peuvent induire un stress oxydant entraînant des perturbations de processus de régulation de la survie et de la prolifération cellulaire comme par exemple certaines voies de signalisation cellulaire (MAPkinase, FAS/TNF) et certaines caspases (Ledirac et al., 2005; Lee et al., 2008a; Saulsbury et al., 2008). Il a été montré que des effets neurotoxiques (Drechsel and Patel, 2008; Rio and Velez-Pardo, 2008), immunotoxiques (Li and Kawada, 2006) ainsi que des effets cancérigènes (Antherieu et al., 2007) et génotoxiques (Bagchi et al., 1995; Calviello et al., 2006) étaient liés à une augmentation de la libération d'espèces réactives de l'oxygène en présence des pesticides.

De plus, sur des cellules mammifères, l'Alachlore, le Chlorpyrifos, le Mancozèbe et le Monochrotophos ont montré une augmentation des aberrations chromosomiques (Bagchi et al., 1995; Calviello et al., 2006) et des bases oxydées de type 8-OH-dG (Calviello et al., 2006) ainsi qu'une présence de micronoyaux (Peitl et al., 1996).

La vinclozoline ainsi qu l'iprodione diminue le taux de glutathion intracellulaire, et augmente le taux de radicaux libres dans les cellules HepG2 (Radice et al., 1998). Dans les follicules ovariens isolés, le methoxychlore entraîne une diminution des activités enzymatiques régulant le statut oxydo-réducteur (SOD, catalase, super-oxyde dismutase) et modifie l'activité respiratoire des mitochondries. (Gupta, RK., et al., 2006). Le malathion (organophosphoré) inhibe l'activité des enzymes de régulation du stress oxydant, diminue la production d'ATP et altère la matrice mitochondriale. (Delgado EHB et al., 2006). Le traitement des rats avec du chlorpyrifos (insecticide) conduit à une diminution des activités des enzymes du type SOD, catalase, à une déplétion en glutathion intracellulaire dans le foie, le rein et le cerveau des animaux traités avec 100mg/kg; (forte dose). (Verma RS et al., 2007). L'alachlore et le chlorpyrifos, induisent *in vitro* (cellules PC12 neuronales) un stress oxydant conduisant à une peroxydation lipidique, des cassures simples et double brins de l'ADN, ainsi qu'à une induction de protéine heat shock. (Bagchi D., et al., 1996).

6. Le stress oxydant

Les substances oxygénées réactives sont continuellement produites dans les cellules, notamment lors du métabolisme oxydatif, ou leur génération peut être stimulée par un grand nombre de drogues ou de xénobiotiques, notamment des métaux lourds : mercure, plomb, cuivre, cadmium, nickel (Doreswamy et *al.*, 2004; Balestrasse et *al.*, 2005 ; Groppa et *al.*, 2007), ou des toxines de micro-organismes (cyanobactéries, bactéries, fungi, végétaux, algues, xenobiotiques...) (Silva et *al.*, 2007 ; Klaric et *al.*, 2008), l'alcool, le tabac ou les médicaments peuvent également produire des espèces oxygénées (Videla et *al.*, 2000 ; Haorah et *al.*, 2005).

6.1. Les espèces réactives de l'oxygène

Les substances oxygénées réactives regroupent les radicaux libres (le radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$, le radical hydroxyle OH^{\cdot} , le radical peroxyde ROO^{\cdot} , le Radical alkoxyde RO^{\cdot} , et le monoxyde d'azote NO) et leurs dérivés oxygénés non radicalaires (le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , l'acide hypochlorique HOCl, l'oxygène singulet 1O_2 , et l'ion peroxydinitrite $ONOO^-$) (Cadenas et Davies, 2000, Ré et *al.*, 2005).

6.2. Conséquences du Stress oxydant

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de biomolécules par oxydation des protéines, des lipides, des glucides ou de l'ADN, mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides.

6.2.1. Oxydation des protéines et protéolyse

Les protéines sont les plus sensibles aux attaques radicalaires, surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH). L'oxydation des protéines induit une dérégulation des signaux cellulaires de prolifération ou de défense (Barouki, 2006). Les protéines oxydées ou dénaturées sont plus sensibles aux systèmes protéolytiques cellulaires pour ainsi éviter leur accumulation intracellulaire. Les systèmes impliqués dans l'élimination de ces protéines sont distribués dans la cellule, le protéasome et la calpaine au niveau cytosolique, le lysosome, la mitochondrie et enfin les voies protéolytiques nucléaires (Mehlase et Grune, 2002).

6.2.2. Attaque radicalaire de l'ADN

Les ERO peuvent provoquer des lésions des acides nucléiques susceptibles d'entraîner des mutations ponctuelles dans le génome, ou d'altérer l'expression des gènes qui aboutiront soit à l'arrêt du cycle cellulaire ou à la mise en route du suicide programmé des cellules (apoptose) si le niveau d'endommagement est trop élevé (Frelon, 2001).

Le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin (**Figure 3**). Des dommages indirects peuvent résulter de l'attaque des lipides dont la peroxydation génère des aldéhydes mutagènes, formant des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine ou éthénodérivés. L'attaque radicalaire des protéines (histones, enzymes et facteurs de la réplication ou de la transcription) entraîne des pontages des protéines ou des adduits sur des bases de type lysinoguanine (Cooke *et al.*, 2003 ; Favier, 2003).

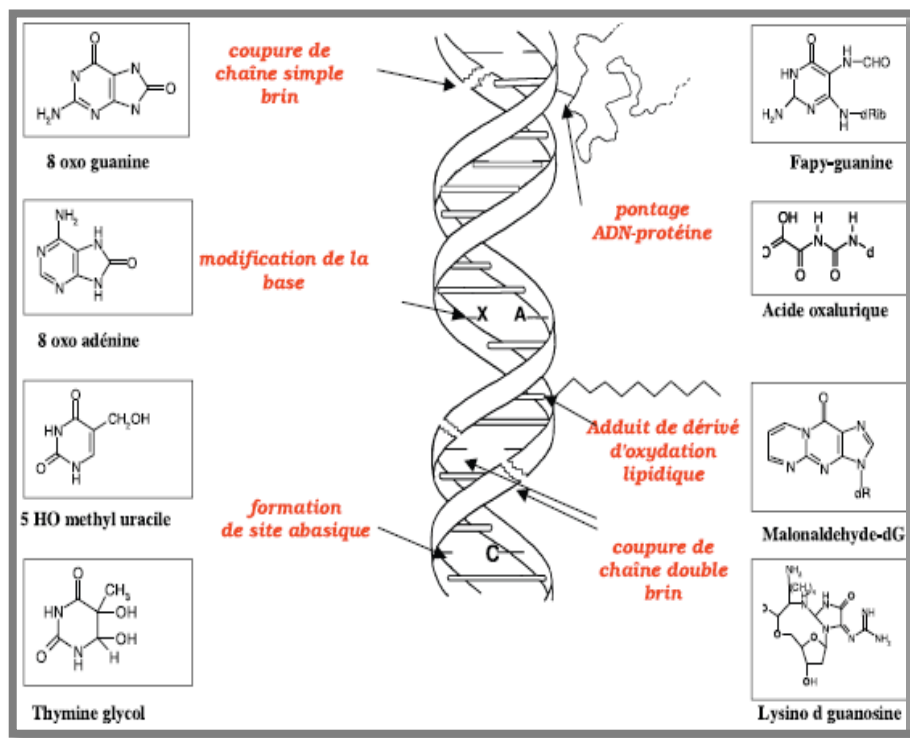


Figure 3 : Lésions de l'ADN provoquées par une attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (Favier, 2003)

6.2.3. Peroxydation lipidique

Sous des conditions de stress oxydatif, les acides gras insaturés subissent une peroxydation lipidique et forment par conséquent des espèces aldéhydes réactives qui sont cytotoxique et génotoxique par leur capacité de modifier de façon covalente les protéines et l'ADN (Sowell et *al.*, 2004).

La peroxydation lipidique affecte principalement les lipides de la membrane cellulaire modifiant la fluidité et la perméabilité de la membrane et peut aussi altérer le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux (Tang et *al.*, 2002). Cette peroxydation touche donc plus particulièrement les acides gras insaturés libres ou estérifiés qui sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle, les phospholipides, les glycolipides, le cholestérol esters et le cholestérol lui-même sont également touchés (Favier, 2003).

Le radical peroxyde, après évolution en un peroxyde cyclique et coupure de la molécule, peut libérer une variété d'aldéhydes α,β insaturés toxiques comme : trans-4-hydroxy-2-nonenal, acroleine et 4-oxo-2-nonenal (Srivastava et *al.* 2000). Ces électrophiles peuvent réagir avec les bases d'ADN pour former, des etheno-adduits (Pang et *al.*, 2007). Le 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) peut former des adduits covalents avec le 2'-deoxyguanosine, adduits très mutagène car il induit la transversion du G:C en T:A dans les cellules humaines, il peut induire l'agrégation des lipides de faible densité (LDL) et causer des liaisons croisées entre les protéines. L'hydroxynonenal (HNE) peut indirectement contribuer à la carcinogénèse en se liant de façon covalente aux enzymes réparant l'ADN (Hubatsch et *al.*, 1998; Sowell et *al.*, 2004). Comme le 4-HNE, le MDA, un autre produit final de la peroxydation lipidique, est capable de former des adduits avec les acides aminés libres et d'autres protéines formant de nouveaux produits tels que les adduits MDA-lysine et carboxyméthyllysine, ce qui induit de profondes altérations de leurs propriétés biochimiques (Praticò, 2002). Il a également été rapporté que le MDA pouvait réagir physiologiquement avec divers nucléosides (deoxyguanosine, cytidine) en formant des adduits (Chaudhary et *al.*, 1994) (**Figure 5**).

7. Les systèmes antioxydant

Les organismes vivants sont continuellement exposés à des espèces chimiques toxiques exogènes et endogènes, leur capacité d'adaptation biologique se traduit par différentes stratégies pour contrer l'effet des composants toxiques et leurs métabolites. Parmi ces mécanismes de défense, telles que la liaison et l'internalisation, les biotransformations

catalytiques, les cellules possèdent un large ensemble d'enzymes capables de transformer différentes molécules chimiques comme la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx), la glutathion réductase (GR), ainsi que des antioxydants non enzymatiques organiques tels que les vitamines C, A et E, le glutathion, ou l'ions métalliques comme le fer, le cuivre et le sélénium qui participent à la détoxification cellulaire (Atencio et *al.*, 2008).

7.1. Système de défense Non-enzymatique

7.1.1. Le glutathion

Parmi les défenses non-enzymatique, le tripeptide glutathion (γ -glutamyl-cysteinyl-glycine; GSH) joue un rôle pivot non seulement chez les humains et les mammifères, mais chez tous les vertébrés, insectes, plantes et micro-organismes (**Figure 4**). Grâce à la fonction thiol de la cystéine, le glutathion est un composé important pour le maintien de l'état redox de la cellule. Cette fonction thiol peut aussi fixer des fonctions électrophiles et sert donc à la détoxification de nombreux xénobiotiques et carcinogènes qui contiennent une telle fonction, il participe aussi dans la biosynthèse de l'ADN, de protéines et de leucotriènes (Arranz et *al.*,

2008).

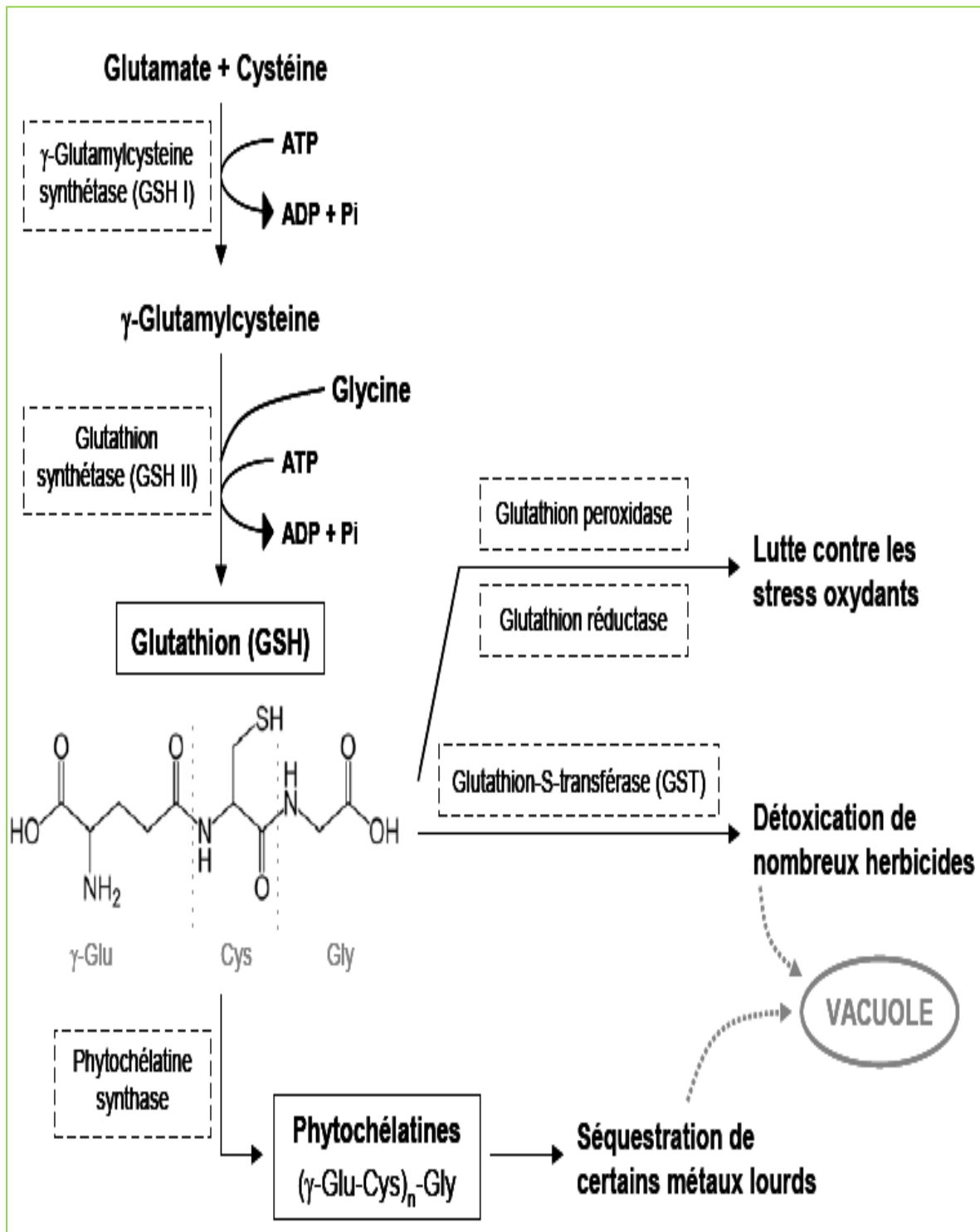


Figure 4 : Synthèse du glutathion et vue générale de son métabolisme dans la plante.

Le glutathion est retrouvé en concentration assez élevée (1-10 mM) dans les cellules sous forme réduite ou oxydée GSSG, les deux étant en équilibre l'une avec l'autre. Il est synthétisé dans le cycle glutamyl par l'action consécutive de la glutamylcystéine synthétase.

De plus, le glutathion a des rôles multifonctionnels dans la régulation du métabolisme cellulaire et la défense contre les ERO, notamment : le radical hydroxyle (OH·), l'acide hypochlorique (HOCl), les radicaux alkoxy (RO·), les peroxyradicaux (ROO·), superoxyde (O₂·), ainsi qu'avec divers radicaux contenant du nitrogène et du carbone à travers la formation de GS· ou radicaux thiyl (Halliwell et Gutteridge, 1999).

En plus de son rôle de « scavenger direct » des radicaux libres, le glutathion sert de cofacteur pour différentes enzymes impliquées dans la défense antioxydante, ces enzymes incluent la glutathion peroxydase, la glutathion réductase et la glutathion S-transférase. Le glutathion peut aussi servir de source de nitrogène et de soufre pour les champignons et participer à des réactions impliquant la synthèse des protéines et des acides nucléiques. Il participe également à la régénération de l'ascorbate en recyclant les formes oxydées de la vitamine C (Noctor et Foyer, 1998).

7.1.2. Autres molécules anti-oxydantes

La vitamine C est un piègeur des espèces réactives de l'oxygène à spectre large, elle peut réduire directement les radicaux peroxydes, hydroxyle et superoxyde ainsi que le peroxy-nitrite et empêche l'oxydation des LDL (Cossu et *al.*, 1997 ; Chen et *al.*, 2000 ; Carr et Frei, 2002). Comme les caroténoïdes, la vitamine E (α -tocopherol) peut inhiber la peroxydation lipidique et ainsi protéger les tissus des dommages oxydatifs (Barja et *al.*, 1996 ; Chen et Tappel, 1996 ; Khalil, 2002 ; Stahl et *al.*, 2002). Les flavonoïdes sont des polyphénols avec des activités anti-oxydantes. La carnosine, est un agent chélateur qui forme un complexe avec des métaux comme le fer et le cuivre, elle les empêche ainsi de participer aux réactions d'oxydoréduction indispensables à la génération des ERO (Berlett et *al.*, 1999). Le zinc peut inhiber partiellement les réactions de formation d'espèces oxygénées induites par le fer ou le cuivre (Mezzetti et *al.*, 1998). Le sélénium participerait aux réactions redox vitales qui impliqueraient l'échange d'atome plutôt que des réactions de transfert d'électron (Giles et Jacob, 2002 ; Soares, 2005).

7.2. Système de détoxification enzymatique

7.2.1. Fonction de détoxification des glutathion S-transférases

Les Glutathion S-transférases (GSTs; EC 2.5.1.18) possèdent principalement deux activités détoxifiantes, elles participent à l'inactivation et la dégradation d'une large gamme de composés électrophiles endogènes et exogènes par la formation de conjugués glutathion (Bartling *et al.*, 1993; Wilce et Parker, 1994 ; Hayes et Pulford, 1995 ; Seidegard et Ekstrom, 1997; Rossjohn *et al.*, 1998 ; Chelvanayagam *et al.*, 2001 ; Rowsey *et al.*, 2001 ; Wagner *et al.*, 2002). La réaction du glutathion (GSH) avec les substrats électrophiles peut être représentée par le schéma suivant:



Elles peuvent aussi protéger la cellule par leur activité peroxydasique, qui consiste à réduire les peroxydes organiques en composés moins réactifs (Ketterer *et al.*, 1990 ; Dulhunty *et al.*, 2001; Faucet-Marquis, 2005).

7.2.2. Les glutathion peroxydases

Les glutathion peroxydases (GPxs) représentent la principale défense enzymatique contre le stress oxydatif causé par les hydroperoxydes. Elles réduisent le peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes organiques, comme les hydroperoxydes d'acides gras, en alcools correspondants (Arthur, 2000 ; Herbette *et al.*, 2007). Le glutathion sous sa forme réduite (GSH), intervient comme donneur d'électron dans les réactions catalysées par la glutathion peroxydase. (Arrigo, 1999 ; Sies, 1999 ; Mates *et al.*, 1999). La molécule du peroxyde d'hydrogène est réduite en deux molécules d'eau par le glutathion, la réaction génère le radical thiyl GS[•] dont l'oxydation produit le GSSG.



7.2.3. La glutathion réductase

Le fonctionnement de la glutathion réductase (GR ; EC 1.6.4.2) est couplé à la glutathion peroxydase. Son rôle est de régénérer le glutathion sous forme réduite au dépens du NADPH. Deux isoformes sont distribuées dans le cytosol et les mitochondries. L'isoforme dépendante du sélénium réagit fortement avec le H₂O₂ et les peroxydes organiques. La

fonction principale de l'isoforme indépendante du sélénium qui réagit faiblement avec les peroxydes organiques, est la détoxification de molécules cancérogènes (Giles et Jacob, 2002).



7.2.4. La thioredoxine réductase

Les thioredoxines agissent comme agents réducteurs principalement dans la réduction/détoxification des peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène, mais aussi dans la régénération du radical ascorbyl en acide ascorbique (Moran et *al.*, 2001).

7.2.5. Les superoxyde dismutases

La superoxyde dismutase (SOD ; EC 1.15.1.1) est une métalloenzyme antioxydante capable d'éliminer l'anion superoxyde par une réaction de dismutation (Ilyukha, 2001). Son rôle est de transformer dans les mitochondries, les radicaux superoxydes en peroxydes d'hydrogène (H_2O_2) étant beaucoup moins réactifs, et empêche ainsi la formation du peroxydinitrite, elle protège les membranes contre les radicaux $\text{O}_2^{\cdot-}$, NO^{\cdot} et ONOO^{\cdot} (Salvemini et *al.*, 2001; Hussain et *al.*, 2004 ; Menvielle-Bourg, 2005) (Figure.5).



7.2.6. Les catalases

L'étape finale de la détoxification des ERO se produit par l'élimination de l'excès de H_2O_2 par les catalases. Ces dernières catalysent la dismutation du peroxyde d'hydrogène en dioxygène et eau selon l'équation bilan :



Les catalases (CAT; EC 1.11.1.6) sont principalement présentes dans la matrice des peroxysomes, leur activité varie selon l'espèce, la lignée, les différents tissus et l'état de développement, leur activité peut être inhibée par de fortes concentrations de H_2O_2 (Van Lente et Pepoye, 1990 ; Yu et *al.*, 1998; Okuno et *al.*, 2008).

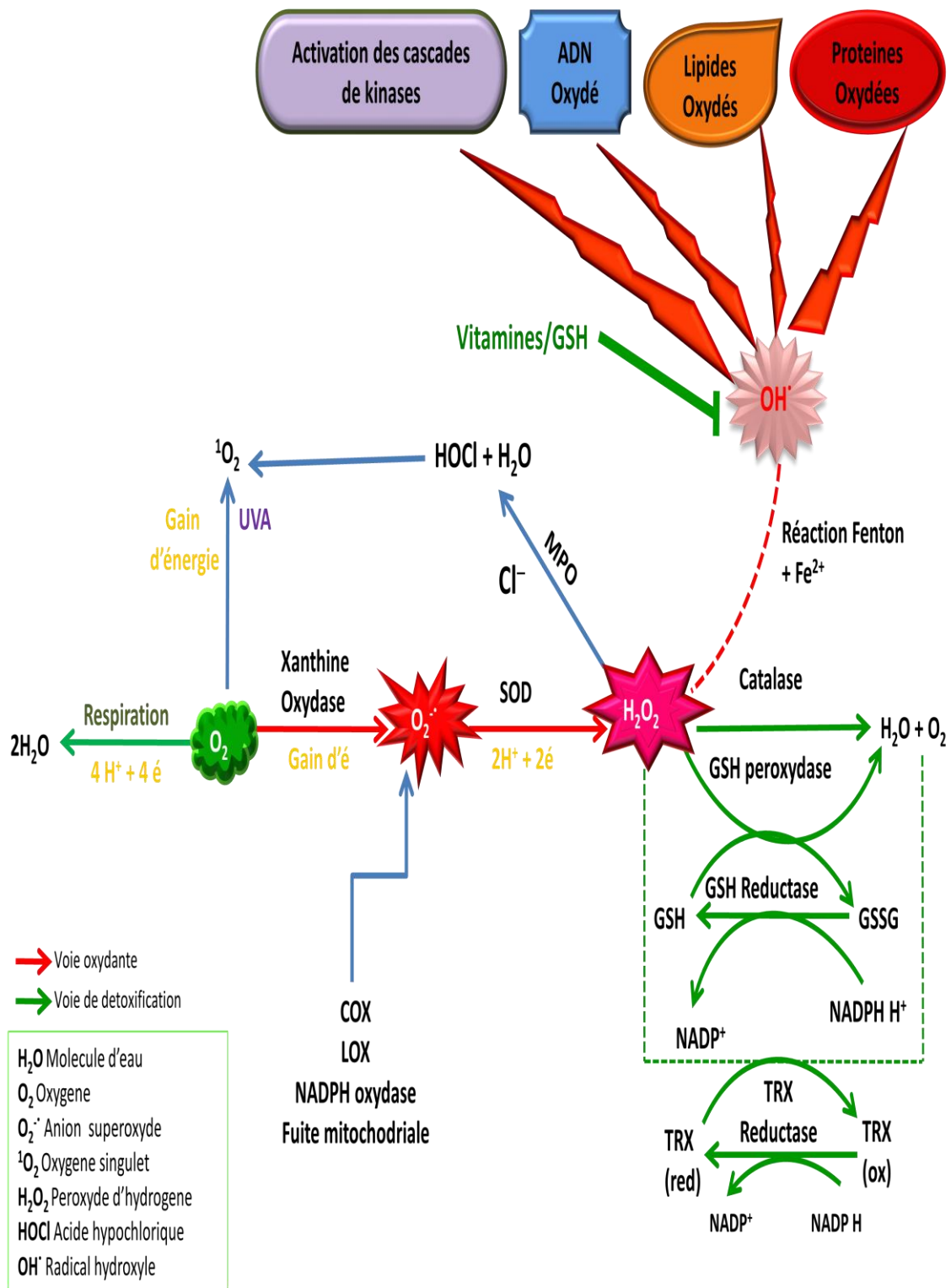


Figure 5 : Voies métaboliques de l’oxygène et des espèces réactives de l’oxygène : Rôle des enzymes antioxydantes (Morel et Barouki, 1998 ; Serteyn et al., 2003 ; Favier, 2003; Nohl et al., 2005 ; Barouki, 2006).

MATERIEL
ET
METHODES

Matériel et Méthodes

I. Matériel

I.1. Matériel biologique

✚ Les Cellules Vero (American Type Culture Collection), issues de reins de singe vert d'Afrique ont été fournies par le Laboratoire d'Immunologie de l'Institut Pasteur d'Algérie.

I.2. Choix du modèle d'étude

La lignée Vero a été utilisée afin d'étudier l'effet des pesticides sur un tissu épithélial. Les cellules Vero sont des cellules issues de reins de singe vert d'Afrique (*Cercopithecus aethiops*) (Macfarlane et Sommerville, 1969). Ce sont des cellules normales non cancéreuses (Phonnok, 2008) et présentent une phase exponentielle de croissance, elles entrent en différenciation spontanée dès qu'elles atteignent la confluence. Les cellules Vero ont en effet, conservé les caractéristiques de différenciation, entre autre la capacité d'inhibition de contact, l'intégrité des chromosomes dont le nombre reste diploïde et la croissance en monocouche. La culture des cellules Vero est obtenue par passages en série effectués tous les 3 à 4 jours (Freshney, 1987).

Habituellement utilisées pour la production ou le contrôle de vaccins viraux (Govorkova et al., 1996 ; Crill et Roehrig, 2001; Balamurugan et al., 2006). Ces cellules ont été utilisées dans plusieurs études portant sur l'optimisation des milieux de culture (Nahapetian et al., 1986), pour l'étude de phénomènes métabolique ou cellulaire (Huang et al., 1997), et pour l'étude de la toxicité de certaines molécules (Konowalchuk et al., 1977 ; Oliveira et al., 2002; Li et al., 2003; Giron et al., 2005; Bouaziz et al., 2006).

I.3. Réactifs et produits chimiques

Les produits chimiques de bonne qualité analytique ainsi que les réactifs sont fournis par les firmes suivantes :

✚ Les différents pesticides (Chlorpyrifos, Cyperméthrine, Acétamipride, Métribuzine, Mancozèbe, Iprodione) ont été gracieusement fournis par le Ministère de l'Agriculture.

Milieu de culture : Milieu Minimum Essentiel d'Eagle modifié par Dulbecco (DMEM), Tris-HCl, Sérum de veau foetal (SVF), Antibiotiques : Pénicilline, Streptomycine, Trypsine, Dimethylsulfoxyde (DMSO), Bleu de bromophenol, Bromure d'ethidium, réactif de Folin ciocalteu (Sigma); Colorant vitaux : Bleu trypan (Sigma), Rouge neutre (Merck); L-glutamine (Eurobio); 5,5'-Dithiobis (2-acide nitrobenzoïque) (DTNB), Sodium dodecylsulfate (SDS), Ethanol, Chlorure de sodium (NaCl), Formaldéhyde, Acide borique, Carbonate de sodium anhydre (Na_2CO_3), Potassium sodium tartrate-4-hydrate ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6\text{H}_2\text{O}$) (Merck); Acide thiobarbiturique (TBA), Acide sulfosalicylique, Chlorure de calcium (CaCl_2), Ethylène diamine tétra-acétate (EDTA), HCl (Prolabo); Acide acétique (Panreac); Acide trichloracétique (TCA), Phénol (Fluka); Soude caustique (NaOH) (Nentech). Agarose (Invitrogen).

II. Méthodes

II.1. Etude de l'effet des pesticides sur la viabilité cellulaire

Afin d'évaluer l'effet toxique potentiel des pesticides et de déterminer leurs intervalles de cytotoxicité ($\approx 20\%$, 50% et 80%), nous avons procédé à des tests de cytotoxicité en déterminant l'effet de la variation des concentrations de pesticides sur la viabilité d'une lignée cellulaire épithéliale, des cellules issues des reins de singes verts d'Afrique (Lignée Vero).

1.1. Entretien des cellules Vero

Les cellules Vero sont conservées congelées à -180°C dans du milieu minimum essentiel d'Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) contenant 10% de sérum de veau foetal (SVF), 10% de DMSO et 1% du mélange d'antibiotique (pénicilline à 100 UI/ml et streptomycine à 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Les cellules sont rapidement décongelées à température ambiante sous agitation, puis incubées dans 12 ml de milieu DMEM contenant 10% de SVF et 1% d'antibiotiques dans des boîtes de 25 cm² pendant 3 heures à 37°C sous atmosphère humide et avec 5% de CO_2 . Après incubation, le milieu est remplacé par un volume égal de DMEM complet.

A confluence, les cellules adhérentes sont détachées du support par addition d'un volume minimum de solution de trypsine versene, puis incubées à 37°C pendant 5 à 10 minutes (Nahapetian et *al.*, 1986). La suspension cellulaire est remise dans du milieu DMEM

complet contenant 10% de sérum de veau fœtal, 1% du mélange pénicilline/ streptomycine et 20 mM de L-glutamine, et répartie dans des boîtes de 25 et 75 cm² (Giron et *al.*, 2005). Le tapis cellulaire est détaché tous les 3 jours puis remis en culture afin d'assurer un développement continu des cellules.

1.2. Dénombrement des cellules viables

L'effet des pesticides sur les cultures est évalué par l'estimation de la viabilité des cellules vero, en utilisant le test d'exclusion Bleu Trypan à 0,4%. Ce colorant vital n'interagit avec les cellules que si les membranes de celles-ci sont endommagées. Ainsi, les cellules viables dont la membrane est intacte excluent le colorant, mais ce dernier est facilement absorbé par les cellules endommagées qui ne peuvent plus l'exclure, ce qui les rend colorées en bleu sous microscope à phase inverse en utilisant un hématimètre de type Malassez (Figure 6.1).

Pour cela, après nettoyage de la cellule Malassez avec de l'éthanol à 70%, la lamelle est placée au dessus des sillons de façon à recouvrir la surface de comptage. Un volume de 200 µl de la suspension cellulaire des cellules Vero, récupérées par trypsination de la monocouche sont ajoutés à un volume égal (200 µl) d'une solution de Bleu Trypan à 0,4%, la suspension est délicatement mélangée et laissée reposer pendant 2 à 5 minutes à température ambiante, sans excéder les 5 minutes pour éviter que les cellules viables commence à incorporer le colorant en raison de la toxicité du colorant (Langdon, 2004 ; Lawson et *al.*, 2011).

A l'aide d'une pipette, les 2 chambres de la cellule de Malassez sont remplies avec un volume approprié de la suspension cellulaire, transférée par le bord de la lamelle planée par capillarité en faisant attention au remplissage des chambres qui ne doivent être ni trop ni pas assez remplies.

En utilisant les objectifs 10 x du microscope à phase inverse, les cellules présentes dans cinq sous sections de chaque chambre choisies au hasard sont comptées (Diagonales, coins et centrale, horizontale, verticale) en ne tenant compte que des cellules chevauchant les lignes du haut et du côté gauche du carré et non celles des lignes du bas et du côté droit (Figure 6.2).

Le dénombrement de toutes les cellules nucléées viables (claire, non bleues) et des cellules nucléées bleues (membranes endommagées) permet de faire une numération des cellules viables et d'estimer leur pourcentage de viabilité en utilisant les formules suivantes :

$$\text{Le nombre total de cellules/ml} = \frac{\text{Nombre de cellule dénombrée}}{\text{Nombre de carré comptabilisé}} \times 100 \times 1000 \times \text{facteur de dilution.}$$

Avec 100 correspondant au nombre totale de carré présent dans une chambre de cellules malassez, et 1000 pour la conversion du cm^2 au ml.

$$\text{Le nombre total de cellules} = \text{Le nombre total de cellules/ml} \times \text{volume d'origine.}$$

$$\text{Le \% de viabilité} = \frac{\text{Nombre total de cellules viables (cellules non colorées)}}{\text{Nombre total de cellules (Cellules colorées et non colorées)}} \times 100.$$

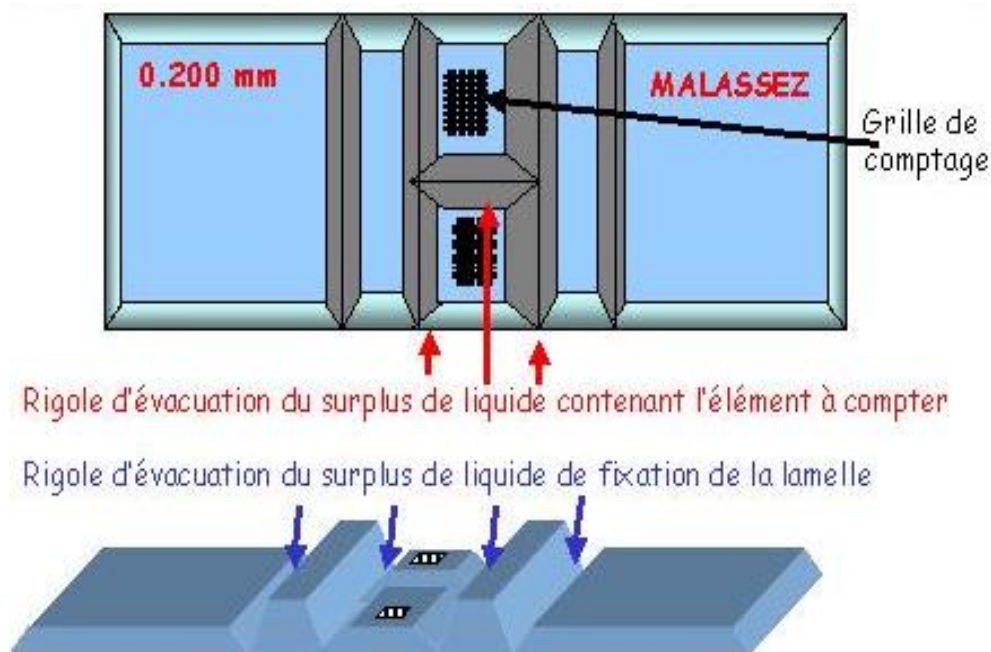


Figure 6.1 : Schéma d'une cellule de Malassez.

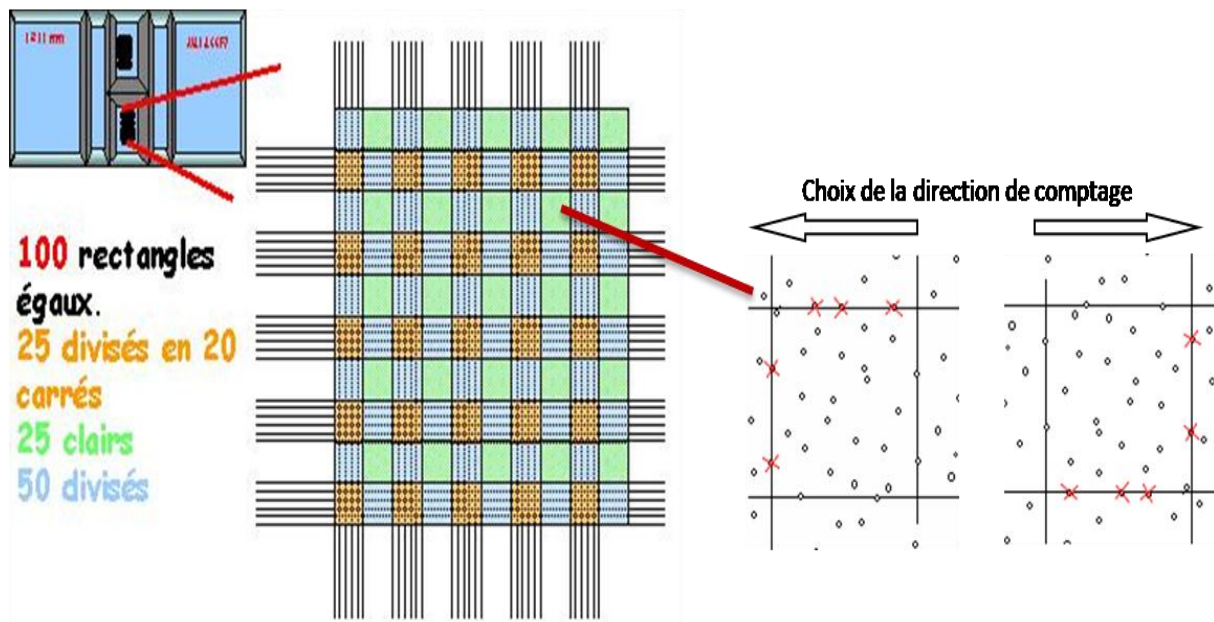


Figure 6.2 : Schéma d'une chambre de cellule Malassez.

1.3. Evaluation de la cytotoxicité des pesticides sur la lignée Vero

La viabilité des cellules Vero est estimée par le test du rouge neutre (RN, 3-amino-7-diméthylamino-2-méthylphénazine hydrochloride). Ce marqueur de la viabilité cellulaire est sélectivement retenu par les lysosomes des cellules métaboliquement actives dont les membranes sont intactes. A pH physiologique, ce colorant pénètre passivement dans les cellules à cause de sa faible charge nette. Il devient chargé lorsqu'il passe à travers le lysosome, il ne peut ainsi traverser à nouveau la membrane vers le cytoplasme, à cause du gradient de proton existant entre le lysosome et le cytoplasme. La perte de ce gradient de pH, par mortalité/morbidité des cellules ou perméabilisation de la membrane provoque la libération du colorant retenu. La quantité de rouge neutre internalisée par les cellules en culture est directement proportionnelle au nombre de cellules viables (Harbell et *al.*, 1997).

Pour notre étude, les cellules Vero sont mises en culture à une densité de 5×10^4 cellules/ml dans des plaques de 96 puits à fond plat pendant 24 heures. Les cellules adhérentes sont incubées en absence ou en présence de concentrations croissantes de pesticides (1, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000 μM) pendant 24 heures. Il est à noter que les pesticides sont au préalable solubilisés dans le DMSO (Diméthyl Sulfoxyde), de même est rajouté le DMSO au témoin cellulaire à une concentration n'excédant pas 1%. Et que les tests ont été faits en quadri-plate (n=4) pour chaque concentration, avec une répétabilité de n= 3.

Les surnageants sont récupérés pour les dosages biochimiques après incubation, et les cellules adhérentes sont rincées avec du tampon phosphate pH 7,0, puis incubées pendant 3 heures avec 200 µl d'une solution de rouge neutre à 50 µg/ml. Par la suite, les cellules Vero sont rapidement fixées pendant 2 à 3 minutes avec une solution de formol calcium [1% CaCl₂, 1% formaldéhyde]. Afin de retirer le colorant non incorporé, un mélange d'acide acétique, d'éthanol et d'eau distillée est ajouté à chaque puits (1:50:49). La plaque est alors soumise à une agitation modérée pendant 15 minutes à température ambiante. La lecture de l'absorbance est réalisée à 490 nm (620 nm comme référence) avec un lecteur ELISA (Damico et *al.*, 2007, Helmholtz et *al.*, 2007).

La cytotoxicité des pesticides est estimée en utilisant la formule suivante (Bouaziz et *al.*, 2006 ; Canal-Raffin et *al.*, 2008) :

$$\% \text{ de cytotoxicité} = 100 - \left[\frac{\text{Absorbance de l'échantillon traité}_{490 \text{ nm} - 620 \text{ nm}}}{\text{Absorbance du contrôle}_{490 \text{ nm} - 620 \text{ nm}}} \times 100 \right]$$

II.2. Etude de l'effet des pesticides sur la balance oxydative

Afin d'évaluer la capacité des pesticides à induire un stress oxydatif, nous avons dosé un médiateur de la balance pro-oxydante à savoir le malondialdéhyde (MDA) qui est un marqueur de la peroxydation des lipides. Les systèmes de défense au stress oxydatif non-enzymatique ont également été étudiés, par la mesure du contenu en glutathion (GSH).

2.1. Dosage du malondialdéhyde

La peroxydation lipidique se produit suite à une libération d'espèces réactives de l'oxygène, ce phénomène a été évalué par un test quantitatif et colorimétrique utilisant l'acide thiobarbiturique (TBA) qui réagit avec le malondialdéhyde (MDA) un produit final de la peroxydation lipidique aboutissant à la formation en milieu acide et à chaud d'un pigment rose avec un maximum d'absorbance à 532 nm.

Les concentrations de malondialdéhyde sont mesurées dans les surnageants de culture des cellules Vero incubées à 37°C avec différentes concentrations de pesticides pendant 24 heures.

Les surnageants sont incubés (v:v) avec de l'acide trichloracétique à 35% à 4°C pendant une heure pour la précipitation des protéines (McMillan et *al.*, 1998). Après une centrifugation de 10 minutes à 5 000 x g à 4°C, 150 µl du surnageant sont mélangés à 50 µl de sulfate dodecylsulfate à 8,1%, 375 µl d'acide acétique à 20% et 375 µl d'acide thiobarbiturique à 0,8% (Moreno et *al.*, 2005). Le mélange est chauffé à 100°C pendant 20 minutes, puis laissé refroidir pendant 10 minutes dans un bain de glace. La densité optique est par la suite mesurée à 532 nm, et la quantité de MDA formée est calculée en utilisant un coefficient d'extinction molaire de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Les concentrations sont exprimées en $\mu\text{M}/10^4$ cellules (Liu et *al.*, 2003 ; Kumar et *al.*, 2003 ; Guleria et *al.*, 2006).

2.2. Dosage du glutathion

La détermination du contenu en glutathion (GSH) dans les surnageants de cultures cellulaires, est réalisée en utilisant le 5,5'-dithiobis 2- acide nitrobenzoïque (DTNB), sa réduction par le glutathion aboutit à la formation d'un composé qui absorbe à 412 nm (Figure 7), l'acide 2-nitro-5-thiobenzoïque (TNB).

Les surnageants cellulaires (150 µl) sont incubés avec 300 µl d'acide sulfosalicylique à 5 % dans de la glace pendant une heure. Après une centrifugation de 10 minutes à 3000 x g à froid, 100 µl du surnageant sont ajoutés à 200 µl de DTNB à 0,6 mM et à 900 µl de tampon phosphate à 0,2 M pH 8,0. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, la mesure de la densité optique s'est faite à 412 nm (Todorova, 2007) (**Figure7**).

La concentration de GSH est déduite à partir du coefficient d'extinction molaire de $13,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ et exprimées en μM par 10^4 cellules (Soares et *al.*, 2008).

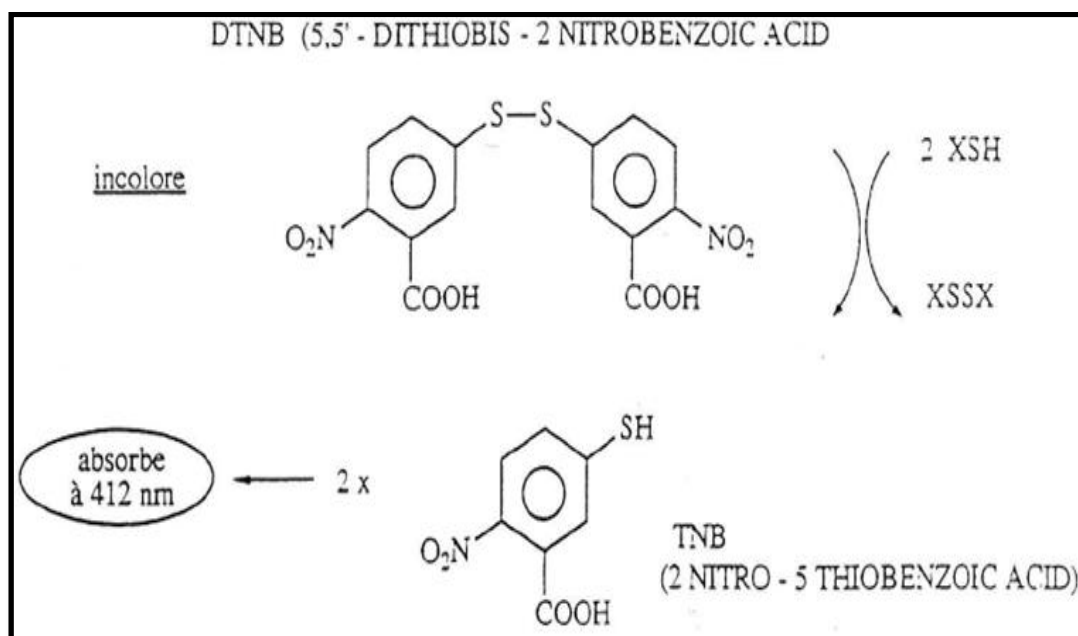


Figure 7 : Réaction chimique entre le DTNB et un composé sulfhydrile (Todorova, 2007).

II.3. Etude de l'effet des pesticides sur les protéines

Cette méthode repose sur la propriété que possèdent les protéines de réduire des acides phosphomolybdotungstiques contenus dans le réactif phosphomolybdotungstique ; cette réaction est chromogène et se traduit par l'existence d'un pic d'absorption à 730 nm. Le réactif phosphomolybdotungstique réagit principalement avec les résidus tyrosine de la protéine (Pharmacopée Européenne, 2008).

Ainsi, les concentrations de protéines totales sont mesurées à partir de culture de cellules Vero incubées à 37°C en absence et en présence des différentes concentrations de pesticides pendant 24 heures, dans des plaques de culture à six puits. Ces cellules sont rincées avec du Tampon phosphate à 1 M pH 7,4, puis trypsinées et centrifugées à 750 x g pendant 10 minutes. Une sonication pendant 30 secondes du culot cellulaire suspendu dans du tampon phosphate a été effectuée afin d'extraire les protéines totales.

Un volume de 0,4 ml de chaque suspension protéique est supplémentée de 2 ml de réactif de cuivre alcalin, puis vortexée, et incubée au bain-marie à 37°C pendant 30 minutes. Après incubation, 0,2 ml du réactif de Folin à 1 N sont ajoutés à chaque tube, puis mélangés et incubés à nouveau au bain-marie pendant 20 minutes. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre UV/visible à 730 nm et les concentrations de protéines, exprimées en µg/ml,

sont déterminées en les comparant à une courbe standard préparée avec des concentrations comprises entre 10 et 100 µg/ml de sérum albumine bovine (Bovin Serum Albumin, B.S.A) (**Figure 8**).

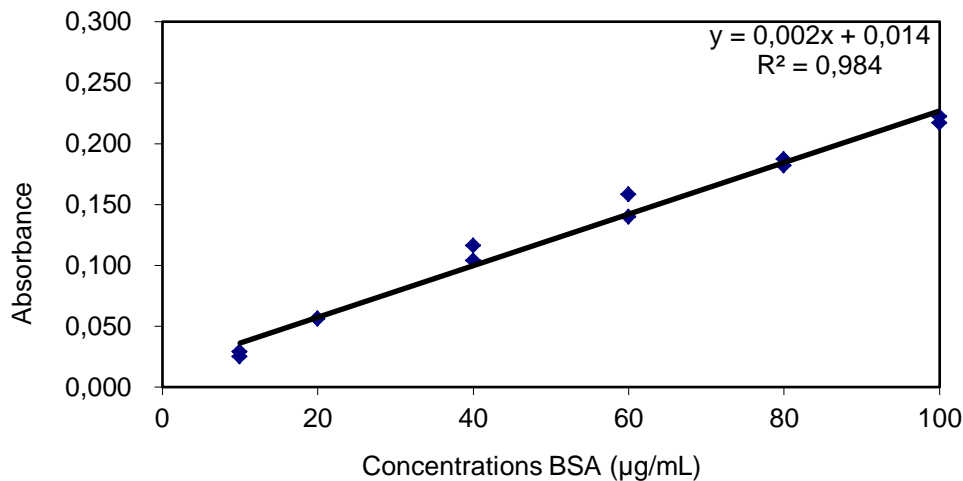


Figure 8 : Représentation de la courbe de calibration par la méthode de Lowry.

II.4. Etude des altérations de l'ADN induites par les pesticides

La séparation et l'analyse de l'état des fragments d'acides nucléiques obtenus sont mises en œuvre par électrophorèse sur gel d'agarose. L'addition du bromure d'ethidium dans le gel nous permet d'observer les fragments sous ultra-violet (UV).

II.4.1. Extraction de l'ADN par la technique de phénol /chloroforme

La technique d'extraction d'ADN que nous avons utilisée dans le laboratoire de Biologie Moléculaire (IPA) est celle au phénol : chloroforme. Elle est basée sur la solubilité différentielle des acides nucléiques entre deux phases non miscibles : le phénol, qui est un déprotéinisant puissant dans lequel ceux-ci ne sont pas solubles, et le chloroforme, qui complète l'extraction phénolique en dénaturant les protéines et en aidant la séparation des phases aqueuses et organiques.

L'extraction de l'ADN a concerné les cellules Vero (10^6 cellules) incubées pendant 24 heures en absence ou en présence de pesticides à différentes concentrations dans des plaques à 6 puits à fond plat, à 37°C avec 5% de CO₂.

Ainsi, les culots cellulaires sont soumis à un choc thermique suivi d'une sonication durant 1 minute, après une centrifugation des suspensions cellulaires à 5 000 x g pendant 10 minutes à température ambiante. Les lysats cellulaires sont supplémentés de 0,25 ml de chloroforme, de 0,25 ml de phénol pour l'élimination des protéines et de 0,5 ml de tampon de lyse TTE (10 mM Tris, 10 mM EDTA, 0,5% Triton X-100, pH 7,4) (Borges *et al.*, 2005; Buthia *et al.*, 2008), chaque tube est alors vortexé pendant 20 minutes puis soumis à une centrifugation de 14 000 x g pendant 25 minutes à 4°C, afin de séparer l'ADN du reste des constituants cellulaires. Les surnageants sont délicatement remis en suspension dans d'autres tubes avec 0,5 ml d'isopropanol et soumis à une autre centrifugation à 14 000 x g pendant 10 minutes à 4°C. La phase aqueuse est délicatement retirée et le culot lavé avec 1 ml d'éthanol froid à 70% puis centrifugé à 14 000 x g pendant 5 minutes à 4°C (Balasubashini *et al.*, 2006). Après évaporation totale de l'éthanol par incubation à température ambiante pendant 2 heures, le culot d'ADN est ensuite lavé avec de l'eau bi-distillée, puis resuspendu dans 50 µl d'eau pure.

II.4.2. Dosage et contrôle de la qualité de l'ADN

a. Evaluation de la concentration et de la pureté de l'ADN par spectrophotométrie

La concentration de l'ADN est évaluée par spectrophotométrie. En effet, les bases puriques et pyrimidiques absorbant fortement dans l'UV à 260 nm. Une unité de DO à 260 nm correspond à une concentration d'ADN double brin de 50 µg/ml. L'éventuelle contamination protéique peut être appréciée par une seconde lecture de DO à 280 nm dans la mesure où les protéines absorbent à ces deux longueurs d'onde. Un ADN pur doit présenter un rapport DO 260/280 compris entre 1,8 et 2.

b. Contrôle de la qualité de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose :

L'électrophorèse sur gel d'agarose à pH 8,3 est une méthode simple et efficace pour la séparation, l'identification et l'analyse qualitative des fragments d'ADN. Elle consiste à faire migrer dans un gel soumis à un champ électrique des molécules chargées négativement. Leur distance de migration dépend principalement de leurs poids moléculaires, de la concentration d'agarose et de l'intensité du courant appliqué.

Les échantillons d'ADN (10µl) sont ensuite mélangés avec 3 µl de bleu de bromophenol à 0,05% puis analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% dans un tampon Tris-Acétate-

EDTA (T.A.E) (1 M Tris, 200 mM Acétate, 50 mM EDTA), pH 8 contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium, et laissés migrer pendant 30 minutes à 100 V avec du tampon Tris-Borate-EDTA (T.B.E) 0,5 M (44 mM tris-HCl, 44 mM acide borique, 50 mM EDTA), pH 8,0. La révélation de l'ADN a été faite par exposition du gel aux rayons Ultra-Violet (Wang et *al.*, 2005).

RESULTATS
ET
DISCUSSION

III. Résultats et Discussion

III.1. Etude de l'effet cytotoxique des différents pesticides sur les cellules Vero

L'effet des pesticides sur la viabilité de la lignée Vero est déterminé par le test de viabilité au Rouge Neutre. Ce test est basé sur l'incorporation du colorant vital dans les lysosomes des cellules viables. Le pourcentage de cellules viables est calculé par le rapport entre l'absorbance des échantillons traités et les valeurs du témoin par 100%. La cytotoxicité relative des différents pesticides est évaluée par la différence entre le pourcentage des cellules viables et 100 (Bouaziz et *al.*, 2006 ; Helmholz et *al.*, 2007 ; Canal-Raffin et *al.*, 2008).

La mise en culture des cellules Vero en absence et en présence de concentrations croissantes de pesticides (1, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 ; 1000 μM) pendant 24 heures montre une variation de la cytotoxicité de ces derniers en fonction des concentrations.

En effet, une augmentation de la cytotoxicité de façon dose dépendante est observée pour les six pesticides étudiés à savoir : le chlorpyrifos, l'acétamipride, la cyperméthrine, la métribuzine, le mancozèbe, l'iprodione et, avec des pourcentages de cytotoxicité allant de $(9.41 \pm 1.22$ à 75.65 ± 2.86 % pour le **chlorpyrifos**, de $(18.51 \pm 3.65$ à $71.29 \pm 2.83)$ % pour la **métribuzine**, de $(7.34 \pm 3.11$ à $85.48 \pm 4.04)$ % pour l'**acétamipride**, de $(7.34 \pm 3.11$ à $85.48 \pm 4.04)$ % pour le **mancozèbe** pour des concentrations de pesticides allant de 1 μM à 500 μM observés après 24 heures d'incubation (**Figure 9**).

Alors que pour des concentrations de pesticides allant de 1 μM et 1000 μM d'**iprodione** et de **cyperméthrine** les taux de cytotoxicité sont respectivement de $(3.92 \pm 1.09$ à $72.17 \pm 3.70)$ % et de $(12.53 \pm 2.40$ % à $72.56 \pm 4.38)$ % respectivement (**Figure 10**), soit une augmentation de plus de 50 %.

Cette étude montre que les cellules choisies présentent une sensibilité diverse à tous les pesticides étudiés, reflétée par l' IC_{50} ou la concentration d'inhibition qui correspond à la concentration de pesticide donnant 50 % de mortalité cellulaire déterminée après 24 heures d'incubation. Sa valeur est de 500 μM pour la **cyperméthrine** et l'**iprodione**, de 400 μM pour le **mancozèbe**, de 200 μM pour l'**acétamipride**, de 100 μM pour la **métribuzine** et de seulement 50 μM pour le **chlorpyrifos**.

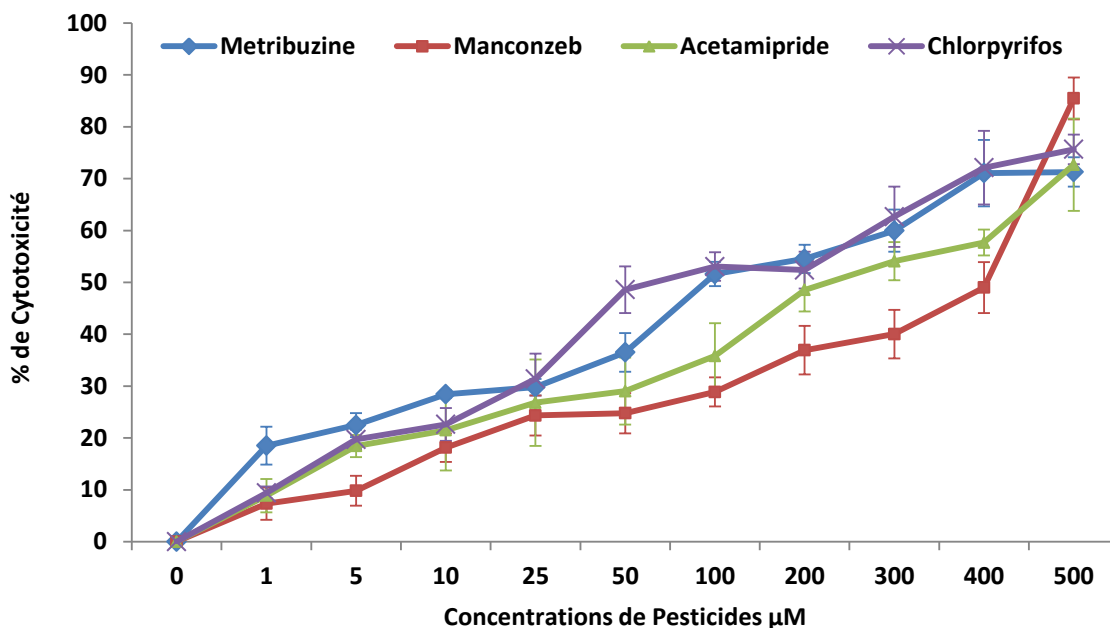


Figure 9 : Effets des pesticides sur les cellules Vero mises en culture pendant 24 heures d'incubation.

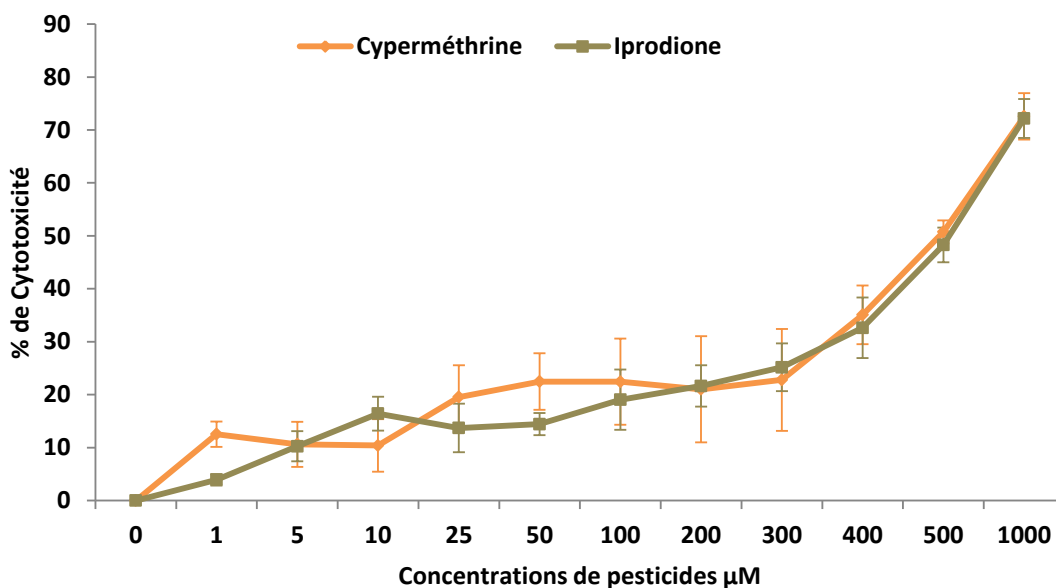


Figure 10: Effets des pesticides sur les cellules Vero mises en culture pendant 24 heures d'incubation.

Il est important de noter, une toxicité importante induite par le mancozèbe démontré par l'augmentation du pourcentage de cytotoxicité de plus de 30 % à seulement 100 μM d'écart de l' IC_{50} . De plus, la toxicité du chlorpyrifos sur les cellules rénales est clairement démontré par l' IC_{50} , des résultats similaires ont été observé par Tan et *al.*, sur des cellules primaires neuronales de l'hippocampe et par Yan sur des cellules du pancréas (Tan et al., 2009 ; Yan, 2010).

Il est à noter, que les concentrations croissantes de pesticides induit une cytotoxicité dose dépendante, traduite par la mort des cellules Vero, ceci a permis de mettre en exergue les concentrations de toxicité des pesticides correspondants aux pourcentages de mort cellulaire à (20, 50 et 80)% voir tableau ci-dessous.

Tableau N° 1 représentant les différents pourcentages cytotoxiques des pesticides.

	<i>Métribuzine</i>	<i>Chlorpyrifos</i>	<i>Acétamépride</i>	<i>Cyperméthrine</i>	<i>Mancozèbe</i>	<i>Iprodione</i>
20%	5 μM	5 μM	5 μM	25 μM	10 μM	100 μM
50%	100 μM	50 μM	200 μM	500 μM	400 μM	500 μM
80%	500 μM	500 μM	500 μM	1000 μM	500 μM	1000 μM

Néanmoins, une concentration de 5 μM de métribuzine, de chlorpyrifos et d'acétamépride, est suffisante pour induire une cytotoxicité aproximative de 20%, et ceci malgré la différence des famille de pesticides, alors que pour le mancozèbe on constate une augmentation de cytotoxicité de plus 30% entre (400 et 500) μM , enfin pour la cyperméthrine et l'iprodione la cytotoxicité à 80% est atteinte avec des concentrations de 1000 μM , nous imputons ces différences à la sensibilité des cellules Vero aux différentes familles de pesticides.

III.2. Effet des pesticides sur la balance oxydative

III.2.1. Effet des pesticides sur la peroxydation lipidique

Afin d'évaluer l'étendue de la peroxydation des lipides occasionnée par les différents pesticides, une espèce réactive à l'acide thiobarbiturique, le malondialdéhyde (MDA) est dosé dans les surnageants des cultures de cellules Vero incubées pendant 24 heures avec les différents pesticides à des concentrations induisant une cytotoxicité de 20, 50 et 80%.

Une augmentation de la peroxydation des lipides est observée au niveau des surnageants cellulaires, traduite par une augmentation des concentrations de MDA en fonction de la concentration des pesticides avec des taux de (83.75 ± 8.69) nM/10⁴ cellules, (129.9 ± 6.36) nM/10⁴ cellules et (135.5 ± 6.64) nM/10⁴ cellules pour des concentrations respectives de (5, 50 et 500) μ M de **chlorpyrifos**, de (44.6 ± 1.83) nM/10⁴ cellules, (71 ± 8.4) nM/10⁴ cellules et (65.45 ± 2.51) nM/10⁴ cellules pour des concentrations de (5, 200 et 500) μ M d'**acétamipride**, de (88.5 ± 2.5) nM/10⁴ cellules, (129.75 ± 7.53) nM/10⁴ cellules et (133.9 ± 2.61) nM/10⁴ cellules pour des concentrations de (25, 500 et 1000) μ M de **cyperméthrine**, de (72.85 ± 3.6) nM/10⁴ cellules, (105.2 ± 6.6) nM/10⁴ cellules et (169.1 ± 9.7) nM/10⁴ cellules pour des concentrations de (10, 400 et 500) μ M de **macozèbe**, de (2.55 ± 0.64) nM/10⁴ cellules, (13.32 ± 1.52) nM/10⁴ cellules et (18.99 ± 1.3) nM/10⁴ cellules pour des concentrations de (100, 500 et 1000) μ M d'**iprodione**, et enfin de (101.05 ± 3.1) nM/10⁴ cellules, (109.4 ± 3.9) nM/10⁴ cellules et (124.25 ± 6.89) nM/10⁴ cellules pour des concentrations de (5, 100 et 500) μ M de **métribuzine**, comparativement au témoin qui était de (29.72 ± 5.38) nM/10⁴ cellules (**Figure 11**).

La présence de ce composé aldéhydique (MDA) dans le milieu extracellulaire, démontre une détérioration de la membrane par l'oxydation des lipides membranaires et la libération du composé dans les surnageants. Les résultats obtenus montrent que les pesticides induisent une peroxydation des lipides dose dépendante *in vitro* au niveau de cette lignée cellulaire. Cette évolution de la peroxydation lipidique corrobore avec la diminution de la viabilité dose dépendante observée.

La précocité de cette perturbation du métabolisme cellulaire démontre la rapidité de la mise en place des cascades de signalisation aboutissant à la libération des médiateurs responsables de la peroxydation lipidique. En d'autres termes, les pesticides seraient responsables de la mise en place du système oxydatif.

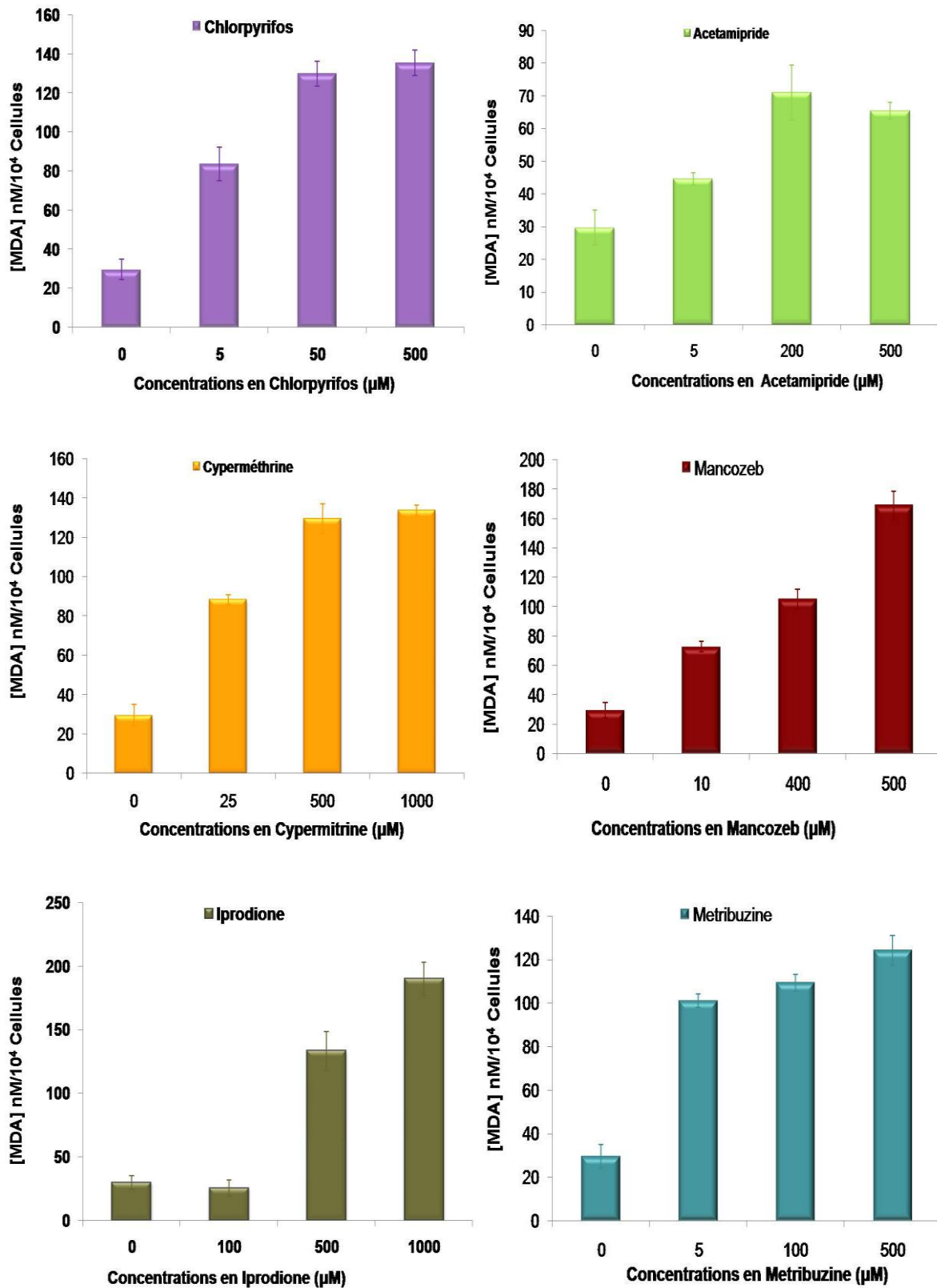


Figure 11 : Détermination du taux de malondialdéhyde dans les surnageants des cultures des cellules Vero incubées avec les pesticides pendant 24 heures.

III.2.2. Etude de l'effet des pesticides sur le système antioxydant (le glutathion)

L'étude de la balance anti-oxydante non-enzymatique par le dosage du glutathion (GSH) dans les surnageants de cultures de cellules Vero avec les pesticides, permet d'observer une nette augmentation du taux de glutathion en fonction des concentrations croissantes de chaque pesticide étudié supérieur à celui du *témoin* qui est de (130.5 ± 4.15) nM/10⁴.

En effet la concentration de GSH varie entre (288.25 ± 9.8) nM/10⁴ cellules, (250 ± 10.2) nM/10⁴ cellules et (130.3 ± 1.13) nM/10⁴ cellules pour des concentrations de (5, 50 et 500) µM de **chlorpyrifos**, de (188.2 ± 3.5) nM/10⁴ cellules, (167.8 ± 10.18) nM/10⁴ cellules et (125 ± 6.5) nM/10⁴ cellules pour des concentrations de (5, 200 et 500) µM d'**acétamipride**, de (365.1 ± 7.9) nM/10⁴ cellules, $(274.25 \pm 9,8)$ nM/10⁴ cellules et (212.15 ± 6.5) nM/10⁴ cellules pour des concentrations de (25, 500 et 1000) µM de **cyperméthrine**, de (267.5 ± 12.5) nM/10⁴ cellules, (239 ± 13.2) nM/10⁴ cellules et (187.85 ± 13) nM/10⁴ cellules pour des concentrations de (10, 400 et 500) µM de **macozèbe**.

Concernant l'**iprodione** et la **métribuzine** les taux sont de (304.5 ± 12.8) nM/10⁴ cellules, (263.65 ± 11.7) nM/10⁴ cellules et (125 ± 5.7) nM/10⁴ cellules pour des concentrations de (100, 500 et 1000) µM, et enfin de $(271.20 \pm 6,2)$ nM/10⁴ cellules, (221.6 ± 9.2) nM/10⁴ cellules et (134.1 ± 11.2) nM/10⁴ cellules pour des concentrations de (5, 100 et 500) µM respectivement (**Figure 12**).

L'augmentation de la libération du GSH dans les surnageants atteignant un taux maximal après expositions des cellules à de faibles concentrations de pesticides, suggère ainsi leur implication probable dans les mécanismes moléculaires de détoxification cellulaire et ceci surviendrait en raison du faible niveau intracellulaire de ce métabolite et en réponse à l'instauration d'un stress oxydatif induit par ces mêmes pesticides, et ce soit par sa régénération à partir de sa forme oxydée GSSG par le biais de la Glutathion réductase, ou encore par sa production de novo par la Glutathion synthétase à partir de la glycine et γ-glutamylcysteine (Kale et al., 1999).

La déplétion subséquente serait probablement due à une consommation du métabolite antioxydant par les espèces réactives oxygénées responsable de l'augmentation du taux de malondialdéhyde déjà observée en vue de sa neutralisation.

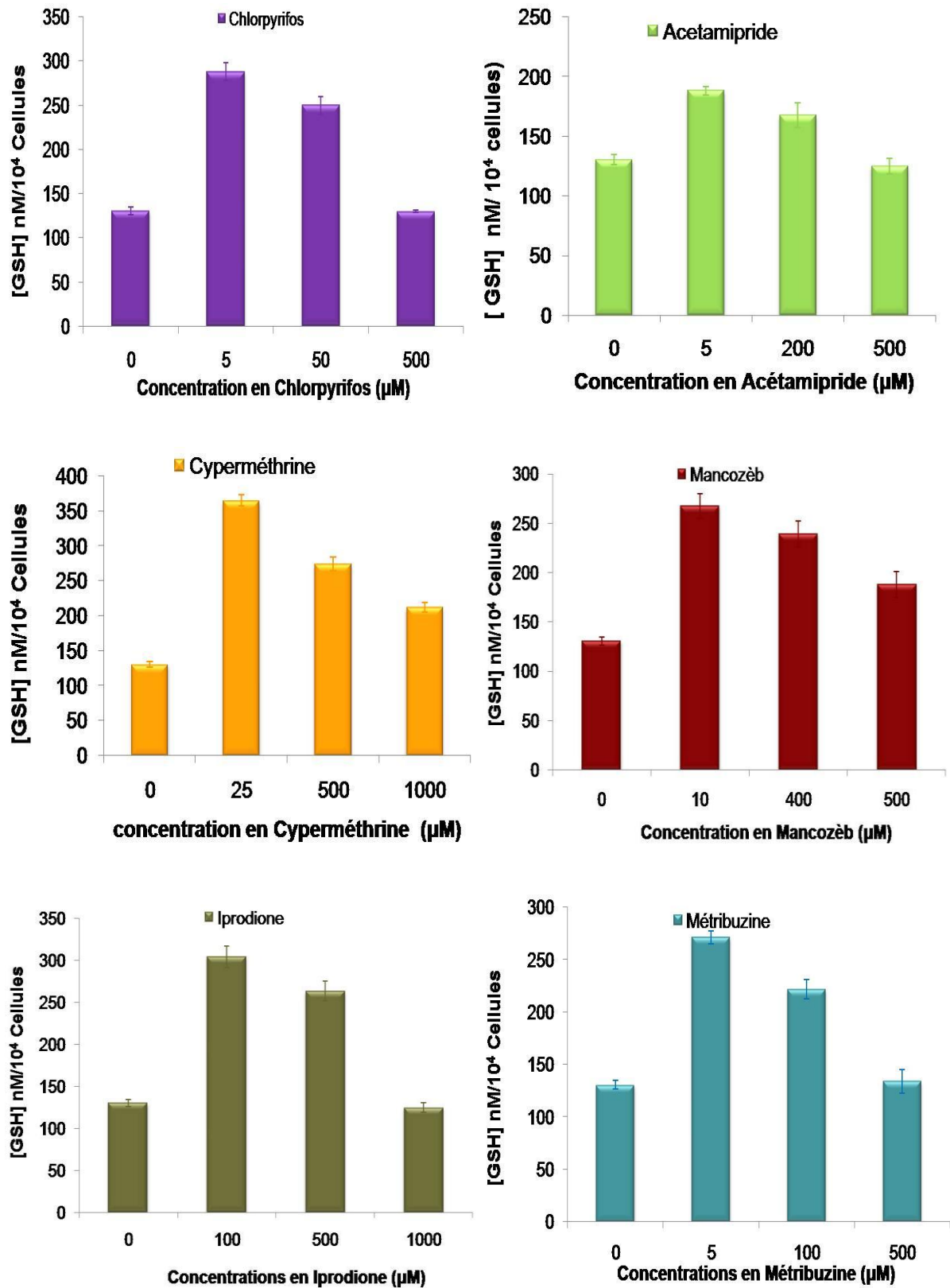


Figure 12: Détermination des taux de glutathion dans les surnageants de cultures de cellules Vero incubées avec les pesticides pendant 24 heures.

3. Etude de l'effet des pesticides sur les protéines

La détermination de l'effet des pesticides sur la concentration des protéines totales, déterminée par la méthode de Lowry, montre que l'exposition des cellules Vero aux différents pesticides se traduit par la modification de la quantité de protéines totales par rapport au témoin.

Ainsi, à des concentrations correspondant aux IC_{50} de 50 μM , 100 μM , 200 μM , 400 μM et 500 μM de chlorpyrifos, de métribuzine, d'acétamipride, de mancozèbe et d'iprodione et de cyperméthrine respectivement les taux en protéines totales se trouvent inférieurs au témoin (2.9 ± 0.1 mg/ml) avec des concentrations de (1.325 ± 0.22) mg/ml, (2.8 ± 0.24) mg/ml, (2.06 ± 0.11) mg/ml, (1.815 ± 0.045) mg/ml, (2.53 ± 0.12) mg/ml, (1.56 ± 0.15) mg/ml respectivement (**Figure 13**).

Cette réduction en protéine totale cellulaire serait due à la formation de dérivés carbonyles due à une attaque des radicaux libres sur les protéines cellulaires. En effet, durant la peroxydation des lipides et la déplétion en glutathion observées suite à l'exposition des cellules aux pesticides, les groupements thiols des protéines se trouveraient oxydées par les radicaux libres, conduisant à la formation de ponts disulfures et également à leur fragmentation et leur catabolisme (Otitoju et Onwurah, 2007).

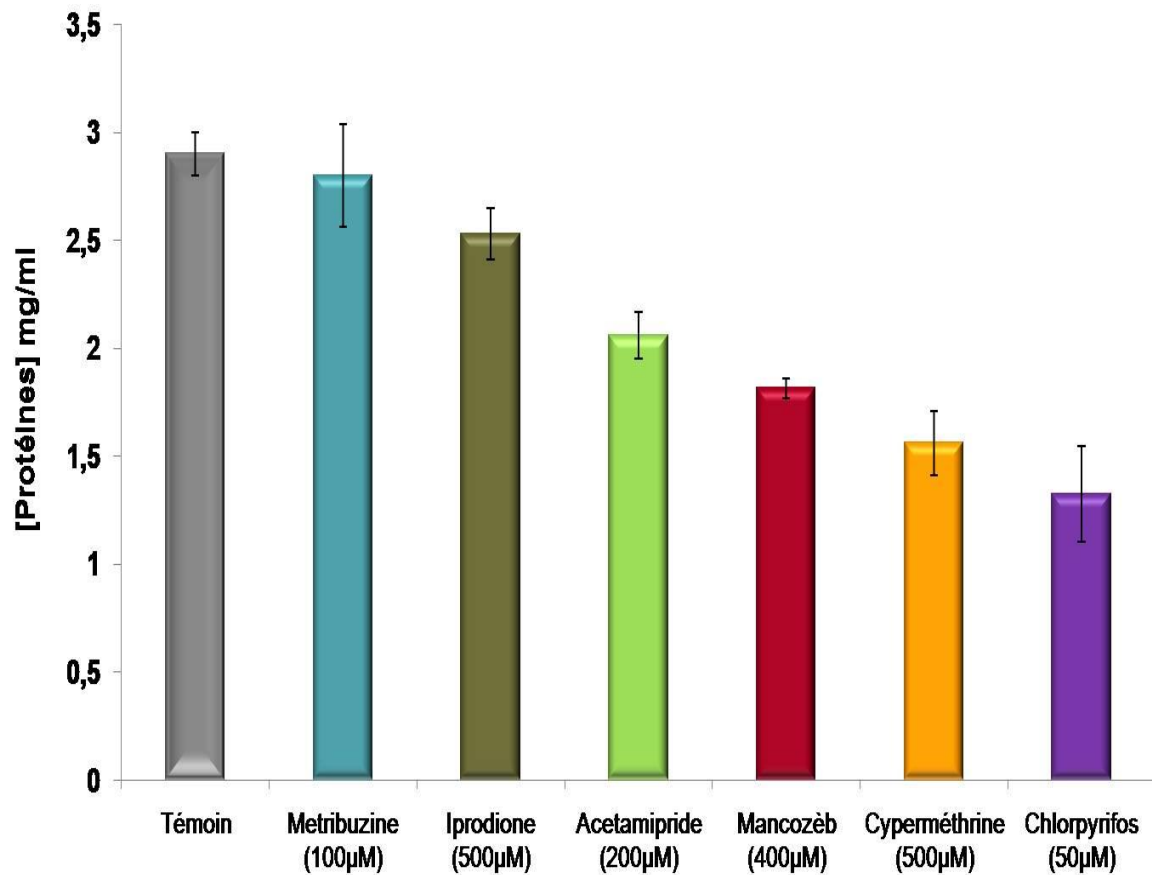


Figure 13: Détermination des taux de protéines totales dans les cultures de cellules Vero incubées avec les pesticides pendant 24 heures.

4. Etude des altérations de l'ADN induites par les pesticides

Le clivage de l'ADN durant l'apoptose se produit à des sites entre les nucléosomes. Cette fragmentation apparaît sous forme d'échelle par électrophorèse sur gel d'agarose. Par contre, la nécrose est caractérisée par une fragmentation aléatoire de l'ADN formant une sorte de traînée sur le gel (Lim et *al.*, 2003).

Ainsi, dans notre étude l'utilisation d'un test qualitatif qui est l'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments d'ADN des cellules incubées avec différentes concentrations de pesticides pendant 24 heures (*in vitro*), montre des bandes apparentes, pour quelques pesticides, et des smires pour d'autres (**Figure 14**) cela indique que la cytotoxicité des pesticides induirait un effet apoptotique probable et aussi un processus nécrotique, en raison de la fragmentation de l'ADN observée par la perte de l'intégrité membranaire démontrée par

le test de viabilité et la libération du contenu cytoplasmique dans les surnageants, tel que le malondialdehyde et le glutathion.

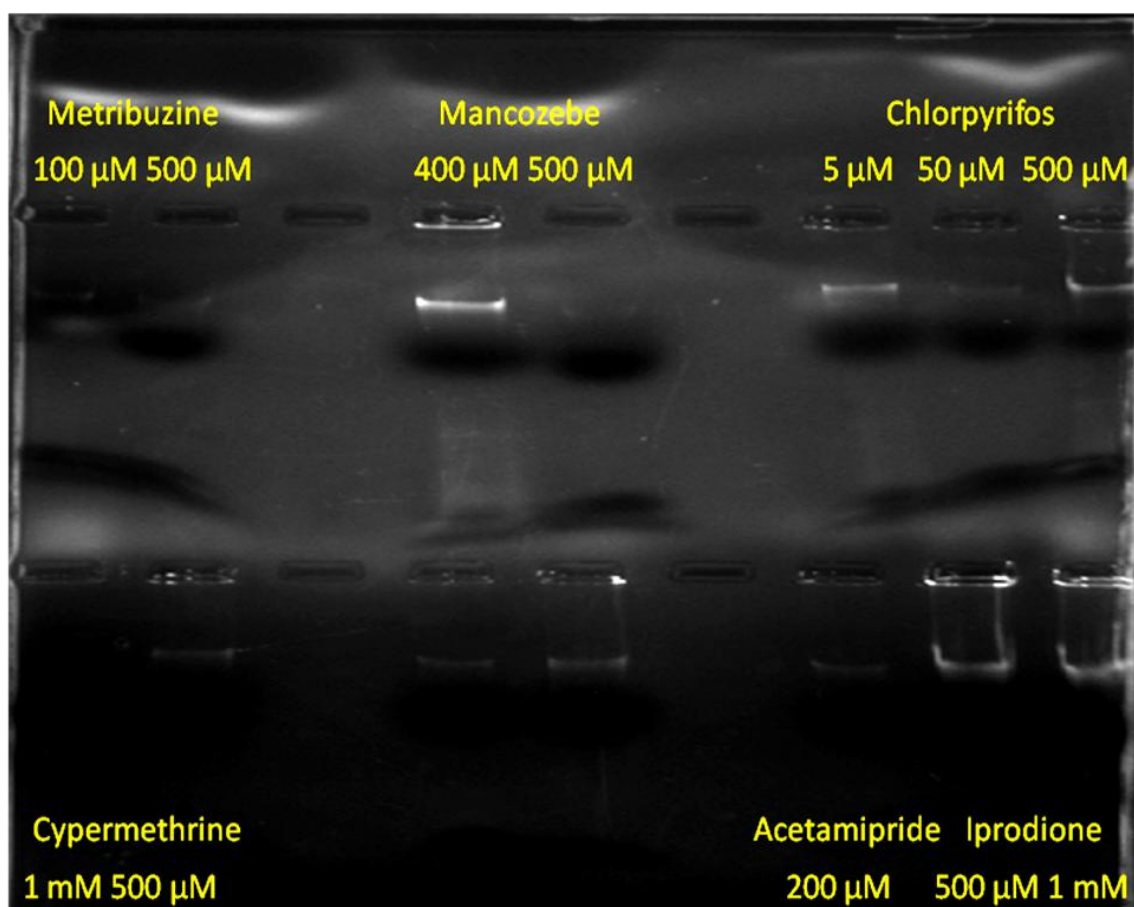


Figure 14 : Profil électrophorétique de l'ADN des cellules Vero.

III.5. Discussion générale

Les pesticides ont permis le développement de l'agriculture et ont contribué à l'augmentation des rendements et à la régulation de la production agricole. L'utilisation des produits phytosanitaires a également limité ou éradiqué un certain nombre de maladies parasitaires très meurtrières. Cependant, aujourd'hui, les pesticides sont soupçonnés de présenter un risque pour la santé de l'homme et pour son environnement (Van der Werf, 1996 ; Köprücü et *al.*, 2006 ; Saxena, 2010).

Par ailleurs, de nombreuses études épidémiologiques suggèrent une corrélation entre l'utilisation professionnelle des pesticides et l'apparition de certaines pathologies dans les populations concernées. Des effets cancérogènes, neurotoxiques ou de type perturbation endocrinienne de ces derniers ont été mis en évidence chez l'animal (Hernandez et *al.*, 2006 ; Atreya, 2008 ; Landau-Ossondo et *al.*, 2009 ; Ojezele et Abatan, 2009). La question des risques pour l'homme est donc posée tant au niveau professionnel qu'à celui du consommateur.

Les pesticides et autres contaminants environnementaux peuvent modifier l'expression de certains gènes via des mécanismes de régulation génique et épigénétique (Edwards and Myers, 2007).

D'autre part, les pesticides peuvent entraîner des effets immunotoxiques et immunomodulateurs en agissant par plusieurs mécanismes. Outre des effets d'inhibition de production d'anticorps, d'interleukines (IL-2), la sécrétion d'immunoglobuline G IgG, et des effets d'induction de la fabrication d'auto-anticorps, certains pesticides, en particulier des organophosphorés et des carbamates, ont montré des effets inhibiteurs de l'activité et de la maturation des cellules NK (Natural killer), LAK (Lymphokine Activated Killer) et CTL (Cytotoxic T Lymphocytes). Ces cellules sont responsables de la mort des cellules tumorales ou des cellules infectées et peuvent être inhibées selon 3 mécanismes : - l'induction de l'apoptose cellulaire, - l'inhibition de leur capacité de sécrétion de substance cytotoxique ou - l'inhibition directe de la voie Fas/FasL essentielle pour leur activité (Corsini et *al.*, 2005 ; Li and Kawada, 2006).

Dans notre étude, la détermination de l'effet des pesticides sur la viabilité cellulaire a été abordée *in vitro* par la culture de cellules de type épithéliale de reins de singe vert d'Afrique, les cellules Vero.

La mise en contact des cellules Vero avec des concentrations croissantes des pesticides de différentes classes induit une cytotoxicité dose dépendante irréversible, se traduisant par une mort cellulaire apparente, avec quelque peu une différence concernant la sensibilité du type cellulaire étudié aux différentes familles. De telles divergences seraient probablement dues à des différences intrinsèques des propriétés des différentes familles de pesticides.

De part la propriété lipophile des pesticides organophosphorés et leur forte affinité d'interaction avec les phospholipides membranaires, leur activité inhibitrice sur l'acétylcholinestérase, à des doses relativement fortes, montre des effets toxiques observés suite à des expositions aiguës ou accidentelles (Kaur et Dhanju, 2005 ; Köprücü et *al.*, 2006; Sailaja et al, 2006 ; Tan et *al.*, 2009). Une étude récente a pu montrer qu'à faibles doses, certains pesticides organophosphorés sont capables de se lier d'une façon spécifique à des protéines au niveau du cerveau et du thymus. Ces propriétés pourraient être à l'origine de leurs effets neurotoxiques et immunotoxiques à long terme (Carter *et al.*, 2007).

La cyperméthrine est un pyrethrine synthétique largement utilisé dans les pays en voie de développement comme insecticide, sa toxicité sur les animaux mammifères conduit à des changements dans leurs activités physiologiques en plus d'autres caractéristiques pathologiques (Saxena, 2010).

Le mancozèbe, appartenant à la famille des carbamates, montre une faible toxicité aiguë et chronique chez l'homme et les animaux (Atamanalp et Yanik, 2003 ; Corsini et *al.*, 2005). Il contribue à une toxicité neuronale ainsi qu'aux pathologies subséquentes (Damico et *al.*, 2007).

La toxicité se produirait soit par conversion des pesticides en radicaux libres ou via la formation de radicaux superoxydes comme sous produits de leur métabolisation. En effet, l'ingestion de pesticides par une exposition directe ou indirecte conduit à la génération d'espèces réactives de l'oxygène. L'augmentation du contenu des espèces réactives à l'oxygène causé par les pesticides conduit à la mise en place d'un stress oxydant (Damico et *al.*, 2007 ; Otitoju et Onwurah, 2007).

L'alachlore et le chlorpyrifos (insecticides) induisent *in vitro* sur les cellules PC12 neuronales un stress oxydant conduisant à une peroxydation lipidique, des cassures simples et double brins de l'ADN, ainsi qu'à une induction de protéine du choc thermique (Bagchi et al., 1996). Aussi la cyperméthrine, un pyréthrianoïde agissant sur les canaux sodiques a également été associée à une augmentation de la production de radicaux libres (Kale et al., 1999 ; Wang et al., 2009). La vinclozoline ou l'iprodione (fongicide) diminue le taux de glutathion intracellulaire, et augmente le taux de radicaux libres dans les cellules HepG2 après une heure de traitement à 25 ou 100 µg/ml (Radice et al., 1998).

La génération excessive de radicaux libres est souvent associée à l'inhibition de la chaîne de transfert d'électrons des mitochondries limitant ainsi les capacités antioxydantes cellulaires, avec en conséquence la détérioration des macromolécules comme l'ADN, une peroxydation lipidique, une modification des protéines, et éventuellement à la mort cellulaire (Doreswamy et al., 2004 ; Damico et al., 2007).

Une perturbation de la balance redox cellulaire est observée dans notre étude. En effet, les pesticides semblent avoir un effet pro-oxydant caractérisé par la libération des ERO. Une probable libération et accumulation du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ par les cellules Vero serait la conséquence de l'augmentation de l'activité de la SOD par la dismutation de l'anion superoxyde et de la diminution de l'activité de la catalase. Le H₂O₂ étant moins réactif serait transformé en radical hydroxyle OH[•] par la réaction de Fenton Haber-Weiss (Reilley et al., 2004). Cette molécule serait au centre des phénomènes d'oxydation des macromolécules.

Les effets inducteurs des espèces oxygénées sur la peroxydation lipidique sont bien connus (Peavy et Fairchild, 1986 ; Davey et al., 2005). L'une de leurs principales cibles est la peroxydation des lipides et la peroxydation des phospholipides membranaire, altérant non seulement le milieu lipidique mais aussi la structure et l'intégrité fonctionnelle de la membrane cellulaire et affecte également l'activité d'enzymes membranaires, conduisant à la modification de la fluidité et la perméabilité membranaire, ou de la perte de l'intégrité membranaire observée dans notre étude. La peroxydation lipidique pourrait également donner lieu à un produit final le malondialdéhyde MDA (Martins et Meneghini, 1994; Ma et al., 1999). Ce dernier, a la capacité de former des adduits avec les protéines et l'ADN responsables des effets mutagènes et carcinogènes (Chaudhary et al., 1994 ; Pratico, 2002).

Les protéines étant les plus sensibles aux attaques radicalaires, leur oxydation conduit soit à une perte de la fonction catalytique, dans le cas des enzymes, ou à la fonction structurale, pour des récepteurs ou protéines de transport. L'atteinte des enzymes impliquées dans la réplication ou la réparation de l'ADN conduit à des mutations ou à des erreurs dans la lecture (Barouki, 2006 ; Frelon, 2001). Par contre, les protéines oxydées peuvent déréguler la signalisation cellulaire impliquée dans la prolifération ou la défense. Ces protéines altérées sont éliminées par un système incluant les calpaïnes, le protéasome, les cathepsines et des protéases (Mehlhase et Grune, 2002).

Les résultats de notre étude montrent également une libération du glutathion suite à une exposition des cellules Vero aux différents pesticides, ceci surviendrait probablement comme une réponse au stress oxydatif, alors que la déplétion en GSH serait due au faible niveau intracellulaire de ce métabolite du fait que le stock cellulaire en GSH soit rapidement consommé par les espèces réactives oxygénées, par la libération excessive du H_2O_2 . Des études ont montré que sous des conditions de stress oxydatif extrême marquées par une déplétion de GSH, la catalase pourrait assurer la cytoprotection (Kang et *al.*, 1996; Kale et *al.*, 1999; Kumar et *al.*, 2003).

En effet, les mécanismes enzymatiques prédominants qui régulent les niveaux intracellulaires du H_2O_2 sont médiés par la catalase et la glutathion peroxydase. La glutathion peroxydase convertirait le H_2O_2 en H_2O dans une réaction qui oxyde le glutathion GSH vers sa forme GSSG. A son tour, le GSH serait régénéré de sa forme GSSG par la glutathion réductase en présence du NADPH, la glutathion synthétase produirait de novo le GSH à partir de la glycine et le γ -glutamylcysteine. La régulation du H_2O_2 par le cycle redox du glutathion est médiée dans le cytosol et la mitochondrie (Kale et *al.*, 1999 ; Srinivasa et *al.*, 2003).

Enfin, les résultats de notre étude, montrent que les différents pesticides conduisent à une perturbation du métabolisme cellulaire, par l'instauration d'un stress oxydatif qui attaquerait les macromolécules cellulaires incluant l'ADN. L'oxydation de ce dernier est à l'origine de l'altération du matériel génétique conduisant à sa fragmentation, et par conséquent à une mort cellulaire.

Des cassures simples et doubles brins de l'ADN, et une augmentation des adduits à l'ADN ont été observé dans le sang périphérique et les lymphocytes d'agriculteurs

(Le Goff, 2005). Aussi, dans les cellules fibroblastiques de rat le mancozèbe induit des cassures simples brins après une heure d'exposition à de faibles doses (Calviello et *al.*, 2005).

De ce fait, la mise en place d'un stress oxydatif avec la libération d'espèces réactives à l'oxygène (peroxyde d'hydrogène), de peroxydation lipidique avec une altération de la membrane plasmique des cellules, sont autant de faits aboutissant à une mort cellulaire. Néanmoins, la présence de l'un des phénomènes de mort cellulaire par nécrose ou apoptose induit par les pesticides reste encore à confirmer.

Tous ces phénomènes seraient en partie ou non responsables de la mort cellulaire.

CONCLUSION

Conclusion et perspectives

L'approche expérimentale menée a consisté à étudier le pouvoir cyto-toxique induit par quelques pesticides utilisés en Algérie, à savoir trois insecticides : le chlorpyrifos, l'acétaméride et la cyperméthrine, ainsi que deux fongicides : l'iprodione et le mancozèbe et un désherbant total qui est la métribuzine.

Pour cela, nous avons estimé leur pouvoir toxique in-vitro, sur une lignée cellulaire épithéliale de reins de singe vert d'Afrique de type Vero.

Dans un premier temps, l'évaluation de la viabilité cellulaire montre une cytotoxicité croissante en fonction des concentrations de pesticides, reflétée par l'exclusion du colorant Rouge Neutre par les cellules Vero. Ceci s'expliquerait par la détérioration des membranes cellulaires, en conséquence probable des perturbations métaboliques induites par les différents pesticides.

Par ailleurs, l'étude biochimique révèle une perturbation du métabolisme cellulaire, avec la génération d'un stress oxydatif. Cet effet pro-oxydatif des pesticides conduit par conséquent à une peroxydation lipidique, déterminé par l'augmentation dose dépendantes du malondialdéhyde.

Parallèlement à l'étude de la balance oxydative, l'évaluation des perturbations du système de détoxification non-enzymatique, par le dosage du contenu en glutathion, montre que les pesticides induisent une production de glutathion à de faibles concentrations et une consommation à de plus fortes concentrations en réponse au stress oxydatif.

La fragmentation de l'ADN de la lignée Vero observée, serait la conséquence de la perturbation de l'équilibre redox cellulaire, caractérisé par l'instauration d'un stress oxydatif, avec la libération probable de radicaux libres qui provoquerait une peroxydation des lipides membranaires d'une part, ce qui contribue à la fragilisation de la membrane cellulaire et la libération de son contenu, et d'autre part, à l'attaque de l'ADN et probablement des protéines enzymatiques cellulaires. La mise en place du système de détoxification, par la mobilisation du tri-peptide le glutathion reste encore insuffisante pour la restauration de l'équilibre cellulaire.

Conclusion & perspectives

L'ensemble des résultats obtenus montre la complexité des mécanismes déclenchés par les pesticides. Notre hypothèse est que l'exposition des cellules aux pesticides pourrait induire en premier lieu, à la libération d'espèces réactives oxygénées, qui conduirait à l'oxydation des lipides membranaires, des protéines et de l'ADN. De plus, les pesticides semblent induire une mobilisation du glutathion. La dégradation des protéines serait due à l'activation probable des voies protéolytiques. Tous ces phénomènes seraient probablement en partie responsables de la toxicité provoquée par les différents pesticides.

Ainsi, d'autres investigations seront nécessaires pour élucider le mécanisme exact de la toxicité induit par les pesticides et de comprendre les rôles relatifs des perturbations cellulaires et moléculaires impliquées dans le stress oxydatif occasionné.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

A

Abell, A., Ernst, E., and Bonde, J. P., 2000. Semen quality and sexual hormones in greenhouse workers. *Scand J Work Environ Health*. 26(6); 492-500.

ACTA, 2005. Index Phytosanitaire ACTA 2005.41ème. Association de Coordination Technique Agricole. France.

AFSSA(2005).<http://www.dive.afssa.fr/agitox/index.php>.

Antherieu, S., Ledirac, N., Luzy, A. P., Lenormand, P., Caron, J. C., and Rahmani, R., 2007. Endosulfan decreases cell growth and apoptosis in human HaCaT keratinocytes: partial ROS-dependent ERK1/2 mechanism. *Journal of Cellular Physiology*. 213(1); 177-186.

Anway, M. D., Cupp, A. S., Uzumcu, M., and Skinner, M. K., 2005. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*. 308(5727); 1466-1469.

Arranz L., Fernández, Rodríguez A., Ribera J.M., De la Fuente M. (2008). The glutathione precursor N-acetylcysteine improves immune function in postmenopausal women. *Free Radical Biology & Medicine* 45: 1252–1262.

Arrigo, A. P., (1999). Gene expression and the thiol redox state. *Free Rad. Biol. Med.* 27: 936-944.

Arthur J.R., (2000). The glutathione peroxidases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57: 1825-1835.

Ascherio, A., Chen, H., Weiskopf, M. G., O'Reilly, E., McCullough, M. L., Calle, E. E., Schwarzschild, M. A., and Thun, M. J., 2006. Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 60(2); 197-203.

Atamanalp M., Yanik T., (2003). Alterations in Hematological Parameters of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Exposed to Mancozeb. *Turk J Vet Anim Sci*. 27: 1213-1217.

Atencio L., Moreno I., Josa A., Pichardo S., Moyano R., Blanco A., Camean A.M. (2008). Dose-dependent antioxidant responses and pathological changes in tenca (*Tinca tinca*) after acute oral exposure to *Microcystis* under laboratory conditions. *Toxicol.* 52. 1–12.

Atreya, K., 2008. Health costs from short-term exposure to pesticides in Nepal. *Social Science & Medicine*, 67: 511–519.

Attamo H., Diawara N.A. et Garba A., (1999). Épidémiologie des envenimations scorpioniques en service de pédiatrie au CHD d'Agadez, Niger, en. *Bull Soc Pathol Exot*, 2002, 95, 209-211.

B

Bagchi, D., Bagchi, M., Hassoun, E. A., and Stohs, S. J., 1996. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology*. 104(1-3); 129-140.

Balaazi, O., 2009. La place de l'environnement dans les représentations des médecins généralistes face à la maladie allergique Elaboration d'un guide d'entretien pour la réalisation de focus group. Thèse diplôme d'état de docteur en médecine. Université Paris Val-de-Marne, France.

Balamurugan v., Sen a., Saravanan p., Rasool t.j., Yadav m. p., Bandyopadhyay s.k., Singh r.k. (2006). Development and characterization of a stable vero cell line constitutively expressing peste des petits ruminants virus (pprv) hemagglutinin protein and its potential use as antigen in enzyme-linked immunosorbent assay for serosurveillance of pprv. *Cinical and vaccine immunology*, vol. 13, no. 12. 1367–1372.

Balasubashini M.S., Karthigayan M., Somasundaram S.T, Balasubramanian T, Rukkumani R., Menon V.P. (2006). Peptide induces apoptosis in hep 2 and hela cells: an insight into the mechanism of induction. *Journal of carcinogenesis*, 5:27.

Baldi, I., and Lebailly, P., 2007. [Cancers and pesticides]. *Rev Prat*. 57(11 Suppl); 40-44.

Baldi, I., Cantagrel, A., Lebailly, P., Tison, F., Dubroca, B., Chrysostome, V., Dartigues, J. F., and Brochard, P., 2003a. Association between Parkinson's disease and exposure to pesticides in southwestern France. *Neuroepidemiology*. 22(5); 305-310.

Baldi, I., Filleul, L., Mohammed-Brahim, B., Fabrigoule, C., Dartigues, J. F., Schwall, S., Drevet, J. P., Salamon, R., and Brochard, P., 2001. Neuropsychologic effects of longterm exposure to pesticides: results from the French Phytoneur study. *Environ Health Perspect*. 109(8); 839-844.

BIBLIOGRAPHIE

- Baldi, I., Lebailly, P., Jean, S., Rougetet, L., Dulaurent, S., and Marquet, P., 2006. Pesticide contamination of workers in vineyards in France. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 16(2); 115-124.
- Baldi, I., Lebailly, P., Mohammed-Brahim, B., Letenneur, L., Dartigues, J. F., and Brochard, P., 2003b. Neurodegenerative diseases and exposure to pesticides in the elderly. *Am J Epidemiol.* 157(5); 409-414.
- Balestrasse KB, Noriega GO, Batlle A, Tomaro ML. (2005). Involvement of heme oxygenase as antioxidant defense in soybean nodules. *Free Radice Res.* Feb;39(2):145-51.
- Balestrasse KB, Noriega GO, Batlle A, Tomaro ML. 2005. Involvement of heme oxygenase as antioxidant defense in soybean nodules. *Free Radic Res.* 39 (2):145-51.
- Bannister, A. J., and Kouzarides, T., 2005. Reversing histone methylation. *Nature.* 436(7054); 1103-1106.
- Barja G., Cadenas S., Rojas C., Perez-Campo R., Lopez-Torres M., Prat J., Pamplona R., (1996). Effect of dietary vitamin E levels on fatty acid profiles and nonenzymatic lipid peroxydation in the guinea pig liver. *Lipids*, 31, 963-970.
- Barouki R., (2006). Stress oxydant et vieillissement. *Médecine sciences*, vol. 22, n° 3, p. 266-272.
- Bartling D., Radzio R., Steiner U. & Weiler E.W., (1993) A glutathione S-transferase with glutathione-peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*. Molecular cloning and functional characterization. *European Journal of Biochemistry.* 216: 579-586.
- Bartling D., Radzio R., Steiner U. & Weiler E.W., (1993) A glutathione S-transferase with glutathione-peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*. Molecular cloning and functional characterization. *European Journal of Biochemistry.* 216: 579-586.
- Berlett B.S., Stadtman E.R., (1999). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 272, 20313-20316.
- Berlett B.S., Stadtman E.R., (1999). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 272, 20313-20316.
- Bhutia S.K., Mallick S.K., Stevens S.M., Prokai L., Vishwanatha J.K., Maiti T.K., (2008). Induction of mitochondria-dependent apoptosis by abrus agglutinin derived peptides in human cervical cancer cell. *Toxicology in vitro.* 22, 344-351.
- Blanchoud, H., Farrugia, F., and Mouchel, J. M., 2004. Pesticide uses and transfers in urbanised catchments. *Chemosphere.* 55(6); 905-913.
- Blanchoud, H., Garban, B., Ollivon, D., and Chevreuil, M., 2002. Herbicides and nitrogen in precipitation: progression from west to east and contribution to the Marne river (France). *Chemosphere.* 47(9); 1025-1031.
- Bolognesi, C., Perrone, E., and Landini, E., 2002. Micronucleus monitoring of a floriculturist population from western Liguria, Italy. *Mutagenesis.* 17(5); 391-397.
- Borges M., Cordeiro Da Silva A., Vergnes B., Sereno D., Ouaiissi A. 2005. Conversion of *trypanosoma cruzi* tc52 released factor to a protein inducing apoptosis Tissue and cell, 37. 469-478.
- Bouaziz C., Abid-Essefi S., Bouslimi A., El Golli E., Bacha H. 2006. Cytotoxicity and related effects of t-2 toxin on cultured vero cells. *Toxicol*, 48: 343-352.
- Bouvier, G., Blanchard, O., Momas, I., and Seta, N., 2006. Environmental and biological monitoring of exposure to organophosphorus pesticides: application to occupationally and non-occupationally exposed adult populations. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 16(5); 417-426.
- Brown, T. P., Rumsby, P. C., Capleton, A. C., Rushton, L., and Levy, L. S., 2006. Pesticides and Parkinson's disease--is there a link? *Environ Health Perspect.* 114(2); 156-164.

C

Cadenas E., Davies K-J., (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 29: 222-230.

Calviello, G., Piccioni, E., Boninsegna, A., Tedesco, B., Maggiano, N., Serini, S., Wolf, F. I., and Palozza, P., 2006. DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: involvement of the oxidative mechanism. *Toxicol Appl Pharmacol.* 211(2); 87-96.

Campoy, C., Jimenez, M., Olea-Serrano, M.F., Moreno Frias, M., Canabate, F., Olea, N., Bayés, R.

BIBLIOGRAPHIE

- and Molina-Font, J.A., 2001. Analysis of organochlorine pesticides in human milk: preliminary results. *Early Hum dev.* 65 Suppl; S 183-190;
- Canal-Raffin M., l'Azou B., Jorly J., Hurtier A., Cambar J., Brochard P., (2008). Cytotoxicity of folpet fungicide on human bronchial epithelial cells. *Toxicology*, 249, 160–166.
- Carr A.C., Frei B., (2002). Human neutrophils oxidize low-density lipoprotein by hypochlorous acid-dependent mechanism: The role of vitamin C. *Biol. Chem.*, Vol. 383, pp. 627-636.
- Carter, W. G., Tarhoni, M., Rathbone, A. J., and Ray, D. E., 2007. Differential protein adduction by seven organophosphorus pesticides in both brain and thymus. *Hum Exp Toxicol.* 26(4); 347-353.
- Casida, JE., Gammon, D.W., Glickman, A.H., Lawrence, L.J., 1983. Mechanisms of selective action of pyrethroid insecticides. *Ann. Rev Pharmacol Toxicol.* 23:413-438
- CEC. 2002. Making the environment Healthier for Our Kids-An overview of environmental challenges to the health of North America's children.
- Charpentier A, Menozzi P, Marcel V, Villatte F, Fournier D. 2000. A method to estimate acetylcholinesterase-active sites and turnover in insects. *Anal Bioch.* 285(1):76-81.
- Chaudhary A.K., Nokubo M., Reddy G.R., Yeola S.N., Morrow J.D., Blair I.A., Marnett L.J., 1994 Detection of endogenous malondialdehyde-deoxyguanosine adducts in human liver. *Science*, 265, 1580-1582.
- Chelvanayagam G., Parker M.W., Board P.G., (2001). Fly fishing for GSTs: a unified nomenclature for mammalian and insect glutathione transferases. *Chemico-Biological Interactions* 133: 256-260.
- Chen H., Tappel A., (1996). Protection by multiple antioxidants against lipid peroxidation in rat liver homogenate. *Lipids*, vol. 31, n.1, 47-50.
- Chen K., Suh J., Carra A.C., Morrow J.D., Zeind J., Frei B., (2000). Vitamin C suppresses oxidative lipid damage in vivo, even in the presence of iron overload. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 279 (6), p. E1406-1412. Zolin in dicarboximide-susceptible and resistant isolates of *Botrytis cinerea*. *Pestic. Biochim. Phy.* 55, 29-39.
- Choi, G.J., Lee, H.J., Cho, K.Y., 1996. Lipid peroxidation and membrane disruption by vinclozolin in dicarboximide-susceptible and resistant isolates of *Botrytis cinerea*. *Pestic. Biochem. Phys.* 55: 29-39.
- Cole, D. C., Carpio, F., Julian, J., and Leon, N., 1998. Assessment of peripheral nerve function in an Ecuadorian rural population exposed to pesticides. *J Toxicol Environ Health A.* 55(2); 77-91.
- Colin, F., 2000. Approche spatiale de la pollution chronique des eaux de surface par les produits phytosanitaires Cas de l'Atrazine dans le bassin versant de Sousson (Gers, France). Unité mixte Cemagref-ENGREF "Structure des systèmes spatiaux". 233.
- Cooke M.S., Evans M.D., Dizdaroglu M., Lunec J., (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.*, Vol 17 (10), p. 1195-1214.
- Corsini Emanuela, Sarah, Birindelli, Silvia Fustinonic, Gioia DePaschale, Teresa Mammone b, Sara Visentin b, Corrado L. Galli a, Marina Marinovich a, Claudio Colosio Toxicology and Applied Pharmacology 208 (2005) 178– 185
- Cossu C, Doyotte A, Jacquin MC, Babut M, Exinger A, et Vasseur P., (1997). Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicol Envir Saf.* 38 (2): 122-131.
- Costa, C., Teixeira, J. P., Silva, S., Roma-Torres, J., Coelho, P., Gaspar, J., Alves, M., Laffon, B., Rueff, J., and Mayan, O., 2006. Cytogenetic and molecular biomonitoring of a Portuguese population exposed to pesticides. *Mutagenesis.* 21(5); 343-350.
- 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>
- Cravedi, J. P., Zalko, D., Savouret, J. F., Menuet, A., and Jegou, B., 2007. [The concept of endocrine disruption and human health]. *Med Sci (Paris).* 23(2); 198-204.
- Crill W.D. et Roehrig J.T., (2001), Monoclonal Antibodies That Bind to Domain III of Dengue

Virus E Glycoprotein Are the Most Efficient Blockers of Virus Adsorption to Vero Cells *Journal OF Virology*, Vol. 75, No. 16, p. 7769–7773.

D

Damico D.C.S., Minardi Nascimento J., Lomonte B., Ponce-Sotoa L.A., Joazeiro P., Camillo Novello J., Marangonia S., Collares-Buzato C.B., (2007). Cytotoxicity of *Lachesis muta muta* snake (bushmaster) venom and its purified basic phospholipase A2 (lmtx-i) in cultured cells. *Toxicol.* 49, 678–692.

Damstra, T., 2002. Potential effects of certain persistent organic pollutants and endocrine disrupting chemicals on the health of children. *J Toxicol Clin Toxicol.* 40(4); 457-465.

Davey M.W., Stals E., Panis B., Keulemans J., Swennen R.L., (2005). High-throughput determination of malondialdehyde in plant tissues. *Analytical Biochemistry* 347 201–207.

Davies M.J. (2003). Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 305 (3), p. 761-770.

Delgado, E.H., Streck, E.L., Quevedo, J.L., Dal-Pizzol, F., 2006. Mitochondrial respiratory dysfunction and oxidative stress after chronic malathion exposure. *Neurochem Res.* 31(8):1021-5.

Dewailly, E., Ayotte, P., Bruneau, S., Gingras, S., Belles-Isles, M., and Roy, R., 2000. Susceptibility to infections and immune status in Inuit infants exposed to organochlorines. *Environ Health Perspect.* 108(3); 205-211.

Doreswamy K., Shrilatha B., Rajeshkumar T., Muralidhara. 2004. Nickel-induced oxidative stress in testis of mice: evidence of DNA damage and genotoxic effects. *J. Androl.* 25 (6): 996-1003.

Drechsel, D. A., and Patel, M., 2008. Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. *Free Radical Biology and Medicine.* 44(11); 1873-1886.

Dulhunty A, Gage P, Curtis S, Chelvanayagam G & Board P (2001) The glutathione transferase structural family includes a nuclear chloride channel and a ryanodine receptor calcium release channel modulator. *Journal of Biological Chemistry* 276: 3319-3323.

E

Edwards, T. M., and Myers, J. P., 2007. Environmental exposures and gene regulation in disease etiology. *Environ Health Perspect.* 115(9); 1264-1270.

EEA, and WHO, E. (2002). *Children's Health and Environment: A review of evidence.*

Elbaz, A., and Tranchant, C., 2007. Epidemiologic studies of environmental exposures in Parkinson's disease. *J Neurol Sci.* 262(1-2); 37-44.

F

Faucet-Marquis V., (2005). L'ochratoxine A, contaminant alimentaire, est-elle un cancérigène génotoxique ou épigénétique ? Recherche des effets génotoxiques par la technique de post-marquage de l'ADN au 32P en relation avec la métabolisation de l'ochratoxine A. Thèse de doctorat N° d'ordre : 2295. Institut national polytechnique de Toulouse.

Favier A., (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Mécanismes biochimiques.* 108-115.

Frelon S., (2001). Influence de métaux de transition sur la dégradation radicalaire de l'ADN. Thèse de Doctorat. Université Joseph Fourier-Grenoble I.

Freshney I.A., (1987). *Culture of animal cells: a manual of basic technique.* A.R. LISS, Inc., new York.

G

Garaj-Vrhovac, V., and Zeljezic, D., 2000. Evaluation of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides using single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay. Pesticide genotoxicity revealed by comet assay. *Mutat Res.* 469(2); 279-285.

Gerecke, A. C., Scharer, M., Singer, H. P., Muller, S. R., Schwarzenbach, R. P., Sagesser, M., Ochsenein, U., and Popow, G., 2002. Sources of pesticides in surface waters in Switzerland: pesticide load through waste water treatment plants-current situation and reduction potential. *Chemosphere.* 48(3); 307-315.

Giles G.L., Jacob C., (2002) Reactive sulfur species : an emerging concept in oxidative stress. *Biol. Chem.*, vol. 383, p. 375-388.

Giles G.L., Jacob C., (2002) Reactive sulfur species : an emerging concept in oxidative stress. *Biol. Chem.*, vol. 383, p. 375-388.

Girón E.M., Aguilar I., Romero L., Sánchez E.E., Pérez J.C., Rodríguez-Acosta A., (2005). A low-cost method to test cytotoxic effects of *Crotalus vegrandis* (serpentes: viperidae) venom on kidney cell cultures. *rev. inst. med. trop. s. Paulo* 47(3):147-15.

Gomez-Arroyo, S., Diaz-Sanchez, Y., Meneses-Perez, M. A., Villalobos-Pietrini, R., and De Leon-Rodriguez, J., 2000. Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides. *Mutat Res.* 466(1); 117-124.

Govorkova E.A., Murti G., Meignier B., De Taisne C., Webster R.G., (1996). African green monkey kidney (vero) cells provide an alternative host cell system for influenza a and b viruses. *Journal of virology*, vol. 70, no. 8. 5519–5524.

Groppa, M.D., Tomaro, M.L., Benavides, M.P., 2007. Polyamines and heavy metal stress: the antioxidant behavior of spermine in cadmium- and copper-treated wheat leaves. *Biometals.* 20(2):185-95.

Guimont S, 2005. Devenir des pesticides dans les sols en fonction de l'état d'humidité et du mode de circulation de l'eau dans le sol. Thèse de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, France.

Guleria S.R., Pan J., Dipette D., Singh U.S., (2006). Hyperglycemia inhibits retinoic acid-induced activation of *rac1*, prevents differentiation of cortical neurons, and causes oxidative stress in a rat model of diabetic pregnancy. *Diabetes*, vol. 55. 3326-3334.

Gupta, R.K., Miller, K.P., Babus, J.K., and Flaws, J.A., 2006. Methoxychlor inhibits growth and induces atresia of antral follicles through an oxidative stress pathway. *Toxicology Science* 93(2); 382-9.

H

Halliwell B. & Gutteridge J.M.C. (1999) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford Science Publications, Oxford.

Hancock, D. B., Martin, E. R., Mayhew, G. M., Stajich, J. M., Jewett, R., Stacy, M. A., Scott, B. L., Vance, J. M., and Scott, W. K., 2008. Pesticide

exposure and risk of Parkinson's disease: a family-based case-control study. *BMC Neurol.* 8(6).

Haorah, J., Knipe, B., Leibhart, J., Ghorpade, A., Persidsky, Y. 2005. Alcohol-induced oxidative stress in brain endothelial cells causes blood-brain barrier dysfunction. *J Leukoc Biol.* 78(6):1223-32.

Harbell J.W., Koontz S.W., Lewis R.W., Lovell D., Acosta D., (1997). Cell cytotoxicity assays. *Food and chemical toxicology.* 35. 79-126.

Hasheesh W.S., R.T. Mohamed, (2011). Bioassay of two pesticides on *Bulinus truncatus* snails with emphasis on some biological and histological parameters, *Pestic. Biochem. Physiol.*(2011), doi:10.1016/j.pestbp.2011.01.008

Hayes, J. D., et Pulford, D.J., (1995). The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Critical Reviews In Biochemistry And Molecular Biology* 30, 445-600.

Helmholz H., Ruhnau C., Schutt C., Prange A., (2007). Comparative study on the cell toxicity and enzymatic activity of two northern scyphozoan species *Cyanea capillata* (L.) and *Cyanea lamareckii* (Peron & Leslieur) *Toxicol.* 50, 53–64.

Herbette S., Roedel-Drevet P. et Drevet J.R., (2007) .Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. *FEBS Journal* 274: 2163-2180.

Huang H.Y., Wen Y., Valbuena D., Kriissel J.S., Polan M.L. (1997). Interleukin-1 regulates vero cell interleukin-1 receptor type I messenger ribonucleic acid expression. *Biology of reproduction* 57, 783-790.

Hubatsch I., Ridderstrom M. & Mannervik B., (1998). Human glutathione transferase A4-4: an Alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4-hydroxynonenal and other genotoxic products of lipid peroxidation. *Biochemical Journal* 330: 175-179.

Hussain S.P., Amstad P., He P., Robles A., Lupold S., Kaneko I., Ichimiya M., Sengupta S., Mechanic L., Okamura S., Hofseth L.J., Moake M., Nagashima M., Forrester K.S., et Harris C.C., (2004). p53-Induced Up-Regulation of MnSOD and GPx but not Catalase Increases Oxidative Stress and Apoptosis. *Cancer Research* 64, 2350–2356.

I

IFEN, 2007. Les pesticides dans les eaux, Données 2005. Institut Français de l'Environnement.

Ilyukha V. A., (2001). Superoxide Dismutase and Catalase in the Organs of Mammals of Different Ecogenesis. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, Vol. 37, No. 3, pp. 241-245.

Index des produits phytosanitaires à usage agricole; direction de la protection des végétaux et des contrôles techniques. Edition 2007.

INERIS, 2005. <http://www.ineris.fr/>

Iwasa, T., Motoyama, N., Ambrose, J.T., Roe, M.R. 2004. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee. *Apis mellifera*. *Crop Protection* 23: 371-378.

J

Jacobson, J. L., and Jacobson, S. W., 1996. Intellectual impairment in children exposed to polychlorinated biphenyls in utero. *N Engl J Med*. 335(11); 783-789.

Jaffredo, T., Nottingham, W., Liddiard, K., Bollerot, K., Pouget, C., and de Bruijn, M., 2005. From hemangioblast to hematopoietic stem cell: an endothelial connection? *Exp Hematol*. 33(9); 1029-1040.

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

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

K

Kale M., Rathore N., John S., Bhatnagar D., (1999). Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes: a possible involvement of reactive oxygen species. *Toxicology Letters*, 105, 197-205.

Kamel, F., and Hoppin, J. A., 2004. Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease. *Environ Health Perspect*. 112(9); 950-958.

Kang Y.J., Chen Y., et Epstein P.N., (1996). Suppression of Doxorubicin Cardiotoxicity by Overexpression of Catalase in the Heart of Transgenic Mice. *The journal of biological chemistry*. Vol. 271, No. 21, pp. 12610-12616.

Karlsson, G., Blank, U., Moody, J. L., Ehinger, M., Singbrant, S., Deng, C. X., and Karlsson, S., 2007. Smad4 is critical for self-renewal of hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 204(3); 467-474.

Karmaus, W., Kuehr, J., and Kruse, H., 2001. Infections and atopic disorders in childhood and organochlorine exposure. *Arch Environ Health*. 56(6); 485-492.

Kaur S. et Dhanju C.K., (2005). Biochemical effects of some organophosphorus pesticides on the ovaries of albino rats. *Indian J Physiol Pharmacol*; 49(2): 148-152.

Keifer, M., Rivas, F., Moon, J. D., and Checkoway, H., 1996. Symptoms and cholinesterase activity among rural residents living near cotton fields in Nicaragua. *Occup Environ Med*. 53(11); 726-729.

Ketterer B., Meyer D.J., Taylor J.B., Pemble S., Coles B., et Fraser G. (1990). GSTs and protection against oxidative stress. In: *Glutathione-S-transferases and drug resistance* (Hayes J.D., Pickett C.B. and Mantle T.J., Eds) Taylor and Francis, London 97-109.

Khalil A., 2002. Molecular mechanisms of protective effect of vitamin E against atherosclerosis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 80 (7), p. 662-669.

Klarić, M.S., Rumora, L., Ljubanović, D., Pepeljnjak, S., 2008. Cytotoxicity and apoptosis induced by fumonisin B(1), beauvericin and ochratoxin A in porcine kidney PK15 cells: effects of individual and combined treatment. *Arch Toxicol*. 82(4):247-55.

Konowalchuk J., Speirs J. I., et Stavric S., 1977. Vero Response to a Cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infection And Immunity*. Vol. 18, No. 3. p. 775-779.

Köprücü Sibel oimöek, Köprücü, Kenan Mevlüt, Sener Ural, Ünal .İspir, Murat Pala., 2006.

Acute toxicity of organophosphorous pesticide diazinon and its effects on behavior and some hematological parameters of fingerling European catfish (*Silurus glanis L.*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 86 : 99–105.

Kreiter S, Esmenjaud D, Martinez M, Sforza R, Thiéry D, Van Helden M, Yvon M, 2008. *Ravageurs de la vigne*, 2ème édition.

Kumar o., Sugendran k., Vijayaraghavan r., (2003). Oxidative stress associated hepatic and renal toxicity induced by ricin in mice. *Toxicol*, 41, 333-338.

L

Landau-Ossondo M., N. Rabia, J. Jos-Pelage, L.M. Marquet, Y. Isidore, C. Saint-Aime, M. Martin, P. Irigaray, D. Belpomme (2009). Why pesticides could be a common cause of prostate and breast cancers in the French Caribbean Island, Martinique. An overview on key mechanisms of pesticide-induced cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 63, 383-395.

Lander, B. F., Knudsen, L. E., Gamborg, M. O., Jarventaus, H., and Norppa, H., 2000. Chromosome aberrations in pesticide-exposed greenhouse workers. *Scand J Work Environ Health*. 26(5); 436-442.

Langdon S.P., (2004). *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols In: Methods in Molecular Medicine*, vol. 88. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.

Lawson A., Ahmad H., Sambanis A., (2011). Cytotoxicity effects of cryoprotectants as single-component and cocktail vitrification solutions. *Cryobiology*, 62: 115–122.

Le Goff, J., Andre, V., Lebailly, P., Pottier, D., Perin, F., Perin, O., and Gauduchon, P., 2005. Seasonal variations of DNA-adduct patterns in open field farmers handling pesticides. *Mutat Res*. 587(1-2); 90-102.

Lebailly, P., Vigreux, C., Lechevrel, C., Ledemeny, D., Godard, T., Sichel, F., LeTalaer, J. Y., Henry-Amar, M., and Gauduchon, P., 1998. DNA damage in mononuclear leukocytes of farmers measured using the alkaline comet assay: modifications of DNA damage levels after a one-day field spraying period with selected pesticides. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 7(10); 929-940.

Ledirac, N., Antherieu, S., d'Uby, A. D., Caron, J. C., and Rahmani, R., 2005. Effects of organochlorine insecticides on MAP kinase pathways in human HaCaT keratinocytes: key role of reactive oxygen species. *Toxicological Sciences*. 86(2); 444-452.

Lee, J., Huang, M. S., Yang, I. C., Lai, T. C., Wang, J. L., Pang, V. F., Hsiao, M., and Kuo, M. Y., 2008a. Essential roles of caspases and their upstream regulators in rotenone-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 371(1); 33-38.

Lennartz, B., Kamra, S., and Meyer-Windel, S., 1997. Field scale variability of solute transport parameters and related soils properties. *Hydrology and earth system Sciences*. 4(801-811).

Li w., Choy d.f., Lam m.s., Morgan t., Sullivan m.e. (2003) Use of cultured cells of kidney origin to assess specific cytotoxic effects of nephrotoxins post toxicology in vitro. *j.m.17*: 107–113.

Li, Q., and Kawada, T., 2006. The mechanism of organophosphorus pesticide-induced inhibition of cytolytic activity of killer cells. *Cellular and Molecular Immunology*. 3(3); 171-178.

Lim K.T., Lee S.J., Heo K.S., lim K., (2003). Effect of glycoprotein isolated from *Rhus verniciflua* stokes on TPA-induced apoptosis and production of cytokines in cultured mouse primary splenocytes. *Toxicology letters*, 145, 261-271.

Liu R., Liu I.Y., Bi X., Thomson R.F., Doctrow S.R., Malfroy B., Pnas V., (2003). Reversal of age-related learning deficits and brain oxidative stress in mice with superoxide dismutase / catalase mimetics. 100, n 14, 8526-8531.

Lores, E.M., Bradeway, D.E., Moserman, R.F., 1978. Organophosphorus pesticide poisonings in human: determination of residus and metabolites in tissus and urine. *Arch. Environ. Health*. 33:270.

Louchard, X., Voltz, M., Andrieux, P., and Moussa, R., 2001. Herbicide transport to surface waters at field and watershed scales in a Mediterranean vineyard area. *Journal of Environmental Quality*. 30(982-990).

Lu, C., Barr, D. B., Pearson, M. A., and 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.

Lyons, G., 2000. Mixed messages : pesticides that confuse hormones. Pesticides Action Network UK.

M

M.A.D.P Rapport du ministère de l'Agriculture et du développement rural 2009.

Ma JU-F, Ochsner U.A., Klotz M.G., Nanayakkara V.K., Howell M.L., Johnson Z., Posey J.E., Vasil M.L., Monaco J.J., et Hassett D.J., (1999). Bacterioferritin A Modulates Catalase A (KatA) Activity and Resistance to Hydrogen Peroxide in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, Vol. 181, No. 12, p. 3730–3742.

Macfarlane D.E. et Sommerville R.G., (1969). VERO Cells (*Cercopithecus Aethiops* Kidney) Growth Characteristics and Viral Susceptibility for Use in Diagnostic Virology. *Archiv fur die gesamte Virusforschung* 27, 379—385.

Marcheterre, L., Choudhry, G., and Webster, G., 1988. Environmental Photochemistry of Herbicides. *Reviews of Environmental Contaminations and Toxicology.* 103(61-126.

Martin-Eauclaire M.F., Legros C. Bougis P., Rochat H., (1999). Les toxines des venins de scorpion. *Annales de l'Institut Pasteur, Elsevier.* 10, 2, 207-222.

Martins E.A.L. et Meneghini R., (1994). Cellular DNA damage by hydrogen peroxide is attenuated by hypotonicity. *Biochem. J.*, 299, 137-140.

Mates J.M., Perez-Gomez C., Nunez de Castro I., (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.*, vol. 32 (8), p. 595-603.

McMillan d.c., Jensen c.b., Jollow d.j., (1998). Role of lipid peroxidation in dapsone-induced hemolytic anemia. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics.* vol. 287, no. 3, 868–876.

Mehlhase J., Grune T., (2002). Proteolytic response to oxidative stress in mammalian cells. *Biol. Chem.*, Vol. 383, p. 559-567.

Menvielle-Bourg F.J., (2005). La superoxyde dismutase, puissant antioxydant naturel, désormais disponible par voie orale. *Phytothérapie, Numéro 3:* 118-121.

Mezzetti A., Pierdomenico S.D., Costantini F., Romano F., De Cesare D., Cuccurullo F., Imbastaro T., Riario-Sforza G., Di Giacomo F., Zuliani G., Fellin R., (1998). Copper/zinc ration and systemic oxidant load: effect of aging and aging-related degenerative diseases. *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 25 (6), p. 676-681.

Moeys, Julien; 2007. Variabilité spatiale et déterminismes agro-pédologiques du devenir d'un herbicide dans l'horizon de surface application au cas de l'isoproturon dans un secteur agricole de Beauce chartraine ; Thèse de Doctorat, Ecole doctorale ABIES, Paris, France.

Monosson, E., Kelce, W. R., Lambright, C., Ostby, J., and Gray, L. E., Jr., 1999. Peripubertal exposure to the antiandrogenic fungicide, vinclozolin, delays puberty, inhibits the development of androgen-dependent tissues, and alters androgen receptor function in the male rat. *Toxicol Ind Health.* 15(1-2); 65-79.

Moore, A., Waring, C.P., 2001. The effects of a synthetic pyrethroid pesticide on some aspects of reproduction in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquat Toxicol.*

Moran L.K., Gutteridge J.M., et Quinlan G.L., (2001). Thiols in cellular redox signalling and control. *Curr. Med. Chem.* 8: 763-772.

Morel Y. et Barouki R. (1998). Influence du stress oxydant sur la régulation des gènes. *médecine/sciences; 14 :* 713-21.

Moreno I., Pichardo S., Josa A., Gomez-Amores L., Mateb A., Vazquez C.M., Camean A.M., (2005). Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally. *Toxicol.* 45, 395–402.

Moser, V. C., 2007. Animal models of chronic pesticide neurotoxicity. *Hum Exp Toxicol.* 26(4); 321-331.

Muniz, J. F., McCauley, L., Scherer, J., Lasarev, M., Koshy, M., Kow, Y. W., Nazar-Stewart, V., and Kisby, G. E., 2008. Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: a pilot study. *Toxicol Appl Pharmacol.* 227(1); 97-107.

Murthy K. R.K., (2000). The scorpion envenoming syndrome: a different perspective. The physiological basis of the role of insulin in scorpion envenoming. *J. Venom. Anim. Toxins* vol.6 n.1

N

Nahapetian A.T., Thomas J.N, Thilly W.G., (1986). Optimization of environment for high density vero cell culture: effect of dissolved oxygen and nutrient supply on cell growth and changes in metabolites. *J. cell sci.* 81, 65-103.

Nasterlack, M., 2007. Pesticides and childhood cancer: an update. *Int J Hyg Environ Health.* 210(5); 645-657.

Neumann, M., Liess, M., and Schulz, R., 2003. A qualitative sampling method for monitoring water quality in temporary channels or point sources and its application to pesticide contamination. *Chemosphere.* 51(6); 509-513.

Noctor G., Foyer CH., (1998). Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249-279.

Nohl N., Gille L., et Katrin S., (2005). Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* 69: 719-723.

O

Ojezele M.O. et Abatan O.M., (2009). Toxicological effects of chlorpyrifos and methidathion in young chickens. *African Journal of Biochemistry Research* Vol.3 (3), 048-051.

Okuno Y., Matsuda M., Kobayashi H., Morita K., Suzuki E., Fukuhara A., Komuro R., Shimabukuro M., Shimomura I., (2008). Adipose expression of catalase is regulated via a novel remote PPARc-responsive region. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 366: 698–704.

Oliveira J.C.R., Montes De Oca H., Duarte M., Diniz C.R., Fortes-Dias C.L., (2002). Toxicity of South American snake venoms measured by an in vitro cell culture assay. *Toxicol.* 40, 321-325.

Orth, A.B., Sfarra, A., Pell,E.J., Tien,M., 1992. An investigation into the role of lipid peroxidation in the mode of action of aromatic hydrocarbon and dicarboximide fungicides. *Pestic. Biochem. Biophys.* 44, 91-100.

Otitoju O., Onwurah I.N.E., (2007). Glutathione S-transferase (GST) activity as a biomarker in ecological risk assessment of pesticide contaminated environment. *African Journal of Biotechnology.* Vol. 6 (12), pp. 1455-1459,

P

Pang B., Zhou X., Yu H., Dong M., Taghizadeh K., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. et Dedon P.C., (2007). Lipid peroxidation dominates the chemistry of DNA adduct formation in a mouse model of inflammation. *Carcinogenesis*, vol.28, no.8, pp.1807–1813.

Paul-Pont I., 2010. Sensibilité et adaptation de populations de bivalves marins soumis à des stress multiples : infestation parasitaire, contamination microbienne et pollution métallique. Thèse de Doctorat Université Bordeaux, France.

Peavy D.L. P., Fairchild E.J., (1986). Evidence for Lipid Peroxidation in Endotoxin-Poisoned Mice. *Infection and immunity*, vol. 52, No. 2, p. 613-616.

Peitl, P. J., Sakamoto-Hojo, E. T., and de Syllos Colus, I. M., 1996. Genotoxic activity of the insecticide Nuvacron (Monocrotophos) detected by the micronucleus test in bone marrow erythrocytes of mice and in CHO cells. *Brazilian journal of Genetics.* 19(4); 571-576.

Pharmacopée Européenne, addendum 1, Edition 2008.

Phillips, T. M., 2000. Assessing environmental exposure in children: immunotoxicology screening. *J Expo Anal Environ Epidemiol.* 10(6 Pt 2); 769-775.

Phonnok S., (2008). Cytotoxicity test of microbial extracts against cancer cell lines in vitro. Srinakharinwirot University, Bangkok.

Pimentel, D., 1995. Amounts of pesticides reaching target pest: environmental impacts and ethics. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics.* 8(17-29).

Pommer, E.H., Lorenz, G., 1987. Dicarboximide fungicides. In : Lyr, H.(Ed.), *Modern Selective Fungicides. Properties, Application and mechanism of Action.* Fisher, Jena, pp. 92-105.

Praticò, D., (2002). Lipid Peroxidation and the Aging Process. *Science of Aging Knowledge Environment*: 1-4.

Prichard, P.H., Fate of pollutants. 1986, *J. water pollutant control*; 58(6):636.

Priyadarshi, A., Khuder, S. A., Schaub, E. A., and Priyadarshi, S. S., 2001. Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis. *Environ Res.* 86(2); 122-127.

Priyadarshi, A., Khuder, S. A., Schaub, E. A., and Shrivastava, S., 2000. A meta-analysis of Parkinson's disease and exposure to pesticides. *Neurotoxicology.* 21(4); 435-440.

Q

Qiao, D., Seidler, F. J., Tate, C. A., Cousins, M. M., and Slotkin, T. A., 2003. Fetal chlorpyrifos exposure: adverse effects on brain cell development and cholinergic biomarkers emerge postnatally and continue into adolescence and adulthood. *Environ Health Perspect.* 111(4); 536-544.

R

Radice, S., Marabini, L., Gervasoni, M., Ferraris, M., Chiesara, E., 1998. Adaptation to oxidative stress: effects of vinclozolin and iprodione on the HepG2 cell line. *Toxicology.* 129(2-3); 183-91.

Ré D.B., Nafia I., Nieoullon A., Kerkerian Le Goff L., Had-Aissouni L., (2005). Cerebral oxidative stress: are astrocytes vulnerable to low intracellular glutamate concentrations? Consequences for neuronal viability. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 24 : 502-509.

Reilly K., Gomez-Vasquez R., Buschmann H., Tohme J. et Beeching J.R., (2004). Oxidative stress responses during cassava post-harvest physiological deterioration. *Plant Molecular Biology* 56: 625-641.

Revitt, D., Ellis, J., and Llewellyn, N., 2002. Seasonal removal of herbicides in urban runoff. *Urban Water.* 4(13-19).

Ribas-Fito, N., Cardo, E., Sala, M., Eulalia de Muga, M., Mazon, C., Verdu, A., Kogevinas, M., Grimalt, J. O., and Sunyer, J., 2003. Breastfeeding, exposure to organochlorine compounds, and neurodevelopment in infants. *Pediatrics.* 111(5 Pt 1); 580-585.

Rio, M. J., and Velez-Pardo, C., 2008. Paraquat induces apoptosis in human lymphocytes: protective and rescue effects of glucose, cannabinoids and insulin-like growth factor-1. *Growth Factors.* 26(1); 49-60.

Ritz, B., and Yu, F., 2000. Parkinson's disease mortality and pesticide exposure in California 1984-1994. *Int J Epidemiol.* 29(2); 323-329.

Romieu, I., Hernandez-Avila, M., Lazcano-Ponce, E., Weber, J. P., and Dewailly, E., 2000. Breast cancer, lactation history, and serum organochlorines. *Am J Epidemiol.* 152(4); 363-370.

Ronis, M.J.J., Ingelman-Sundberg, M., Badger, T.M., 1994. Introduction, suppression and inhibition of multiple hepatic cytochrome P₄₅₀ isozymes in the male rat and bobwhite quail (*Colinus virginianus*) by ergosterol biosynthesis inhibiting fungicides (EBIFs). *Biochem. Pharmacol.* 48: 1953-1965.

Rosjohn J., Polekhina G., Feil S.C., Allocati N., Masulli M., DiLlio C., Parker M.W., (1998). A mixed disulfide bond in bacteria glutathione transferase: functional and evolutionary implications. *Structure* 6: 721-734.

Roulland, S., Lebailly, P., Lecluse, Y., Briand, M., Pottier, D., and Gauduchon, P., 2004. Characterization of the t(14;18) BCL2-IGH translocation in farmers occupationally exposed to pesticides. *Cancer Res.* 64(6); 2264-2269.

Rowsey I.R., Thomson A.M., Flanagan J.U., Murdock P.R., Moore G.B.T., Meyer D.J., Murphy G.J., Smith S.A., Hayes J.D., (2001). Mammalian class sigma glutathione S-transferases: catalytic properties and tissue-specific expression of human and rat GSH-dependent prostaglandin D₂ synthases. *Biochemical Journal* 359: 507-516.

S

Sailaja, N., Chandrasekhar, M., Rekhadevi, P. V., Mahboob, M., Rahman, M. F., Vuyyuri, S. B., Danadevi, K., Hussain, S. A., and Grover, P., 2006. Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production. *Mutat Res.* 609(1); 74-80.

Salameh, P. R., Waked, M., Baldi, I., Brochard, P., and Saleh, B. A., 2006b. Chronic bronchitis and pesticide exposure: a case-control study in Lebanon. *Eur J Epidemiol.* 21(9); 681-688.

Salameh, P., Waked, M., Baldi, I., Brochard, P., and Saleh, B. A., 2006a. Respiratory diseases and

pesticide exposure: a case-control study in Lebanon. *J Epidemiol Community Health*. 60(3); 256-261.

Salvemini D., Mazzon E., Dugo L., Riley D.P., seraino I., Caputi A.P., Cuzzocrea S., (2001). Pharmacological manipulation of the inflammatory cascade by the superoxide dismutase mimetic, M40403. *British Journal of Pharmacology*, 132: 815-827.

Saulsbury, M. D., Heyliger, S. O., Wang, K., and Round, D., 2008. Characterization of chlorpyrifos-induced apoptosis in placental cells. *Toxicology*. 244(2-3); 98-110.

Saunders, M., Fox, D., Salisbury, C., Strokes, V., Palmer, A., and Preece, A., 2004. Placental transfer and foetal uptake of pesticides. *Toxicology and applied pharmacology*. 197(341).

Savitz, D. A., 2001. Environmental exposures and childhood cancer: our best may not be good enough. *Am J Public Health*. 91(4); 562-563.

Saxena, P., Saxena, A.K., 2010. Cypermethrin Induced Biochemical Alterations in the Blood of Albino Rats. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 3(3); 111 – 114.

Schiff, K., Bay, S., and Stransky, C., 2002. Characterization of stormwater toxicants from an urban watershed to freshwater and marine organisms. *Urban Water*. 4(215-227).

Schlessinger, J., and Ullrich, A., 1992. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron*. 9(3); 383-391.

Schreck, Eva., Influence des modes d'entretien du sol en milieu viticole sur le transfert des pesticides vers les eaux d'infiltration – Impact sur les lombriciens- Université de Toulouse, France.

Schulz, R., 2001. Rainfall-induced sediment and pesticide input from orchards into the Lourens River, Western Cape, South Africa: importance of a single event. *Water Res*. 35(8); 1869-1876.

Schulz, R., 2004. Field studies on exposure, effects, and risk mitigation of aquatic nonpointsource insecticide pollution: a review. *J Environ Qual*. 33(2); 419-448.

Seidegard, J., et Ekstrom, G. (1997). The role of human glutathione transferases and epoxide hydrolases in the metabolism of xenobiotics. *Environmental Health Perspectives* 105, 791-799.

Serteyn D., Grulke S., Franck T., Mouithys-Mickalad A., Deby-Dupont G., (2003). La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. *Ann. Méd. Vét*. 147, 79-93.

Shelby, M. D., Newbold, R. R., Tully, D. B., Chae, K., and Davis, V. L., 1996. Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of in vitro and in vivo assays. *Environ Health Perspect*. 104(12); 1296-1300.

Sies, H., (1991). ed., *Oxidative Stress: Oxidants and Anti-oxidants.*, London Academic Press.

Silva, C.G., Fernandes, P.N., Mannarino, S.C., Pereira, M.D., Panek, A.D., Eleutherio, E.C. 2007. Oxidative stress response in eukaryotes: effect of glutathione, superoxide dismutase and catalase on adaptation to peroxide and menadione stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Redox Rep*;12(5):236-44.

Simoniello, M. F., Kleinsorge, E. C., Scagnetti, J. A., Grigolato, R. A., Poletta, G. L., and Carballo, M. A., 2008. DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures. *J Appl Toxicol*.

Soares A.F., (2005). Effet du stress oxydant sur le fonctionnement des adipocytes : adiponectine et prostaglandines. Thèse de doctorat N° : 2005-ISAL-00123. Institut National des sciences appliquées de Lyon.

Soares S.S., Martins H., Gutiérrez-Merino C., Aureliano M., (2008). Vanadium and cadmium in vivo effects in teleost cardiac muscle: metal accumulation and oxidative stress markers. *Comparative biochemistry and physiology, part c*, 147, 168–178.

Sowell J., Frei B., et Stevens J.F., (2004). Vitamin C conjugates of genotoxic lipid peroxidation products: Structural characterization and detection in human plasma. *PNAS*, vol. 101, no. 52, 17964–17969.

Srinivasa P.S. Rao, Yamada Y. et Leung K-Y., (2003), A major catalase (KatB) that is required for resistance to H₂O₂ and phagocyte-mediated killing in *Edwardsiella tarda*. *Microbiology* 149, 2635–2644.

Srivastava S., Dixit B.L., Cai J., Sharma S., Hurst H.E., Bhatnagar A., et Srivastava S.K., (2000). Metabolism of lipid peroxidation product, 4-hydroxynonenal (hne) in rat erythrocytes: role of

BIBLIOGRAPHIE

aldose reductase. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 29, No. 7, pp. 642–651.

Stahl W., Ale-agma N., Polidori M.C., (2002). Non-antioxidant properties of carotenoides. *Biol. Chem.*, vol. 383, p. 553-558.

Stokes, L., Stark, A., Marshall, E., and Narang, A., 1995. Neurotoxicity among pesticide applicators exposed to organophosphates. *Occup Environ Med.* 52(10); 648-653.

Sun, Z., Hardy, J.K., (2000). Determination of Organophosphorous Pesticides in Water Using Permeation Sampling. *Adv. Environ. Res.* 3(4) 49905-7

T

Tan, D-H., Peng, S-Q., Wu, Y-L., Wang, Y-M., Lu, C-F., Ding, W., Wang, Q-X., Yan, C-H., (2009). Chlorpyrifos Induces Delayed Cytotoxicity after Withdrawal in Primary Hippocampal Neurons through Extracellular Signal-Regulated Kinase Inhibition. *Biol. Pharm. Bull.* 32(10) 1649—1655.

Tang D.G., La E., Kern J., Kehrer J.P., (2002). Fatty acid oxidation and signaling in apoptosis. *Biol. Chem.*, Vol. 383, pp. 425-442.

Taylor, J. R., Selhorst, J. B., Houff, S. A., and Martinez, A. J., 1978. Chlordecone intoxication in man. I. Clinical observations. *Neurology.* 28(7); 626-630.

Todorova T. Glutathione s-transferases and oxidative stress in *saccharomyces cerevisiae*. thèse de doctorat, université louis pasteur, Strasbourg, 2007.

Toppari, J., Larsen, J. C., Christiansen, P., Giwercman, A., Grandjean, P., Guillette, L. J., Jr., Jegou, B., Jensen, T. K., Jouannet, P., Keiding, N., Leffers, H., McLachlan, J. A., Meyer, O., Muller, J., Rajpert-De Meyts, E., Scheike, T., Sharpe, R., Sumpter, J., and Skakkebaek, N. E., 1996. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect.* 104 Suppl 4(741-803).

V

Van Der Werf, H., 1996. Assessing the impact on the environment. *Agriculture, Ecosystems and Environment.* 60(81-96).

Van Lente F. et Pepoy M., (1990). Coupled-Enzyme Determination of Catalase Activity in

Erythrocytes. *Clinical Chemistry*, Vol. 36, No. 7, 1339-1343.

Verma R.S., Mehta A., Srivastava N., (2007). Comparative studies on chlorpyrifos and methyl parathion induced oxidative stress in different parts of rat brain: Attenuation by antioxidant vitamins. *Pesticide. Biochemistry and Physiology.* doi: 10.1016/j.pestbp.2009.08.004.

Vetrano A.M., D Heck.E., Mariano T.M., Mishin V., Laskin D.L., et Laskin J.D., (2005). Characterization of the Oxidase Activity in Mammalian Catalase. *The journal of biological chemistry* vol. 280, NO. 42, pp. 35372–35381.

Videla LA. 2000. Energy metabolism, thyroid calorigenesis, and oxidative stress: functional and cytotoxic consequences. *Redox. Rep.* 5(5):265-75.

W

Wagner U., Edwards R., Dixon D.P., Mauch F., (2002). Probing the diversity of the arabidopsis glutathione S- transferase gene family. *Plant Molecular Biology*, 49: 515-532.

Wang, C.G., Cai, Z., Lu, W., Wu, J., Xu, Y., Shi, Y., Chi, C.W., (2005). A novel short-chain peptide BmKX from the Chinese scorpion *Buthus martensi* Karsch, sequencing, gene cloning and structure determination. *Toxicon*, 45, 309–319.

Wilce M.C.J., Parker M.W., (1994). Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1205: 1-18.

Wolfe, N., Mingelgrin, U., and Miller, G., 1990. Abiotic transformations in water, sediments and soils. *Soil Science Society of America*. Madison, Wisconsin, USA.

Wolff, M. S., Berkowitz, G. S., Brower, S., Senie, R., Bleiweiss, I. J., Tartter, P., Pace, B., Roy, N., Wallenstein, S., and Weston, A., 2000. Organochlorine exposures and breast cancer risk in New York City women. *Environ Res.* 84(2); 151-161.

Worthing, C.R., 1983. *Pesticide manual- a world compendium.* 7 ème edition. British crop protection council.

Y

Yan ez, L., Ortiz, D., Calderon, J., Batres, L., Carrizales, L., Mejia, J., Martinez, L., Garcia-Nieto, E., and Diaz-Barriga, F., 2002. Overview of

human health and chemical mixtures: problems facing developing countries. *Environ Health Perspect.* 110 Suppl 6(901-909).

Yan Z., (2010). Characterization of chlorpyrifos toxicity on the pancreatic beta cell line RINM5F. PhD. Wright State University.

Yu X.X., Drackley J.K. et Odle J., (1998). Food Deprivation Changes Peroxisomal β -Oxidation Activity but Not Catalase Activity during Postnatal Development in Pig Tissues. *Biochemical and Molecular Roles of Nutrients* 128: 1114–1121.

Z

Zeljezic, D., Garaj-Vrhovac, V., and Perkovic, P., 2006. Evaluation of DNA damage induced by atrazine and atrazine-based herbicide in human lymphocytes in vitro using a comet and DNA diffusion assay. *Toxicology In Vitro.* 20(6); 923-935.

RESUME

Les pesticides ont permis le développement de l'agriculture et ont contribué à l'augmentation des rendements et à la régulation de la production agricole. L'utilisation des produits phytosanitaires a également limité ou éradiqué un certain nombre de maladies parasitaires très meurtrières. Cependant, ces derniers, sont soupçonnés de présenter un risque pour la santé de l'homme et pour son environnement. Ils sont en effet fréquemment impliqués dans la réduction de la biodiversité terrestre et ils sont retrouvés dans les lacs et les rivières ainsi que dans les eaux douces souterraines et les eaux côtières

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés particulièrement à l'étude des effets cytotoxiques de six pesticides comptant parmi les plus utilisés en Algérie.

Notre travail a concerné en premier lieu à évaluer l'effet des différents pesticides sur la prolifération des cellules Véro *in-vitro*, et à déterminer les intervalles de concentrations cytotoxiques par le test du rouge neutre. Les résultats montrent que tous les pesticides induisent une cytotoxicité irréversible, et que les intervalles de concentrations cytotoxiques varient d'une famille de pesticides à une autre.

L'effet des pesticides sur les protéines cellulaires a été réalisé par le dosage de ces dernières par la méthode de Lowry, les résultats obtenus montrent que les pesticides étudiés ont un effet sur les protéines cellulaires

L'analyse de l'effet des pesticides sur la génération du malondialdéhyde, marqueur du stress oxydatif a également été réalisé. Les résultats obtenus montrent que même à faible concentrations les pesticides induisent une peroxydation des lipides en corrélation avec la mobilisation du glutathion. Enfin, la fragmentation de l'A.D.N cellulaire serait probablement la conséquence de l'instauration d'un stress oxydatif qui aboutirait à l'attaque de l'A.D.N et /ou aux protéines cellulaires.

Mots-clés : Pesticides, cellules Vero, cytotoxicité, stress oxydatif, M.D.A, G.S.H.

ABSTRACT

The pesticides allowed the development of agriculture and contributed to the increase in the outputs and the regulation of the agricultural production. The use of the pesticides also limited or eradicated number of very fatal parasitic diseases. However, they are suspected of presenting a health hazard of the man and for his environment. They are indeed frequently implied in the reduction of the terrestrial biodiversity and they are found in the lakes and the rivers like in underground fresh waters and coastal water

In this study, we were interested particularly in the study of the cytotoxic effects of six pesticides most used in Algeria.

Our work, initially, concerned the evaluation of the effect of the various pesticides on the proliferation of the Véro cells in-vitro, and to determine the intervals of cytotoxic concentrations by the test of the neutral red. The results showed that all the pesticides induce an irreversible cytotoxicity, and that the cytotoxic intervals of concentrations vary from a family of pesticides to another.

The effect of the pesticides on cellular proteins was carried out by proportioning of these last by the method of Lowry, the results obtained show that the pesticides have an effect on cellular proteins. The analysis of the effect of the pesticides on the generation of malondialdehyde, marker of the oxydative stress was also carried out. The results obtained show that even with low concentrations the pesticides induce a peroxidation of the lipids interrelated with the mobilization of the glutathion. Lastly, the fragmentation of the cellular D.N.A. would be probably the consequence of the introduction of an oxydative stress which would lead to the attack of the D.N.A. and / or with cellular proteins.

Key Words: Pesticides, Vero cells, cytotoxicity, oxidative stress, M.D.A, G.S.H

ملخص

قد مكن استعمال المبيدات تطوير الزراعة و قد ساهم كذلك في زيادة الغلة وتنظيم الإنتاج الزراعي. كما خفض استخدام المبيدات القضاء على العديد من الأمراض الطفيلية القاتلة. كما أن هذه الأمراض تشتبه في أنها تشكل خطرا على صحة الإنسان والبيئة. وكثيرا ما تكون بالفعل عامت أساسي في الحد من التنوع البيولوجي. كما نجد هذه المبيدات في الأراضي , البحيرات , الأنهار والمياه الجوفية والمياه العذبة والمياه الساحلية.

في هذه الدراسة، ركزنا بشكل خاص على دراسة الآثار و الأفات الناتجة من استعمال لسته مبيدات من بين الأكثر استعمالا في الجزائر علي خلايا فيرو.

إن في عملنا هذا اهتمنا في المقام الأول بتقييم تأثير المبيدات المختلفة على انقسام خلايا فيرو في المختبر. وتحديد تركيز المبيد السام وذلك باختبار الأحمر المعتدل علي الخلايا. وتظهر النتائج أن جميع المبيدات لها آثار لا رجعة فيها ، وأن يتراوح تركيز المبيدات السامة للخلايا من عائلة لأخرى.

تم تنفيذ تأثير المبيدات على البروتينات الخلوية التي يعاير لهم طريقة لوري ، والنتائج. تبين أن المبيدات التي تم الحصول عليها درس يكون لها تأثير على البروتينات الخلوية

كما تمت دراسة الأكسدة و ذلك بتحليل تأثير المبيدات على توليد المالون ثنائي الالدهيد، وتظهر النتائج أن تركيزات منخفضة من المبيدات الحشرية لها تأثير علي أكسدة الدهون , ترتبط مع حشد من الجلوتاثيون. وأخيرا ، فإن تفتيت الحمض النووي الخلوي من المحتمل أن يكون نتيجة لإدخال الأكسدة التي تؤدي إلى هجوم من الحمض النووي و / أو البروتينات الخلوية.

الكلمات المفتاحية : مبيدات ،خلايا فيرو، الأكسدة ، الجلوتاثيون، المالون ثنائي الالدهيد