



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
THÈSE EN VUE DE L'OBTENTION D'UN DIPLOME DE DOCTORAT
Spécialité : Biologie Animale Environnementale
Option : Reproduction et Développement
Intitulée

**Impact d'un mélange de pesticides sur quelques
paramètres physiologiques et sur la santé cellulaire**

Présentée Par : M. AICHE Mohamed Amine

Directeur de thèse :

M^{me} MALLEM Leila

Pr. Université d'Annaba

Membres de jury :

Mr. ABDENOUR Cherif

Président

Pr. Université d'Annaba

Mr. KHELILI Kamel

Examineur

Pr. Université d'Annaba

M^{me}. DAHAMNA Saliha

Examineur

Pr. Université de Sétif

M^r. BAAZIZ Nacer

Examineur

MC. Université de Constantine 1

Année universitaire : 2016-2017

Remerciements

A l'issue de la rédaction de cette recherche, je suis convaincu que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifesté à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans cette phase délicate de «l'apprenti-chercheur».

En premier lieu, je tiens à remercier grandement ma directrice de thèse, Madame Mallem Leila pour la confiance qu'elle m'a accordée en me proposant ce thème très intéressant, pour ses multiples conseils et pour toutes les heures qu'elle a consacrées à suivre cette recherche. Sincèrement, nos discussions m'ont également permis de beaucoup progresser sur mon développement personnel. J'aimerais également lui dire à quel point j'ai apprécié sa grande disponibilité pour la relecture et la correction des documents que je lui ai adressés. La justesse de ses critiques a été très constructive et utile. Je lui exprime ma très profonde gratitude.

J'exprime également mes profonds remerciements aux membres de jury qui ont bien voulu juger ce travail : Pr. Abdenour Cherif qui m'a fait l'honneur de présider ce jury, Pr. Khelili Kamel, Pr. Dahamna Saliha et Pr. Baaziz Nacer qui m'ont fait un grand honneur en acceptant d'examiner ce travail.

Mes pensées et mes sincères remerciements vont à notre regretté défunt le professeur Boulakoud Mohamed Salah mon enseignant et mon encadreur en master, Un grand Merci.

Je tiens évidemment à remercier Tata Tahar et Benchikh Rym ingénieurs du laboratoire pour leur disponibilité et les nombreux services qu'ils m'ont rendus durant la réalisation de ce travail.

Je tiens à exprimer aussi ma très grande considération et ma vive reconnaissance à l'ensemble du personnel du service d'Anatomie Pathologique «Hôpital IBN ROCHD» Annaba, pour la réalisation et l'interprétation des coupes histologiques.

Je tiens également à remercier les nombreuses personnes avec qui j'ai pu partager de bons moments !

Tout d'abord je remercie Yahia Elkhansa avec qui j'ai passé des années de travail durant la préparation de la partie pratique de mémoire de Master II et de doctorat, on s'est vite très bien entendu pour devenir de très bons amis.

Je remercie mes collègues et amis tous particulièrement : Linda, Bachir, Hichem, Nesrine, Hiba, Ines pour leur soutien et tous les sympathiques moments partagés et ceux à venir.

Je remercie tous les doctorants du laboratoire d'Ecophysiologie Animale pour tous les délires et les bons moments que nous avons partagés ensemble.

Une pensée émue à mon père, c'est pour toi que j'ai fait ce parcours et je regrette de ne pas t'avoir parmi nous en ce moment tant attendu, t'es jamais parti pour moi tu resteras dans mon cœur et mon esprit en toute circonstance.

Un grand Merci à ma maman, à mes frères Kamel et Chaouki et tout le reste de la famille.

Enfin, mes remerciements ne vont pas à Mark Zuckerberg, qui m'a fait perdre beaucoup de temps

Et Merci aux oubliés...

Résumé :

L'objectif de ce travail est d'évaluer la toxicité de deux fongicides utilisés seuls ou en combinaison, le propiconazole et le propineb appartenant aux familles respectives des triazoles et des dithiocarbamates, et de déterminer les effets toxiques sur les paramètres hématologiques, hépatiques, rénales et notamment la reproduction.

49 rats mâles adultes ont été utilisés et répartis en 7 groupes à raison de 7 rats par groupes. Le groupe témoin (G1) a reçu de l'eau, les autres groupes ont été traités par gavage aux deux fongicides individuellement aux doses (Propiconazole G2: 60 mg/kg de poids corporel, G3: 150 mg/kg de poids corporel), (Propineb G4: 100 mg/kg de poids corporel, G5: 250 mg/kg de poids corporel). Les animaux ont été traité au mélanges de la moitié des deux doses de chaque fongicides (G6: 30 mg/kg de poids corporel de propiconazole + 50 mg/kg de poids corporel de propineb, G7: 75 mg/kg de poids corporel de propiconazole + 125 mg/kg de poids corporel de propineb) pendant 28 jours.

Les résultats obtenus a montré que le traitement par les deux fongicides seuls ou en combinaison dans les conditions expérimentales utilisée a induit une diminution significative de la masse corporelle chez le groupe traité au propiconazole associée à une diminution de la consommation d'eau et d'aliment chez plusieurs groupes traités comparés au groupe témoin. L'étude de la masse des organes a indiqué une augmentation de la masse du foie; en revanche la masse des testicules et de l'épididyme a significativement diminué. Une perturbation des paramètres hématologiques a été notée toujours chez les groupes traités. Le même résultat a été observé dans les paramètres biochimiques: acide urique, urée, créatinine, cholestérol, triglycéride, protéines totaux, transaminases (ASAT, ALAT), phosphatase alcaline (PAL), et albumine. Il semble aussi que traitement par les fongicides utilisés surtout en mélangé ont affecté la production des spermatozoïdes se traduisant par une diminution de la concentration, la mobilité et la vitalité des spermatozoïdes. L'implication de ces fongicides dans le stress oxydant est peut être confirmée à travers une augmentation significative de la malondialdéhyde (MDA) et la glutathion s- transférase (GSH-ST), une réduction significative de l'activité de glutathion peroxydase (GSH-Px) et une diminution du glutathion (GSH) au niveau des tissus étudiés (foie et testicules). Sur le plan histopathologique, la microscopie optique révèle une altération tissulaire hépatique, rénale ainsi qu'au niveau des testicules et de l'épididymes chez les différents groupes traités comparés au groupe témoin.

Mots clés : Fongicides, mélanges, paramètres biochimiques, reproduction, stress oxydant, histologie, rats.

Summary:

This study aims to evaluate the toxic effects of two commonly used pesticides, alone or as a mixture, propiconazole and propineb respectively from the triazole and dithiocarbamate families and to determine the possible changes on the parameters of hematological, hepatic, renal and reproductive function.

49 adult male rats were divided into 7 groups of 7 rats each, the control group received water whereas the other groups were exposed to both individual pesticides (Propiconazole G2: 60 mg/kg body weight, G3: 150 mg/kg body weight), (Propineb G4: 100 mg/kg body weight, G5: 250 mg/kg body weight) as well as the lower dose mixture (G6: 30 mg/kg body weight of propiconazole + 50 mg/kg body weight of propineb, G7: 75 mg/kg body weight of propiconazole + 125 mg/kg of propineb), and that throughout the 4 weeks experimental period.

The results obtained showed that the treatment with the two fungicides alone or in combination under the experimental conditions used induced a significant decrease in the body mass in the group treated with propiconazole and associated with a decrease in the consumption of water and food in several treated groups compared to the control group. The study of the mass of the organs indicated an increase in the mass of the liver; On the other hand, the mass of the testicles and of the epididymis decreased significantly. Disruption of haematological parameters was noted in the treated groups. The same result was observed in biochemical parameters: uric acid, urea, creatinine, cholesterol, triglyceride, total proteins, transaminases (ASAT, ALAT), alkaline phosphatase (PAL), and albumin. It also appears that treatment by fungicides used mainly in mixture, affected sperm production resulting in decreased concentration, mobility and viability of the spermatozoa. The involvement of these fungicides in oxidative stress can be confirmed by a significant increase in Malondialdehyde (MDA) and glutathione s-transferase (GSH-ST), a significant reduction in glutathione peroxidase (GSH-Px) activity, and A decrease in glutathione (GSH) in the tissues studied (liver and testes). Histopathologically, optical microscopy reveals hepatic, renal, testicular and epididymis tissue damage in the different treated groups compared to the control.

Key words: Fungicides, mixtures, biochemical parameters, reproduction, oxidative stress, histology, rats.

ملخص :

كان الهدف من هذه الدراسة تقييم التأثير السمي لاثنين من المبيدات الفطرية، مستعملة كل على حدى أو كخليط، و هما Propiconazole و Propineb من عائلتي Triazoles و Dithiocarbamates على التوالي، ومن تم تحديد التأثيرات السامة على العوامل المتعلقة بمؤشرات الدم، الكبد، الكلى و التكاثر لدى فئران التجارب.

أستعمل 49 من ذكور الفئران البالغة ووزعت إلى 7 مجموعات تحتوي كل واحدة على 7 فئران، عوملت بجرعات مختلفة كالتالي، تلقت مجموعة الشاهد مياه الحنفية ، الفئران المعرضة إلى هذين المبيدين بشكل أحادي كالتالي (البروبيكونازول G2 : 60ملغ/كغ من وزن الجسم، G3 : 150ملغ/كغ من وزن الجسم) (البروبيباب G4 : 100ملغ/كغ من وزن الجسم، G5 : 250ملغ/كغ من وزن الجسم) ، تعرضت كذلك الفئران إلى خليط المبيدين الذي يحتوي على المركبين بتركيز أقل (G6 : بروبيكونازول: 30ملغ/كغ + بروبيباب: 50ملغ/كغ، G7 : بروبيكونازول: 75ملغ/كغ + بروبيباب: 125ملغ/كغ) و هذا لمدة 28 يوما.

أظهرت النتائج المتحصل عليها أن المعاملة بالمبيدين المستعملين على حدى أو خليط في ظروف التجربة تسبب في إنخفاض معنوي في وزن الفئران التي تعرضت للبروبيكونازول تزامنت مع إنخفاض ملحوظ في إستهلاك الغذاء و الماء عند جميع المجموعات المعالجة بالمقارنة مع المجموعة الشاهد. أظهرت دراسة كتلة بعض الأعضاء، ارتفاع في كتلة الكبد، بينما انخفضت كتلة الخصيتين و البربخ . كما لوحظ أيضا إضطراب في قيم الصيغة الدموية (FNS).

سمية هذه المبيدات الفطرية أثرت أيضا على قياسات المؤشرات البيوكيميائية: الغلوكوز، حمض اليوريك، اليوريا، الكرياتينين، الكولسترول، الدهون الثلاثية، البروتين الكلي، ناقلات الأمين (ASAT, ALAT)، الفوسفاتاز القاعدي (PAL) و الألبومين.

إتضح من خلال الدراسة تسجيل إنخفاض في بعض مؤشرات الحيوية للحيوانات المنوية (التركيز، الحركة و حيوية الحيوانات المنوية).

تأكيد مشاركة هذه المبيدات في الإجهاد الأوكسدي و ذلك من خلال زيادة معنوية في مستوى ال MDA و نشاط الغلوتاتيون ترنسفيراز (GSH-ST) و النقص المعنوي في نشاط كل من الغلوتاتيون بيروكسيداز (GSH-Px) مع انخفاض محسوس في مستوى الغلوتاتيون (GSH) في الأعضاء المدروسة (كبد و الخصيتين).

أكدت التغييرات النسيجية الملاحظة على مستوى الكبد، الكلى، الخصيتين و البربخ النتائج البيوكيميائية المتحصل عليها سابقا.

الكلمات الدالة: المبيدات الفطرية، الخلائط، المؤشرات البيوكيميائية، الخصوبة، الإجهاد التأكسدي، الأنسجة، الجرذان.

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ALAT : Alanine aminotransférase

ASAT : Aspartate aminotransférase

BSA : Bis (triméthylsilyl) acétamide

CAT : Catalase

CDNB : 1-chloro, 2,4-dinitrobenzène

Cu/Zn-SOD : Superoxyde dismutase

DSENO ou NOAEL : Dose Sans Effet Nocif Observé

DTNB : Acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) ou réactif d'Ellman

EDTA : Ethylène diamine tétra-acétique

FAO : Organisation Mondiale pour l'Alimentation et l'Agriculture

GB : Globule blanc

GPx : Glutathion peroxydase

GR : Globule rouge

GR : Glutathion réductase

GSH : Glutathion réduit

H₂ O₂ : Peroxyde d'hydrogène

H₂SO₄ : Acide sulfurique

Hb : Hémoglobine

HT : Hématocrite

LDH : Lactate déshydrogénase

LDL : Lipoprotéines de densité légère

LMR : limites maximales de résidus

LOO• : Radical peroxyde lipidique

LOOH : Hydroperoxyde lipidique

LY : Lymphocyte

MDA : Malondialdéhyde

NaCl : Chlorure de sodium

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit

PAL : Phosphatase alcaline

PLT : Plaquettes

-SH : Groupement sulfhydryle

TBA : Acide thiobarbéturique

TCA : Acide trichloroacétique.

UIPP : Union des industries de la protection des plantes

USDA : United States Department of Agriculture

Unités/Divers

°C : Degré Celcius

DO : Densité optique

mol : Mole

pH : Potentiel hydrogène

U/l : Unité internationale/litre

μl : Microlitre

μg/L : Microgramme/litre

Liste des figures

Figure 01. Estimation des rendements mondiaux moyens selon l'utilisation ou non de produits phytopharmaceutiques, par rapport au rendement maximal	08
Figure 02. Evaluation de la demande mondiale en produits végétaux agricoles (En milliards de tonnes)	09
Figure 03. Disponibilité mondiale de la Surface Agricole Utilisée en fonction de l'évolution de la population	10
Figure 04. Répartition mondiale des produits phytosanitaires par catégories de produits utilisés en 2010. (Les produits divers concernent les acaricides, nématicides, rodenticides, ...).	11
Figure 05. Répartition du chiffre d'affaires par région du monde en 2010.	11
Figure 06. Quantité des pesticides importés en Algérie en tonnes de 1975 à 2007.	12
Figure 07. Devenir des pesticides dans l'environnement.	13
Figure 08. Les différentes voies d'exposition aux pesticides	14
Figure 09. Populations particulièrement exposées ou vulnérables aux pesticides	17
Figure 10. Maladies cryptogamiques (fongiques). a/ Feuille de vigne parasitée par le mildiou, b/ tavelure pommier	24
Figure 11. Action des fongicides par contact.	25
Figure 12. Action des fongicides pénétrant.	26
Figure 13. Emballage Antracol WP-70.	41
Figure 14. Emballage Tilt 250EC.	43
Figure 15. Différentes étapes du protocole expérimental	46
Figure 16. Malformations morphologique caractéristique des spermatozoïdes exposées à un stress hypo osmotique.	69
Figure 17. Variation de la masse absolue du foie (g) chez les rats témoins (T) et les rats traités après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).	71
Figure 18. Variation de quelques bio-marqueurs liés à l'activité hépatique (PAL, ASAT, ALAT, Albumine et protéines totales) chez les rats témoins (T) et les rats traités après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).	75
Figure 19. Photographies illustrant les changements morphologiques bruts du foie des rats témoins (T) et les rats traités (PZ, PB et MIX) après 28 jours de traitement A: foie normal du rat témoin, B: rat traité au propiconazole 60 mg /	76

kg, C: rat traité au propineb 100 mg / kg, D : rat traité au mélange (30 mg/kg propiconazole + 50 mg/kg propineb).	
Figure 20. Coupes histologiques du foie (Gr x 100) et (Gr x 400) des rats témoins (T [A] et [A1]) et traités (PZ [B] [B1]; PB [C] [C1]; MIX [D] [D1]) après 28 jours de traitement.	78
Figure 21. Variation de la masse absolue des reins (g) chez les rats témoins (T) et les rats traités après 28 jours de traitement (M ± SD, n = 7).	79
Figure 22. Variation de la concentration sérique de l'urée, créatinine et acide urique chez les rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement (M ± SD, n = 7).	81
Figure 23. Coupes histologiques du rein (Gr x 100) et (Gr x 400) des rats témoins (T [A] [A1]) et traités (PZ [B] [B1]; PB [C] [C1]; MIX [D] [D1]) après 28 jours de traitement.	83
Figure 24. Variation de la masse absolue des testicules et de l'épididyme (g) chez les rats témoins (T) et les rats traités après 28 jours de traitement (M ± SD, n = 7).	85
Figure 25. Variation de la concentration du cholestérol et des triglycérides chez les rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement (M ± SD, n = 7).	86
Figure 26. Variation de la concentration des spermatozoïdes x10 ⁶ /ml) chez les rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement (M ± SD, n = 7).	88
Figure 27. Variation de la mobilité des spermatozoïdes (%) chez les rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement (M ± SD, n = 7).	89
Figure 28. Coupes histologiques du testicule (Gr x 400) des rats témoins (T [A]) et traités (PZ [B]; PB [C] ; MIX [D]) après 28 jours de traitement.	91
Figure 29. Coupes histologiques de l'épididyme des rats témoins (T [A]) et traités (PZ [B]; PB [C] ; MIX [D]) après 28 jours de traitement.	92
Figure 30. Variation de taux du glutathion tissulaire (nM/mg prot) dans le foie des rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement (M ± SD, n = 7).	94
Figure 31. Variation de taux du glutathion tissulaire (nM/mg prot) dans les testicules des rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement (M ± SD, n = 7).	94
Figure 32. Variation du taux de MDA tissulaire (nM/mg de tissu) dans le	96

foie des rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).	
Figure 33. Variation du taux de MDA tissulaire (nM/mg de tissu) dans le testicule des rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).	96
Figure 34. Variation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase ($\mu\text{M GSH/mg prot}$) dans le foie et le testicule chez les rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).	98
Figure 35. Variation de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (nM GSH-CDNB/min/mg prot) dans le foie chez les rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).	99

Liste des tableaux

Tableau 01. Marché des pesticides en Algérie en million de dollars entre 2006 et 2012.	12
Tableau 02 : Classification des fongicides selon les propriétés chimique.	27
Tableau 03. Composition de l'alimentation pour 1 kilogramme d'aliment.	39
Tableau 04. Tableau récapitulatif des propriétés physico-chimiques du Propineb.	40
Tableau 05. Propriétés Antracol WP 70.	41
Tableau 06. Tableau récapitulatif des propriétés physico-chimiques du Propiconazole.	42
Tableau 07. Propriétés du Tilt 250 EC.	43
Tableau 08. Variation de la masse corporelle (g) des rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).	68
Tableau 09. Variation de la consommation d'aliment (g/lot/j) et de l'eau de boisson (ml/lot/j) chez les rats témoins (T) et les rats traités après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).	69
Tableau 10. Variation des paramètres sanguins chez les rats témoins (T) et les rats traités après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).	70
Tableau 11. Variation de la masse absolue du foie (g) chez les rats témoins (T) et les rats traités après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).	71
Tableau 12. Variation de quelques paramètres biochimiques (PAL, ASAT,	73

ALAT, Albumine et protéines totales) chez les rats témoins (T) et les rats traités après 28 jours de traitement (M ± SD, n = 7).	
Tableau 13. Variation de la masse absolue des reins (g) chez les rats témoins (T) et les rats traités après 28 jours de traitement (M ± SD, n = 7).	79
Tableau 14. Variation de la concentration sérique de l'urée, créatinine et acide urique chez les rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement (M ± SD, n = 7)	80
Tableau 15. Variation de la masse absolue des testicules et de l'épididyme (g) chez les rats témoins (T) et les rats traités après 28 jours de traitement (M ± SD, n = 7).	84
Tableau 16. Variation de la concentration du cholestérol et des triglycérides chez les rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement (M ± SD, n = 7).	86
Tableau 17. Variation de la concentration des spermatozoïdes x10 ⁶ /ml) chez les rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement (M ± SD, n = 7).	88
Tableau 18. Variation de la mobilité des spermatozoïdes (%) chez les rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement (M ± SD, n = 7).	88
Table 19. Variation du taux de malformations (A, B, C, N, V) (%) des spermatozoïdes chez les rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement (M ± SD, n = 7).	89
Tableau 20. Taux du glutathion (nM/mg prot) dans le foie et les testicules chez les rats témoins (T) et après 28 jours de traitement (M ± SD, n = 7).	93
Tableau 21. Taux du malondialdéhyde (nM/mg de tissu) dans le foie et les testicules chez les rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement (M ± SD, n = 7).	95
Tableau 22. Variation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (µM GSH/mg prot), la glutathion S-transférase (nM GSH-CDNB/min/mg prot) dans le foie et le testicule chez les rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement (M ± SD, n = 7).	97

Table des matières

Remerciements

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Résumé

Introduction générale..... 01

Synthèse bibliographique.....

I. Etude bibliographique sur les pesticides..... 04

1. Les pesticides dans l'agriculture..... 04

1.1. Définition et classification "Que sont les pesticides?"..... 04

1.2. Les différentes familles de pesticides..... 04

1.3. Utilité et utilisation des pesticides dans le monde et en Algérie..... 07

2. Devenir des produits phytosanitaires dans l'environnement..... 12

3. Les voies d'exposition aux pesticides..... 14

3.1. Exposition via la nourriture..... 14

3.2. Exposition via les pulvérisations de pesticides en milieux agricole et urbain..... 16

3.3. Exposition via la poussière domestique, la pulvérisation et la terre des jardins..... 17

4. Populations particulièrement exposées ou vulnérables..... 17

4.1. Travailleurs agricoles..... 18

4.2. Enfants, nourrissons et exposition in utero..... 18

5. Impacts sanitaires liés à l'exposition aux pesticides..... 19

5.1. Effets de l'exposition in utero et chez les enfants en bas âge..... 19

5.2. Les pesticides et le cancer chez les adultes..... 19

5.3. Les effets des pesticides sur le système nerveux..... 20

5.4. Impacts sur le système Immunitaire..... 20

5.5. Impacts sur le système hormonal..... 21

5.5.1. Troubles de la glande thyroïde..... 21

5.5.2. Pesticides et hormones sexuelles..... 22

5.6. Empoisonnement aux pesticides..... 22

II. Etude sur les fongicides..... 24

1. Mode d'action des fongicides au niveau des plantes..... 24

1.1. Les fongicides de contact.....	25
1.2. Les fongicides pénétrants.....	25
2. Familles ou groupes chimiques des fongicides.....	26
2.1. Fongicides inorganiques et organométalliques.....	26
2.2. Fongicides organiques de synthèse.....	27
III. Etudes sur l'exposition à des mélanges de pesticides.....	28
1. Mélanges de pesticides et effets sur la santé.....	28
1.1. Les effets attendus des mélanges	28
1.2. Le choix des mélanges.....	34
1.3. Les effets observés	34
Matériel et méthodes.....
1. Matériel et méthodes.....	38
1.1 Matériel.....	38
1.1.1. Matériel biologique.....	38
1.1.2. Entretien des rats.....	38
1.1.3. Choix des fongicides étudiés.....	39
1.1.4. Traitement des rats.....	44
1.1.5. Sacrifice et prélèvements des échantillons.....	44
1.1.4.1. Sacrifices des animaux.....	44
1.1.4.2. Prélèvement de certains organes.....	45
1.2. Méthodes de dosage.....	47
1.2.2. Dosage des paramètres hématologiques.....	47
1.2.2. Dosage des paramètres biochimiques.....	47
1.2.2.1. Dosage de l'urée.....	47
1.2.2.2. Dosage de la créatinine.....	49
1.2.2.3. Dosage de l'acide urique.....	50
1.2.2.4. Dosage du cholestérol.....	51
1.2.2.5. Dosage des triglycérides.....	52
1.2.2.6. Dosage de l'aspartate aminotransférase (ASAT).....	54
1.2.2.7. Dosage de l'alanine aminotransférase (ALAT).....	55
1.2.3.8. Dosage de la phosphatase alcaline (PAL).....	56
1.2.3.9. Dosage des protéines totales.....	57

1.2.3. Dosage des paramètres du stress oxydant.....	58
1.2.3.1. Dosage du glutathion (GSH).....	58
1.2.3.2. Dosage du malondialdéhyde (MDA).....	59
1.2.3.3. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion- peroxydase (GPx).....	60
1.2.3.4. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (GST).....	61
1.2.3.5. Dosage des protéines.....	62
1.2.4. Etude histologique.....	63
1.2.4.1. Fixation des échantillons.....	63
1.2.4.2. Déshydratation des échantillons.....	63
1.2.4.3. Inclusion des échantillons.....	63
1.2.4.4. Confection des coupes histologiques.....	63
1.2.4.5. Coloration.....	63
1.2.4.6. Montage.....	64
1.2.5. Etude de la biologie des spermatozoïdes selon la méthode de l'OMS, (1993).....	65
1.2.6.1. Concentration	65
1.2.6.2. La mobilité.....	65
1.2.6.3. Les malformations morphologiques des spermatozoïdes.....	66
1.2.7. Analyse statistique des résultats.....	67
Résultats.....
1. Influence du traitement sur la variation de quelques paramètres physiologiques.....	68
1.1. Variation de la masse corporelle des rats.....	68
1.2. Variation de la consommation quotidienne de l'aliment et de l'eau de boisson.....	69
2. Influences du traitement sur les paramètres hématologiques.....	70
3. Influence du traitement sur la fonction hépatique.....	71
3.1. Variation de la masse absolue du foie.....	71
3.2. Effet sur l'activité des aminotransaminases.....	72
3.3. Effet sur l'activité de la phosphatase alcaline.....	72
3.4. Effet sur la concentration sérique en protéines totales et en albumine.....	72
3.4. Observation macroscopique du foie.....	75
3.5. Etude histologique du foie.....	75
4. Influence du traitement sur la fonction rénale.....	79
4.1. Variation de la masse absolue du rein.....	79
4.2. Effet sur les marqueurs rénaux.....	80

4.2. Etude histologique du rein.....	82
5. Influence du traitement sur la fonction reproductrice.....	84
5.1. Variation de la masse absolue des testicules et epididymes.....	84
5.2. Effet sur quelques marqueurs biochimiques.....	85
5.3. Variation de la concentration des spermatozoïdes.....	87
5.4. Variation de la mobilité des spermatozoïdes.....	87
5.5. Variation du taux de malformations (A, B, C, N, V) (%) des spermatozoïdes.....	87
5.6. Étude histologique des testicules.....	90
5.7. Etude histologique de l'épididyme.....	90
6. Influence du traitement sur les paramètres du stress oxydant.....	93
6.1. Influence du traitement sur le glutathion tissulaire (GSH).....	93
6.2. Influence du traitement sur le malondialdéhyde (MDA).....	95
6.3. Influence du traitement sur l'activité des enzymes antioxydantes (GPx, GST).....	97
Discussion.....	
Discussion.....	100
Conclusions générales et perspectives.....	119
Références bibliographiques.....	120

INTRODUCTION

Introduction générale

L'homme cultive les plantes pour se nourrir depuis l'antiquité. Dès lors l'agriculture a été soumise à l'usage de produits phytopharmaceutiques afin de garantir la qualité et la quantité des récoltes face aux ravageurs naturels (animaux, végétaux et micro-organismes). Ces substances, dans un premier temps naturelles, ont ensuite suivi l'essor de la chimie industrielle au cours de la Seconde Guerre Mondiale (Gatignol & Étienne, 2010). La population mondiale a doublé depuis 1950 et paradoxalement la surface des terres cultivées pour la nourrir n'a augmenté que de 10%. Ces terres subissent de très fortes pressions pour produire des aliments bon marché, et les sols s'en trouvent de plus en plus appauvris en nutriments. L'utilisation massive d'intrants (engrais et pesticides) n'est qu'un « pansement » qui tente de cacher les plaies profondes de l'agriculture intensive (Greenpeace, 2015).

Les pesticides de synthèse sont largement utilisés dans le monde entier depuis les années 1950. Au fil du temps, ces produits chimiques ont envahi notre environnement, à la fois en raison de leur utilisation massive mais aussi, dans certains cas, de leur persistance.

En raison de cette persistance, et des risques potentiels pour la faune et la flore, les recherches sur les impacts des pesticides se sont multipliées au cours des 30 dernières années (Köhler et Triebkorn, 2013). Désormais, il apparaît clairement que ces impacts sont variés et de grande ampleur. En outre, la compréhension scientifique des conséquences pour la santé humaine et des mécanismes d'action des pesticides ont rapidement progressé. Des études ont notamment mis en évidence des liens entre exposition aux pesticides et risques accrus principalement hématopoïétique, d'hépatotoxicité et immunotoxique (Purdue et al., 2007; Mahajan et al., 2006; Ruder et al., 2006); ainsi que des troubles du développement, des détériorations des fonctions neurologiques (Liu et al., 2003; Baldi et al., 2003; Alavanja et al., 2004; Chade et al., 2006), et de déficiences immunitaires (Colosio et al., 2005) voire de certains cancers (Mendola et al., 2002).

D'après l'Institut National de la Protection des Végétaux (INPV), plus de 480 pesticides sont homologués et commercialisés en Algérie, sous l'euphémisme admis : « pesticides à usage agricole ». Ces derniers, se répandent de plus en plus avec le développement de l'agriculture. Actuellement dans notre pays, le dispositif de déclaration des cas d'intoxications par les pesticides, mis en place par le Ministère de la Santé en Mai 2004, a permis d'enregistrer quelques dizaines de cas de contaminations accidentelles résultant de la manipulation des pesticides au cours des opérations de lutte antiacridienne. Par ailleurs, les laboratoires

Introduction générale

nationaux analysent rarement les produits alimentaires pour déterminer leur teneur en pesticide et cela par défaut d'équipements appropriés. Tout comme le suivi et la gestion de ces produits toxiques qui échappent totalement au contrôle public (Bouziani, 2007). Puis encore, des pesticides interdits de commercialisation et d'usage dans l'Union Européenne depuis les années 70 existent encore en Algérie (Merhi, 2008).

Puisque, il reste très difficile à prouver de façon incontestable que l'exposition à un pesticide donné entraîne une maladie ou un état pathologique chez l'être humain. Tous les groupes de population humaine sont, d'une façon ou d'une autre, exposés aux pesticides, et la plupart des pathologies ont de multiples causes ce qui complique les évaluations sanitaires (Meyer-Baron et al., 2015). De plus, la plupart des personnes sont exposées à des cocktails chimiques complexes, qui évoluent sans cesse et ne comportent pas que des pesticides. En réalité, les pesticides sont une des composantes d'un lourd fardeau toxique que nous portons au quotidien, par le biais de plusieurs voies d'exposition.

Un des enjeux majeurs de la toxicologie environnementale concerne la problématique des effets des mélanges de substances chimiques auxquels les agriculteurs ou la population générale peuvent être exposés au travers de leur alimentation et de leur environnement au sens large (Inserm, 2013). La question des faibles doses et de la chronicité des expositions en constitue un autre, tout aussi importante. Cela est bien illustré par les pesticides qui sont retrouvés sous forme de « cocktails » dans la majorité des denrées alimentaires mais également dans tous les milieux naturels (Kortenkamp, 2008; European Commission, 2011). Les effets toxiques de ces cocktails sont particulièrement mal compris, même s'il est reconnu que certaines substances peuvent agir en synergie et créer ensemble un effet plus important que celui de chaque composant pris individuellement (Reffstrup et al., 2010). Il est très compliqué d'évaluer la toxicité des mélanges de résidus de pesticides étant donné le nombre élevé de combinaisons et d'interactions possibles.

Pour prédire le risque d'exposition à faible dose à long terme à un composé de mélange particulier, les études de toxicité sub-chronique sont presque toujours inestimables pour évaluer le profil de sécurité des xénobiotiques (Aniagu et al., 2005).

Du fait de cette importance, notre étude s'est portée sur les effets de l'exposition sub-chronique à deux pesticides fortement utilisés dans le domaine de l'agriculture. Deux fongicides classés étant des perturbateurs endocriniens, Propiconazole (Pz) et Propineb (Pb)

Introduction générale

des familles des triazoles et dithiocarbamates respectivement sur plusieurs paramètres physiologiques et notamment la reproduction chez le rat male Wistar.

Ce manuscrit est divisé en trois grandes parties ;

- La première partie consiste à une étude bibliographique sur les pesticides en générale et les effets de ces composés utilisés seuls puis en mélange basée sur de récentes études.

- Dans la deuxième partie nous avons développé les méthodes utilisées dans l'étude des effets des pesticides utilisés seul ou en combinaison sur la fonction hématologique, hépatique, rénale et la reproduction chez le modèle biologique choisi, le rat Wistar. Cette partie fait le détail sur le cheminement suivi et fixe le protocole qui a abouti aux résultats obtenus.

- La troisième partie est enfin consacrée aux résultats obtenus ; une discussion générale est engagée et les perspectives de notre travail sont clarifiées. Dans cette partie, nos résultats sont largement commentés et des comparaisons sont faites par rapport aux recherches antérieures qui font référence dans le domaine.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Etude bibliographique sur les pesticides

1. Les pesticides dans l'agriculture

1.1. Définition et classification "Que sont les pesticides?"

'Pesticide' ou action de tuer un nuisible. Les pesticides chimiques de synthèse sont des substances chimiques ou des mélanges de substances destinés à lutter contre les nuisibles tels que les insectes, les champignons, les moisissures ou les mauvaises herbes. Les substances utilisées sont également connues sous le nom de « produits de protection des plantes » ou « produits phytosanitaires ».

Ils sont le plus souvent classés en fonction des nuisibles visés, sous les catégories suivantes par exemple :

- **Insecticides**, pour lutter contre les insectes nuisibles
- **Herbicides**, pour lutter contre les mauvaises herbes
- **Fongicides**, pour lutter contre les champignons

Ces catégories regroupent un grand nombre d'ingrédients actifs individuels, de préparations et de marques. Les pesticides peuvent également être classés en fonction de leur famille chimique, dans les catégories des organophosphorés (OPP), des organochlorés (OCP), des carbamates et des néonicotinoïdes, par exemple (Greenpeace, 2015).

1.2. Les différentes familles de pesticides

• Les pesticides organochlorés (OCP)

Utilisés à des fins agricoles ou de santé publique depuis 1950, bien que l'utilisation de certains d'entre eux ait fait l'objet de restrictions ou d'interdictions, en raison de leur toxicité avérée pour les espèces non ciblées, notamment pour les humains. Certains pesticides organochlorés sont des composés très stables et, de fait, extrêmement persistants dans l'environnement, en raison de leur résistance aux processus naturels de dégradation. C'est pourquoi un certain nombre d'entre eux ont été classés parmi les polluants organiques persistants dans le cadre de la Convention de Stockholm de 2001. Bien que le niveau de présence dans l'environnement de certains composés organochlorés ait diminué au fil des années, nombre d'entre eux contaminent encore une grande partie des compartiments de

Synthèse bibliographique

l'écosystème, tels que les sols, les sédiments des rivières, les sédiments marins côtiers, et même les eaux profondes et les pôles (Willet et al., 1998).

Les principaux OCP comprennent notamment le tétrachlorure de carbone, le chlordane, le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane), le DDE (dichlorodiphényldichloroéthylène), la dieldrine, l'heptachlore, le bêta HCH et le gamma HCH.

• Les pesticides organophosphorés (OPP)

Les propriétés insecticides de certains composés organophosphorés ont été découvertes lors de recherches militaires sur les gaz innervant et, depuis la seconde guerre mondiale, de nombreux pesticides organophosphorés (OPP) ont été commercialisés à des fins agricoles. Les OPP regroupent une large gamme de structures chimiques. Leur mode de toxicité les rend efficaces en tant que pesticides, car les produits chimiques qu'ils contiennent inhibent une enzyme (l'acétylcholinestérase) primordiale pour le système nerveux central et périphérique, une propriété qui explique également en partie leur toxicité pour les espèces non-ciblées (Greenpeace, 2015).

Les principaux OPP regroupent l'acéphate, le chlorpyrifos, le coumaphos, le diazinon, le dichlorvos, le fonofos, le parathion, le malathion, le parathion méthyl et le phosmet.

• Les carbamates

Ils sont généralement neurotoxiques et ils inhibent également l'acétylcholinestérase. Certains ont été associés à des effets négatifs sur le développement humain, notamment chez les bébés et les enfants (Morais et al., 2012).

Les principaux carbamates comprennent notamment l'aldicarbe, le carbaryl, **le propineb**, le méthiocarbe, le pirimicarbe, le manèbe, le mancozèbe (des dithiocarbamates) et l'EPTC (éthyl-S-dipropyl thiocarbamate) (un thiocarbamate).

• Les pyréthrinoïdes de synthèse

Ils perturbent la signalisation cellulaire (canaux ioniques). Certains ont été associés à des effets néfastes sur les fonctions reproductives mâles et sont suspectés d'être des perturbateurs endocriniens (qui affectent les fonctions hormonales) (Koureas et al., 2012).

Les principaux pyréthrinoïdes comprennent notamment la cyhalothrine, la cyperméthrine, la deltaméthrine et la perméthrine.

Synthèse bibliographique

• Les néonicotinoïdes

Ils sont une nouvelle famille de pesticides comprenant notamment l'imidaclopride, qui a été commercialisée pour la première fois en 1985. Ces substances présentent une structure très semblable à celle de la nicotine, et bloquent certains passages de signalisation des cellules. Ils ont également des effets néfastes sur le développement neurologique (Kimura-Kuroda et al., 2012). L'Union européenne a mis en place des restrictions concernant l'utilisation de ces substances, du fait de leur toxicité suspectée pour les abeilles sauvages et domestiques.

Les principaux néonicotinoïdes comprennent notamment la clothianidine, l'imidaclopride et le thiaméthoxame.

• Les chloroacétamides

Ils peuvent provoquer des anomalies du développement. L'utilisation de l'alachlore et du métolachlore n'est plus autorisée par l'UE (Greenpeace, 2015).

• Le paraquat

Il s'agit d'un herbicide neurotoxique qui inhibe la photosynthèse. Son utilisation n'est plus autorisée par l'UE (Greenpeace, 2015).

• Le glyphosate

L'un des composants actifs du Roundup entre autres, il agit comme inhibiteur d'une enzyme spécifique chez les plantes. Bien que son impact sur la santé fasse encore débat, le Centre international de recherche sur le Cancer (IARC) a récemment classé le glyphosate dans le groupe 2, c'est à dire « probablement cancérigène pour l'homme » (Guyton et al., 2015).. Le glyphosate présente également un risque de perturbation endocrinienne sur des lignées cellulaires humaines et peut avoir des effets néfastes sur le système reproducteur (Gasnier et al., 2009; Cassault-Meyer et al., 2014). Cette substance est largement utilisée dans le monde entier et constitue l'ingrédient actif de plus de 750 produits utilisés dans les domaines de l'agriculture et de l'entretien des forêts, ainsi qu'en milieu urbain et dans le cadre domestique. Son utilisation a considérablement augmenté dans le cadre des cultures « Roundup Ready », qui sont génétiquement modifiées pour être résistantes au glyphosate.

• Autres pesticides à la structure chimique variable

Il existe également d'autres pesticides dont l'utilisation est autorisée par l'Union européenne et qui sont également utilisés ailleurs dans le monde, tels que l'abamectine (également connue sous le nom d'ivermectine), l'azoxystrobine, le boscalid, le captane, le cyprodinil, le dicamba, le dinitrol, le fipronil, la pendiméthaline et le pyriméthanil. D'autres substances existent, dont l'utilisation n'est pas autorisée par l'UE (mais qui peuvent néanmoins être autorisées ailleurs), dont notamment le bénomyl, le sulfure de carbone, le dibromure d'éthylène (1,2-dibromoéthane), l'imazéthapyr et la trifluraline. Le diéthyltoluamide (DEET), utilisé comme un répulsif anti-moustique et pour ses effets synergiques dans certaines formulations de pesticides (dont les carbamates), n'est pas mentionné dans la réglementation européenne (Greenpeace, 2015).

1.3. Utilité et utilisation des pesticides dans le monde et en Algérie

Dans la nature, de nombreuses agressions peuvent faire obstacle au bon développement des plantes : insectes ravageurs, maladies (champignons, bactéries, virus), mauvaises herbes...

Les produits phytopharmaceutiques sont utiles car ils permettent de lutter, si besoin :

- Contre les maladies des plantes avec des fongicides,
- Contre les mauvaises herbes avec des herbicides,
- Contre les insectes ravageurs avec des insecticides.

Du fait de la mondialisation des échanges, la pression des organismes nuisibles est en constante évolution.

A titre d'exemple, plus de 41 nouvelles espèces d'insectes ravageurs sont apparues entre 2000 et 2005 sur le territoire français ; parmi elles *Diabrotica virgifera* (la chrysomèle du maïs) et plusieurs espèces de cochenilles et de thrips (UIPP, 2010).

La FAO (Organisation Mondiale pour l'Alimentation et l'Agriculture) a réalisé des estimations de l'impact de l'absence de traitements phytopharmaceutiques sur différentes productions. Le graphique ci-dessous fait apparaître les rendements mondiaux moyens calculés par la FAO avec ou sans produits phytopharmaceutiques.

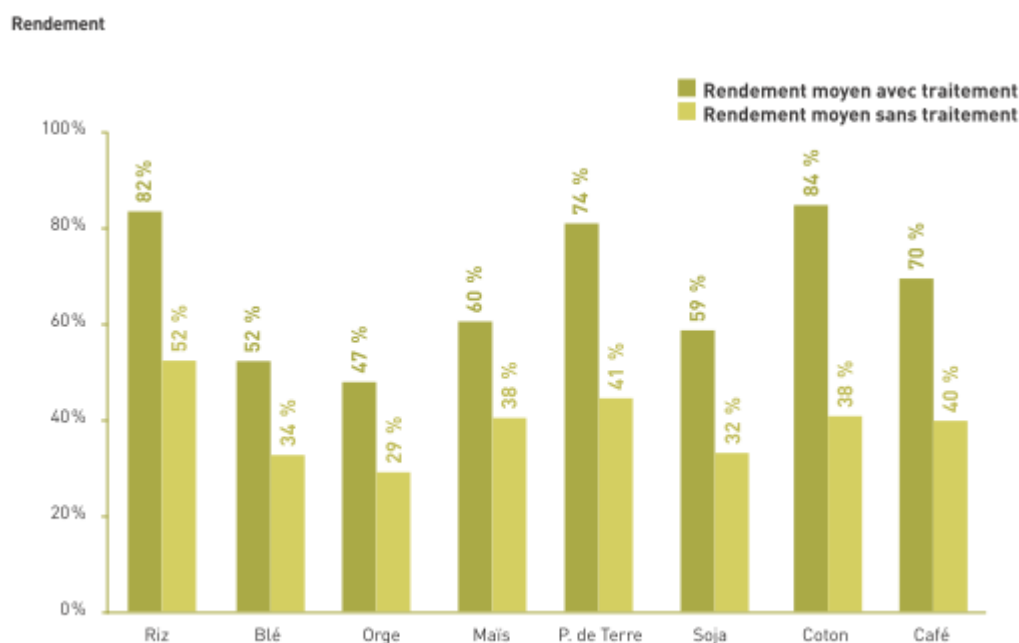


Figure 01. Estimation des rendements mondiaux moyens selon l'utilisation ou non de produits phytopharmaceutiques, par rapport au rendement maximal (FAO, 2010).

Toujours selon la FAO, les besoins alimentaires mondiaux vont augmenter de 50 % d'ici à 2030. Les stocks alimentaires sont en baisse, d'autant que les pratiques alimentaires se diversifient, avec une consommation de viande en croissance et une hausse corrélative des besoins en récoltes végétales pour l'alimentation animale. Par ailleurs, aux débouchés alimentaires, textiles et industriels s'ajoutent les utilisations énergétiques des productions agricoles. En conséquence, les stocks de céréales ont diminué de plus de 40 % depuis 2000.

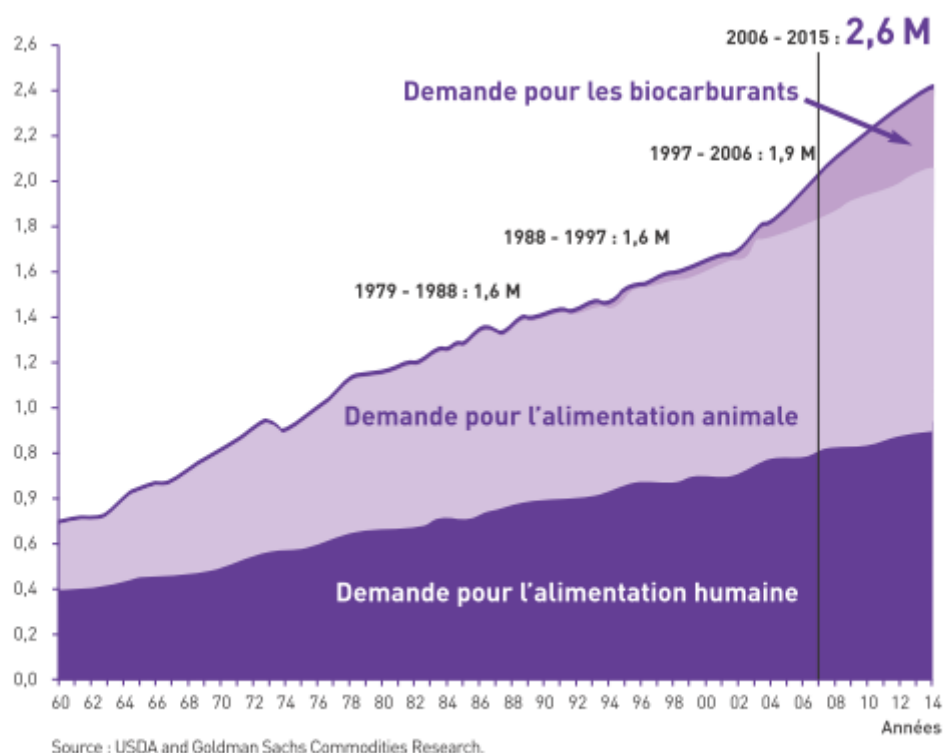


Figure 02. Evaluation de la demande mondiale en produits végétaux agricoles (En milliards de tonnes) (USDA, 2010).

Six fois, au cours des sept dernières années (période 2000-2007), la production céréalière mondiale a été inférieure à la consommation. Il a alors fallu puiser dans les stocks, lesquels reculent. A cet égard, la FAO lance des alertes sur les « risques croissants » pour la sécurité alimentaire mondiale : « nous produisons moins que nous consommons : « on mange les stocks ». En Europe, selon les mêmes sources, on estime les stocks de céréales à 1 à 2 mois de consommation. Ce contexte explique en partie aussi la flambée des cours des matières premières agricoles observée aujourd’hui.

Ainsi au fur à mesure que la population mondiale augmente, la proportion de terres cultivables diminue (figure 3), d’où la nécessité d’accroître les rendements des cultures pour répondre à l’accroissement des besoins alimentaires, ce qui incite à accroître l’utilisation de produits (FAO, 2002).

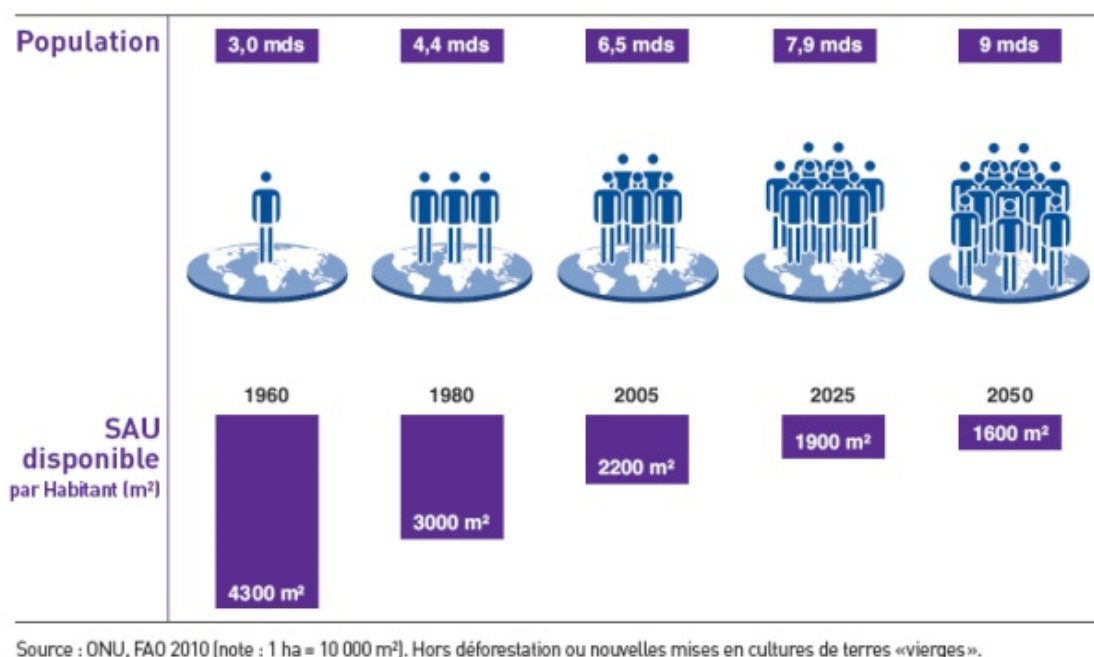


Figure 03. Disponibilité mondiale de la Surface Agricole Utilisée en fonction de l'évolution de la population (FAO, 2010).

• Utilisation des pesticides dans le monde

D'après les données de l'UIPP, les herbicides sont les pesticides les plus utilisés dans le monde toutes cultures confondues (45.2 % du tonnage mondial en 2010). Apparaissent ensuite, à utilisation égale, les insecticides (26.1%) et les fongicides (25.9%) (Figure 4). Cette même année, le marché européen était de 10584 millions de dollars, devant le marché asiatique (9994 millions de \$) et derrière l'Amérique du nord (7945 millions de \$) (Figure 5).

Synthèse bibliographique

(Total : 38 316 millions de dollars)

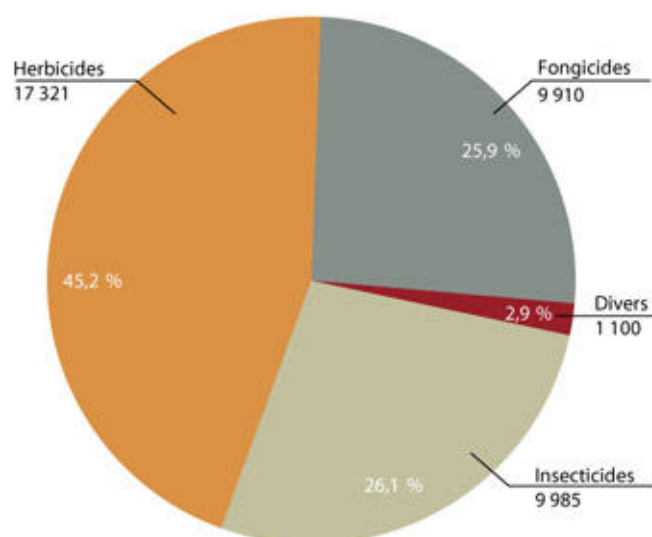
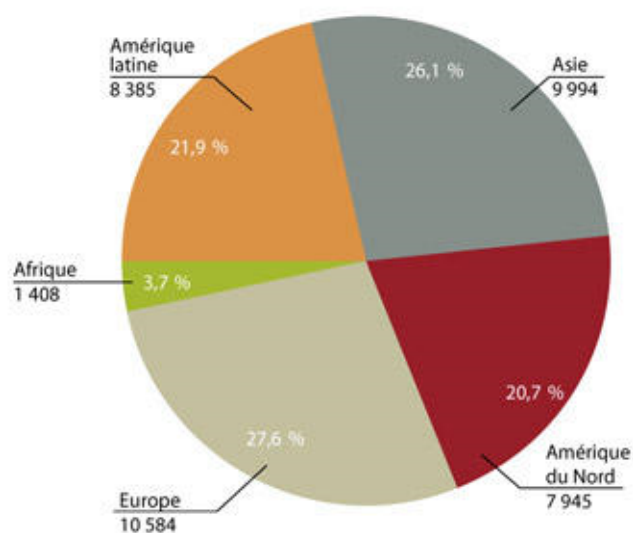


Figure 04. Répartition mondiale des produits phytosanitaires par catégories de produits utilisés en 2010 (Les produits divers concernent les acaricides, nématicides, rodenticides, ...) (UIPP, 2010).

(Total : 38 316 millions de dollars)



Source : Phillips Mc Dougall AgriServices

Figure 05. Répartition du chiffre d'affaires par région du monde en 2010 (UIPP, 2010).

• Utilisation des pesticides utilisés en Algérie

Le marché algérien en pesticides ne cesse d'augmenter ; en 2010 l'Algérie a importé pour 91.76 millions USD de pesticides en 2011, 81.67 million USD contre 29.78 millions en 2006 (FAOSTAT, 2016).

Pour la seule année de 2006 la quantité de pesticides importés a dépassé les 25000 tonne une nette augmentation par rapport aux années précédentes (Douane Algérienne, 2010).

Tableau 01. Marché des pesticides en Algérie en million de dollars entre 2006 et 2012 (FAOSTAT, 2016).

Année	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Valeurs (M\$)	29,788	49,376	77,092	65,856	59,648	81,672	91,76

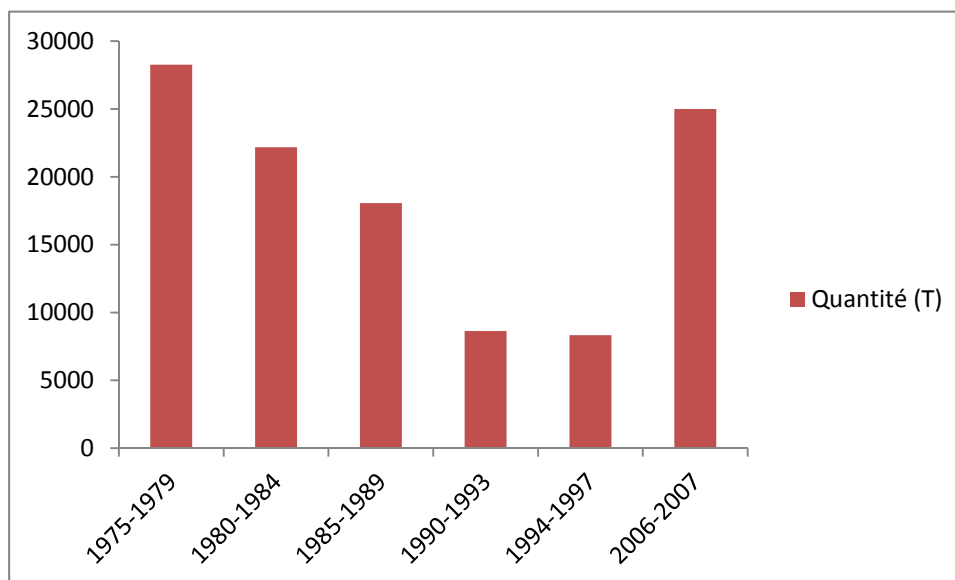


Figure 06. Quantité des pesticides importés en Algérie en tonnes de 1975 à 2007 (Douane Algérienne, 2010).

2. 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).

Synthèse bibliographique

Ils peuvent alors être soumis à différents processus (Figure 7) (Lissalde, 2010):

- 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 07. Devenir des pesticides dans l'environnement (Lissalde, 2010).

3. Les voies d'exposition aux pesticides

Il existe de nombreuses façons d'être exposé aux pesticides (figure 8) (Greenpeace, 2015):

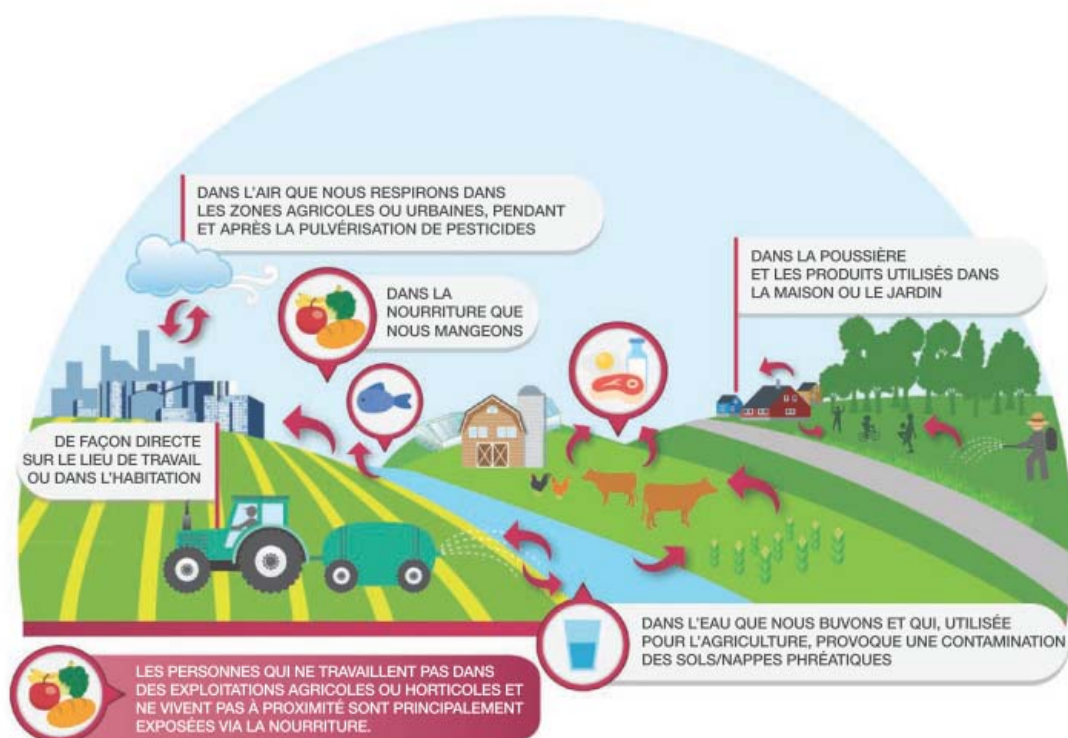


Figure 08. Les différentes voies d'exposition aux pesticides (Greenpeace, 2015).

3.1. Exposition via la nourriture

Les aliments cultivés par le biais de l'agriculture industrielle intensive contiennent généralement des résidus de pesticides. Des études montrent qu'un même aliment contient souvent de nombreux résidus, ce qui fait que nous sommes exposés à ces derniers sous forme de mélanges ou cocktails (Fenik et al., 2011). Les effets toxiques de ces cocktails sont particulièrement mal compris, même s'il est reconnu que certaines substances peuvent agir en synergie et créer ensemble un effet plus important que celui de chaque composant pris individuellement (Reffstrup et al., 2010).

D'après une étude menée par Sutton et al. (2011), aux États-Unis le niveau de résidus de pesticides contenus dans la nourriture est tel que les schémas classiques de consommation alimentaire peuvent entraîner une exposition hautement cumulative de la population aux pesticides. Ce phénomène semble bien s'appliquer également à d'autres pays et semble préoccupant étant donné la consommation répétée de pesticides, notamment de substances lipophiles (solubles dans les corps gras) qui s'accumulent dans le corps jour après jour.

Synthèse bibliographique

- **Les pesticides dans les fruits et légumes**

Les pesticides sont largement utilisés dans la production commerciale de fruits et légumes.

Des résidus des pesticides peuvent persister dans les tissus des aliments cultivés ou à leur surface lors de leur introduction sur le marché. Depuis de nombreuses années, les scientifiques ont développé différentes techniques pour quantifier les niveaux de pesticides dans la nourriture. Leurs résultats suggèrent qu'il est nécessaire de surveiller ces niveaux en continu, afin de s'assurer du mieux possible que les valeurs limites établies pour les résidus de pesticides ne soient pas dépassées pour les produits vendus sur le marché (Wilkowska and Biziuk, 2011; Li et al., 2014). La plupart des pays ont mis en place des limites maximales de résidus (LMR) pour chaque substance, que ce soit au niveau national ou au niveau régional, au-delà desquelles les aliments sont considérés comme impropres à la consommation humaine. L'Union européenne a elle aussi défini des LMR qui s'appliquent à tous les pays membres.

De nombreuses études publiées entre 2007 et 2014 suggèrent que les légumes, notamment les légumes à feuilles vertes, et les fruits, tels que les pommes et les raisins, sont généralement les aliments qui contiennent les niveaux de résidus de pesticides les plus élevés (Bempah et al., 2012; Jardim et al., 2012; Fan et al., 2013; Yuan et al., 2014). Certaines preuves conséquentes indiquent que ces substances sont régulièrement présentes sous forme de mélanges de nombreux résidus et, dans de nombreux cas, à des niveaux supérieurs aux LMR définies dans certains pays (Latifah et al., 2011; Jardim et al., 2012). Parmi de nombreux autres pesticides, la cyperméthrine, le chlorpyrifos, l'iprodione, le boscalid, les dithiocarbamates et l'acéphate sont régulièrement détectés dans la nourriture (Claeys et al., 2011; Lozowicka et al., 2012; Yuan et al., 2014). Bien que des recherches poussées suggèrent que le fait de nettoyer les légumes et de les cuisiner réduise le niveau de certains résidus situés à la surface, dans certains cas la préparation peut au contraire concentrer les niveaux de résidus (Keikotlhaile et al., 2010).

- **Les pesticides dans le poisson**

Une étude sur la pollution par les organoétains dans les environnements marins a déterminé qu'un composé du triphénylétain (TPT), utilisé en tant que pesticide sur terre, constituait l'un des polluants les plus répandus dans les sédiments (Yi et al., 2012). Les composés du triphénylétain ne sont pas facilement biotransformés par les organismes marins, ce qui

entraîne leur bioaccumulation et potentiellement leur bioamplification par le biais des chaînes alimentaires marines. Les concentrations d'organoétains sont particulièrement élevées dans le sang des personnes consommant de grandes quantités de fruits de mer, et il a été suggéré que la surveillance régulière des niveaux de ces substances était nécessaire à des fins de santé publique (Yi et al., 2012).

- **Les pesticides dans les produits animaux**

Les animaux d'élevage peuvent également accumuler les pesticides par le biais d'aliments contaminés et de traitements vétérinaires. Bien que ces substances soient généralement stockées dans la graisse et les muscles des animaux, on en retrouve également dans le cerveau, le foie, les poumons et autres abats (LeDoux, 2011). Les insecticides et les acaricides sont souvent utilisés pour lutter contre les ectoparasites tels que les araignées rouges dans le cadre de la production avicole (volailles et œufs).

Certains de ces pesticides s'accumulent dans les muscles, la graisse et le foie des animaux, et peuvent être détectés dans les œufs longtemps après que les produits chimiques aient été éliminés des autres tissus (Schenck and Donoghue, 2000).

Le lait et les produits laitiers en général contiennent eux aussi de nombreuses substances en raison de la bioaccumulation et du stockage des pesticides dans les tissus graisseux des animaux. Ce phénomène est particulièrement inquiétant quand on sait que le lait de vache constitue souvent un élément de base de l'alimentation chez l'homme, et qu'il est en grande partie consommé par les enfants.

3.2. Exposition via les pulvérisations de pesticides en milieu agricole et urbain

Les pesticides pulvérisés sur les terres agricoles et dans les zones urbaines entrent en suspension et peuvent parcourir de longues distances par les airs. Par exemple, une étude menée aux États-Unis montre que plusieurs pesticides communément utilisés peuvent être détectés très loin des sites où ils ont été pulvérisés. À des distances allant de 10 m à 150 m du lieu de pulvérisation des pesticides, des substances telles que le diazinon et le chlorpyrifos affichaient encore des niveaux supérieurs aux limites maximales définies par le gouvernement (Sutton et al., 2011). Les personnes vivant dans des zones agricoles sont donc susceptibles d'être hautement exposées aux pesticides suite à l'inhalation de la dérive de pulvérisation.

Synthèse bibliographique

De la même façon, lorsque les pesticides sont pulvérisés dans des parcs, dans des zones urbaines, ou dans les habitations, les personnes respirant l'air contaminé peuvent être exposées.

3.3. Exposition via la poussière domestique, la pulvérisation et la terre des jardins

Des études ont montré que la poussière domestique était contaminée par de nombreux produits chimiques dont certains pesticides, particulièrement ceux utilisés pour lutter contre les parasites ménagers (Naeher et al., 2010). Les principales substances utilisées pour lutter contre les insectes dans le cadre domestique sont des pyréthrinoïdes tels que la perméthrine et la cyfluthrine, et dans certains cas le chlorpyrifos. L'ingestion, l'inhalation et le contact avec la peau de poussière contaminée peuvent mener à une exposition continue et variée aux pesticides (Morgan et al., 2007, 2014; Starr et al., 2008). Il a été démontré que les habitations situées dans des zones agricoles, particulièrement celles situées à proximité de terres sur lesquelles sont pulvérisés des pesticides, sont plus contaminées que les autres (Harnly et al., 2009). Toutefois, la poussière contaminée représente également un problème dans les zones urbaines, où des résidus persistent dans l'air suite à l'utilisation de pesticides dans le cadre domestique (Naeher et al., 2010; Muñoz-Quezada et al., 2012).

4. Populations particulièrement exposées ou vulnérables

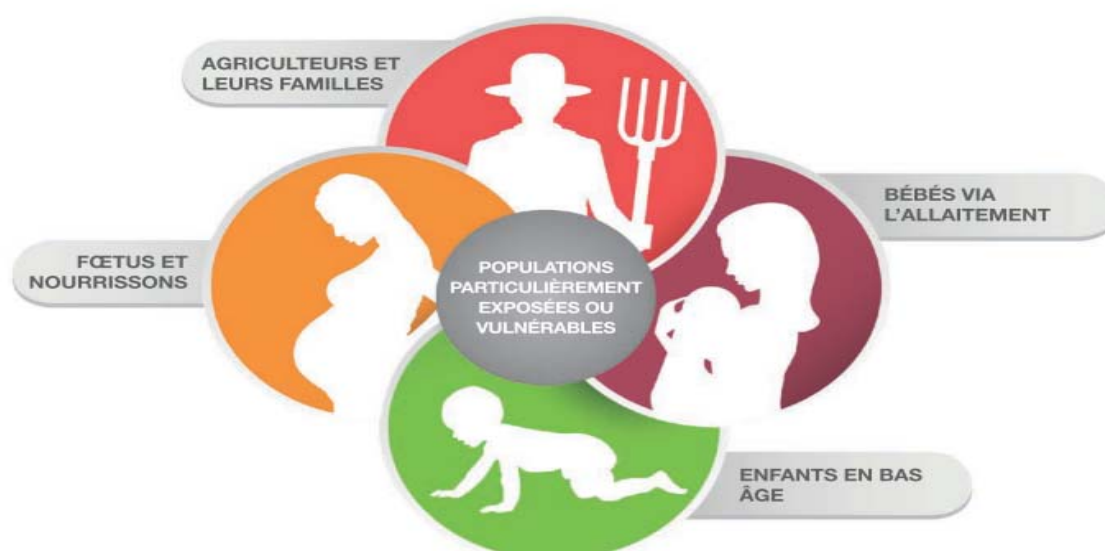


Figure 09. Populations particulièrement exposées ou vulnérables aux pesticides (Greenpeace, 2015).

Synthèse bibliographique

4.1. Travailleurs agricoles

Les agriculteurs et leur famille présentent un risque d'exposition plus élevé que le reste de la population. Les agriculteurs qui pulvérisent des pesticides sont en effet exposés aux niveaux les plus élevés, même si les personnes travaillant dans des serres peuvent être également hautement exposées. Une étude menée en Europe portant sur les résidus retrouvés dans les cheveux des travailleurs agricoles a dénombré pas moins de 33 substances différentes, notamment des herbicides et des fongicides (Greenpeace, 2015).

Les pesticides les plus fréquemment rencontrés étaient le pyriméthanil, le cyprodinil et l'azoxystrobine, ce qui correspondait aux types de cultures pratiquées et aux produits utilisés. Des niveaux similaires de P, P'-DDE et de gamma HCH (qui n'est plus utilisé à l'heure actuelle) ont été trouvés sur tous les sujets, quelle que soit leur activité dans l'exploitation, indiquant une exposition sous-jacente à long terme aux composés organochlorés, particulièrement persistants dans l'environnement (Schummer et al., 2012). Ces résultats indiquent que, même lorsque les personnes qui appliquent les pesticides respectent les précautions de sécurité adéquates, elles sont toujours confrontées à des niveaux d'exposition élevés, détectables dans leurs tissus. La longévité dans l'organisme de certains pesticides toujours utilisés à l'heure actuelle est encore peu connue. Toutefois la durée de leur persistance dans le corps pourrait être moins importante dans le cas d'une utilisation et d'une exposition régulière. Les familles des agriculteurs vivant dans des zones agricoles peuvent également être confrontées à des niveaux d'exposition légèrement plus élevés que la moyenne. Ceci est dû au fait que des pesticides entrent en suspension lors de leur pulvérisation dans les champs et se déplacent dans l'air, ainsi qu'au fait que les travailleurs agricoles introduisent leurs vêtements et chaussures contaminés dans leur habitation après leur journée de travail. Ce phénomène est particulièrement inquiétant pour les nourrissons et les enfants, plus vulnérables aux effets toxiques de certains pesticides que les adultes (Arcury et al., 2007).

4.2. Enfants, nourrissons et exposition in utero

Lorsque des femmes enceintes ou qui allaitent sont exposées aux pesticides, leurs enfants sont également susceptibles d'y être exposés. Certains pesticides peuvent passer dans le placenta pour atteindre le fœtus en développement dans l'utérus, ainsi que dans le lait maternel pour atteindre le nourrisson. Lors des premiers stades du développement, les organes de l'enfant se forment et se développent et ils peuvent être très vulnérables aux effets des produits toxiques.

Synthèse bibliographique

Par exemple, le cerveau en plein développement d'un enfant est plus sensible aux substances neurotoxiques, et la dose de pesticides par rapport au poids est plus importante chez les enfants en raison de leur petite taille (Weiss, 2000). Enfin, les niveaux de présence et d'activité de certains enzymes contribuant à la détoxification de formes actives de pesticides sont plus bas chez les enfants (Holland et al., 2006).

5. Impacts sanitaires liés à l'exposition aux pesticides

5.1. Effets de l'exposition in utero et chez les enfants en bas âge

Le développement humain est particulièrement vulnérable aux effets des produits chimiques toxiques, dont les pesticides font partie. L'exposition des femmes enceintes aux pesticides, et dans certains cas l'exposition des enfants en bas âge eux-mêmes, a été associée à des effets néfastes pour la santé des enfants, tels que :

1. Un poids et une taille réduits à la naissance et des malformations congénitales
2. Un quotient intellectuel plus faible
3. Des modifications du comportement
4. Une incidence plus importante de la leucémie et d'autres cancers
5. Une incidence plus importante de fausse couche

Des impacts négatifs sur la santé ont été reportés chez des enfants dont les mamans ont travaillé avec des pesticides pendant la grossesse, mais les effets sanitaires de l'exposition aux pesticides sont également inquiétants pour le reste des enfants, qu'ils vivent dans des zones agricoles ou urbaines (Greenpeace, 2015).

5.2. Les pesticides et le cancer chez les adultes

Il est très difficile d'établir qu'un pesticide en particulier peut engendrer un risque accru de contracter un cancer précis étant donné qu'il existe généralement de nombreux facteurs de confusion lors de toute expérience ou étude de population. Toutefois, d'après Alavanja et al. (2013), selon les éléments de preuve apportés par des études liées aussi bien au Agricultural Health Study (AHS) qu'à d'autres études robustes sur les pesticides et leur association avec le cancer, l'utilisation des pesticides représente un problème non négligeable pour la santé publique. De plus, certains éléments suggèrent que les risques de contracter un cancer seraient

élevés non seulement pour les personnes qui appliquent des pesticides, mais également pour l'ensemble de la population vivant dans des zones où l'exposition aux pesticides est importante (Parrón et al., 2013). Bien que le lien de causalité directe entre exposition aux pesticides et cancer reste plus ou moins équivoque, il semble tout de même que des schémas d'association ressortent entre certains pesticides et de nombreux cancers. Les substances visées font l'objet d'une classification établie par l'OMS allant de «peu dangereuse» à «extrêmement dangereuse».

Toutefois, aucune d'entre elles n'est désignée comme cancérigène. Cela souligne la difficulté de présenter des preuves irréfutables dans le but de modifier les politiques en la matière, et le fait qu'un grand nombre de ces substances continue à être utilisées dans l'agriculture

5.3. Les effets des pesticides sur le système nerveux

De nombreux pesticides, particulièrement les insecticides, sont conçus spécialement pour attaquer le système nerveux des nuisibles. C'est pourquoi ces substances peuvent également être neurotoxiques pour les animaux non ciblés, dont, dans certains cas, les hommes et autres mammifères (Bjørling-Poulsen, 2008). Les effets sur le développement neurologique d'une exposition significative aux pesticides chez les enfants ont fait l'objet de nombreuses études. Le lien avec certaines maladies neurodégénératives chez les adultes est moins connu, mais il semble que leur développement peut être dû à une combinaison de facteurs environnementaux et de prédisposition génétique. Bien que la vieillesse constitue sûrement le facteur de risque le plus élevé, l'exposition à de petites doses de pesticides à long terme a été identifiée parmi les facteurs. La compréhension des mécanismes sous-jacents de l'interaction entre ces facteurs environnementaux et ces composantes génétiques constituera un sujet important d'études à venir (Baltazar et al., 2014).

5.4. Impacts sur le système Immunitaire

Les résultats des nombreuses études menées sur l'immunotoxicité des pesticides dressent un tableau complexe. Des méthodologies expérimentales diverses, et la difficulté d'établir des groupes témoins (sujets non exposés) et de quantifier l'exposition aux pesticides, compliquent la déduction du lien de causalité. Toutefois, des études chez les animaux suggèrent que le système immunitaire serait une autre cible de l'action des pesticides, un phénomène mécaniquement possible chez l'homme, et qui pourrait mener à une augmentation de l'hypersensibilité à certains produits chimiques (immunostimulation) ou, dans certains cas, à

Synthèse bibliographique

l'immunosuppression, particulièrement chez les enfants (Corsini et al., 2013). Par exemple, certains éléments indiquent que l'exposition à différents produits chimiques agricoles sur le lieu de travail pourrait être liée à un asthme chronique ou allergique, ou à des rhinites allergiques, bien que les résultats soient peu concluants (Corsini et al., 2013). Autre exemple, ces agriculteurs sujets de l'AHS présentaient un risque d'asthme 2 fois plus élevé, risque qui pourrait être lié à l'exposition à des niveaux élevés à de nombreux pesticides, dont le coumaphos, l'heptaclor, le parathion, le dibromoéthane, ainsi qu'à des mélanges contenant du tétrachlorure de carbone et du sulfure de carbone (Hoppin et al., 2009). De plus, Slager et al. (2010) indiquent que l'utilisation de pesticides tels que le glyphosphate, le diaznon, le chlorpyrifos, le dichlorvos, le malathion, le carbaryl, la perméthrine et le captane pourrait contribuer à des épisodes accrus de rhinites allergique chez les agriculteurs. L'utilisation de pesticides spécifiques (la pendiméthaline et l'aldicarb) pourrait exacerber les symptômes chez les sujets déjà asthmatiques (Henneberger et al., 2014). Les maladies auto-immunes qui pourraient être potentiellement liées à l'exposition aux pesticides dans les cadres professionnel et domestique chez les femmes ménopausées comprennent notamment l'arthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux systémique (Parks et al., 2011).

5.5. Impacts sur le système hormonal

5.5.1. Troubles de la glande thyroïde

Des études expérimentales identifient de nombreux pesticides comme des perturbateurs endocriniens pouvant altérer le fonctionnement de différentes hormones (Mnif et al., 2011; Mandrich et al., 2014). Il apparaît que la production d'hormones thyroïdiennes serait inhibée par des substances telles que l'amtrole, la cyhalothrine, le fipronil et le pyriméthanil. Des niveaux élevés d'hormones thyroïdiennes ont été relevés chez les travailleurs de la floriculture ayant été exposés à de nombreux OPP (Lacasaña et al., 2010). D'autres pesticides pourraient également altérer les niveaux d'hormones thyroïdiennes et mener potentiellement à des troubles de la glande thyroïde.

D'après l'AHS, les femmes de travailleurs chargés d'appliquer des pesticides vivant et/ou travaillant dans des régions agricoles seraient plus vulnérables aux troubles de la glande thyroïde que le reste de la population (Goldner et al., 2010). Il semblerait que l'incidence accrue de troubles de la glande thyroïde chez ces sujets serait due à leur exposition à de nombreux insecticides organochlorés ainsi qu'aux fongicides bénomyl et manèbe/mancozèbe (carbamates). Dans une région brésilienne largement contaminée par les OCP, Freire et al.

Synthèse bibliographique

(2013) ont constaté que sur une population de 608 adultes (303 hommes et 305 femmes), il existait une prévalence accrue d'hyperthyroïdie. Cette étude faisait également ressortir des différences spécifiques au sexe, les femmes présentant des taux d'hormones thyroïdiennes plus élevés, alors que les hommes présentaient quant à eux des taux plus faibles que ceux observés dans le reste de la population.

5.5.2. Pesticides et hormones sexuelles

Des études expérimentales menées *in vitro* (dans un tube à essai ou sur des lignées cellulaires de culture) confirmeraient les observations selon lesquelles l'équilibre des hormones sexuelles peut être perturbé par l'exposition à certains pesticides (Kjeldsen et al., 2013). D'après Andersen et al. (2008), les fils de femmes ayant été exposés à des pesticides pendant la grossesse alors qu'elles travaillaient dans des serres pourraient souffrir de troubles du développement. Quant aux filles de femmes ayant travaillé dans des serres au Danemark pendant le premier trimestre de leur grossesse, leur poitrine se développerait plus rapidement que chez les autres jeunes filles, même à taux d'hormones égaux en âge d'aller à l'école (Wohlfahrt-Veje et al., 2012). Certains éléments suggèrent également que la fertilité serait réduite aussi bien chez l'homme que chez la femme suite à une exposition prolongée aux pesticides (Abell et al., 2000; Oliva et al., 2001). Ce phénomène est particulièrement problématique pour les personnes souffrant déjà de facteurs génétiques ou médicaux qui altéreraient leur fertilité.

5.6. Empoisonnement aux pesticides

Malgré un grand nombre de preuves d'effets nocifs graves, les données disponibles sont trop limitées pour permettre une analyse complète de l'impact global des pesticides suite à une exposition chronique. Toutefois, en 2002, le nombre de morts par auto-empoisonnement intentionnel à l'aide de pesticides a été estimé à 186 000, et certaines estimations montaient même jusqu'à 258 000 (Pruss-Ustun et al., 2011). En 2002, l'auto-empoisonnement intentionnel (suicide) à l'aide de pesticides représentait environ un tiers des suicides dans le monde et en 2004, 71 % des empoisonnements non intentionnels auraient pu être évités en améliorant les méthodes de sécurité en matière de produits chimiques (WHO, 2008; Gunnell et al., 2008). Les personnes les plus à risque pour l'empoisonnement non intentionnel aux pesticides sont les enfants, plus particulièrement entre 0 et 4 ans (Perry et al., 2014). Dans le cas des décès dus à un empoisonnement aux pesticides, la plupart étaient dus à l'ingestion d'OPP. Les cas les plus sévères d'empoisonnement aux OPP se manifestent sous la forme de

Synthèse bibliographique

syndrome cholinergique, qui se caractérise par des troubles du système nerveux central entraînant une vision brouillée, des mots de tête, des troubles de l'élocution, le coma, des convulsions et le blocage respiratoire. Dans certains cas l'empoisonnement peut engendrer une neuropathie tardive entraînant une dégénérescence progressive des cellules nerveuses. Toutefois les mécanismes à l'origine de cette pathologie sont encore peu connus (Bjørling-Poulsen et al., 2008). Ainsi, de nombreux éléments suggèrent que les personnes qui survivent à un empoisonnement aigu aux OPP pourraient souffrir d'effets négatifs à long terme sur le système nerveux. Ce rapport est destiné à décrire les menaces des pesticides pour la santé humaine, aussi bien dues à leur utilisation qu'aux conséquences plus larges de leur utilisation. Ces menaces ne constituent évidemment pas le seul problème induit par notre dépendance aux pesticides et aux systèmes non durables d'agriculture industrielle qu'ils sous-tendent.

II. Etude sur les fongicides

En agriculture, les maladies fongiques sont responsables de près de la moitié des pathologies enregistrées chez les plantes, et les pertes de production occasionnées s'élèvent à plusieurs millions de tonnes annuelles dans le monde (Lepoivre, 2003). Dans des situations extrêmes, les attaques des maladies fongiques peuvent engendrer des conséquences dramatiques aboutissant à des crises alimentaires. Les crises provoquées par certaines maladies cryptogamiques telles que le mildiou de la pomme de terre, le mildiou de la vigne, la graphiose de l'orme font que dans certains pays, elles ont été classées dans la rubrique des calamités agricoles (Rapilly, 1991). La nécessité de maîtriser ces menaces a entraîné l'émergence de la phytopathologie comme science multidisciplinaire dans le but d'améliorer nos connaissances sur les maladies et de développer des méthodes de lutte efficace.

A côté des méthodes de lutte culturales, génétiques ou biologiques, les fongicides sont largement utilisés pour combattre les maladies fongiques (Leroux and Gardan, 2003). L'emploi des fongicides en agriculture moderne a eu l'effet bénéfique d'améliorer significativement l'efficacité du contrôle des maladies, mais il a également engendré des conséquences néfastes sur l'homme et l'environnement.

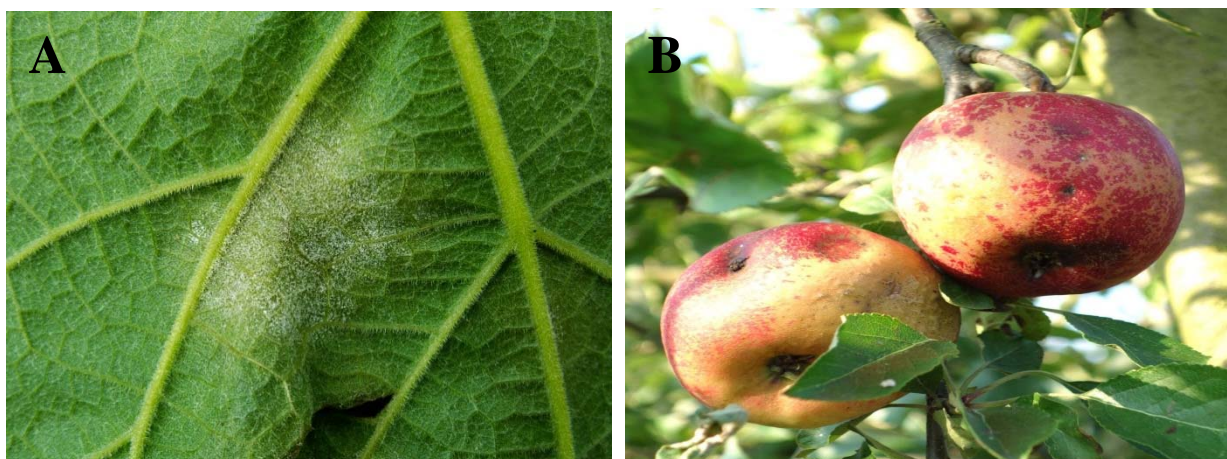


Figure 10. Maladies cryptogamiques (fongiques). A: Feuille de vigne parasitée par le mildiou (Rude, 2007), B: tavelure pommier (lepotiblog.com).

1. Mode d'action des fongicides au niveau des plantes

Selon Couvreur (2002), les fongicides peuvent être répartis en trois catégories principales, en fonction de leur comportement au niveau de la plante : contact, pénétrant ou systémique. On distingue les inhibiteurs respiratoires, les inhibiteurs de la division cellulaire, les inhibiteurs

de la biosynthèse des stérols et les fongicides affectant la biosynthèse des acides aminés et des protéines (Aubertot et al., 2005).

1.1. Les fongicides de contact

Les fongicides de ce groupe ont une activité antifongique liée exclusivement à la fraction présente au niveau des barrières externes des plantes (cuticule pour les parties aériennes) et ne subissent pas de transfert interne (figure 11). Ils ne peuvent pas franchir la barrière de la cuticule et restent à la surface du végétal (Couvreur, 2002). Les fongicides de ce groupe sont qualifiés de multi-sites parce qu'ils interagissent avec de nombreux systèmes enzymatiques. Parmi ces fongicides on distingue les **dithiocarbamates (mancozèbe, manèbe, propinèbe)**, les phtalimides (captan, folpel...) et les chloronitriles (chlorothalonil) (Marin et al., 2003).

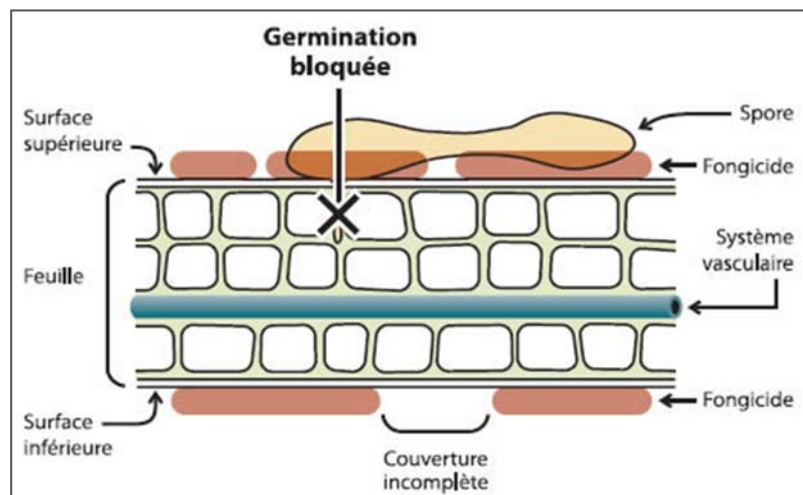


Figure 11. Action des fongicides par contact (Couvreur, 2002).

1.2. Les fongicides pénétrants

Après un transfert limité dans les plantes, ces fongicides sont susceptibles d'inhiber un parasite présent dans les tissus végétaux. Cette propriété est à l'origine de leur activité curative vis-à-vis des champignons parasites (Figure 12). Ils sont pénétrants à l'intérieur de la plante sans transport ultérieur (Ma & Michailides, 2005). Chez les champignons, la toxicité du fongicide se traduit par l'inhibition de la germination et la déformation du tube germinatif. Parmi les fongicides de ce groupe on distingue les familles des benzimidazoles (benomyl, thiabendazole) et la famille des thiophanate (thiophanate-méthyl) (Leroux & Gardan, 2003).

Synthèse bibliographique

Ces fongicides peuvent être systémiques, non systémiques et translaminaires. Lorsque le fongicide est systémique, il est plus ou moins redistribué dans toutes les parties de la plante par le système vasculaire de cette dernière (Canas-Gutierrez et al., 2009). Les fongicides translaminaires pénètrent dans les tissus de la plante sans être redistribués alors que les non-systèmeux demeurent à la surface des tissus (Zou et al., 2006). Ces produits affectent les organismes pathogènes de différentes façons : blocage de la respiration des mitochondries, inhibition de la synthèse des stérols (qui jouent un rôle vital pour le fonctionnement cellulaire) et perturbation de la division cellulaire.

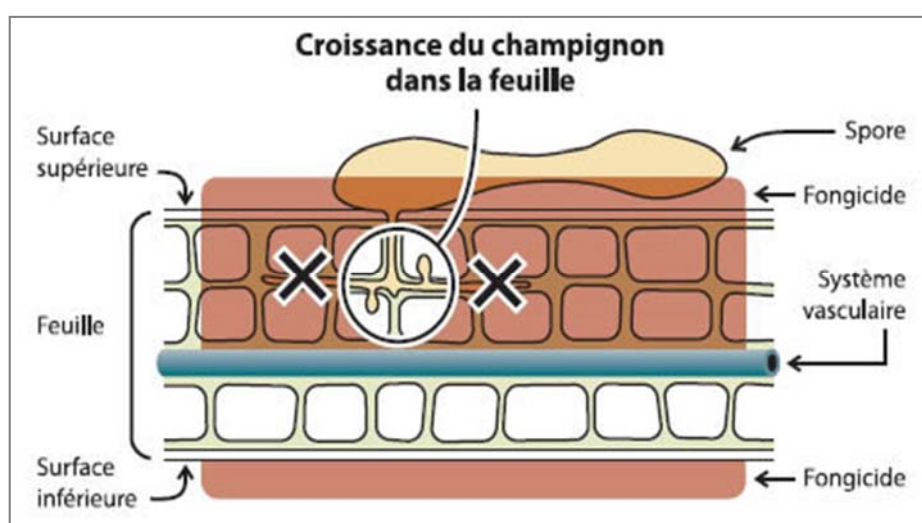


Figure 12. Action des fongicides pénétrant (Couvreur, 2002).

2. Familles ou groupes chimiques des fongicides

Les familles chimiques sont très nombreuses (plusieurs dizaines) ; chacune regroupant de très nombreux composés. En général, on peut diviser les fongicides en deux groupes : les composés minéraux et les fongicides organiques de synthèse.

2.1. Fongicides inorganiques et organométalliques

Les plus anciens fongicides connus sont de divers sels cupriques, le soufre et certains de ses dérivés minéraux. La bouillie bordelaise, un mélange d'une solution aqueuse de sulfate de cuivre est aujourd'hui encore en usage contre les maladies cryptogamiques. Il en est de même de l'oxychlorure de cuivre qui est le composé cuprique ayant été le plus largement utilisé comme fongicide par rapport aux autres dérivés de ce métal. Le soufre micronisé a aussi donné lieu à un vaste usage comme anticryptogamique, en particulier contre les maladies des plantes cultivées causées par l'Oïdium (Ramade, 2011).

Synthèse bibliographique

2.2. Fongicides organiques de synthèse

Les fongicides minéraux ont été remplacés, dans la plupart de leurs applications, par de nombreux dérivés organiques de synthèse au cours des dernières décennies. Cependant, Il en existe aujourd'hui encore de nombreuses familles aujourd'hui encore en usage. Les principales sont les organomercuriels, les organostaniques, les dérivés de l'acide carbamique et dithiocarbamique, les benzimidazoles, les dérivés des phénols, **les triazoles**, diverses diazines et triazines (Ramade, 2011).

Tableau 02 : Classification des fongicides selon les propriétés chimique. (Commission européenne, 2003).

Famille chimique	Principale matière active
1) Fongicides minéraux	Soufre, cuivre
2) Fongicides organiques de synthèse	
• Carbamates	
- dérivés de l'acide carbamique	Bénomyl, carbendazime, diéthofencarbe, thiophanate-méthyl, thiabendazole
- dérivés de l'acide dithiocarbamique	Mancozèbe, propinèbe, manèbe, zinèbe
• Dicarboximides/phtalimides	Folfet, captane
• Triazoles	Propiconazole, diniconazole, cyproconazole
• Morpholines	Diméthomorphe, dodémorphe, fenpropimorphe
• Phosphates d'éthyle	Foséthyl
• Pipéridines	Fenpropidine
• Dérivés du benzène	Chlorothalonil
• Imidazoles	Imazalil, prochloraze
• Pipérazines	Triforine

Commission européenne. Les produits phytosanitaires, la santé et l'environnement. Luxembourg (Office des publications officielles des Communautés européennes ; 2003).

III. Etudes sur l'exposition à des mélanges de pesticides

A l'heure actuelle, l'évidence de l'exposition de la population générale à des mélanges de résidus de pesticides dans l'alimentation ou l'environnement suscite l'intérêt des experts en matière de santé publique. Une même culture peut recevoir, ensemble ou séparément, différents pesticides ayant des mécanismes d'action similaires ou différents. Les agriculteurs et la population habitant dans une zone agricole sont exposés à des formulations et des mélanges de pesticides (Yanez et al., 2002).

Le dernier rapport de la commission des communautés européennes concernant le suivi des résidus des pesticides dans les produits végétaux montre que 26,7% des échantillons analysés présentent des résidus de deux ou plusieurs pesticides. Les données montrent une présence de résidus de deux à plus que huit pesticides dans 11,1% à 1,34% des échantillons respectivement (Commission of the European Communities, 2007).

En plus, près de 24% des échantillons analysés par la DGCCRF (Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes) en France en 2003 contenaient plus de 2 résidus mais à des teneurs souvent inférieures aux LMR (limite maximale de résidus) (en particuliers, salades, agrumes, pommes, fraises, raisins et poires). Les connaissances en matière d'effets combinés des pesticides sont encore très lacunaires. En général, les modèles expérimentaux utilisés pour étudier le risque toxicologique des pesticides concernent un seul produit ou différents produits testés à l'état individuel (Merhi, 2008).

Par ailleurs, les opinions concernant l'existence ou non d'une menace pour la santé humaine suite à l'exposition à des faibles doses de pesticides sont divisées. Dans une communication publiée en 2003, le parlement de la Commission Européenne déclare que «Même à faible niveau, l'exposition au cours des dernières décennies à un mélange complexe de polluants dans l'air, l'eau, la nourriture, les produits de consommation et les bâtiments, peuvent avoir un effet significatif sur l'état de santé des citoyens européens» (CEC, 2003). Claudio, en 2002 a également souligné que le risque d'une exposition à des faibles doses de contaminants environnementaux. Cependant, l'hypothèse largement adoptée par plusieurs auteurs considère qu'une exposition à des mélanges des produits chimiques aux doses bien au-dessous de la DSENO (Dose Sans Effet Nocif Observé ou NOAEL) de chaque constituant est sans problème pour la santé (Merhi, 2008).

Dans une revue récente, Kortenkamp et al en 2007 ont montré que des effets significatifs peuvent être observés en présence de combinaisons de pesticides même à des doses bien inférieures à leurs DSENO et quel que soit le mode d'action de ces produits (Kortenkamp et al., 2007). Ils ajoutent également que l'hypothèse assimilant la DSENO à une dose à « zéro effet » serait erronée parce qu'elle ne prend pas en considération le fait que des interactions beaucoup plus complexes qu'une simple additivité d'effet pourraient avoir lieu. Il ne faut donc pas exclure la possibilité d'effets sur la santé d'une exposition à des mélanges de faibles doses de pesticides (Merhi, 2008).

En revanche, cette conclusion est essentiellement basée sur les études expérimentales et, à l'heure actuelle, il n'y a aucune étude d'observation permettant de mettre en évidence l'impact d'une exposition aux pesticides à faibles doses et à long terme à laquelle la population générale est soumise.

1. Mélanges de pesticides et effets sur la santé

1.1. Les effets attendus des mélanges

Il est difficile de mettre en évidence une relation entre mélanges de pesticides et impact sur la santé pour plusieurs raisons : la variabilité de la composition des mélanges au cours de la vie professionnelle et au cours de l'année ; l'interaction entre les substances actives. S'il reste difficile d'évaluer expérimentalement toutes les combinaisons possibles, il est cependant indispensable d'évaluer les effets de mélanges représentatifs, établis sur la base réelle de mesures d'exposition (Inserm, 2013). La plupart des études sur les effets des mélanges ont été réalisées dans le cadre des travaux relatifs à la sécurité alimentaire. Elles concernent des mélanges de pesticides retrouvés fréquemment sur les fruits et légumes les plus consommés et testés à de faibles doses. Ces mélanges représentatifs de l'exposition du consommateur ne correspondent pas forcément à l'exposition du professionnel pour lequel la voie cutanée est la source d'exposition la plus plausible (Inserm, 2013).

Il a été admis pendant longtemps que les composés présents aux doses correspondant à leur NOAEL (No Observable Adverse Effect Level) et qui agissent via des mécanismes d'action différents, ne pouvaient pas exercer d'effets même lorsqu'ils étaient présents en mélange. Cependant, de nombreuses études expérimentales relatives aux perturbateurs endocriniens et à la fonction de reproduction, montrent que certains mélanges :

Synthèse bibliographique

- peuvent exercer des effets marqueurs de perturbations endocriniennes à des doses inférieures à leur NOAEL, que leur mécanisme d'action soit similaire ou différent ;
- peuvent exercer des effets cumulatifs et/ou dépendants de la dose lorsque les composés du mélange ont pour cible un même tissu.

Ainsi, l'exposition à des mélanges induit des effets variant selon les composés testés, le tissu, les paramètres biologiques ou la fonction physiologique étudiés. Quelques exemples sont présentés ci-dessous pour illustrer ces propos (Inserm, 2013).

- **Effet synergique : le mélange a un effet supérieur à celui cumulé de chacun des pesticides**

L'exposition d'amphibiens à un mélange de 9 pesticides à de très faibles doses (0,1 ppb) altère la fonction immunitaire, la différenciation sexuelle et le développement de façon plus importante que ne le font les produits seuls. Mais, dans cette étude la question reste posée de savoir si un ou plusieurs des composés du mélange contribue à l'effet (Hayes et al., 2006). L'influence des mélanges a également été testée sur des modèles de rongeurs ou de poissons en se focalisant principalement sur les conséquences au niveau d'un système biologique comme le système nerveux et le système reproducteur. Ainsi, l'exposition à un mélange de trois insecticides organophosphorés (dichlorvos, diméthoate et malathion) pendant la période périnatale chez des rats, induit des effets sur la fonction reproductive des descendants. Le mélange exerce des effets différentiels selon la dose testée sur plusieurs paramètres du système reproducteur (poids des organes reproducteurs et taux d'hormones sexuelles) alors qu'isolément ces pesticides n'exercent aucun effet sur ces paramètres (Yu et al., 2011). Certaines combinaisons binaires d'organophosphorés peuvent exercer chez le saumon des effets neurotoxiques additifs synergiques mais à de fortes concentrations (proches de la dose létale) (Laetz et al., 2009).

- **Effet synergique : le mélange a un effet supérieur à celui cumulé de chacun des pesticides selon le paramètre testé d'une fonction physiologique donnée**

Key et al. (2007) étudient la toxicité d'un mélange de trois pesticides, un herbicide et deux insecticides (atrazine, fipronil et imidaclopride) sur la larve de crevette d'herbier. Lorsqu'ils sont administrés isolément, le fipronil est le plus toxique et l'atrazine ne l'est pas du tout. En combinaison binaire avec l'atrazine, la toxicité de chacun des pesticides n'évolue pas. De même, on n'observe pas de toxicité plus qu'additive avec le mélange fipronil et

Synthèse bibliographique

imidaclopride. Mais lorsque l'atrazine est combiné aux deux autres insecticides (fipronil et imidaclopride), le mélange présente une toxicité supérieure à la toxicité additive de ces deux insecticides.

Perobelli et al. (2010) montrent qu'un mélange de 5 insecticides (dicofol, dieldrine, dichlorvos, endosulfan et perméthrine) aux doses NOAEL (No Observed Adverse Effect Level), administré par l'alimentation chez le rat mâle, exerce un effet sur certains paramètres de la reproduction (motilité des spermatozoïdes) alors que l'administration isolée de chacun des insecticides n'affecte pas ce paramètre. Christiansen et al. (2009) rapportent les mêmes conclusions à propos d'un autre type de mélange (phtalate et fongicides). Ces études montrent un effet des faibles doses des mélanges qui peut être synergique ou additif en fonction du paramètre étudié de la différenciation sexuelle. Blystone et al. (2009) observent des effets cumulatifs ou antagonistes selon la fonction ou le paramètre étudié après exposition des rats mâles à deux fongicides, la vinclozoline (fréquemment utilisée dans l'industrie viticole), et l'iprodione pendant un mois. Les résultats montrent que ces fongicides agissent sur des cibles communes d'une manière tissu spécifique quand ils sont co-administrés au rat mâle pubère.

Thiruchelvam et al. (2000) montrent que l'activité motrice des souris est altérée uniquement en présence du mélange paraquat et manèbe (5 à 10 et 15 à 30 mg/kg respectivement) et n'est pas modifiée en présence des pesticides isolés.

- **Pas d'effets additifs : le mélange a un effet identique à celui observé pour l'un ou plusieurs produits**

Un mélange de 15 pesticides, fréquemment retrouvé dans l'alimentation en Italie, administré à la dose totale de 1 mg/kg/jour pendant 10 jours, chez le rat provoque des dommages de l'ADN (oxydation des bases) dans le foie. Cet effet est dû à la seule présence de deux fongicides, la diphénylamine et le chlorothalonil (Lodovici et al., 1997). L'administration de trois organophosphorés (chlorpyrifos, méthyl parathion et malathion) en mélange n'entraîne pas de potentialisation de leur effet pro-oxydant dans différents tissus chez le rat (Ojha et al., 2011). Certaines études se sont également intéressées aux conséquences de ces expositions sur les fonctions du système nerveux. Cicchetti et al. (2005) n'observent pas d'effets synergiques de deux pesticides ayant les mêmes cibles physiologiques (paraquat, 10 mg/kg et manèbe, 30 mg/kg) sur la dégénérescence neuronale. C'est l'effet du paraquat qui prédomine.

- **Pas d'effet du mélange**

Wade et al. (2002) ont testé les effets d'un mélange complexe de contaminants environnementaux persistants qui mime la contamination réelle des canadiens du Nord (biphényles polychlorés 'PCB', 'DDT', dieldrine, endosulfan...) pendant 70 jours chez le rat. Seules les doses les plus fortes (NOAEL X1000) perturbent le métabolisme général et celui du foie et du rein. Peu d'effets sont observés sur le système immunitaire, les taux hormonaux et différents paramètres de la reproduction. Padhi et al. (2008) montrent que la plupart des gènes activés dans le cerveau des rats par les composés individuels de ce mélange retournent à un niveau « contrôle » lorsque les animaux sont exposés au mélange. Ceci montre que la co-exposition aux contaminants peut masquer les effets de chacun des composants du mélange sur l'expression des gènes du cerveau. Après exposition aux composants isolés, les profils d'expression des gènes sont différents chez le mâle et la femelle montrant ainsi que le genre est un facteur biologique influençant la réponse génomique aux contaminants environnementaux. Un mélange de 12 pesticides (alachlore, atrazine, carbofuran, chlorpyrifos, diazinon, dicofol, endosulfan, iprodione, mancozèbe, manèbe, procymidone et roténone), chacun à la dose journalière admissible, a été testé chez des rats qui présentent une hépatocarcinogénèse induite expérimentalement (Perez Carreon et al., 2009). Aucun effet de potentialisation ou de co-carcinogénicité n'a été rapporté.

- **Effet des mélanges différent de l'effet des pesticides seuls**

Le paraquat (herbicide) et le triadimefon (fongicide) n'ont pas le même impact sur la motricité selon qu'ils sont administrés seuls ou en mélange (Reeves et al., 2003) bien qu'ayant tous les deux une action sur la fonction dopaminergique. L'association paraquat triadimefon, comme le paraquat seul, inhibe un type d'activité motrice (déplacement horizontal) alors que le triadimefon seul augmente cette activité.

Le mélange à faible concentration de chlorpyrifos et de diazinon, deux insecticides organophosphorés, inhibiteurs de l'acétylcholinestérase induit chez *Caenorhabditis elegans* l'expression de gènes différents (89 gènes) de ceux induits lorsqu'ils sont administrés seuls. L'effet du mélange à faible dose n'est pas la somme des effets des pesticides seuls. Cependant, même si les gènes sont différents, les voies de signalisation activées restent les mêmes ce qui conduit à des réponses similaires (Vinuela et al., 2010).

Synthèse bibliographique

Viau et al. (2002) et Canistro et al. (2008) soulignent la complexité de l'effet des mélanges. L'influence des composés d'un mélange peut s'exercer pendant l'absorption, la distribution, la biotransformation et l'excrétion des xénobiotiques. La prédiction d'une interaction potentielle des composés nécessite la connaissance des processus de biotransformation de chaque composant du mélange ainsi que des systèmes enzymatiques impliqués. Canistro et al. (2008) montrent bien que les mélanges testés perturbent les activités des enzymes du métabolisme de xénobiotiques d'une façon très complexe et non prédictive, ce qui renforce la conviction de la difficulté de prédire les risques toxicologiques à partir de l'effet des molécules évaluées individuellement.

- **Effets des mélanges : approche mécanistique**

Dans les études *in vitro*, les résultats relatifs à l'impact des mélanges de pesticides semblent moins complexes. La plupart des études montrent un effet des mélanges supérieur à celui des pesticides seuls (Pâyne et al., 2001 ; Olgun et Misra, 2006 ; Hewitt et al. 2007 ; Valeron et al., 2009 ; Sharma et al., 2010 ; El-Demerdash et al., 2011 ; Graillet et al., 2012 ; Crepet et al., 2012) avec un effet important de la dose testée (Das et al., 2007 ; Ohlsson et al., 2010 ; Aubé et al., 2011). Des études récentes cherchent à caractériser les mécanismes moléculaires mis en jeu, et mettent en évidence des perturbations dans les processus de protection des cellules (upregulation des enzymes de détoxification, CYP3A4 et CYP3A11, et processus anti-apoptotiques) (Rouimi et al., 2012).

La complexité de l'effet des mélanges est liée aux différents niveaux d'interaction cellulaire et moléculaire des pesticides. Les pesticides peuvent affecter l'expression ou l'activité des transporteurs ABC, première barrière de l'organisme vis-à-vis des xénobiotiques. Ils peuvent moduler l'activité ou l'expression de certains cytochromes P450 impliqués dans la détoxification de nombreux composés exogènes. L'impact d'un pesticide sur ces deux systèmes cellulaires peut modifier leur propre biodisponibilité ou celle d'autres pesticides ou médicaments. De plus, la plupart des pesticides possèdent des propriétés pro-oxydantes et certains composés agissent sur l'activité de voies de signalisation impliquées dans la régulation de la croissance et de la survie cellulaire. On comprend alors aisément qu'un mélange de pesticides en interagissant à différents niveaux cellulaires et moléculaires puisse conduire à des effets non prédictibles par rapport à l'effet des pesticides seuls (Inserm, 2013).

En conclusion, les éventuels effets néfastes d'un mélange de contaminants peuvent résulter d'interactions complexes impliquant leur métabolisme, leurs différents modes d'action ou

leurs différentes cibles par exemple au niveau des voies de signalisation cellulaire. Ainsi, les démarches conceptuelles conduisant au choix des mélanges de pesticides à tester peuvent être variées.

1.2. Le choix des mélanges

Plusieurs équipes de recherche ont tenté d'examiner la toxicité de mélanges de pesticides. Certains auteurs ont testé les familles chimiques (Payne et al., 2001), d'autres ont testé l'additivité potentielle de l'effet de certains pesticides en mélange en se basant sur des données statistiques (Stork et al., 2006). D'autres auteurs ont testé les pesticides les plus récents ou ceux dont les résidus ont été retrouvés dans le sang circulant de certaines populations (Padhi et al., 2008) ou dans l'alimentation (Lodovici et al., 1994). Dans d'autres études les pesticides étaient associés à leurs composants de formulation (adjuvant ou « formulant ») ou à leurs propres métabolites (Zeljezic et al., 2006; Enoch et al., 2007). De plus, des pesticides ont été testés en combinaison car ils avaient les mêmes cibles au niveau du fonctionnement ou de la physiologie cellulaires (Canistro et al., 2008) ou ils étaient connus pour entraîner le même effet biologique chez l'animal (Jonker et al., 1993; Ito et al., 1995; Jonker et al., 1996; Marinovich et al., 1996; Feron et al., 1998; Carpy et al., 2000; Payne et al., 2001; Zeljezic et al., 2006).

Nous remarquons que, dans la majorité des études, les pesticides testés en combinaison étaient choisis dans le but de déterminer essentiellement la présence ou non d'interactions et/ou d'effet additif entre les différents composants en se basant soit sur un effet connu soit sur un mécanisme d'action bien défini. De ce fait, l'ensemble des mélanges testés comprenaient souvent des pesticides appartenant à la même famille chimique. Cependant, l'exposition réelle de la population (consommateurs ou utilisateurs de pesticides) ne se limite pas à une famille ou à un groupe de composés chimiques mais ce sont des mélanges assez complexes et variés quelques soient le pays, l'occupation, l'âge et le mode de vie. En conclusion, nous estimons que, dans le but de déterminer l'existence d'un vrai risque lié à l'exposition aux pesticides, il faudrait tester un mélange constitué de pesticides appartenant aux différentes familles et ayant des mécanismes d'action plus ou moins différents (Merhi, 2008).

2.3. Les effets observés

A l'heure actuelle, les données existantes sont insuffisantes pour conclure sur l'effet de l'exposition générale de la population aux pesticides d'une part parce que les concentrations testées ne sont pas représentatives de l'exposition réelle et d'autre part parce que les

Synthèse bibliographique

interactions révélées à ces fortes doses ne représentent pas nécessairement celles qui pourraient être observées aux faibles doses.

Dans une revue des études expérimentales effectuées entre 1985-1998, les auteurs ont conclu que l'exposition à des mélanges de pesticides à faibles doses ne présente pas un risque pour la santé humaine (Carpy et al., 2000).

Parmi les différentes études examinant les effets de mélanges de pesticides, certaines ont montré des effets significatifs *in vivo* (Stork et al., 2006; Enoch et al., 2007; Padhi et al., 2008). L'administration orale d'un mélange d'Atrazine et de ses principaux métabolites à des rates gestantes a entraîné une inhibition du développement des glandes mammaires chez les mères et les descendantes (Enoch et al., 2007). Chez des rats exposés par voie orale, une altération de l'activité motrice a été plus importante en présence de mélanges de pesticides organophosphorés à faibles doses par rapport à chaque substance testée séparément (Stork et al., 2006). Dans des cellules nerveuses humaines *in vitro* des effets d'inhibition de synthèse protéique observés avec certains pesticides (Benomyl, Azinphos, Diazinon, Pirimiphos et Diméthoate) ont été également accentués quand ces pesticides étaient testés en combinaisons (Marinovitch et al., 1996). De plus, des lymphocytes humains exposés *in vitro* à un mélange d'Atrazine et de sa formulation commerciale ont montré une augmentation des dommages à l'ADN et du nombre des cellules apoptotiques (Zeljezic et al., 2006).

Les travaux d'Astiz et al. (2009 a,b,c) ont montré que de l'exposition chronique aux pesticides chez les rats injectés *i.p.*(intrapéritonéal) Pendant 5 semaines avec des doses comprises entre 1/50 et 1/250 DL50 de diméthoate, glyphosate et zineb, seuls ou en combinaison ont augmenté l'état de stress oxydatif dans le plasma, le foie les reins et les testicules, et ont également modifié les paramètres hormonaux impliqués dans la fonction reproductrice et ces effets été plus prononcés lorsque les pesticides sont administrés en association.

De même, l'étude de Birkhøj et al. (2004) ont étudiés les effets du mélange de cinq pesticides agissant de manière dissemblable ont été analysés pour des effets antiandrogéniques *in vitro* et *in vivo*. La deltaméthrine, le méthiocarbe, le prochloraz, la simazine et le tribénuron-méthyle sont tous couramment utilisés à des fins agricoles et horticoles, les résultats ont montré que les pesticides agissaient additivement *in vitro*. *In vivo*, les changements de poids des organes indiquent que les pesticides ont un effet d'accumulation qui n'a pas été observé pour les pesticides individuels. (Gray et al., 2001) et (Price et al., 2000) sont arrivé à la même conclusion et ont trouvé que les fongicides vinclozoline et procymidone agissaient de façon

Synthèse bibliographique

additive à des doses plus faibles, comme le montrent les changements de poids d'organe dans leurs essais.

Par ailleurs Rao et al. (2005) dans une étude qui a été menée pour étudier l'effet d'une combinaison fongicide (métalaxyl + mancozeb) sur les testicules, l'épididyme et la fertilité des rats mâles adultes qui ont reçu par voie orale du métalaxyl + mancozèbe (500 mg / kg de poids corporel / jour) pendant 60 jours montrent une réduction significative du nombre de spermatozoïdes, de la motilité et de la viabilité a été observée. Les activités des testicules 3 β , 17 β hydroxysteroid deshydrogenases et les niveaux de protéines ont également diminué, les activités des phosphatases acides et alcalines et le taux de cholestérol ont également été modifiés dans les testicules suivis d'une chute du taux d'androgènes dans le sérum.

Tahir et Nour (2009) ont montré une manifestation toxique dans les paramètres hématologiques, biochimiques et histologique du foie et du rein, cette manifestation été plus accentué chez le groupe traité a la dose combinée de Triadimefon (50mg / kg) et de Propiconazole (50mg / kg) que celle du fongicide individuel (100mg / kg) et que cela peut être attribué à l'interaction des composés.

D'autre part, certaines études ont montré que l'effet d'un mélange ne reflète pas nécessairement les effets connus de ses composants. La Vinchlozoline, l'Acéphate et le Fenarimol ont été testés séparément ou sous forme de différentes combinaisons sur des cytochromes murins in vitro (Canistro et al., 2008). Une autre étude a comparé l'effet d'un mélange d'organochlorés sur l'expression des gènes au niveau du cerveau de rats exposés in vivo par rapport aux composants testés séparément (Padhi et al., 2008). Les résultats de ces deux études ont montré que l'effet d'un mélange n'était pas prédictible à partir des effets des substances prises individuellement. Les interactions possibles entre les composants d'un mélange sont donc assez complexes et rendent la prédiction de l'effet global très difficile.

Lodivici et al. ont testé un mélange de pesticides comparable à celui auquel la population générale est exposée via l'alimentation en croisant des données de consommation avec des données d'analyse de résidus de pesticides (Lodovici et al., 1994). Ces auteurs ont montré que des doses relativement faibles (comparables aux doses d'exposition du consommateur adulte) d'un mélange de 15 pesticides étaient capables de provoquer des dommages à l'ADN via un mécanisme de génération de radicaux libres au niveau de foie de rats exposés par voie orale. Par contre, dans un modèle de carcinogénèse in vivo chez le rat, Ito et al n'ont pas observé d'effets en présence de mélanges de pesticides à des faibles doses (Ito *et al.*, 1995).

Ainsi dans l'étude de Manal et al (2008) qui visait à évaluer les effets toxiques d'une préparation commerciale d'un mélange de pesticides Durasine, qui contient 60% de diazinon

Synthèse bibliographique

(DA) et 0,5% de deltaméthrine (DM), par rapport aux pesticides commerciaux individuels de 30% DA et 5% DM. La cholinestérase (ChE), le malonaldéhyde (MDA), le glutathion (GSH), la glutathion-S-transférase (GST), la superoxyde dismutase (SOD), le cholestérol total (TC), le triglycéride (TG) et les isoenzymes d'estérase non spécifiques dans le sang des mâles Des rats albinos ont été déterminés après 7 et 14 jours de traitement. Les résultats biochimiques enregistrés hebdomadairement ont été utilisés comme critères pour estimer l'action conjointe du mélange de pesticides testé. Le mécanisme de défense antioxydant et la peroxydation lipidique dans le plasma de rat ont montré les mêmes réponses avec une intensité différente selon les différents traitements. L'analyse biochimique a montré que l'administration de DA et de DM provoquait des altérations du métabolisme lipidique et de l'estérase non spécifique. Les résultats ont également révélé que le mélange induit des effets antagonistes vis-à-vis de tous les paramètres testés, à l'exception du niveau de glutathion total réduit, qui était synergétique à la 2ème semaine. L'étude a souligné l'importance d'effectuer des tests biochimiques sur le mélange commercial d'insecticides.

En conclusion, l'ensemble de ces études ne permet pas de répondre de façon définitive à la question de savoir si l'exposition de la population générale à des mélanges de contaminants présente un risque pour la santé. Cependant, elles montrent qu'il est important d'apporter un éclairage à cette question.

MATERIEL ET METHODES

Matériel et méthodes

1. Matériel et méthodes

1.1 Matériel

1.1.1. Matériel biologique

Notre étude expérimentale a été réalisée sur des rats mâles blancs (*Albinos wistar*). Ce sont des mammifères nocturnes de l'ordre de rongeurs fréquemment utilisés dans les recherches. La puberté survient entre le cinquantième et le soixantième jour après la naissance. En fonction des conditions environnementales, un rat en bonne santé peut vivre de deux ans et demi à trois ans.



1.1.2. Entretien des rats

Quarante-neuf (49) rats males provenant de l'institut Pasteur d'Alger, âgés de huit semaines avec un poids de 250 ± 50 g. Les animaux ont été élevés au sein de l'animalerie du département de biologie de l'université d'Annaba. Ils ont été soumis à une période d'adaptation aux conditions de l'animalerie d'environ deux semaines, à une température de 21 ± 2 °C, une hygrométrie de 40-60 % et une photopériode naturelle. Les rats sont logés dans

Matériel et méthodes

des cages en polyéthylène, tapissés d'une litière composée de copeaux de bois. Les cages ont été nettoyés et la litière changée une fois tous les deux jours. Les animaux ont été nourris avec un aliment sec sous forme de croquette à base de blé, maïs, orge (tableau 0) provenant du complexe agroalimentaire (ONAB, El-Kseur, Béjaia). L'eau de boisson est servie dans des biberons *ad libitum* de 250ml, et renouvelée quotidiennement.

Tableau 03. Composition de l'alimentation pour 1 kilogramme d'aliment (ONAB).

Matière alimentaire	Quantité en g/kg d'aliment	Pourcentage (%)
Mais	620	62
Soja	260	26
Phosphate	16	1.6
Calcaire	9	0.9
Cellulose	10	1.0
Minéraux	10	1.0
Vitamines	10	1.0

1.1.3. Choix des fongicides étudiés

Pour notre étude nous avons choisi de définir et de tester deux fongicides parmi les plus utilisés sur la région d'Annaba.

Dans un premier temps, nous avons commencé par une enquête sur le terrain chez les agriculteurs et le vendeur de pesticides dans la région de Annaba (El Hadjar, Ben M'hidi, Annaba) et chez différentes agences étatique (Maison de l'agriculture d'Annaba, Institut National de la Protection des Végétaux 'INPV', Alphyt), et cette démarche nous a conduit à tester 2 fongicides qui figuraient dans la liste des pesticides les plus utilisés par les agriculteurs de la région. Il s'agissait d'un premier fongicide (Propineb) qui appartient à la famille des dithiocarbamates et d'un second fongicide (Propiconazole) qui appartient à la famille des triazoles.

a. Le propineb

- **Definition et utilisations**

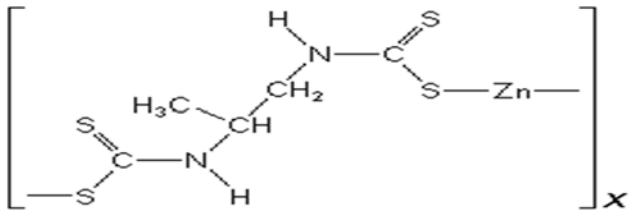
Le propylène-bis-dithiocarbamate de zinc polymérique (Propineb) est un composé largement utilisé dans les cultures de fruits et de légumes, en raison de son large spectre d'activité contre les maladies fongiques des plantes (OMS, 1998). Bien que les dithiocarbamates (DTC) soient

Matériel et méthodes

principalement utilisés en agriculture, de fortes propriétés chélatrices de métaux et antioxydantes ont favorisé une application généralisée de cette classe de composés dans de nombreux procédés industriels (OMS, 1998) et en médecine (Sauna et al., 2005).

- **Propriétés physico-chimiques du propineb**

Tableau 04. Tableau récapitulatif des propriétés physico-chimiques du Propineb (Agritox, 2004).

Activité biologique	Fongicide
Famille chimique	Carbamate EDBC
Noms chimiques	IUPAC : Polymeric zinc 1, 2-propylenebis (dithiocarbamate)
Aspect physique	Solide
Couleur	Blanc
Structure détaillé	
Structure brute	(C5 H8 N2 S4 Zn)x
Toxicité	LD 50 =5000mg/kg chez le rat
Poids moléculaire	289.8
Solubilité	Peux soluble dans l'eau

- **Absorption, distribution, élimination et métabolisme (Agritox, 2004)**

- **Absorption orale (rat) :** 50 - 66 % absorption rapide mais incomplète.

- **Accumulation (rat) :** accumulation temporaire, probablement sous forme de métabolites et particulièrement dans la thyroïde.

- **Distribution (rat) :** Principalement dans la thyroïde.

- **Élimination (rat) :** rapidement et totalement éliminé en 48 heures, principalement par l'urine (53%) et les fèces (46%).

Matériel et méthodes

- **Métabolisme (rat) :** Le propineb est dégradé principalement en propylènthiourée (PTU) ainsi qu'en PDA (propylène diamine). Alors que le PDA semble être un produit final dans l'urine et les fécès, le PTU est retransformé selon 3 voies métaboliques. Les produits finaux majoritaires sont le PU (propylène-urée) et le N-formyl-PDA.

- **Formulation du propineb utilisé**

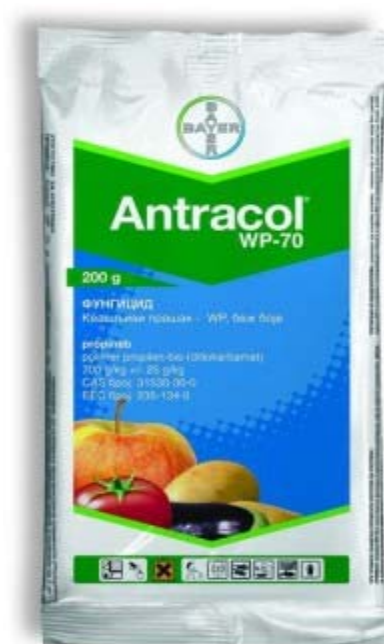


Fig 13. Emballage Antracol WP-70 (agrosava.com).

Tableau 05. Propriétés Antracol WP 70 (Index des produits phytosanitaires à usage agricole, 2015).

Nom	Antracol® WP-70
Classe	Fongicide
Matière active	Propineb 700g/kg
Formulation	Poudre mouillable
Application	Antracol® WP-70 est un fongicide de contact à action préventive
Firme	Bayer Crop Science AG
Représentant	Bayer Algérie SPA

Matériel et méthodes

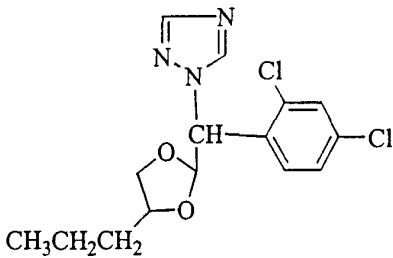
b. Le propiconazole

- Définition et utilisations

Le propiconazole est un fongicide appartenant à la famille chimique des triazoles. Il agit par inhibition de la biosynthèse de l'ergostérol, composant essentiel des membranes cellulaires de champignons. Cette substance est utilisée pour éviter la prolifération de champignons sur un certain nombre de cultures, d'arbres fruitiers et de noix, des plantes ornementales et le gazon. Elle est également utilisée pour la conservation du bois et en tant que fongicide dans les colles, adhésifs papier, textiles... (INERIS, 2014).

- Propriétés physico-chimiques du propiconazole :

Tableau 06. Tableau récapitulatif des propriétés physico-chimiques du Propiconazole (Agritox, 2010).

Activité biologique	Fongicide
Famille chimique	Triazole
Noms chimiques	1-[[[2-(2,4-Dichlorophenyl)-4-propyl-1,3-dioxolan-2-yl]methyl]-1H-1,2,4-triazole
Aspect physique	liquide visqueux
Couleur	Clair
Structure détaillé	
Structure brute	C15 H17 Cl2 N3 O2
Toxicité par gavage	LD 50 = 3000mg/kg chez le rat
Poids moléculaire	342.2
Solubilité	<u>DANS L'EAU :</u> <ul style="list-style-type: none"> • 150 mg/L à 20 °C et au pH de 5.2

Matériel et méthodes

- Absorption, distribution, élimination et métabolisme (Agritox, 2010)
 - Absorption orale (rat) : 86 % en 48 heures.
 - Accumulation (rat) : pas d'accumulation.
 - Distribution (rat) : largement distribué, les résidus les plus élevés sont dans le foie et le rein.
 - Elimination : 95 % élimination rapide en 48 heures, 50% dans l'urine, 50% dans les fèces (présence d'un cycle entétohépatique).
 - Métabolisme : très métabolisé, plus de 20 métabolites dans l'urine.
- Formulation du propiconazole utilisé



Fig 14. Emballage Tilt 250EC (syngenta.co.ke).

Tableau 07. Propriétés du Tilt 250 EC (Index des produits phytosanitaires à usage agricole, 2015).

Nom	TILTI® 250EC
Classe	Fongicide
Matière active	250 g/l propiconazole
Formulation	EC Concentré émulsionnable
Application	Curatif, Préventif, Systémique, Foliaire
Firme	SYNGENTA CROP PROTECTION AG.
Représentant	SYNGENTA AGRO SERVICES AG.

1.1.4. Traitement des rats

Après la période d'adaptation (15 jours), les rats ont été répartis au hasard en sept groupes de huit rats chacun, les rats ont été traités pendant vingt-huit (28) jours comme suit :

- ✚ Groupe 1 (T) : le groupe témoin a reçu de l'eau distillé par gavage (*per os*) durant 28jours.
- ✚ Groupe 2 (PZ) : les rats ont été traités par le propiconazole à raison de 60 mg/kg du poids corporel par gavage durant 28jours.
- ✚ Groupe 3 (PZ) : les rats ont été traités par le propiconazole à raison de 150 mg/kg du poids corporel par gavage durant 28jours.
- ✚ Groupe 4 (PB) : les rats ont été traités par le propineb à raison de 100 mg/kg du poids corporel par gavage durant 28jours.
- ✚ Groupes 5 (PB) : les rats ont été traités par le propineb à raison de 250 mg/kg du poids corporel par gavage durant 28jours.
- ✚ Groupe 6 (MIX) : les rats ont été traités traité avec la combinaison du propiconazole et du propineb à raison de 30 mg/kg/pc de PZ et de 50 mg/kg/pc de PB.
- ✚ Groupe 7 (MIX) : les rats ont été traités traité avec la combinaison du propiconazole et du propineb à raison de 75 mg/kg/pc de PZ et de 125 mg/kg/pc de PB.

NB : La durée du traitement a été évoquée dans la littérature ainsi que les doses choisies.

1.1.5. Sacrifice et prélèvements des échantillons

1.1.5.1. Sacrifices des animaux

A la fin de la période du traitement, les rats sont mis à jeun pendant une nuit. Ils sont sacrifiés le matin par décapitation, et le sang a été immédiatement recueilli dans deux tubes différents :

- ✚ L'un à EDTA : destiné au dosage des paramètres hématologiques ou formule de numération sanguine (FNS).
- ✚ L'autre sec : a subit une centrifugation à 5000 tours/min pendant 15 minutes, ensuite le sérum résultant est récupéré puis placé à -20 °C, il est destiné au dosage des paramètres biochimiques.

Matériel et méthodes

1.1.5.2. Prélèvement de certains organes

Après la dissection, le foie, les reins, les testicules et l'épididyme ont été prélevés et débarrassés de leurs tissus adipeux puis pesés. Une partie du foie et des testicules ont été stockés au congélateur à -20 °C pour le dosage des paramètres du stress oxydant. Le reste du foie et une partie des testicules ont été fixés dans le formol pour effectuer les coupes histologiques.

Matériel et méthodes

La figure 9 résume les différentes étapes du protocole expérimental.

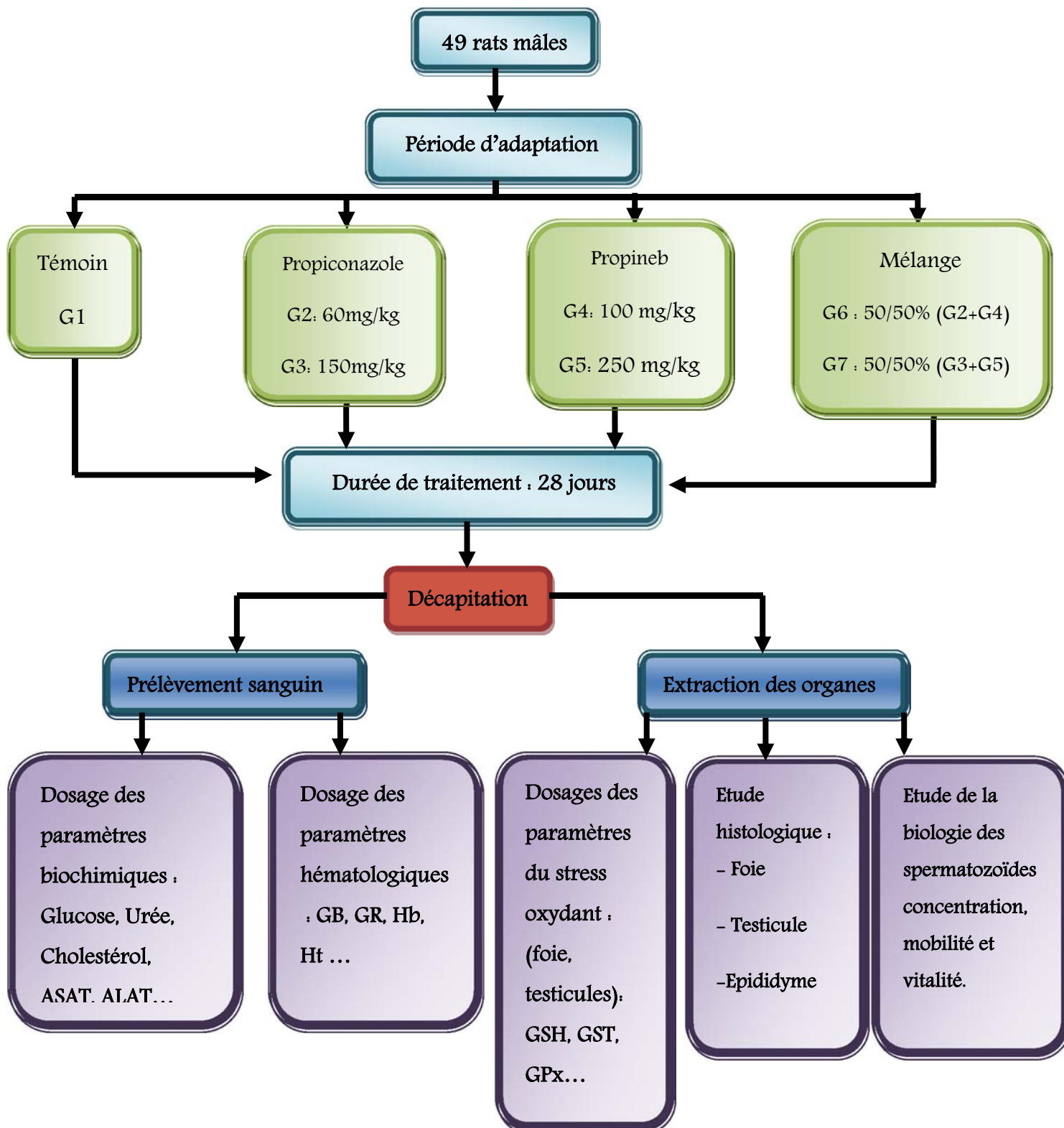


Figure 15. Schéma récapitulatif du protocole expérimental

1.2. Méthodes de dosage

1.2.1. Dosage des paramètres hématologiques


La mesure de la formule de numération sanguine a été effectuée en utilisant un automate d'hématologie (Marque: ABACUS 4). Le tube à EDTA contenant le sang est placé dans l'automate, et la mesure de la FNS commence. Au bout de 2 minutes les résultats s'affichent sur l'écran, et ensuite on les imprime. Les paramètres hématologiques mesurés sont : globule rouge (GR), globule blanc (GB), hémoglobine (Hb), hématocrite (HT), plaquettes (PLT).

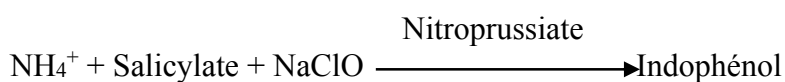
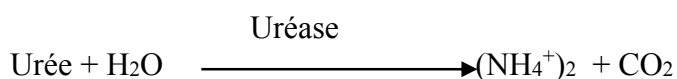
1.2.2. Dosage des paramètres biochimiques

Les paramètres biochimiques mesurés sont : l'urée, la créatinine, l'acide urique, le cholestérol, les triglycérides, les lipides totaux, aspartate aminotransférase (ASAT), alanine aminotransférase (ALAT), phosphatase alcaline (PAL), Albumine, Protéines totales.

1.2.2.1. Dosage de l'urée

Le dosage de l'urée a été réalisé par la méthode enzymatique colorimétrique selon la fiche technique du Kit Spinréact (Espagne).

 **Principe :** l'uréase hydrolyse l'urée en ammonium (NH_4^+) et dioxyde de carbone (CO_2). Les ions ammonium formés réagissent avec le salicylate et l'hypochlorite en présence du nitroprussiate, pour former un indophénol vert selon les réactions ci-dessous :



L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration de l'urée dans l'échantillon (Kaplan, 1984).

Matériel et méthodes

Réactifs

Réactif 1:	Phosphate pH 6,7	50 mM/L
Tampon	EDTA	2 mM/L
	Salicylate de sodium	400 mM/L
	Nitroprussiate de sodium	10 mM/L
Réactif 2:	Hypochlorite de sodium (NaClO)	140 mM/L
NaClO	Hydroxyde de sodium	150 mM/L
Réactif 3:	Uréase	3000 U/L
Enzymes		
Urée calibrateur	Urée aqueuse (standard)	50 mg/dL

Réactif de travail : dissoudre un comprimé de R3 dans un flacon de R1 et mélanger légèrement.


Mode opératoire :

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (mL)	1,0	1,0	1,0
Etalon (µL)	-	10	-
Echantillon (µL)	-	-	10

Mélanger et incuber 10 min à température ambiante (15-25°C).

	Blanc	Etalon	Echantillon
R2 (mL)	1,0	1,0	1,0

Mélanger et incuber 10 min à température ambiante (15-25°C). Lire l'absorbance (A) des échantillons et de l'étalon, contre le blanc à 580 nm. La couleur est stable pendant 30 minutes à 15°-25°C.


 **Calcul de la concentration :** la concentration de l'urée est calculée par la formule suivante :

$$\text{Urée (mg/dL)} = \frac{(\text{A}) \text{ Echantillon}}{(\text{A}) \text{ Etalon}} \times 50 \text{ (Concentration du calibrateur)}$$

Matériel et méthodes

1.2.2.2. Dosage de la créatinine

Le dosage de la créatinine a été réalisé par la méthode cinétique colorimétrique selon la fiche technique du Kit Spinréact (Espagne).

 **Principe :** l'essai est basé sur la réaction de la créatinine avec le picrate de sodium comme décrit par Jaffé. La créatinine réagit avec le picrate alcalin formant un complexe rouge. L'intervalle de temps est choisi pour les mesures de telle sorte qu'il évite des interférences avec d'autres constituants de sérum. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration en créatinine dans l'échantillon (Murray, 1984a).

Réactifs :


Réactif 1: Réactif picrique	Acide picrique	17,5 mM/L
Réactif 2: Réactif alcalin	Hydroxyde de sodium	0,29 mM/L
Créatinine calibrateur	Créatinine aqueuse (standard)	2 mg/dL

Réactif de travail : mélanger un volume de réactif 1 avec un volume de réactif 2. Le réactif du travail est stable pendant 10 jours à 15-25°C.

Mode opératoire :

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (mL)	1,0	1,0	1,0
Etalon (µL)	-	100	-
Echantillon (µL)	-	-	100

Mélanger, déclencher le chronomètre. Lire à 492 nm la densité optique (A1) après 30 secondes et la densité optique (A2) après 90 secondes.

 **Calcul de la concentration :** la concentration de la créatinine est calculée par la formule suivante :


$$\text{Créatinine (mg/dL)} = \frac{(\Delta A) \text{ Echantillon} - (\Delta A) \text{ Blanc}}{(\Delta A) \text{ Etalon} - (\Delta A) \text{ Blanc}} \times 2 (\text{Concentration du calibrateur})$$

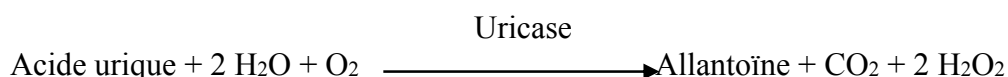
$(\Delta A) = A2 - A1$

Matériel et méthodes

1.2.2.3. Dosage de l'acide urique

Le dosage de l'acide urique a été réalisé par la méthode enzymatique colorimétrique selon la fiche technique du Kit Spinréact (Espagne).

 **Principe :** l'acide urique est oxydé par l'uricase en allantoïne et peroxyde d'hydrogène ($2 \text{ H}_2\text{O}_2$) qui, sous l'influence de la peroxydase, du 4-aminophénazone (4-AP), et du 2-4 dichlorophénol-sulfonate (DCPS), forme un composé rouge de quinonéimine donné par les réactions suivantes :



L'intensité de la coloration rouge formée est proportionnelle à la concentration de l'acide urique dans l'échantillon (Schultz, 1984).

Réactifs :

Réactif 1:	Phosphate pH 7,4	50 mM/L
Tampon	2-4 dichlorophénol sulfonate (DCPS)	4 mM/L
Réactif 2:	Uricase	60 U/L
Enzymes	Peroxydase (POD)	660 U/L
	Ascorbate oxydase	200 U/L
	4-Aminophénazone (4-AP)	1 mM/L
Acide urique calibrateur	Acide urique aqueux (standard)	6 mg/dL

Réactif de travail : dissoudre le contenu d'une bouteille de R2 dans un flacon de R1. Mélanger légèrement. La couleur est stable pendant 30 minutes.

Mode opératoire :

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (mL)	1,0	1,0	1,0
Etalon (µL)	-	25	-
Echantillon (µL)	-	-	25

Mélanger et incubé 10 min à 15-25°C. Lire l'absorbance (A) des échantillons et de l'étalon, contre le blanc à 520 nm.

Matériel et méthodes

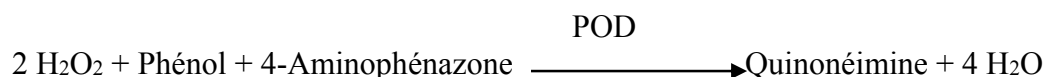
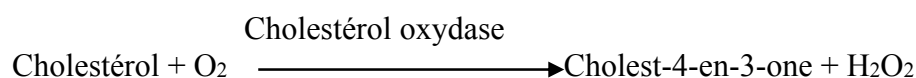
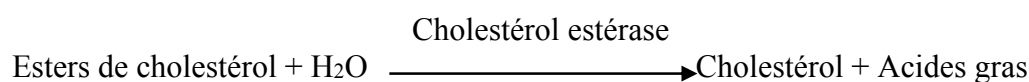
✚ **Calcul de la concentration** : la concentration de l'acide urique est calculée par la formule suivante :

$$\text{Acide urique (mg/dL)} = \frac{(\text{A}) \text{ Echantillon}}{(\text{A}) \text{ Etalon}} \times 6 (\text{Concentration du calibrateur})$$

1.2.2.4. Dosage du cholestérol

Le dosage du cholestérol a été réalisé par la méthode enzymatique colorimétrique selon la fiche technique du Kit Spinréact (Espagne).

✚ **Principe** : le cholestérol et ses esters sont libérés à partir des lipoprotéines par des détergents. Le cholestérol estérase hydrolyse les esters et le H₂O₂ est formé dans la réaction d'oxydation enzymatique du cholestérol sous l'action de la cholestérol oxydase. Le peroxyde d'hydrogène réagit avec le phénol pour produire le quinonéimine, selon les réactions ci-dessous :



L'intensité de la coloration rouge formée est proportionnelle à la concentration du cholestérol dans l'échantillon (Naito, 1984).

✚ Réactifs :

Réactif 1:	PIPES pH 6,9	90 mM/L
Tampon	Phénol	26 mM/L
Réactif 2:	Cholestérol estérase (CHE)	300 U/L
Enzymes	Cholestérol oxydase (CHOD)	300 U/L
	Peroxydase (POD)	1250 U/L
	4-Aminophénazone (4-AP)	0,4 mM/L
Cholestérol calibrateur	Cholestérol aqueux (standard)	200 mg/dL

Réactif de travail : dissoudre le contenu d'une bouteille de R2 dans un flacon de R1 et mélanger légèrement. Ce réactif est stable pendant 4 mois à 2-8°C ou 40 jours à 15-25°C.

Matériel et méthodes

Mode opératoire :

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (mL)	1,0	1,0	1,0
Etalon (µL)	-	10	-
Echantillon (µL)	-	-	10

Mélanger et incuber 10 min à température ambiante. Lire l'absorbance (A) des échantillons et de l'étalon, contre le blanc à 505 nm. La couleur est stable pendant 60 minutes.

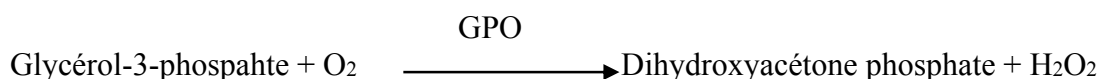
Calcul de la concentration : la concentration du cholestérol est calculée par la formule suivante :

$$\text{Cholestérol (mg/dL)} = \frac{(A) \text{ Echantillon}}{(A) \text{ Etalon}} \times 200 \text{ (Concentration du calibrateur)}$$

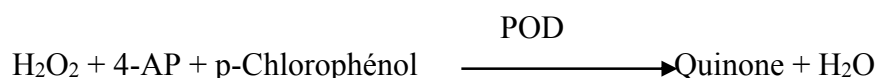
1.2.2.5. Dosage des triglycérides

Le dosage des triglycérides a été réalisé par la méthode enzymatique colorimétrique selon la fiche technique du Kit Spinréact (Espagne).

Principe : les triglycérides incubés avec la lipoprotéinlipase (LPL), libèrent le glycérol et les acides gras libres. Le glycérol est converti en glycérol-3-phosphate (G3P) et adénosine-5-diphosphate (ADP) par la glycérol kinase et l'adénosine triphosphate (ATP). Le glycérol-3-phosphate (G3P) est alors converti par la glycérol phosphate déshydrogénase (GPO) en dihydroxyacétone phosphate (DAP) et peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Dans la dernière réaction, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) réagit avec 4-aminophénazone (4-AP) et p-chlorophénol en présence de la peroxydase (POD) pour donner une coloration rouge. Le protocole comprend donc les réactions suivantes :



Matériel et méthodes



L'intensité de la coloration rouge formée est proportionnelle à la concentration des triglycérides dans l'échantillon (Bucolo et David, 1973).

❖ Réactifs :

Réactif 1:	GOOD pH 7,5	50 mM/L
Tampon	p-Chlorophénol	2 mM/L
Réactif 2:	Lipoprotéine lipase (LPL)	150000 U/L
Enzymes	Glycérol kinase (GK)	500 U/L
	Glycérol-3-oxydase (GPO)	2500 U/L
	Peroxydase (POD)	440 U/L
	4-Aminophénazone (4-AP)	0,1 mM/L
	ATP	0,1 mM/L
Triglycérides calibrateur	Triglycérides aqueux (standard)	200 mg/dL

Réactif de travail : dissoudre le contenu d'une bouteille de R2 dans un flacon de R1 et mélanger légèrement. Ce réactif est stable pendant 6 semaines à 2-8°C ou une semaine à 15-25°C.

🚦 Mode opératoire :

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (mL)	1,0	1,0	1,0
Etalon (µL)	-	10	-
Echantillon (µL)	-	-	10

Mélanger et incuber 10 min à température ambiante. Lire l'absorbance (A) des échantillons et de l'étalon, contre le blanc à 505 nm. La couleur est stable pendant 30 minutes.

🚦 **Calcul de la concentration :** la concentration des triglycérides est calculée par la formule suivante :

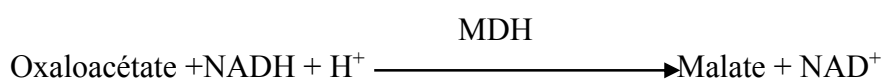
$$\text{Triglycérides (mg/dL)} = \frac{(\text{A}) \text{ Echantillon}}{(\text{A}) \text{ Etalon}} \times 200 \text{ (Concentration du calibrateur)}$$

Matériel et méthodes

1.2.2.6. Dosage de l'aspartate aminotransférase (ASAT)

Le dosage de l'aspartate aminotransférase a été réalisé par la méthode cinétique selon la fiche technique du Kit Spinréact (Espagne).

Principe : l'aspartate aminotransférase (ASAT) appelée aussi la glutamate-oxaloacétate transaminase (GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'aspartate au α -cétoglutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate est réduit au malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH+H⁺ selon les réactions suivantes :



Le taux de la diminution de la concentration en NADH+H⁺, mesuré par photométrie, est proportionnel à l'activité catalytique de l'aspartate aminotransférase (Murray, 1984b).

Réactifs :

Réactif 1:	TRIS pH 7,8	80 mM/L
Tampon	L-Aspartate	200 mM/L
Réactif 2:	NADH	0,18 mM/L
Substrat	Lactate déshydrogénase (LDH)	800
	Malate déshydrogénase (MDH)	U/L
	α -cétoglutarate	600 U/L
		12 mM/L

Réactif de travail : dissoudre un comprimé de R2 dans un flacon de R1 et mélanger légèrement. Ce réactif est stable pendant 21 jours à 2-8°C ou 72 heures à 15-25°C.

Mode opératoire :

Réactif de travail (mL)	1,0
Echantillon (μL)	100

Mélanger et incuber pendant 1 minute. Lire l'absorbance initiale (A) de l'échantillon à 340 nm. Lancer le chronomètre et lire les absorbances pendant 3 minutes à une minute d'intervalle.

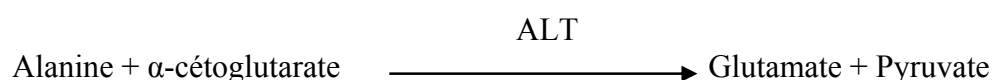
Matériel et méthodes

✚ **Calcul de la concentration :** l'activité catalytique de l'ASAT est calculée par la formule suivante : Activité de ASAT (U/L) = $\Delta A/\text{min} \times 1750$

1.2.2.7. Dosage de l'alanine aminotransférase (ALAT)

Le dosage de l'alanine aminotransférase a été réalisé par la méthode cinétique selon la fiche technique du Kit Spinréact (Espagne).

✚ **Principe :** l'alanine aminotransférase (ALAT) appelée aussi la glutamate-pyruvate transaminase (GPT) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'alanine au α -cétoglutarate formant le glutamate et le pyruvate. Le pyruvate est réduit au lactate par la lactate-déshydrogénase (LDH) et le NADH selon les réactions suivantes :



Le taux de la diminution de la concentration en $\text{NADH} + \text{H}^+$, mesuré par photométrie, est proportionnel à l'activité catalytique de l'alanine aminotransférase (Murray, 1984c).

✚ Réactifs :

Réactif 1:	TRIS pH 7,8	100 mM/L
Tampon	L-Alanine	500 mM/L
Réactif 2:	NADH	0,18 mM/L
Substrat	Lactate déshydrogénase (LDH)	1200 U/L
	α -cétoglutarate	15 mM/L


Réactif de travail : dissoudre un comprimé de R2 dans un flacon de R1 et mélanger légèrement. Ce réactif est stable pendant 21 jours à 2-8°C ou 72 heures à 15-25°C.

✚ Mode opératoire :

Réactif de travail (mL)	1,0
Echantillon (μL)	100


Mélanger et incuber pendant 1 minute. Lire l'absorbance initiale (A) de l'échantillon à 340 nm. Lancer le chronomètre et lire les absorbances pendant 3 minutes à une minute d'intervalle.

Matériel et méthodes

 **Calcul de la concentration :** l'activité catalytique de l'ALAT est calculée par la formule suivante : $\text{Activité de ALAT (U/L)} = \Delta A/\text{min} \times 1750$

1.2.2.8. Dosage de la phosphatase alcaline (PAL)

Le dosage de la phosphatase alcaline a été réalisé par la méthode cinétique selon la fiche technique du Kit Spinréact (Espagne).

 **Principe :** la phosphatase alcaline (PAL) catalyse l'hydrolyse du p-nitrophényl phosphate à pH 10,4, libérant le p-nitrophénol et le phosphate, selon la réaction suivante :



Le taux de la diminution de la concentration en $\text{NADH} + \text{H}^+$, mesuré par photométrie, est proportionnel à l'activité catalytique de la phosphatase alcaline (Wenger, 1984).

 **Réactifs :**


Réactif 1:	Diéthanolamine (DEA) pH 10,4	1 mM/L
Tampon	Chloride de magnésium	0,5 mM/L
Réactif 2:	p-Nitophénylphosphate (pNPP)	10 mM/L
Substrat		

Réactif de travail : dissoudre un comprimé de R2 dans un flacon de R1 et mélanger légèrement. Ce réactif est stable pendant 21 jours à 2-8°C ou 72 heures à 15-25°C.

 **Mode opératoire :**

Réactif de travail (mL)	1,2
Echantillon (µL)	20

Mélanger et incuber pendant 1 minute. Lire l'absorbance initiale (A) de l'échantillon à 405 nm. Lancer le chronomètre et lire les absorbances pendant 3 minutes à une minute d'intervalle.

 **Calcul de la concentration :** l'activité catalytique de la PAL est calculée par la formule suivante : $\text{Activité de PAL (U/L)} = \Delta A/\text{min} \times 3300$

Matériel et méthodes

2.3.1.1. Dosage des protéines totales

Le dosage de protéines a été réalisé par la méthode colorimétrique (selon la fiche technique Spinreact).

Les protéines forment un complexe coloré en bleu violet intensif avec les ions de cuivre dans un milieu alcalin. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration des protéines totales dans l'échantillon (Koller, 1984 ; Burtis et al., 2005).

Réactifs

Réactif (Biuret)	Tartrate de potassium sodium	15 mmol/l
	Iodure de sodium	100 mmol/l
	Iodure de potassium	5 mmol/l
	Sulfate de cuivre	19 mmol/l
Étalon	Sérum albumine bovin	7 g/dl

Mode opératoire

	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Étalon (µl)	--	25	--
Échantillon (µl)	--	--	25

Mixer et incuber 5 min à 37 °C ou 10 min à la température ambiante (15-25°C).

Lire les absorbances des échantillons et de l'étalon contre le blanc réactif à 540 nm.

La coloration finale est stable au moins 30 minutes.

Calcul de la concentration

La concentration des protéines totales est calculée par la formule suivante :

$$\text{Protéines totales (g/dl)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times \text{concentration de l'étalon (7 g/dl)}$$

1.2.3. Dosage des paramètres du stress oxydant

1.2.3.1. Dosage du glutathion (GSH)

✚ **Principe :** le dosage du glutathion a été réalisé selon la méthode de Weckbecker et Cory (1988). Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5-mercaptopurique. Ce dernier résulte de la réduction de l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (réactif d'Ellman, DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion. Pour cela une déprotéinisation de l'homogénat est indispensable afin de garder uniquement les groupements thiol spécifiques du glutathion.

✚ **Préparation de l'homogénat :** le dosage du glutathion a été fait au niveau du foie et des testicules. 200 mg de chaque tissu ont été mis en présence de 8 mL d'une solution d'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA) à 0,02 M, puis ont été broyés à froid en utilisant un broyeur ultra son (4 °C) pour obtenir un homogénat.

✚ **Mode opératoire :**

- ✚ Prélever 0,8 mL de l'homogénat.
- ✚ Déprotéiniser en ajoutant 0,2 mL d'une solution d'acide sulfosalicylique (SSA) 0,25 %.
- ✚ Agiter le mélange et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace.
- ✚ Centrifuger à 1000 tours/min pendant 5 min.
- ✚ Prélever 0,5 mL du surnagent.
- ✚ Ajouter 1 mL du tampon Tris + EDTA (0.02 M d'EDTA), pH 9,6.
- ✚ Mélanger et ajouter 0,025 mL de DTNB à 0,01 M (dissous dans le méthanol absolu).
- ✚ Laisser pendant 5 min à température ambiante pour la stabilisation de la couleur qui se développe instantanément.
- ✚ Lire les densités optiques à 412 nm contre le blanc.


✚ **Calcul de La concentration :** la concentration du glutathion est obtenue par la formule suivante:


$$[\text{GSH}] (\mu\text{M GSH/mg protéines}) = \frac{\text{DO} \times 1 \times 1,525}{13,100 \times 0,8 \times 0,5 \times \text{mg protéines}}$$

Matériel et méthodes








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

1.2.3.2. Dosage du malondialdéhyde (MDA)

 **Préparation de l'homogénat :** le dosage de MDA a été fait au niveau du foie, et des testicules. 500 mg de chaque tissu ont été mis en présence de 5 mL d'une solution de tampon phosphate (0,1 M, pH 7.4), puis ont été broyés à froid (4 °C) en utilisant un broyeur ultra son pendant 30 secondes pour obtenir un homogénat.

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

Mode opératoire :

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

Matériel et méthodes

✚ **Calcul de la concentration du MDA :** la quantité du MDA dans l'échantillon est exprimée en nM/gramme de tissu (foie ou testicule). Elle est obtenue grâce à une courbe standard réalisée avec du 1,1',3,3'-tetraethoxypropane faite dans les mêmes conditions.

1.2.3.3. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx)

✚ **Préparation de l'homogénat :** le dosage de la glutathion peroxydase a été fait au niveau du foie, et des testicules. 500 mg de chaque tissu ont été mis en présence de 5 mL d'une solution TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4), puis ont été broyés à froid (4 °C) en utilisant un broyeur pendant 30 secondes pour obtenir un homogénat.


✚ **Principe :** l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) a été mesurée par la méthode de Flohé et Günzler (1984). Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la GPx selon la réaction suivante :



✚ **Mode opératoire :**

- ✚ Prélever 0.2 mL de l'homogénat.
- ✚ Ajouter 0.4 mL de GSH (0.1 mM).
- ✚ Ajouter 0.2 mL de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4).
- ✚ Incuber au bain marie à 25°C, pendant 5 min.
- ✚ Ajouter 0.2mL de H₂O₂ (1,3 mM) pour initier la réaction, laisser agir pendant 10 minutes.
- ✚ Ajouter 1 mL de TCA (1 %) pour arrêter la réaction.
- ✚ Mettre le mélange dans la glace pendant 30 minutes.
- ✚ Centrifuger durant 10 minutes à 3000 tours /minutes.
- ✚ Prélever 0,48 mL du surnageant.
- ✚ Ajouter 2,2 mL de la solution tampon TBS.
- ✚ Ajouter 0,32 mL de DTNB (1 mM)
- ✚ Mélanger et après 5 minutes lire les densités optiques à 412 nm contre le blanc.

Matériel et méthodes


 **Calcul de l'activité enzymatique de la GPx:** la détermination de l'activité enzymatique de la GPx se fait à l'aide de la formule suivante :


$$Q = \frac{(\text{DO échantillon} - \text{DO étalon}) \times 0.04}{\text{DO étalon}}$$


- ✓ Q : Quantité de GSH disparue (oxydée)
- ✓ DO échantillon : Densité optique de l'échantillon.
- ✓ DO étalon : Densité optique de l'étalon.
- ✓ 0.04 : Concentration du substrat (GSH).

$$\text{L'activité de la GPx } (\mu\text{M GSH/min/mg protéines}) = \frac{Q}{\text{mg protéines}}$$

1.2.3.4. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (GST)

 **Préparation de l'homogénat :** le dosage de la glutathion S-transférase a été fait au niveau du foie. 500 mg de chaque tissu ont été mis en présence de 5 ml d'une solution TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4), puis ont été broyés à froid (4 °C) en utilisant un broyeur ultra son pendant 30 secondes pour obtenir un homogénat.

 **Principe :** la mesure de l'activité des GSTs a été réalisée par la méthode de Habig et al. (1974), celle-ci consiste à fournir à l'enzyme un substrat en général du 1-chloro,2,4-dinitrobenzène (CDNB), qui se conjugue facilement avec glutathion sous l'action de nombreuses formes de GST. La réaction de conjugaison de ces deux produits entraîne la formation d'une molécule nouvelle qui absorbe la lumière à 340 nm de longueur d'onde.

 **Mode opératoire :** la méthode utilisée dans cette étude consiste à faire agir les GSTs contenues dans l'homogénat sur un mélange (GSH + CDNB) à une température de 37 °C et à un pH de 6,5. La variation de la densité optique, due à l'apparition du complexe GSH-CDNB, est mesurée pendant 1 minute durant 5 minutes à une longueur d'onde de 340 nm.

Matériel et méthodes

Réactifs	Blanc (µL)	Essai (µL)
Tampon phosphate (0,1 M) pH 6,5	850	830
CDNB (0,02 M)	50	50
GSH (0,1 M)	100	100
Homogénat	-	20

✚ **Calcul de l'activité enzymatique de la GST :** l'activité enzymatique de la GST est obtenue par la formule suivante :

$$\text{L'activité de la GST (nM GSH-CDNB/min/mg protéines)} = \frac{(\text{DO échantillon/min} - \text{DO blanc/min})}{9,6 \times \text{mg protéines}}$$

- ✓ DO échantillon/min : Densité optique de l'échantillon par minute.
- ✓ DO blanc/min : Densité optique du blanc par minute.
- ✓ 9,6 : Coefficient d'extinction du GSH-CDNB exprimé en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

1.2.3.5. Dosage des protéines

✚ **Principe :** la concentration de protéines est déterminée selon la méthode de Bradford (1976) qui utilise le bleu de Coomassie (G 250) comme réactif. Ce dernier réagit avec les groupements amines ($-\text{NH}_2$) des protéines pour former un complexe de couleur bleu. (L'apparition de la couleur bleue reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité correspond à la concentration des protéines).

✚ **Mode opératoire :**

- ✚ Prélever 0,1 mL de l'homogénat.
- ✚ Ajouter 5 mL du réactif de Bradford.
- ✚ Agiter et laisser reposer 5 min.
- ✚ Lire la densité optique à 595 nm, contre le blanc.

✚ **Calcul de La concentration des protéines :** la densité optique obtenue est rapportée sur une courbe d'étalonnage préalablement tracée. La concentration des protéines est déterminée par comparaison à une gamme étalon d'albumine sérique bovine (1 mg/mL) réalisée dans les mêmes conditions.

Matériel et méthodes

1.2.4. Etude histologique

Les coupes histologiques ont été réalisées à l'hôpital d'Ibn Roched d'Annaba, Service d'Anatomie Pathologique, suivant la technique décrite par (Martoja and Martoja ,1967). La technique comporte les étapes suivantes :

1.2.4.1. Fixation des échantillons

Les organes prélevés sont immédiatement fixés au formol (10%), elle a pour but : la conservation des tissus et le durcissement des pièces. Les prélèvements réalisés sont alors mis dans des cassettes spéciales à parois tournées afin de permettre le passage des liquides.

1.2.4.2. Déshydratation des échantillons

Comme la paraffine est hydrophobe on doit auparavant déshydrater les échantillons dans des bains d'éthanol de concentration croissante (70%, 90% et 100%). Cette étape est réalisée par un automate qui permet le passage automatique et progressif des échantillons.

1.2.4.3. Inclusion des échantillons

L'inclusion consiste à mettre les pièces dans des bains de paraffine liquide. Les tissus étant maintenus et imbibés de paraffine, ils sont placés dans des moules appelés les barres de Leuckart, puis sont remplis de paraffine. Ceci facilite la confection des coupes.

1.2.4.4. Confection des coupes histologiques

Les blocs de paraffine ainsi formés vont être coupés par un microtome, permettant de réaliser des tranches de section de 2 à 5 μm . Les rubans de paraffine obtenus sont étalés sur des lames porte-objet, puis dépliés et fixés par l'eau. Les lames sont ensuite séchées dans une étuve à 100°C pendant 1 heure.

1.2.4.5. Coloration

La coloration a pour but d'accentuer les contrastes pour mieux voir les différents éléments de la préparation. Le colorant utilisé est l'Hématoxylline-Eosine (HE) selon les étapes suivantes :

Le déparaffinage des échantillons s'effectue à l'aide du xylène pour que les colorants puissent y pénétrer. Ensuite, on fait passer les lames dans des bains d'alcool de degré décroissant (100%, 90%, 70%) pour la réhydratation. Le rinçage est réalisé avec l'eau du robinet. Puis, mettre les lames dans l'hématoxylline pendant 10 à 20 minutes, celui-ci colore les noyaux en

Matériel et méthodes

violet. Après rinçage les lames sont mis dans l'eau ammoniacuée (25ml d'eau + 2 gouttes d'ammoniac), et un deuxième rinçage, puis on utilise l'éosine 1% pendant 10 minutes pour mettre en évidence le cytoplasme coloré en rose. Après un autre rinçage, on fait passer les lames dans des bains d'alcool d'ordre croissant (90%, 100%) pour les déshydrater. Enfin, nous plaçons les lames dans un mélange de 50% de xylène + 50% d'acétone, puis les lames sont mises dans deux bacs de xylène.

1.2.4.6. Montage

Le montage se fait pour protéger des échantillons des différents tissus par des lamelles en verre après la coloration, en mettant deux gouttes d'Eu kitt (colle).

Ensuite, on laisse les lames sécher, et on passe à l'observation au microscope optique équipé d'un appareil photographique.

Matériel et méthodes

1.2.5. Etude de la biologie des spermatozoïdes selon le manuelle de l'OMS, (1993)

Afin d'estimer l'effet du fongicide utilisé sur : la fertilité des rats à travers les caractéristiques des spermatozoïdes et la qualité du sperme, nous avons procédé au test du sperme selon la méthode de l'Organisation Mondiale de la Santé (1993).

Après dissection le sperme est prélevé à partir d'une petite ouverture au niveau de la queue de l'épididyme et ce pour étudier : la concentration, la vitesse, la mobilité, et la vitalité des spermatozoïdes. 1µl de sperme est dilué dans 50 µl de solution physiologique Na Cl 0,9%, mis dans une étuve à une température de 37°C.

Le spermogramme est un test qui cherche à apprécier les caractéristiques suivantes :

1.2.5.1. Concentration

La concentration des spermatozoïdes est mesurée en utilisant une cellule de Malassez.

Après le mélange de l'échantillon dilué, une goutte est introduite dans la cellule de Malassez, puis recouverte par une lamelle.

Nous procédons au comptage des spermatozoïdes dans 05 cellules au grossissement ×40.

La concentration des spermatozoïdes est calculée par l'équation suivante :

$$\text{Concentration (spz. } 10^6/\text{ml)} = (D \times V \times n) / N$$

D : coefficient de dilution (50).

V : volume de la cellule de Malassez.

n : le nombre de spermatozoïdes comptés dans 05 cellules.

N : le nombre de petites cellules.

1.2.5.2. La mobilité

Une goutte du sperme est déposée sur une lame, puis recouverte d'une lamelle. L'observation en microscope se fait au grossissement ×40. Le champ d'observation est divisé en 03, le pourcentage des spermatozoïdes mobiles est calculé pour 100 spermatozoïdes.

Matériel et méthodes

1.2.5.3. Test de vitalité (test de gonflement hypo osmotique)

Ce test est réalisé pour étudier les modifications morphologiques des spermatozoïdes.

Préparation de solution utilisée

Dissoudre 0.367g de citrate de sodium ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) et 0.675g de fructose dans 50 ml d'eau distillée, et mis dans le congélateur pour 10 mn

Après décongélation, bien mélanger la solution avant usage.

Mode de travail

Mettre 1ml de la solution placée dans un tube Eppendorf fermé dans un bain marie à une température 37°C pour 3 mn. Puis, 0.1 ml du liquide de sperme est ajouté, ensuite on laisse incuber à 37°C pendant 30mn.

Après observation au microscope à l'objectif [X40].

On Calcule le pourcentage des spermatozoïdes présentant des anomalies au niveau du flagelle sur un total de spermatozoïdes compté (OMS, 1993).

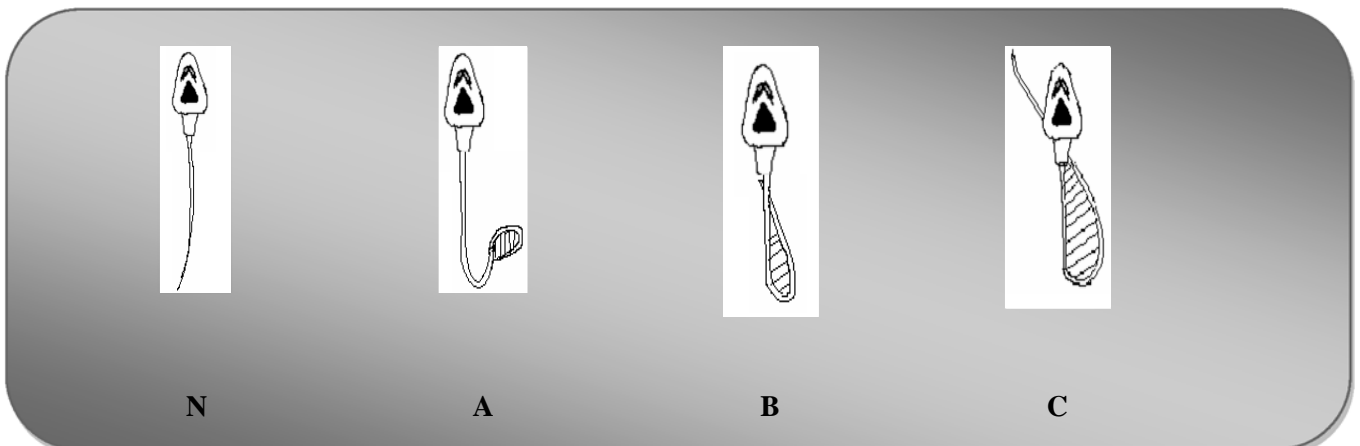


Fig16. Malformations morphologique caractéristique des spermatozoïdes exposées à un stress hypo osmotique

N : Pas de malformation au niveau de flagelle = spermatozoïde normale

A : Malformation légère du flagelle = petit nœud au niveau du flagelle

B : Malformation importante au niveau du flagelle = un nœud moyen a atteint la pièce intermédiaire

C : Malformation très importante au niveau du flagelle = un grand nœud a atteint la tête du spermatozoïde.

1.2.6. Analyse statistique des résultats

Les résultats obtenus sont exprimés en moyenne plus ou moins l'écart type (Moyenne \pm SD). L'analyse des données a été effectuée par application du test *t* de Student, qui est basé sur la comparaison des moyennes deux à deux : entre le lot témoin et chacun des lots traités, en utilisant le logiciel MINITAB (Version 13.31). Les différences sont considérées comme :

- Significatives : lorsque ($P < 0,05$).
- Hautement significatives : lorsque ($P < 0,01$).
- Très hautement significatives : lorsque ($P < 0,001$).

RESULTATS

Résultats

1. Influence du traitement sur la variation de quelques paramètres physiologiques.

1.1. Variation de la masse corporelle des rats.

Le suivi de la masse corporelle des animaux durant la période de traitement indique que l'utilisation du Pz au (G1) a la dose (60mg/kg) par voie de gavage, a induit une diminution significative ($P < 0.05$) puisque la moyenne de la masse corporelle des rats traités était (285.66 ± 8.82) au début du traitement pour atteindre la masse moyenne de (275.8 ± 16.8) à la fin de la période de traitement (28 jours) comparés au groupe témoin. Le même résultat a été enregistré avec la deuxième dose (G2) (150 mg /kg) du même fongicide avec une diminution du poids corporel mais avec un résultat non significative. Par contre, le deuxième fongicide le Propineb, malgré qu'il appartient à la famille des dithiocarbamates connus pour avoir un effet sur la thyroïde, ainsi que le mélange des deux produits dans les conditions de l'expérimentation semble n'avoir causé aucun effet significatif toujours comparés au groupe des animaux non traités, avec une augmentation non significative du poids corporel pour les groupes 4 et 5, et une diminution non significative du poids corporel pour les groupes 6 et 7 traités au mélange (Tableau 08).

Tableau 08. Variation de la masse corporelle (g) des rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).

Paramètres	Groupes expérimentaux						
	T (G1)	PZ (G2)	PZ (G3)	PB (G4)	PB (G5)	MIX (G6)	MIX (G7)
Masse initiale(g)	287.66 ± 15.43	285.66 ± 8.82	288.66 ± 9.94	288.5 ± 16.35	289.83 ± 19.78	287.33 ± 10.74	287.83 ± 14.32
Masse finale (g)	302.2 ± 21.4	$275.8 \pm 16.8^*$	267.33 ± 23.44	290.0 ± 19.2	297.5 ± 12.53	284.7 ± 11.2	273.0 ± 17.05
Gain/Perte de poids(g)	+ 14.54	- 9.86	-21.33	+ 2.5	+7.67	- 2.63	-14.83

* ($P < 0,05$) : Différence significative comparant au témoin.

Résultats

1.2. Variation de la consommation quotidienne de l'aliment et de l'eau de boisson.

Dans notre étude, le suivi de la consommation de l'aliment (g) pour chaque groupe ainsi que celle de l'eau de boisson (ml) est résumé dans le tableau 09. Ces résultats ont mis en évidence une diminution significative de la consommation quotidienne de l'aliment et de l'eau chez les groupes traités au Pz (G2 et G3), Pb (G4) et au mélange (G6 et G7) ce résultat n'a pas été observé que chez le groupe traité Pb (G5) avec une diminution non significative de la consommation de l'aliment et une augmentation non significative pour celle de l'eau de boisson (Tableau 09).

Tableau 09. Variation de la consommation d'aliment (g/lot/j) et de l'eau de boisson (ml/lot/j) chez les rats témoins (T) et les rats traités après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).

Paramètres	Groupes expérimentaux						
	T (G1)	PZ (G2)	PZ (G3)	PB (G4)	PB (G5)	MIX (G6)	MIX (G7)
Quantité d'aliment consommée (g/groupe/j)	113.77 ± 4.74	93.5 ± 11***	96.12 ± 8.88***	105.73 ± 4.36***	112.12 ± 9.75 ns	103.50 ± 4.81***	93.19 ± 10.83***
Quantité d'eau consommée (ml/groupe/j)	182.57 ± 7.95	145.3 ± 27.5***	163.14 ± 25.72**	169.9 ± 26.9*	193.05 ± 28.89 ns	168.1 ± 16.9***	154.38 ± 37.08**

** ($P < 0,01$) : Différence hautement significative comparant au témoin.

*** ($P < 0,001$) : Différence très hautement significative comparant au témoin.

Résultats

2. Influences du traitement sur les paramètres hématologiques.

Nos résultats (Tableau 10) révèlent que le traitement des rats par les deux fongicides et le mélange pendant 28 jours provoque une augmentation significative ($P < 0,05$) des globules blancs chez les groupes traités au Pb (G4 et G5) et une augmentation hautement significative de celle-ci ($P < 0,01$) chez les autres groupes traité au Pz (G2 et G3) et Mix (G6 et G7). Une diminution significative des globules rouges ($P < 0,05$) est observé chez les rats des groupes Pz (G2 et G3) et G7 traité au mélange. De plus nous avons enregistré toujours une baisse significative ($P < 0,05$) de l'hémoglobine chez tous les groupes traités à la dose la plus forte chez les rats traités. Une diminution significative ($P < 0,05$), hautement significative ($P < 0,01$) des plaquettes a été observée chez les groupes Pz G2 et G3, respectivement par rapport au groupe témoin.

Tableau 10. Variation des paramètres sanguins chez les rats témoins (T) et les rats traités après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).

Paramètres	Groupes expérimentaux						
	T (G1)	PZ (G2)	PZ (G3)	PB (G4)	PB (G5)	MIX (G6)	MIX (G7)
GB ($10^3/\text{mm}^3$)	10.87 \pm 1.65	18.11 \pm 2.24**	17.91 \pm 1.35**	14.58 \pm 2.95*	17.52 \pm 3.83*	15.93 \pm 3.24**	19.73 \pm 2.85**
GR($10^6/\text{mm}^3$)	9.35 \pm 0.29	8.36 \pm 0.64*	8.42 \pm 0.73*	8.78 \pm 0.59	9.08 \pm 0.38	8.99 \pm 0.49	8.81 \pm 0.53*
Hb (g/L)	151.5 \pm 6.35	141.33 \pm 13.98	134.4 \pm 12.6*	145.17 \pm 10.42	144.33 \pm 4.03*	144.83 \pm 6.43	138.33 \pm 10.63*
Hct (%)	40.27 \pm 3.55	38.52 \pm 3.31	38.77 \pm 3.21	39.28 \pm 1.14	39.56 \pm 1.99	39.82 \pm 0.93	39.48 \pm 2.31
PLT($10^3/\text{mm}^3$)	342.3 \pm 124	166.3 \pm 48.8*	195 \pm 79**	229 \pm 104	240.7 \pm 68.5	252 \pm 144	224.8 \pm 64.9

* ($P < 0,05$) : Différence significative comparant au témoin.

** ($P < 0,01$) : Différence hautement significative comparant au témoin.

Résultats

3. Influence du traitement sur la fonction hépatique.

Afin d'évaluer l'hépatotoxicité des fongicides utilisés, nous avons dosés les paramètres biochimiques et réaliser des coupes histologiques en relation avec l'activité hépatique.

3.1. Variation de la masse absolue du foie.

La variation de la masse absolue du foie chez les différents groupes traités révèle une augmentation significative qui a atteint (8.24 ± 1.01 , 8.336 ± 0.626 , 7.768 ± 0.63 , 8.065 ± 0.792 , 8.033 ± 0.825 et 8.38 ± 0.825 g) chez les groupes 2, 3, 4, 5, 6 et 7 respectivement en comparaison au groupe témoin, dont la masse est (7.099 ± 0.203 g) (Tableau 11, Figure 17).

Tableau 11. Variation de la masse absolue du foie (g) chez les rats témoins (T) et les rats traités après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).

Paramètres	Groupes expérimentaux						
	T (G1)	PZ (G2)	PZ (G3)	PB (G4)	PB (G5)	MIX (G6)	MIX (G7)
Poids foie (g)	7.099 ± 0.203	$8.24 \pm 1.01^*$	$8.336 \pm 0.626^{**}$	7.768 ± 0.63	$8.065 \pm 0.792^*$	$8.033 \pm 0.825^*$	$8.38 \pm 0.608^{**}$

* ($P < 0,05$) : Différence significative comparant au témoin.

** ($P < 0,01$) : Différence hautement significative comparant au témoin.

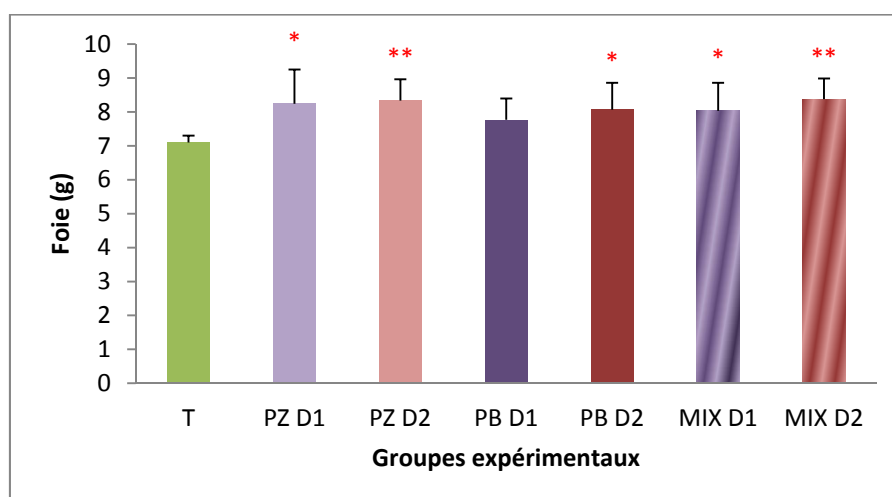


Figure 17. Variation de la masse absolue du foie (g) chez les rats témoins (T) et les rats traités après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).

3.2. Effet sur l'activité des aminotransaminases.

Le gavage orale des rats par le Pz, Pb et le mélange des deux produits a entraîné des troubles du métabolisme biochimique, caractérisés par une augmentation hautement significative ($P < 0.01$) de l'activité enzymatique de l'ASAT chez tous les groupes traités Pz (G2 et G3) et Pb (G4 et G5) et une augmentation significative ($P < 0.05$) chez les rats traités au mélange (G6 et G7) comparé aux rats témoins. Nous enregistrons aussi une augmentation significative ($P < 0.05$) dans la concentration de l'ALAT chez les groupes traités Pz (G2 et G3) et Mix (G7) et une augmentation non significative pour les autres groupes toujours comparé au groupe témoin (Tableau 12, Figure 18).

3.3. Effet sur l'activité de la phosphatase alcaline.

Nos résultats (Tableau 12, Figure 19) illustrent une augmentation significative ($P < 0.05$) de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline enregistrée chez le groupe traité au Pz (G2), Pb (G4), Mix (G5 et G7), le groupe traité au Pz (G3) montre une augmentation très hautement significative ($P < 0.001$) comparés au groupe témoin.

3.4. Effet sur la concentration sérique en protéines totales et en albumine.

Les résultats obtenus indiquent une augmentation significative et hautement significative de la concentration sérique en protéines totales chez tous les groupes traités; de même, le dosage de l'albumine révèle une diminution hautement significative de sa concentration sérique chez les différents groupes de rats traités (Tableau 12, Figure 18).

Résultats

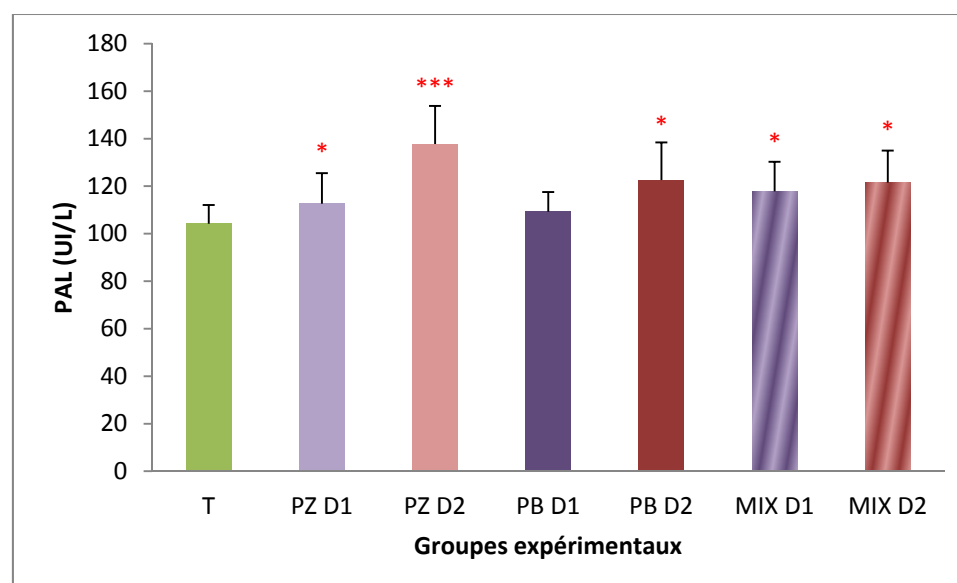
Tableau 12. Variation de quelques paramètres biochimiques (PAL, ASAT, ALAT, Albumine et protéines totales) chez les rats témoins (T) et les rats traités après 28 jours de traitement (M \pm SD, n = 7).

Paramètres	Groupes expérimentaux						
	T (G1)	PZ (G2)	PZ (G3)	PB (G4)	PB (G5)	MIX (G6)	MIX (G7)
PAL (UI/L)	104.18 \pm 7.89	118.6 \pm 12.9*	137.72 \pm 16.04***	109.28 \pm 8.25	122.57 \pm 15.84*	117.8 \pm 12.5*	121.52 \pm 13.49*
ASAT (UI/L)	20.19 \pm 5.02	32.51 \pm 6.69**	39.56 \pm 9.33**	30.96 \pm 7.48**	36.96 \pm 8.13**	27.56 \pm 4.02*	35.22 \pm 13.38*
ALAT (UI/L)	109.7 \pm 17.4	128.8 \pm 11.5*	139.7 \pm 30.7*	116.9 \pm 16.9	121.30 \pm 21.39	118.4 \pm 15.7	131.32 \pm 20.52*
Albumine (g/dl)	38,16 \pm 5.63	28.64 \pm 3.43**	28.36 \pm 2.37**	28.31 \pm 2.82**	28.66 \pm 3.64**	28.51 \pm 3.01**	26.84 \pm 2.84**
Protéine T (g/l)	71.37 \pm 9.35	92.30 \pm 4.24***	95,42 \pm 5.18***	85.38 \pm 6.95**	88,52 \pm 7,15*	81.08 \pm 4.78*	84,35 \pm 7.26*

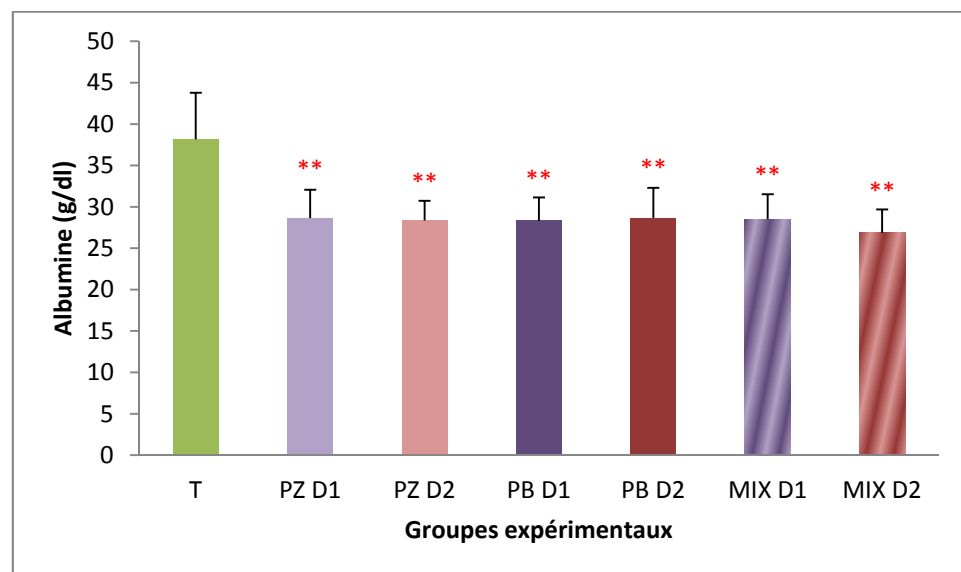
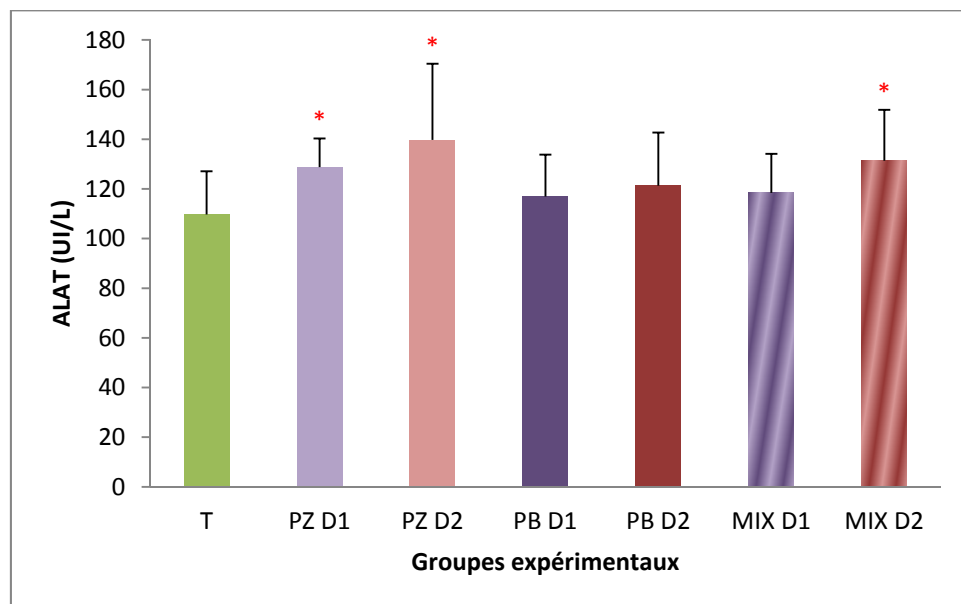
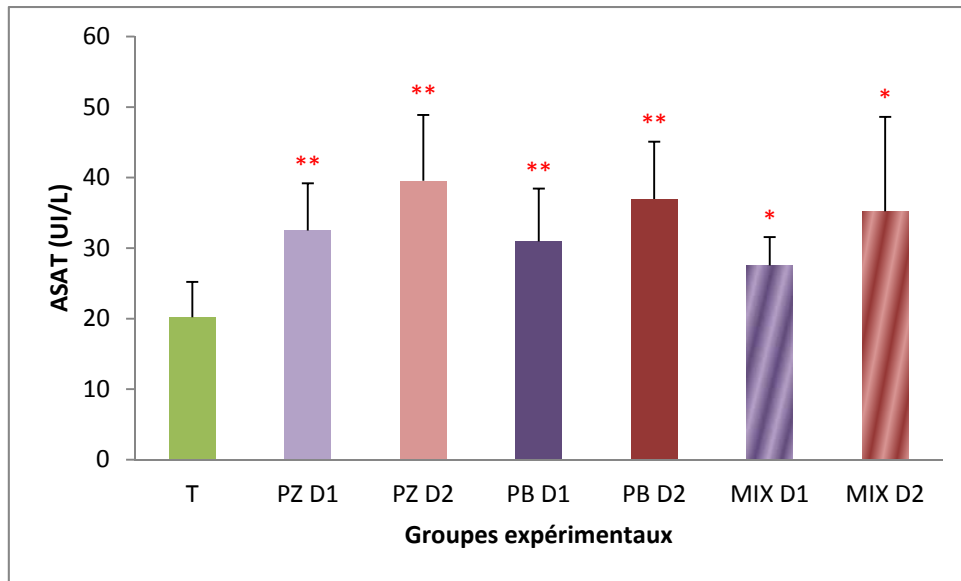
* (P< 0,05) : Différence significative comparant au témoin.

** (P< 0,01) : Différence hautement significative comparant au témoin.

*** (P< 0,001) : Différence très hautement significative comparant au témoin.



Résultats



Résultats

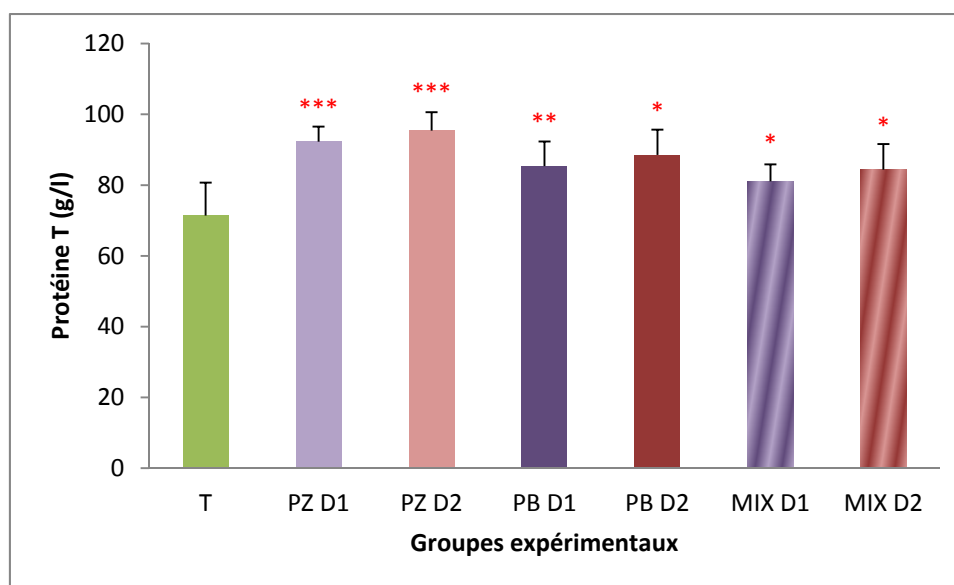


Figure 18. Variation de quelques bio-marqueurs liés à l'activité hépatique (PAL, ASAT, ALAT, Albumine et protéines totales) chez les rats témoins (T) et les rats traités après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).

3.5. Observation macroscopique du foie.

Les photographies du foie des rats témoins présentait une apparence normale de foie (figure 19, a). En revanche, l'observation macroscopique (fig. 19, b, c, d) du foie des groupes traités (Pz, Pb et Mix) après 28 jours de traitement montre des changements morphologiques, avec présence de nodules irréguliers sur les surfaces hépatiques.

3.6. Etude histologique du foie.

La figure 20 illustre l'effet des fongicides utilisés et leur mélange sur le tissu hépatique des rats. Nous constatons que le groupe témoin (microphotographie A) montre un parenchyme hépatique d'aspect normal présentant des espaces portes ainsi que des lobules hépatiques régulier centré par une veine centrolobulaire.

Par contre la photo B montre le foie du groupe traité au Propiconazole nous remarquons essentiellement une congestion vasculaire avec une hypertrophie de l'hépatocyte, des élargissements des espaces portes renferment une infiltration inflammatoire lymphocytaire, indiquant des signes de souffrance hépatocytaire de type lobulisation et clarification cytoplasmique.

Concernant l'effet du deuxième fongicide, Propineb sur le même tissu. Nous observons dans la photo C un parenchyme hépatique présentant des changements morphologique et présente

Résultats

des sièges de discrets remaniements congestifs et inflammatoires qui sont représentés ici par quelques parois vasculaires congestives à lumière gorgée d'hématies.

Pour le groupe d'animaux traités au mélange des deux fongicides (D), l'étude histologique du foie montre un aspect identique à celui observé dans le tissu hépatique des rats traité au Propiconazole.

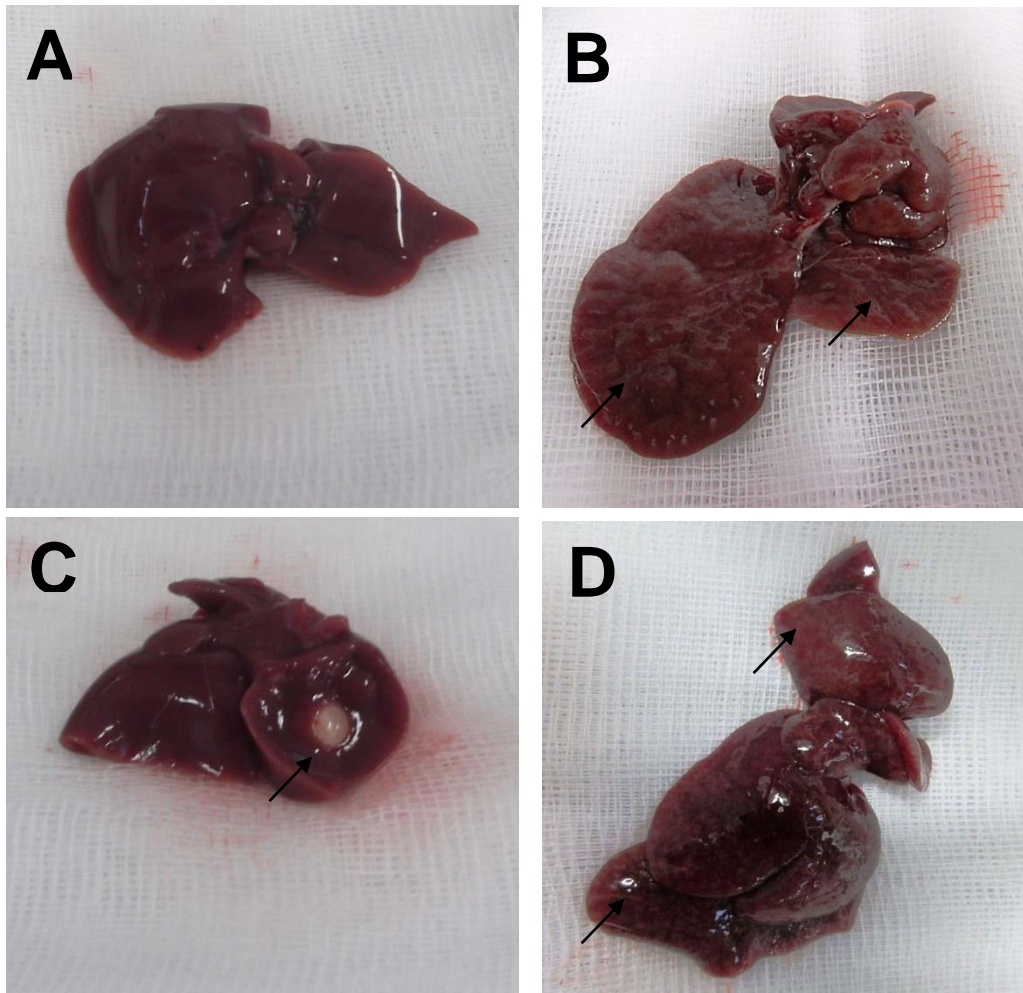


Figure 19. Photographies illustrant les changements morphologiques bruts du foie des rats témoins (T) et les rats traités (PZ, PB et MIX) après 28 jours de traitement A: foie normal du rat témoin, B: rat traité au propiconazole 60 mg / kg, C: rat traité au propineb 100 mg / kg, D : rat traité au mélange (30 mg/kg propiconazole + 50 mg/kg propineb). Flèches: présence de nodules irréguliers sur les surfaces hépatiques.

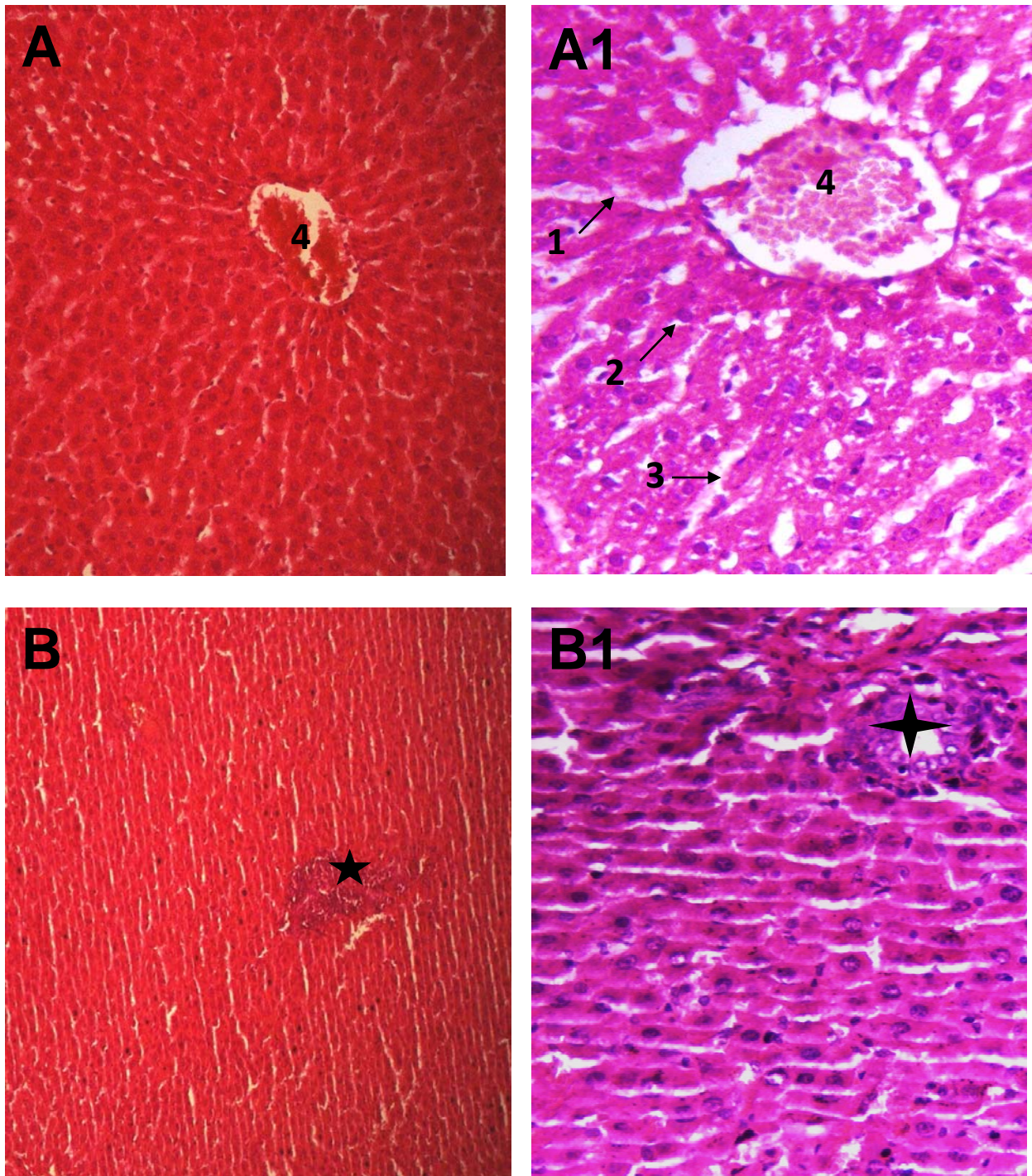


Figure 20 (suite). Coupes histologiques du foie (Gr x 100) et (Gr x 400) des rats témoins (T [A] et [A1]) et traités (PZ [B] [B1]; PB [C] [C1]; MIX [D] [D1]) après 28 jours de traitement. 1 : Veine centrolobulaire ; 2 : Travées de Remak ; 3 : Les capillaires sinusoides ; 4 : La veine centrolobulaire.

★ Nécrose et infiltration des cellules inflammatoires

✦ Congestion vasculaire

→ Changements morphologique

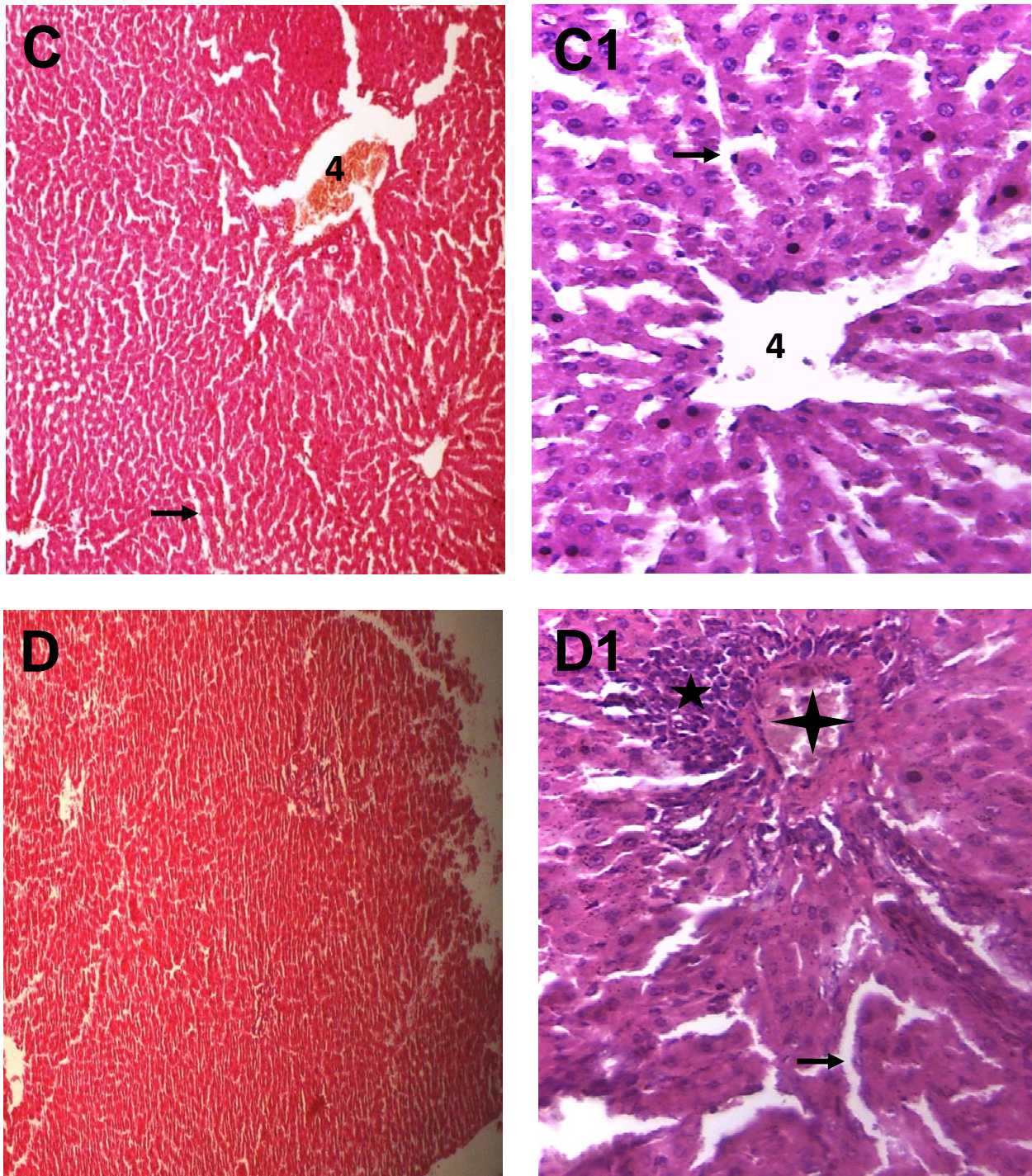


Figure 20 (suite). Coupes histologiques du foie (Gr x 100) et (Gr x 400) des rats témoins (T [A] et [A1]) et traités (PZ [B] [B1]; PB [C] [C1]; MIX [D] [D1]) après 28 jours de traitement. 1 : Veine centrolobulaire ; 2 : Travées de Remak ; 3 : Les capillaires sinusoides ; 4 : La veine centrolobulaire.

- ★ Nécrose et infiltration des cellules inflammatoires
- ✦ Congestion vasculaire
- Changements morphologique

Résultats

4. Influence du traitement sur la fonction rénale.

4.1. Variation de la masse absolue du rein.

La variation de la masse absolue des organes révèle une augmentation significative ($P < 0.05$) de la masse des reins chez le groupe traité Pz (G2) en comparaison au groupe témoin (Tableau 13, Figure 21).

Tableau 13. Variation de la masse absolue des reins (g) chez les rats témoins (T) et les rats traités après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).

Paramètres	Groupes expérimentaux						
	T (G1)	PZ (G2)	PZ (G3)	PB (G4)	PB (G5)	MIX (G6)	MIX (G7)
Poids Rein (g)	0.9143 ± 0.071	1.005 ± 0.065*	0.976 ± 0.07	0.905 ± 0.112	0.905 ± 0.047	0.921 ± 0.104	0.909 ± 0.125

* ($P < 0,05$) : Différence significative comparant au témoin.

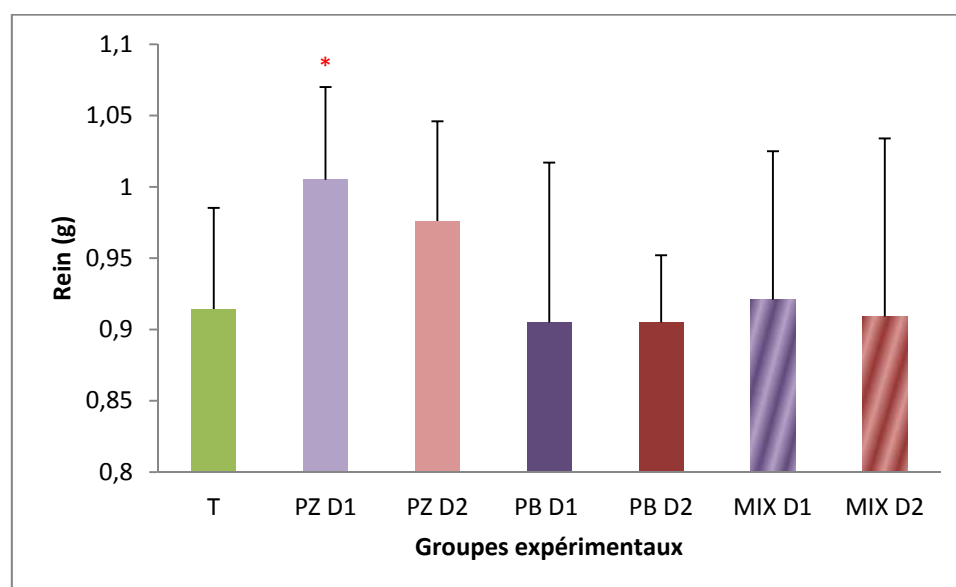


Figure 21. Variation de la masse absolue des reins (g) chez les rats témoins (T) et les rats traités après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).

Résultats

4.2. Effet sur les marqueurs rénaux.

Les résultats du tableau 14 et de la figure 22 illustrent une augmentation significative ($P < 0.05$) de l'urée chez le groupe traité au mélange (G6) et une augmentation hautement significative chez les rats traités Pz (G2) et Mix (G7), les résultats de ce même marqueur chez tous les groupes traités Pb (G4) et (G5) comparé au témoin a été très hautement significative ($P < 0.001$). Aussi on observe une augmentation mais non significative de la créatinine chez les groupes traités Pb (G4) et Mix (G6) et (G7), une augmentation significative dans les groupes traités au Pz (G3) et Pb (G5) et une augmentation hautement significative ($P < 0.01$) chez le groupe traité Pz (G2). Le taux de l'acide urique augmente significativement chez les rats traités Mix (G6), l'augmentation de ce marqueur chez les autres groupes traités et hautement significative ($P < 0.01$) comparant toujours aux rats témoins.

Tableau 14. Variation de la concentration sérique de l'urée, créatinine et acide urique chez les rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).

Paramètres	Groupes expérimentaux						
	T (G1)	PZ (G2)	PZ (G3)	PB (G4)	PB (G5)	MIX (G6)	MIX (G7)
Urée (g/l)	35.86 ± 8.55	51.00 ± 8.29**	53.86 ± 12.75**	55.71 ± 7.91***	52.00 ± 9.49***	47.57 ± 5.71*	50.00 ± 3.46**
Créatinine (mg/l)	5.18 ± 0.98	7.15 ± 1.29**	7.27 ± 1.28*	5.87 ± 0.95	6.91 ± 1.41*	5.79 ± 0.57	6.34 ± 0.70
Acide U. (mg/l)	28.02 ± 4.0	38.37 ± 2.8**	42.50 ± 4.2**	35.83 ± 2.4**	35.00 ± 3.74**	32.17 ± 1.7*	37.53 ± 2.86**

* ($P < 0,05$) : Différence significative comparant au témoin.

** ($P < 0,01$) : Différence hautement significative comparant au témoin.

*** ($P < 0,001$) : Différence très hautement significative comparant au témoin.

Résultats

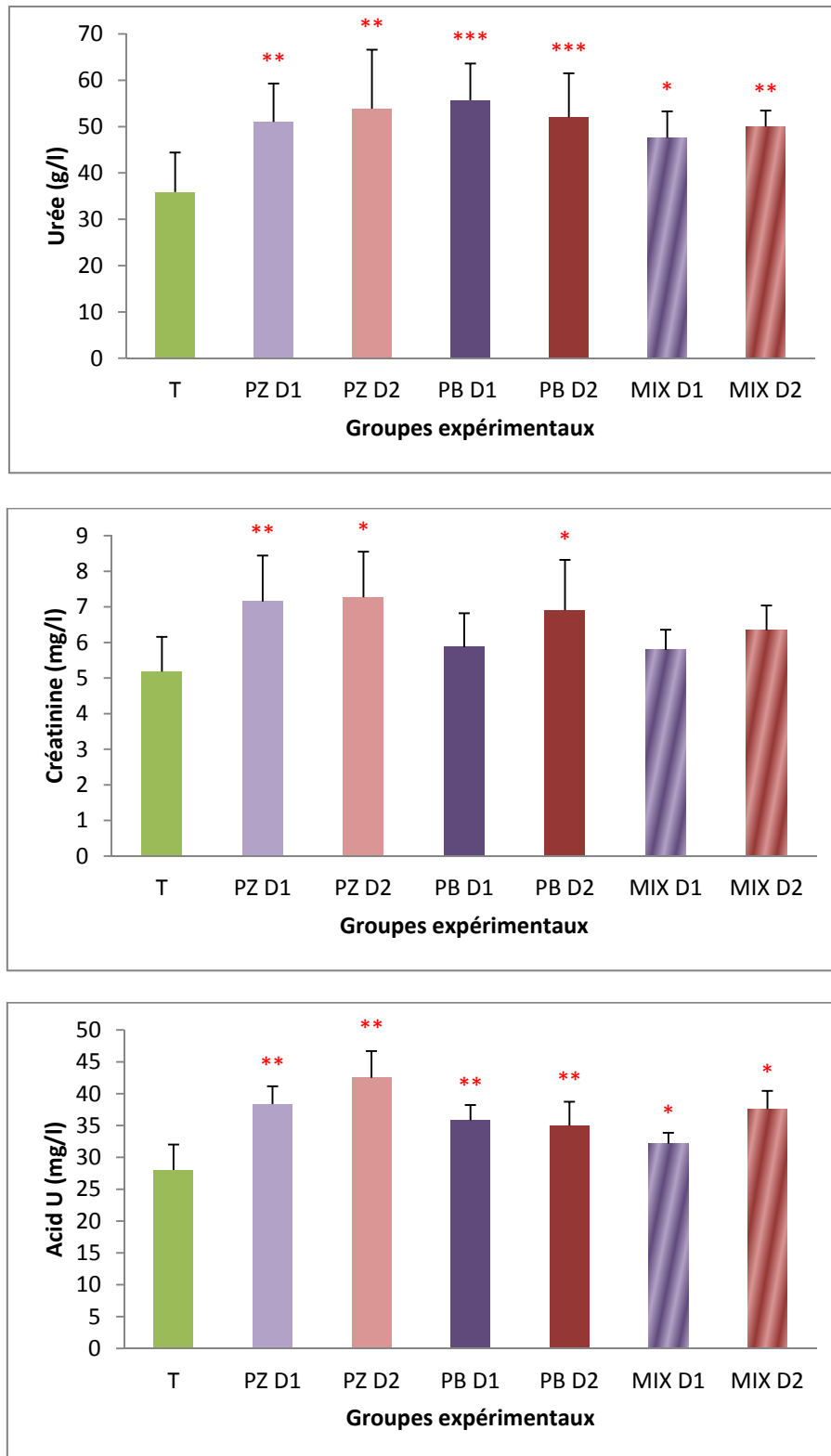
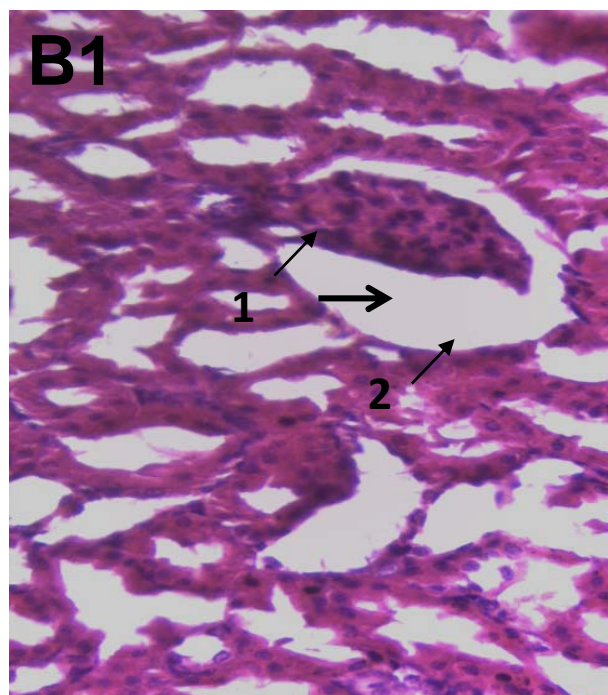
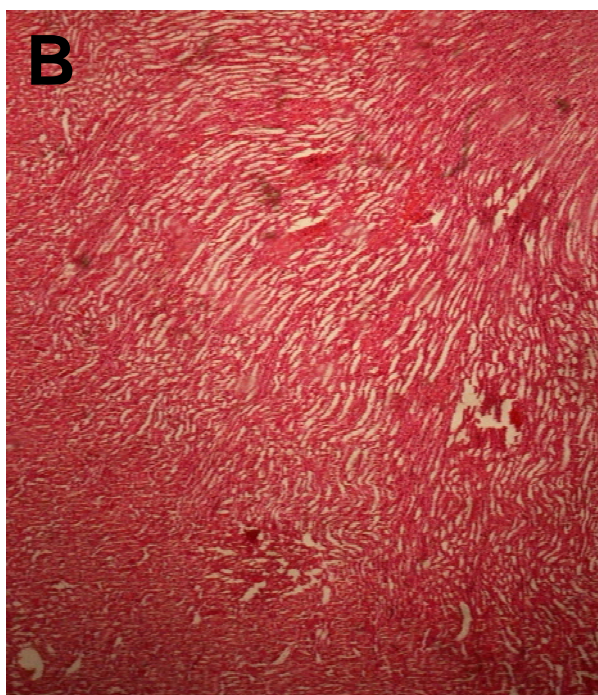
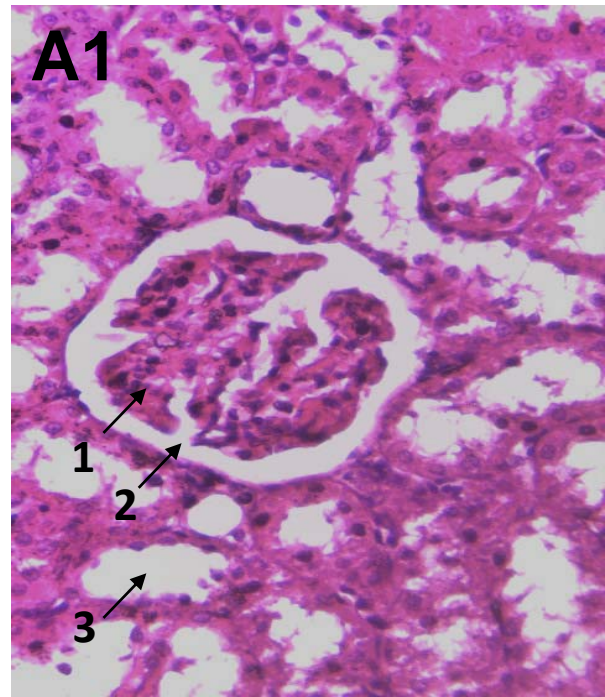
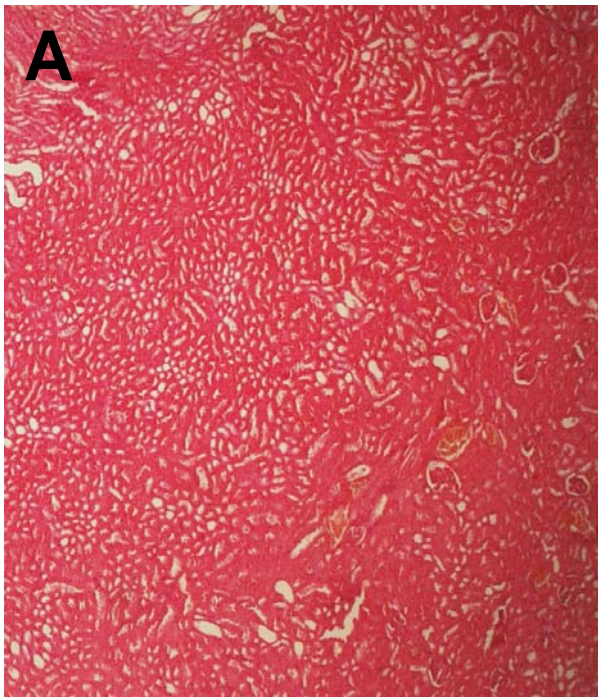


Figure 22. Variation de la concentration sérique de l'urée, créatinine et acide urique chez les rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).

4.3. Etude histologique du rein.

l'observation microscopique des coupes histologiques rénales des rats du groupe témoin a montré un parenchyme rénal normal avec des glomérules et des tubules bien définis (figure 23, A). Pour les groupes de rats traités au propiconazole (B), propineb (C) et le mélange (D) les altérations histologiques sont représentées essentiellement par des remaniements congestifs, des dilatations tubulaires et d'une dégénérescence des glomérules rénaux.



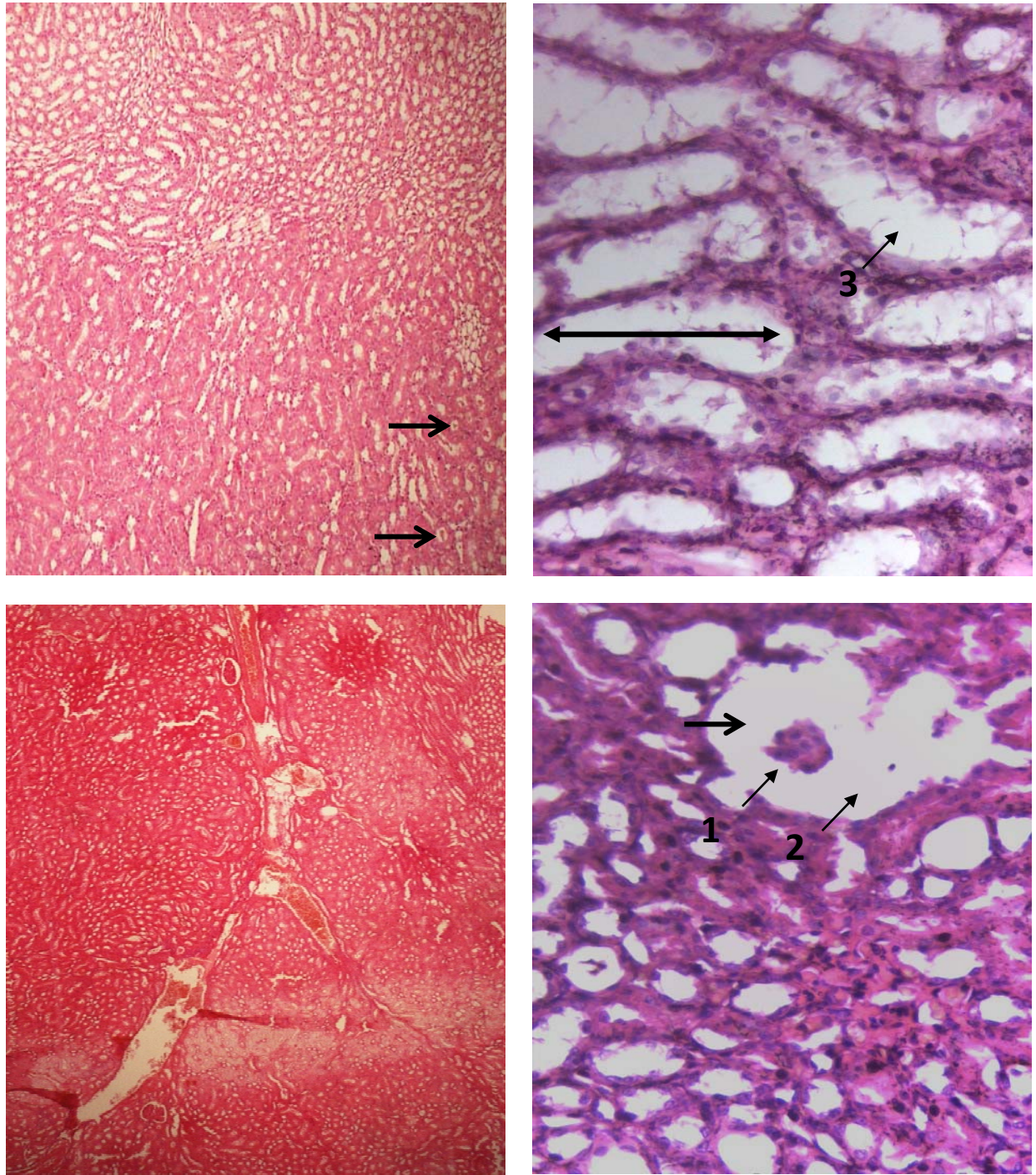


Figure 23. Coupes histologiques du rein (Gr x 100) et (Gr x 400) des rats témoins (T [A] [A1]) et traités (PZ [B] [B1]; PB [C] [C1]; MIX [D] [D1]) après 28 jours de traitement.

1 : Glomerule ; 2 : Espace de Bowman ; 3 : Tubes

↔ Dilatation des tubes
→ Grand espace de Bowman

Résultats

5. Influence du traitement sur la fonction reproductrice.

5.1. Variation de la masse absolue des testicules et épидидymes.

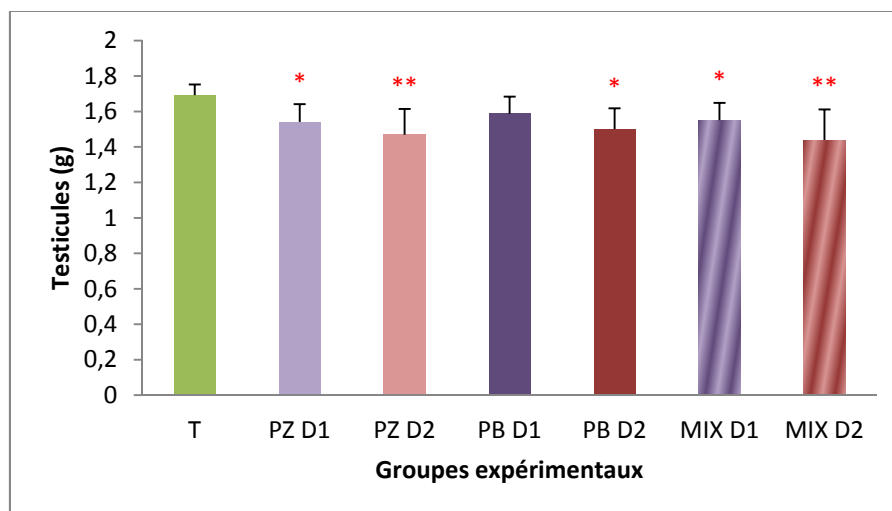
Les résultats obtenus montrent qu'il y a eu une diminution significative du poids absolu des testicules et épидидymes chez les groupes traité par le propiconazole, propineb et le mélange comparant au groupe témoin (Tableau 15, Figure 24).

Tableau 15. Variation de la masse absolue des testicules et de l'épididyme (g) chez les rats témoins (T) et les rats traités après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).

Paramètres	Groupes expérimentaux						
	T (G1)	PZ (G2)	PZ (G3)	PB (G4)	PB (G15)	MIX (G6)	MIX (G7)
Testicules (g)	1.692 ± 0.06	1.541 ± 0.1*	1.469 ± 0.145**	1.587 ± 0.097	1.501 ± 0.117*	1.551 ± 0.098*	1.439 ± 0.173**
Epididymes (g)	0.631 ± 0.98	0.524 ± 0.039*	0.521 ± 0.041**	0.546 ± 0.052*	0.558 ± 0.073*	0.575 ± 0.041*	0.515 ± 0.075**

* ($P < 0,05$) : Différence significative comparant au témoin.

** ($P < 0,01$) : Différence hautement significative comparant au témoin.



Résultats

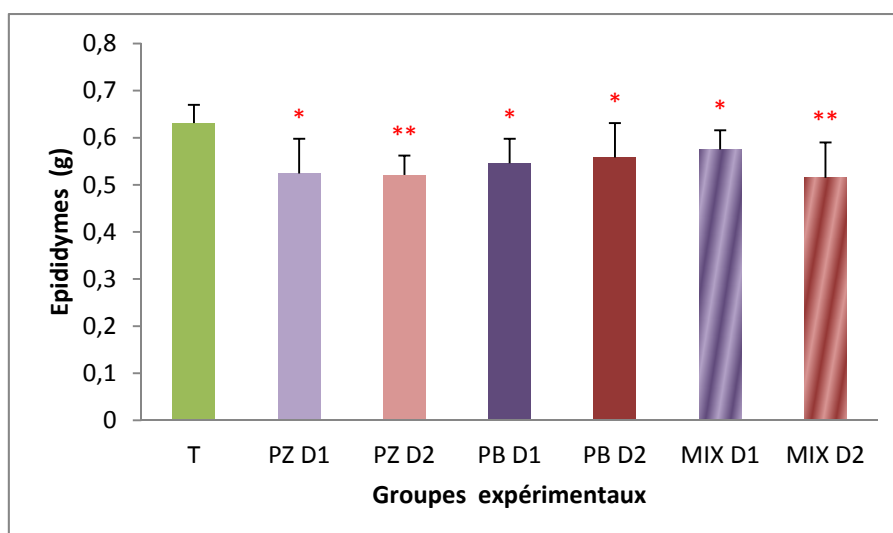


Figure 24. Variation de la masse absolue des testicules et de l'épididyme (g) chez les rats témoins (T) et les rats traités après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).

5.2. Effet sur quelques marqueurs biochimiques.

D'après les résultats illustrés dans le tableau 16 et la figure 25, nous notons une augmentation hautement significative ($P < 0.01$) du cholestérol chez les rats traités des groupes Pb (G5) et Mix (G6 et G7) les autres groupes traités montrent une augmentation non significative. Aussi nous remarquons une diminution hautement significative ($P < 0.01$) des triglycérides chez les groupes traités par Pz (G1 et G2) et Mix (G7), l'augmentation de ce marqueur est très hautement significative ($P < 0.001$) comparé au groupe témoin chez les groupes traités au Pb (G5) et Mix (G6 et G7)

Résultats

Tableau 16. Variation de la concentration du cholestérol et des triglycérides chez les rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).

Paramètres	Groupes expérimentaux						
	T (G1)	PZ (G2)	PZ (G3)	PB (G4)	PB (G5)	MIX (G6)	MIX (G7)
Cholestérol (g/l)	1.96 ± 0.30	1.85 ± 0.33	2.12 ± 0.32	2.34 ± 0.39	2.49 ± 0.13**	2.50 ± 0.09**	2.668 ± 0.171**
Triglycérides (g/l)	0.69 ± 0.09	0.48 ± 0.1**	0.43 ± 0.12**	0.68 ± 0.1	0.78 ± 0.10*	0.41 ± 0.06***	0.44 ± 0.07**

** ($P < 0,01$) : Différence hautement significative comparant au témoin.

*** ($P < 0,001$) : Différence très hautement significative comparant au témoin.

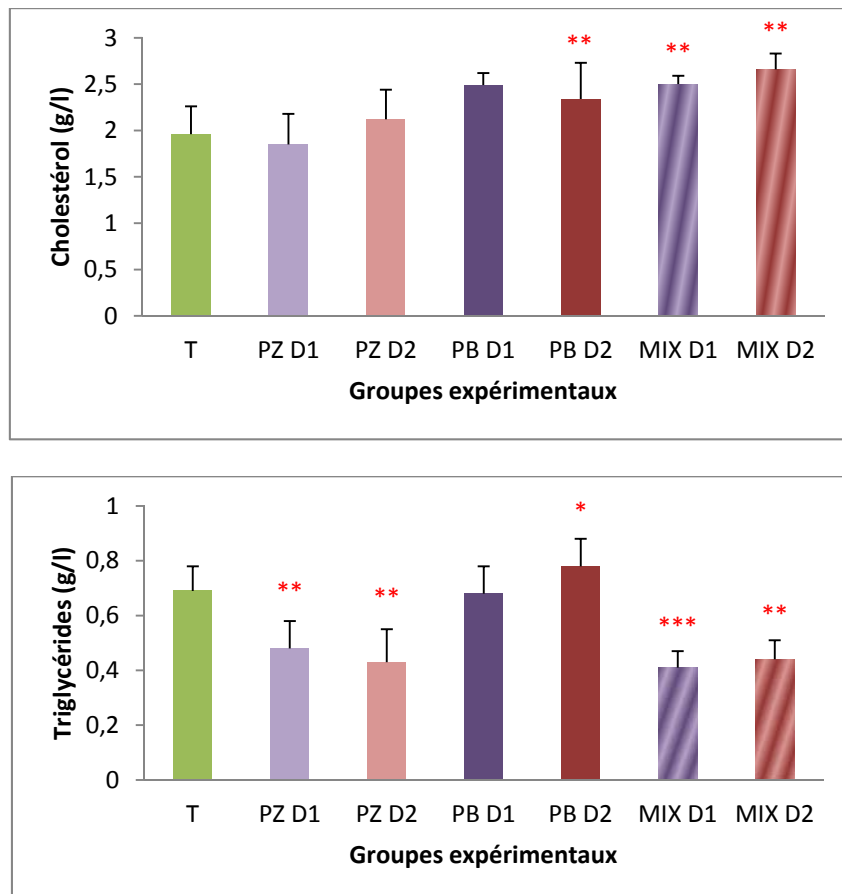


Figure 25. Variation de la concentration du cholestérol et des triglycérides chez les rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).

Résultats

5.3. Variation de la concentration des spermatozoïdes.

Les résultats présentés dans le tableau 17 et la figure 26 montrent une diminution significative ($P < 0.05$) de la concentration des spermatozoïdes chez les groupes traités au Pz (G3), Pb (G5) et Mix (G6) et une augmentation hautement significative ($P < 0.01$) pour le groupe traité Mix (G7) comparé au témoin.

5.4. Variation de la mobilité des spermatozoïdes.

Les données statistiques sur la mobilité des spermatozoïdes révèlent une diminution hautement significative ($P < 0.01$) et très hautement significative ($P < 0.001$) enregistrée chez tous les groupes traités par comparaison au groupe témoin (Tableau 18, Figure 27).

5.5. Variation du taux de malformations (A, B, C, N, V) (%) des spermatozoïdes

Après utilisation du test hypo-osmotique, les résultats donnés dans le tableau 19 concernent les modifications morphologiques observées chez mes rats traités et le groupe témoin.

A. Modification faible du flagelle « A ».

Il existe des changements significatifs ($P < 0,05$) des spermatozoïdes à faibles modifications du flagelle chez les groupes traités au propiconazole (G2), propineb (G4 et G5) et au mélange (G6 et G7) par rapport au groupe témoin.

B. Modification importante au niveau du flagelle « B ».

Une diminution significative du nombre de spermatozoïdes à modification importante au niveau du flagelle chez les rats traités au propineb (G4 et G5) et le mélange (G6 et G7) par rapport au groupe témoin.

C. Modification importante au niveau du flagelle et la pièce intermédiaire « C ».

L'administration du propiconazole, propineb ainsi que le mélange n'entraîne aucun changement significatif ($P < 0,05$) du flagelle et de la pièce intermédiaire.

D. Spermatozoïdes normaux (morts) « N ».

Les résultats montrent qu'il existe une augmentation significative ($P < 0,05$) du nombre des spermatozoïdes normaux chez les groupes traités par le propineb (G5) et le mélange (G6 et G7) et une augmentation non significative pour les groupes traités par le propiconazole par rapport au témoin.

Résultats

Tableau 17. Variation de la concentration des spermatozoïdes $\times 10^6/\text{ml}$ chez les rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).

Paramètres	Groupes expérimentaux						
	T (G1)	PZ (G2)	PZ (G3)	PB (G4)	PB (G5)	MIX (G6)	MIX (G7)
Concentration spz ($\times 10^6/\text{ml}$)	114.8 \pm 39.1	121.8 \pm 27.1	70 \pm 10.5*	112.2 \pm 20.4	75.2 \pm 14.6*	70.0 \pm 16.9*	64.7 \pm 17.2**

* ($P < 0,05$) : Différence significative comparant au témoin.

** ($P < 0,01$) : Différence hautement significative comparant au témoin.

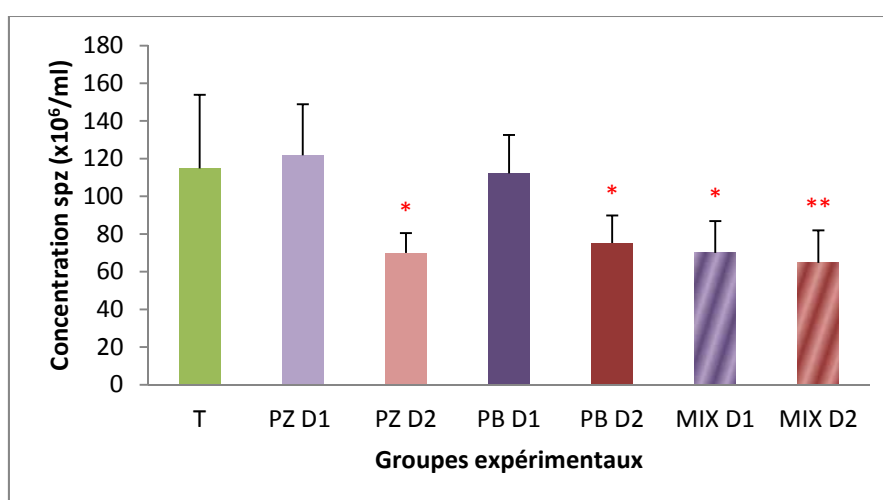


Figure 26. Variation de la concentration des spermatozoïdes $\times 10^6/\text{ml}$ chez les rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).

Tableau 18. Variation de la mobilité des spermatozoïdes (%) chez les rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).

Paramètres	Groupes expérimentaux						
	T (G1)	PZ (G2)	PZ (G3)	PB (G4)	PB (G5)	MIX (G6)	MIX (G7)
Mobilité spz (%)	62.45 \pm 5.78	47.57 \pm 7.6**	42.85 \pm 5.49**	44.14 \pm 6.36***	39.79 \pm 7.6***	41,3 \pm 7,25***	39.77 \pm 3.57***

** ($P < 0,01$) : Différence hautement significative comparant au témoin.

*** ($P < 0,001$) : Différence très hautement significative comparant au témoin.

Résultats

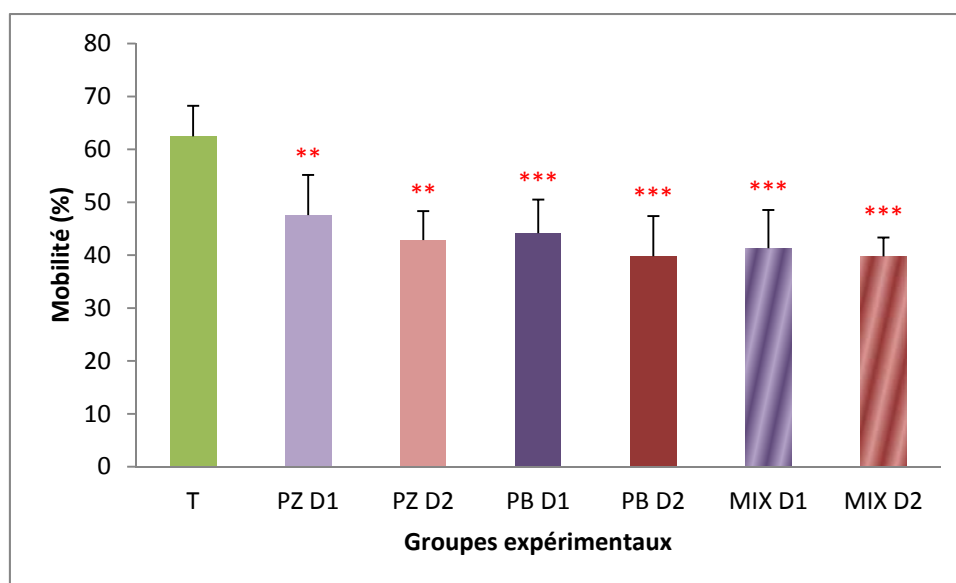


Figure 27. Variation de la mobilité des spermatozoïdes (%) chez les rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement (M ± SD, n = 7).

Tableau 19. Variation du taux de malformations (A, B, C, N, V) (%) des spermatozoïdes chez les rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement (M ± SD, n = 7).

Modifications Morphologiques	Groupes expérimentaux						
	T (G1)	PZ (G2)	PZ (G3)	PB (G4)	PB (G5)	MIX (G6)	MIX (G7)
A	25,56 ± 2,08	18,95 ± 4,70*	20,09 ± 6,4	16,31 ± 5,27*	14,57 ± 2,22*	18,87 ± 4,61*	14,44 ± 3,38*
B	15,09 ± 3,15	17,01 ± 8,34	15,34 ± 3,21	11,79 ± 2,03*	10,98 ± 8,29*	09,62 ± 3,27*	10,21 ± 7,2*
C	13,65 ± 4,4	15,70 ± 3,36	14 ± 2,6	16,76 ± 5,49	13,88 ± 4,7	13,24 ± 5,34	12,87 ± 4,13
N	45,68 ± 3,17	47,75 ± 8,41	50,57 ± 7,12	55,50 ± 10,7	60,57 ± 7,2*	58,27 ± 7,55*	62,48 ± 4,11*

Abréviation: **A**, modification faible du flagelle; **B**, Modification importante au niveau du flagelle; **C**, modification importante au niveau du flagelle et la pièce intermédiaire; **N**: spermatozoïdes normaux (morts).

* (P < 0,05) : Différence significative comparant au témoin.

5.6. Étude histologique des testicules.

L'examen des coupes du tissu testiculaire (Figure 28) des rats témoins (A) montre des tubes séminifères serrés avec une spermatogenèse d'aspect normal. Les mitoses sont distribuées à tous les niveaux ; les spermatogonies de petites tailles sont situées à proximité de la membrane basale et les spermatozoïdes murs remplissent presque la totalité de la lumière des tubes séminifères qui respectent son diamètre. Les testicules des rats traités par le propiconazole (B), le propineb (C) et le mélange des deux produits (D) ont montré des tubules séminifères avec une faible intensité par rapport au groupe témoin. Le diamètre luminal des tubules séminifères était également plus large et la population de spermatozoïdes était nettement réduite. En général, les cellules spermatogénétiques semblent avoir diminué en nombre par rapport au témoin, et la forme caractéristique des tubules séminifères a été perdue.

5.7. Etude histologique de l'épididyme.

L'examen de la section transversale des épидидymes (Figure 29) des rats témoins (A) a montré une structure normale et une densité normale de spermatozoïdes dans les coupes des lumières tubulaires. Cependant, la densité des spermatozoïdes a diminué dans les groupes expérimentaux traités au propiconazole, propineb et au mélange, nous observons une densité modérée de spermatozoïdes dans la lumière de section tubulaire après 28 jours de traitement.

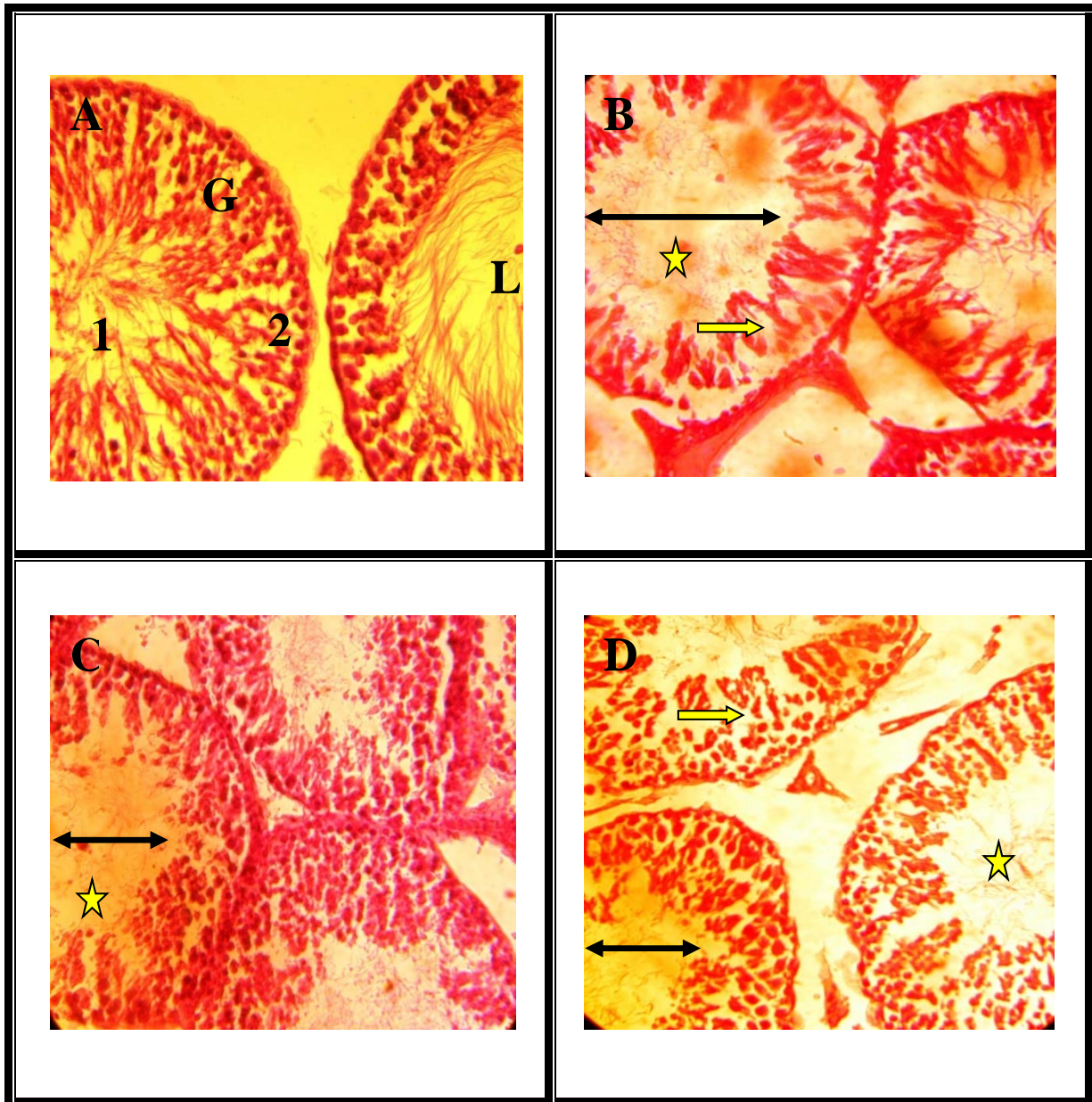


Figure 28. Coupes histologiques du testicule (Gr x 400) des rats témoins (T [A]) et traités (PZ [B]; PB [C] ; MIX [D]) après 28 jours de traitement.

1 : Lumière des tubes séminifères, 2 : Cellules germinales, 3 : Tube séminifère.

↔ Elargissement de la lumière du tube séminifère

→ Perte de la spermatogénèse

★ Dégénérescence et lésion

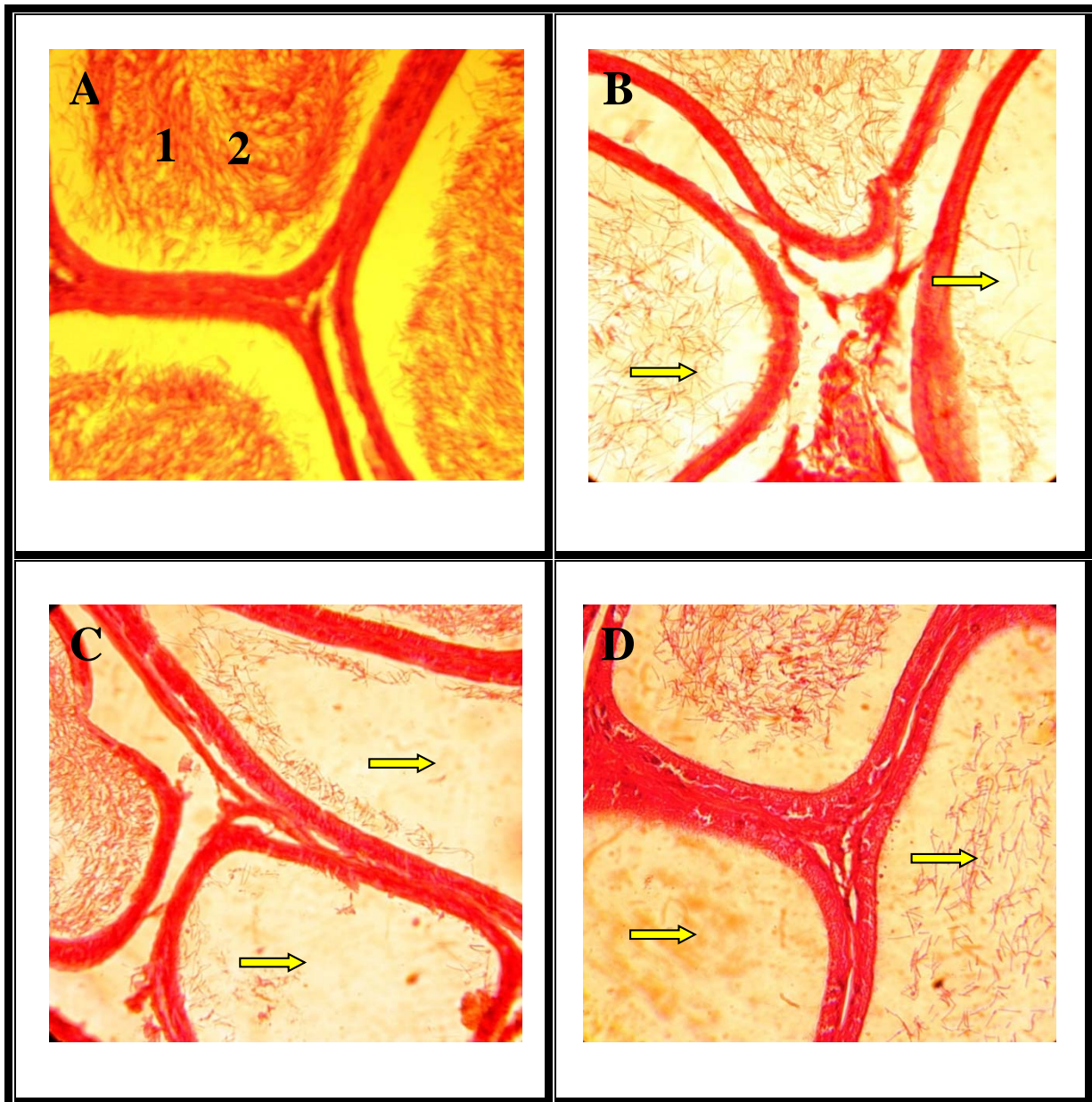


Figure 29. Coupes histologiques de l'épididyme des rats témoins (T [A]) et traités (PZ [B]; PB [C] ; MIX [D]) après 28 jours de traitement.

1: Lumière tubulaire,

2: amas de spermatozoïdes.

→ Densité des spermatozoïdes (-)

Résultats

6. Influence du traitement sur les paramètres du stress oxydant.

6.1. Influence du traitement sur le glutathion tissulaire (GSH).

Le dosage du GSH montre que le traitement par le propiconazole, propineb et le mélange a entraîné une diminution du glutathion tissulaire. On note une diminution significative ($P < 0.05$) de la teneur en glutathion au niveau du foie chez les groupes traités Pz (G2), Pb (G4 et G5) et Mix (G6 et G7) l'augmentation de ce marqueur a été hautement significative ($P < 0.01$) chez le groupe traité Pz (G3). La teneur du glutathion testiculaire chez les différents groupes traités à la dose la plus faible (G2, G4 et G6) a diminué de manière hautement significative et trais hautement significative pour les groupes traités à la dose la plus forte (G3, G5 et G7) (Tableau 08, Figure 30-31).

Tableau 20. Taux du glutathion (nM/mg prot) dans le foie et les testicules chez les rats témoins (T) et après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).

Paramètres	Groupes expérimentaux						
	T (G1)	PZ (G2)	PZ (G3)	PB (G4)	PB (G5)	MIX (G6)	MIX (G7)
Foie	83.17 ± 7.83	59 ± 14.9*	52.17 ± 14.01**	64 ± 13.4*	54.33 ± 16.88*	64.3 ± 13.4*	58.5 ± 15.42*
Testicule	28.17 ± 3.60	14.83 ± 2.56**	10.17 ± 3.19***	16.50 ± 5.43**	10.5 ± 1.87***	16.83 ± 3.19**	10.0 ± 2.1***

* ($P < 0,05$) : Différence significative comparant au témoin.

** ($P < 0,01$) : Différence hautement significative comparant au témoin.

*** ($P < 0,001$) : Différence très hautement significative comparant au témoin.

Résultats

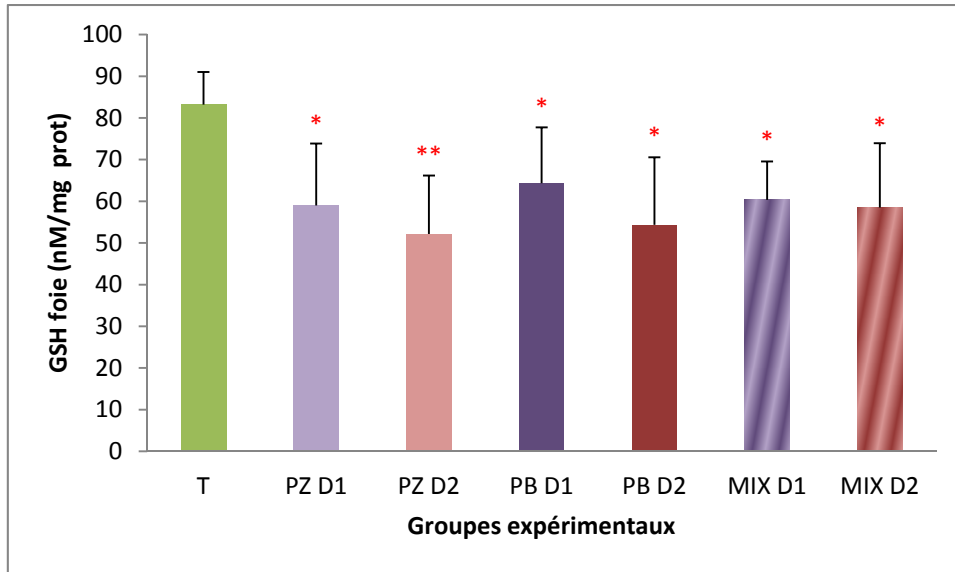


Figure 30. Variation de taux du glutathion tissulaire (nM/mg prot) dans le foie des rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).

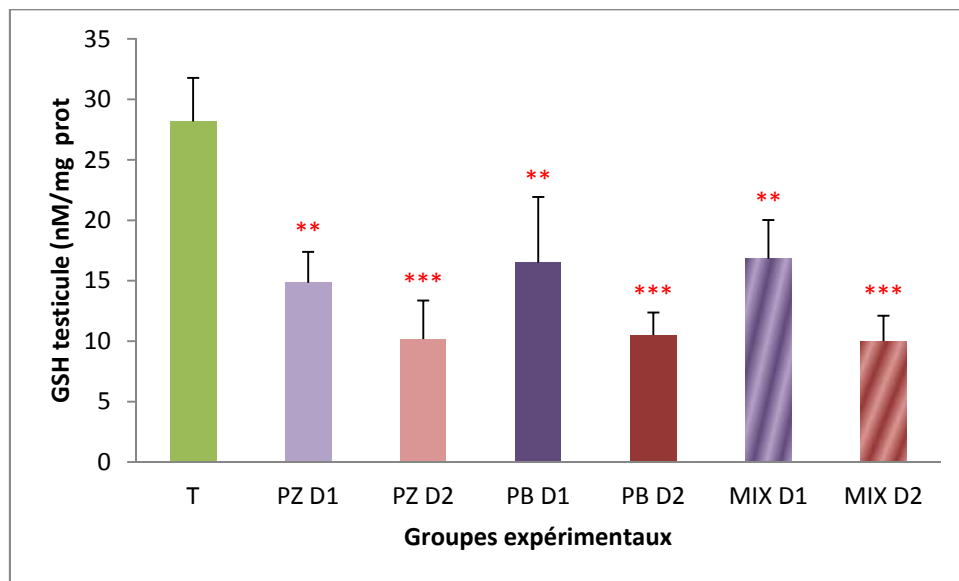


Figure 31. Variation de taux du glutathion tissulaire (nM/mg prot) dans les testicules des rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).

Résultats

6.2. Influence du traitement sur le malondialdéhyde (MDA).

D'après les résultats illustrés dans le tableau 21 et les figures (32-33), nous observons une augmentation hautement significative du taux du MDA hépatique ($P < 0,01$), chez tous les rats traités par le propiconazole, propineb et le mélange par rapport aux rats témoins, et ce taux n'augmente que chez le groupe traité au Pz (G3) et Mix (G7) dans le tissu testiculaire de manière significative et hautement significative respectivement par rapport aux rats témoins.

Tableau 21. Taux du malondialdéhyde (nM/mg de tissu) dans le foie et les testicules chez les rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).

Paramètres	Groupes expérimentaux						
	T (G1)	PZ (G2)	PZ (G3)	PB (G4)	PB (G5)	MIX (G6)	MIX (G7)
Foie	0,33 ± 0,11	0,69 ± 0,10**	0,70 ± 0,06**	0,74 ± 0,13**	0,76 ± 0,12**	0,70 ± 0,04**	0,78 ± 0,14**
Testicule	0,26 ± 0,11	0,42 ± 0,09	0,45 ± 0,1*	0,35 ± 0,09	0,44 ± 0,06	0,41 ± 0,06	0,58 ± 0,05**

* ($P < 0,05$) : Différence significative comparant au témoin.

** ($P < 0,01$) : Différence hautement significative comparant au témoin.

Résultats

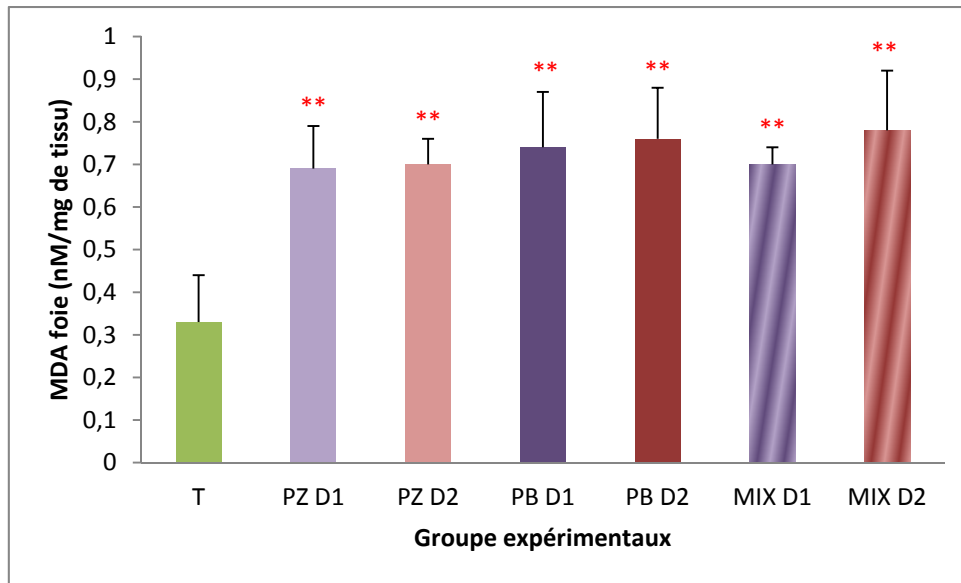


Figure 32. Variation du taux de MDA tissulaire (nM/mg de tissu) dans le foie des rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).

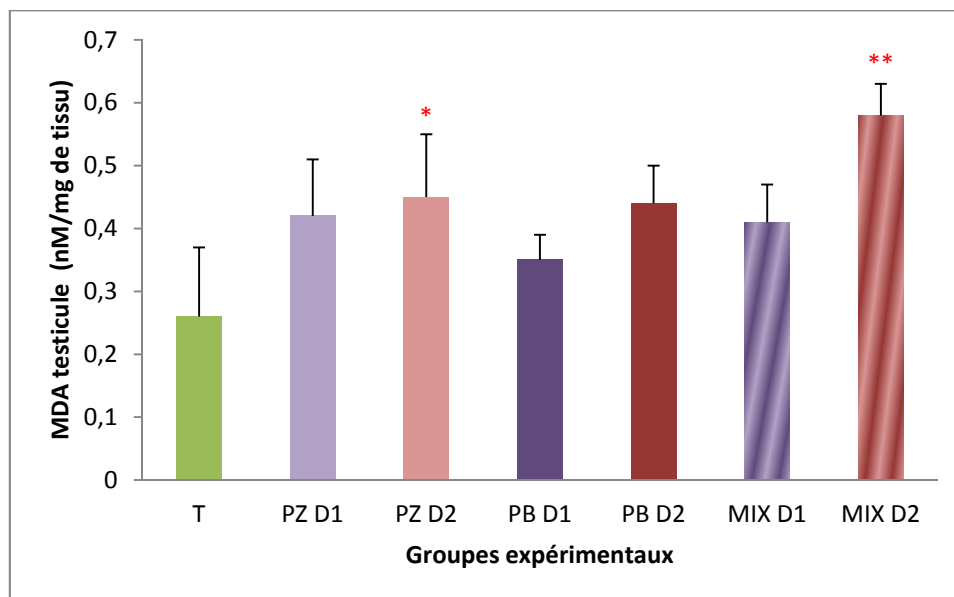


Figure 33. Variation du taux de MDA tissulaire (nM/mg de tissu) dans le testicule des rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).

Résultats

6.3. Influence du traitement sur l'activité des enzymes antioxydantes (glutathion peroxydase GPx, glutathion S-transferase GST).

Les résultats mentionnés au tableau 22 et les figures 34-35 permettent de montrer sur le plan hépatique une claire diminution hautement significative ($p < 0,01$) de l'enzyme antioxydante (GPx) et une augmentation significative ($p < 0,05$) du GST chez les rats traités au propiconazole (G3) et une augmentation très hautement significative dans le groupe traité au mélange (G7), une augmentation non significative est observé chez les autres groupes traités.

L'analyse de l'activité de l'enzyme GPx au niveau des testicules révèle une légère diminution significative ($P < 0.05$) chez le groupe traité Pb (G4), hautement significative ($P < 0.01$) chez les groupes traités Pz (G2), Pb (G5) et Mix (G6), le résultat de ce marqueur a été très hautement significative ($P < 0.001$) chez les groupes traités Pz (G3) et Mix (G7).

Tableau 22. Variation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase ($\mu\text{M GSH}/\text{mg prot}$), la glutathion S-transférase ($\text{nM GSH-CDNB}/\text{min}/\text{mg prot}$) dans le foie et le testicule chez les rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).

Paramètres		Groupes expérimentaux						
		T (G1)	PZ (G2)	PZ (G3)	PB (G4)	PB (G5)	MIX (G6)	MIX (G7)
GPx ($\mu\text{M GSH}/\text{mg prot}$)	Foie	0.46 \pm 0.07	0.35 \pm 0.06*	0.23 \pm 0.06*	0.34 \pm 0.06**	0.28 \pm 0.05**	0.36 \pm 0.07	0.27 \pm 0.07*
	Testicule	0.45 \pm 0.05	0.31 \pm 0.06**	0.19 \pm 0.09***	0.33 \pm 0.04*	0.24 \pm 0.02**	0.28 \pm 0.04**	0.19 \pm 0.03***
GST ($\text{nM GSH-CDNB}/\text{min}/\text{mg prot}$)	Foie	0.47 \pm 0.12	0.57 \pm 0.09	0.78 \pm 0.15*	0.55 \pm 0.09	0.56 \pm 0.09	0.69 \pm 0.13	0.81 \pm 0.16***

* ($P < 0,05$) : Différence significative comparant au témoin.

** ($P < 0,01$) : Différence hautement significative comparant au témoin.

*** ($P < 0,001$) : Différence très hautement significative comparant au témoin.

Résultats

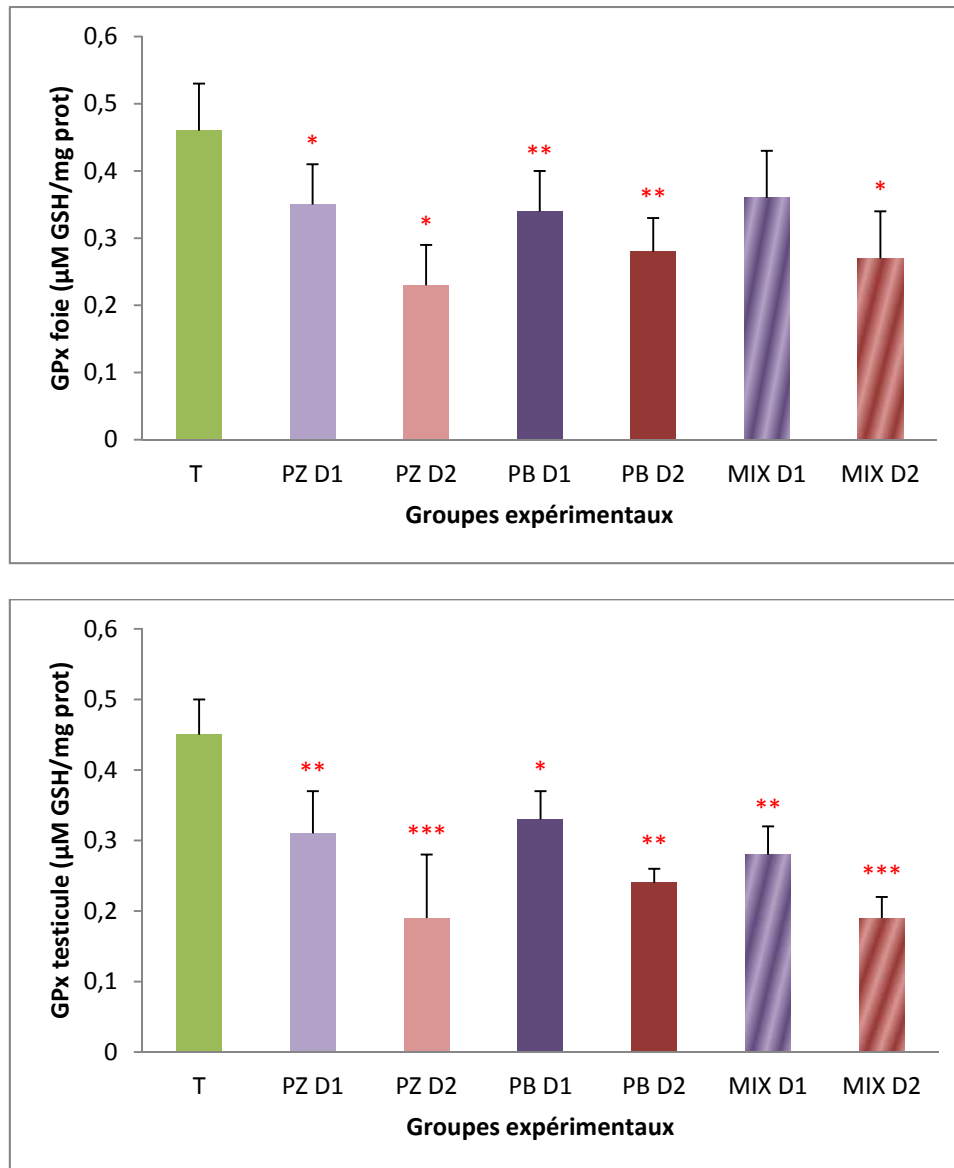


Figure 34. Variation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase ($\mu\text{M GSH/mg prot}$) dans le foie et le testicule chez les rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).

Résultats

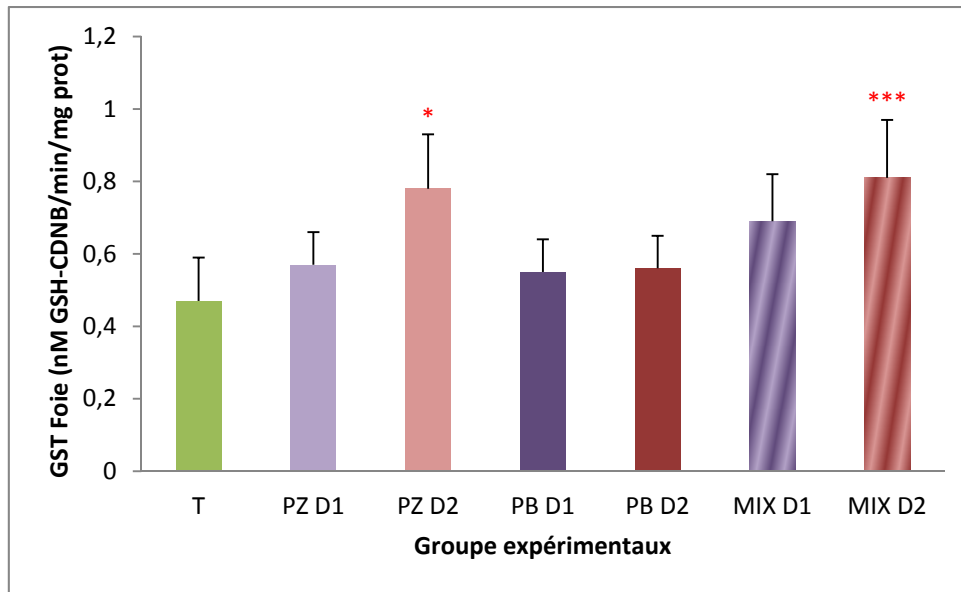


Figure 35. Variation de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (nM GSH-CDNB/min/mg prot) dans le foie chez les rats témoins (T) et traités après 28 jours de traitement ($M \pm SD$, $n = 7$).

DISCUSSION

Discussion

Les chercheurs s'inquiète de plus en plus des effets associés à l'utilisation des pesticides sur la santé. Ces dernières années, plusieurs études ont confirmé la présence de pesticides dans plusieurs matrices, comme la nourriture, l'eau, le sol, l'air. Ce qui signifie que toute la population est souvent exposée à des composés de différentes sources (Rety et al., 2012, Orton et al., 2013, Schummer et al., 2012, Schummer et al., 2012). Dans leur alimentation quotidienne, les humains sont continuellement exposés à une variété de résidus de pesticides qui pourraient agir de manière cumulative et pouvant affecter la santé humaine (Hass et al., 2012, Rieke et al., 2014, Cedergreen, 2014, Kortenkamp, 2014).

En 2013, l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA), chargée de tester les résidus de pesticides sur des échantillons d'aliments provenant de pays européens et des pays tiers avait détecté que 27,3% des échantillons d'aliments analysés étaient contaminés par plus d'un pesticide. En conséquence, les consommateurs sont exposés à un mélange de pesticides plutôt qu'un seul composé individuellement (EFSA, 2015). Les pesticides représentent un groupe important de produits chimiques souvent perturbateurs du système endocrinien qui peuvent affecter la fonction hormonale normale en interférant avec la synthèse, la sécrétion, le transport, le métabolisme, l'action contraignante ou l'élimination des hormones naturelles présentes dans le corps ((IPCS), IPoCS, 2002). L'exposition aux pesticides peut perturber le système endocrinien et a été associée à des effets nocifs sur la santé tels que les cancers, les troubles neurodégénératifs et les troubles de la reproduction (Mostafalou et Abdollahi, 2013). Les effets de cette combinaison de pesticides sur la santé humaine doivent être évalués car l'évaluation réglementaire de la toxicité des pesticides n'est actuellement effectuée que sur des composés seuls.

L'objectif de cette étude était de déterminer les possibles changements dans les paramètres de la fonction hématologique, hépatique, rénale et de la reproduction chez des rats exposés à deux fongicides classés comme des perturbateurs endocriniens et largement utilisés en Algérie, le propineb un fongicide de la famille des dithiocarbamates et un second fongicide le propiconazole de la famille des triazoles ainsi qu'à leur mélange par voie orale pendant 28 jours.

Discussion

L'étude du poids corporel est utilisée comme indicateur de la détérioration de l'état de santé générale du rat, les résultats de notre expérimentation suggèrent que l'administration du propiconazole (G2), fait diminuer la croissance corporelle par rapport à celle des témoins de manière significative ($P < 0,05$), cette diminution est aussi noté chez le groupe Pz (G3) mais est non significative, le résultat obtenu est soutenu par la diminution significative de la consommation d'aliments et d'eau.

Les résultats de l'étude Djefal et al. (2012) concordent parfaitement, puisque le traitement des rats à une dose de 8 mg/kg de méthomyl pendant 3 semaines a entraîné une diminution de la masse corporelle des rats. Ceci a été expliqué par la diminution des prises quotidiennes en aliment. Des études antérieures réalisées sur des rats adultes traités avec des carbamates ont également montré une diminution significative de leurs masses corporelles (El-Demerdash et al., 2004 ; Saoudi et al., 2011 ; Mossa et al., 2014). D'autres études réalisées avec des pesticides ont montré que la diminution corporelle est due essentiellement à une diminution de la masse grasse suivie de celle de la masse maigre, conséquence ultime d'un déséquilibre de la balance énergétique entre les apports qui sont inférieurs aux dépenses énergétiques (Ritz et al., 2007 ; Bhattie et al., 2011; Singh et al., 2011; Jennifer et al., 2007).

Par contre, Ralesh et Kumaran (2013) ont expliqué la diminution de masse corporelle chez des rats male exposés à un fongicide triazole (hexaconzole) à une dose de 25 mg/kg par voie orale pendant 60 jours, par un taux élevé de dégradation des protéines qui pourrait être nécessaire pour répondre aux besoins en énergie au cours de la désintoxication. Ceci a été confirmé par nos résultats qui indiquent une diminution du poids corporel des rats traités au propiconazole.

Concernant l'effet du Propineb sur la masse corporelle (chez les G4, G5) on note une augmentation non significative de la masse corporelle, malgré que le propineb appartient aux dithiocarbamates connu d'avoir un effet sur la thyroïde provoquant une augmentation de la consommation quotidienne de l'aliment et l'augmentation de la masse corporelle. (Yahia et al. 2016).

Tandis que les groupes traités au mélange (Pz+Pb) (G6) et (G7) montrent une diminution non de la masse corporelle. Plusieurs travaux indiquent que cette diminution est probablement due à l'effet dominant ou la présence du Propiconazole

Discussion

Le profil hématologique et biochimique du sang est l'un des paramètres les plus sensibles pour évaluer la toxicité des xénobiotiques et des médicaments chez les humains et les animaux, ces résultats peuvent fournir des informations importantes sur l'environnement interne de l'organisme. L'évaluation des caractéristiques hématologiques et biochimiques des différentes espèces est devenue un moyen important pour comprendre les processus normaux et pathologiques ainsi que les impacts toxicologiques (Liju et al., 2013; Borges et al., 2007; Sudova et al., 2009).

Cette étude a indiqué que la combinaison aux différentes doses d'exposition au Pz et au Pb ainsi que la combinaison (Pz+Pb) peut causer des degrés variables de lésions inflammatoires chez les rats (tableau 10). Nos résultats ont montré que le propiconazole (G2 et G3) exerçait une certaine influence sur certains des indices sanguins étudiés (GB, GR, Hb et PLT), cet effet n'a été observé que dans les résultats des GB et l'Hb chez les groupes traités au propineb, tandis que le groupe traité au mélange (Pz+Pb), on note une augmentation dans le taux des GB dans la D1 et 2, et une diminution des GR et Hb observé dans D2 du mélange.

Dans la présente étude, la principale réponse hématologique du rat male à l'effet sub-chronique du Pz était une concentration significativement plus faible de GR, Hb et PLT, tandis que celle des GB été significativement plus élevées après une exposition d'une durée de 28 jours. La diminution de la concentration de l'Hb, du nombre de globules rouges, peut être un indicateur d'anémie comme le souligne (Talas et Gulhan, 2009) ainsi que Li et al. 2010 dans une étude sur le même fongicide (Pz). Le stress du au Pz dans la présente étude a peut-être causé la condition d'anémie macrocytaire chez le rat, peut-être en détruisant des érythrocytes matures, ce qui a entraîné une réduction des GR et perturbant les mécanismes de synthèse du fer (Adhikari et al., 2004 : Li et al., 2010).

Les changements dans le nombre de leucocytes différentiels sont reconnus comme un indicateur sensible du stress environnemental (Cole et al., 2001). Le nombre de GB diffère de celui des témoins chez les différents groupes traités. Donc à partir des valeurs observées des GB il est clair qu'une augmentation de ce nombre est une réaction normale des rats à ces substances (Pz, Pb, Pz+Pb), ce qui modifie leurs processus physiologiques normaux. La leucocytose observée dans la présente étude indique une réaction du système immunitaire pour protéger les rats contre une infection qui pourrait avoir été provoquée par des infections chimiques et également secondaires, qui peuvent être contractées après l'affaiblissement de l'état des rats. La leucocytose, qui peut être directement proportionnelle à la sévérité de l'état

Discussion

de stress causal, peut être attribuée à une augmentation de la mobilisation des leucocytes (Celi et al., 2009 ; Srivastava et Narain, 1985).

Dans une étude de Tahir et al. 2014 ont rapportés que l'administration orale d'imidaclopride un insecticide aux doses (45, 56,25 mg/kg/jour) et de tétraconazole un fongicide de la famille des triazole aux doses (124,8, 156 mg / kg / jour) à des rats pendant 30 jours a provoqué une augmentation du nombre de GB et une diminution du taux de l'hémoglobine (Hb) par rapport au témoin aux dose fortes, ces résultats étaient aussi en accord avec ceux de Jain et al. 2006.

Tahir et al. 2009 dans une étude sur deux pesticides propiconazole et triadimefon et leur mélange ont constaté que les triazoles humains exercent un effet d'hémolyse chez l'homme. La dose orale de Triadimefon a été associée à une diminution des valeurs de PCV, Hb et MCHC. Cependant, la PCV, Hb ont été augmentées chez les animaux traités au mélange alors que le MCV a été augmenté dans les deux fongicides utilisés seuls. La leucocytose observée à des doses faibles et répétées de fongicide est attribuée à la présence de lésions inflammatoires dans de nombreux tissus comme les poumons, le foie et les reins.

Le foie représente un organe cible pour tous les xénobiotiques étant donné le rôle essentiel de cet organe de détoxification. Nous rappelons aussi qu'il a été prouvé par plusieurs recherches de haut niveau que l'exposition professionnelle aux pesticides peut provoquer des effets néfastes sur la santé en général et plus précisément sur les différents organes ou tissus, incluant le tractus génital, le tissu hématopoïétique, le rein et le foie (Tsatsakis et al., 2001). Ce dernier, en tant qu'organe principal impliqué dans le métabolisme des xénobiotiques, devient une cible majeure pour les divers xénobiotiques (Postic & Girard, 2008). L'hépatotoxicité représente donc un critère important pour évaluer l'effet d'un xénobiotique particulier (Al-Awthan et al., 2012). En plus, le foie est un organe essentiel dans le métabolisme énergétique; il synthétise le cholestérol, les triglycérides, produit et recycle les lipoprotéines (Postic & Girard, 2008).

Les résultats obtenus chez le groupe traité au propiconazole concordent avec plusieurs autres études dont celle de Taxvig et al. (2008) qui ont observé une augmentation du poids relatif du foie après une exposition de 14 jours chez la descendance de femelle gestantes aux différentes doses de propiconazole 100 mg/kg et de 150 mg/kg et d'un autre triazole, le tebuconazole a la dose de 150 mg/kg.

Discussion

Nesnow et al. (2011) dans une étude où le propiconazole a été administré à des souris mâles dans l'alimentation pendant 4 jours avec six souris par groupes aux doses (500, 1250 et 2500 ppm). Ils ont trouvé que le propiconazole a augmenté la masse du foie et la masse relative du foie, avec une augmentation de 61% du poids du foie à 3,2 g (témoin = 1.99 g) et une augmentation de 64% dans le poids relatif du foie à 10,5% du poids corporel (témoin 6.4%) au niveau de la dose la plus forte (INCHEM, 1987).

Concernant le groupe traité au propineb, nos résultats montrent une augmentation significative du poids du foie, ces résultats sont conformes aux travaux de recherche sur les dithiocarbamates de Mallem et al. (2007) et de Yahia et al. (2014). En effet, l'hypertrophie est probablement la conséquence de l'accumulation du propineb dans cet organe, induisant ainsi une augmentation de sa masse. Nos résultats sont aussi similaires à ceux obtenus par Mossa & Abbassy. (2012) qui ont observé une augmentation du poids relatif du foie après une exposition de 90 jours aux différentes doses de chlorpyrifos (9.60 et 300 mg/kg) et de méthomyl (1.70 mg/kg). En outre, El Sayed et al. (2012) ont constaté que l'exposition à une faible dose (1/20 DL₅₀) et une dose élevée (1/10 DL₅₀) du diméthoate, carbofuran et carbendazime administrés individuellement pendant 30 jours augmente le poids relatif du foie.

Notre étude montre que le traitement par le mélange chez les groupes traités (G6 et G7) nous avons observé comme pour les deux produits pris individuellement une augmentation du poids du foie.

Les paramètres biochimiques en relation avec l'activité hépatique sont connus pour avoir une valeur importante dans l'évaluation toxicologique; étant donné que les modifications apparaissent avant que les symptômes cliniques après l'ingestion des substances toxiques (Rao, 2006).

Des études faites sur la toxicité des pesticides ont prouvé que les fongicides, même à des concentrations très basses, interfèrent avec le métabolisme basal (Al-Shinnawy, 2008). Comme d'autres études ont aussi montré que les fongicides peuvent altérer les paramètres biochimiques chez des animaux d'expérience (Garg et al., 2009 ; 2009a ; Karami-Mohajeri & Abdollahi, 2011).

Nos résultats démontrent que le traitement des rats par le propiconazole propineb et le mélange aux deux doses pour chacun pendant la période étudiée, a entraîné des perturbations

Discussion

au niveau des paramètres liés à la fonction hépatique (ASAT, ALAT, PAL, Albumine et Protéines totales).

Dans les études cliniques, les transaminases sont des indicateurs importants des lésions et d'endommagements du foie (Kalender et al., 2005). Tout dommage ou lésion au niveau au foie entraîne une élévation de l'ALT et de l'AST dans le sang. Ceci concorde avec les résultats enregistrés chez les groupes traités comparés au groupe témoin. Nous signalons aussi que les enzymes hépatiques AST, ALT et ALP sont des enzymes cellulaires qui sont présentes à faibles concentrations au niveau du sérum dans des conditions normales. L'ALT est considéré comme le premier signe d'atteinte cellulaire et hépatique (Liju et al., 2013; Mukinda et Eagles, 2010). L'ALAT est essentiellement localisée dans le foie et dans le cytoplasme des hépatocytes alors que l'ASAT se trouve dans quelques tissus (muscles, le myocarde, cerveau, reins) et dans le foie où 80 % de ses activités sont localisées dans les mitochondries (Mansour & Mossa 2010).

Nos résultats concernant l'augmentation des enzymes l'ASAT, ALAT et PAL rejoignent ceux de (Rezg et al., 2008) qui ont observé une augmentation de l'ASAT, ALAT et PAL après l'administration du malathion à une dose de 100 mg/kg pendant 32 jours. Des observations similaires ont été également rapportées par Al-Sarar et al. (2009); néanmoins, l'augmentation significative des niveaux de ces enzymes a été observée chez les travailleurs exposés professionnellement aux mélanges de pesticides (Khan et al., 2008, 2009, 2010 ; Patil et al., 2003). D'autres recherches sur des Carpes indiennes exposées à deux concentrations sub-létales (0,815 mg/L et 1,63 mg/L) de diazinon pendant 30 jours ont montré une augmentation des enzymes hépatiques après 20 et 30 jours. (Haider & Rauf, 2014). Egalement, une augmentation de l'activité plasmatique des transaminases et de la PAL a été rapportée chez les truites arc-en-ciel exposées au diazinon et monocrotophos (Banaee et al., 2011; Agrahari et al., 2006). De même, Hagar et Fahmy. (2009) ont remarqué une augmentation de la concentration sérique des aminotransférases et de la phosphatase alcaline chez les rats après l'administration du diméthoate à une dose de 21 mg/kg/j pendant 2 mois. Des résultats similaires obtenus chez les rats recevant une dose quotidienne (169,35 mg/kg) de cyromazine (substance active d'un insecticide) combinée au chlorpyrifos (6,75 mg/kg) pendant 28 jours consécutifs, a entraîné une élévation significative des transaminases sériques et de la phosphatase alcaline (Heikal et al., 2013). Pareillement, des études antérieures ont rapporté que l'activité enzymatique de la PAL a augmentée chez les groupes des personnes

Discussion

responsables des pulvérisation des pesticides en comparaison aux groupes de personnes non exposées (Hernandez et al., 2013a).

Rappelons aussi que le foie est le site principal de la synthèse des protéines plasmatiques, en particulier l'albumine. Les modifications des protéines totales du sérum ou du rapport A/G (l'albumine par rapport à la globuline) peuvent indiquer une dysfonction hépatique. Ces modifications des protéines plasmatiques n'apparaissent généralement pas, sauf dans le cas d'une dysfonction hépatique chronique ou sévère qui peut être mise en évidence par une diminution de l'albumine et une augmentation de la concentration de globuline. Des changements ont été observés dans les taux de protéines totales et d'albumine, ce qui suggère que le propiconazole, le propineb et leur combinaison de Pz et Pb peut induire des lésions hépatiques et la fonction synthétique du foie peut être affectée par une exposition prolongée aux rats.

Nos résultats ont montré une diminution de la concentration sérique de l'albumine et une augmentation des protéines totales chez les groupes traités au propiconazole, propineb et le mélange, comparés au groupe témoin.

Plusieurs études ont montré que de nombreux cultivateurs d'orchidées thaïlandais, utilisant des quantités excessives de pesticides et non dotés d'équipement de protection ont montré une réduction de la concentration sérique en albumine (Aroonvilairat et al., 2015). Nos résultats sont en concordance parfaite avec ceux de Hagar & Fahmy. (2009), qui ont observé une diminution du taux de l'albumine chez des rats traités au diméthoate à une dose de 21 mg/kg pendant 2 mois.

Basir et al. en (2011) ont rapporté que le traitement des lapins par l'insecticide lambda-cyhalothrine à des doses de 4 et 8 mg/kg a causé une augmentation de la concentration sérique des protéines totales et de l'albumine.

Pour l'effet des produits utilisés sur la structure tissulaire du foie, l'observation des coupes histologiques du tissu du foie chez rats traité au propiconazole, nous a permis de remarquer essentiellement une congestion vasculaire avec une hypertrophie de l'hépatocyte, des élargissements des espaces portes; renferment une infiltration inflammatoire lymphocytaire. Ce qui indique des signes de souffrance hépatocytaire de type lobulisation et clarification cytoplasmique. Ces changements sont dû peut être au propiconazole qui appartient à une famille de fongicide (Azoles) connus d'inhiber les activités enzymatiques de cytochromes

Discussion

P450 (CYP). Des lésions au foie tel qu'une vacuolation des hépatocytes ou des foyers d'hépatocytes hypertrophiés et des nécroses sont des signes d'une toxicité chez les rats (sagepesticide.qc.ca).

Guobin et al. (2004) ont aussi rapporté que le propiconazole a produit une hypertrophie de l'hépatocyte à la dose de 150 mg / kg de poids corporel/jour. Une hypertrophie a été aussi observée avec la dose 75 mg / kg de poids corporel/jour, et une hypertrophie diffuse légère de l'hépatocyte centrilobulaire à la dose de 10 mg / kg de poids corporel/jour.

L'analyse microscopique du tissu hépatique des rats traité au propineb a révélé une désorganisation architecturale des mailles hépatocytaires résultant sûrement d'une nécrose et de la vacuolisation cellulaire et présentent aussi des sièges de discrets remaniements congestifs et inflammatoires représentés par quelques parois vasculaires congestives à lumière gorgée d'hématies. Ces changements pourraient être dus à la grande quantité de propineb accumulé au niveau des hépatocytes. Des résultats semblables sont montrés par d'autres auteurs après une exposition à d'autres pesticides (Yahia et al., 2016 ; Garoui et al., 2011; Ksheerasagar et al., 2011; Renugadevi et al., 2009; Ksheerasagar&Kaliwal, 2006; Pedraza-Chaverri et al., 2006; Choudhary et al., 2003).

Pour le groupe d'animaux traités au mélange des deux fongicides, l'étude histologique du foie montre un aspect identique à celui observé dans le tissu hépatique des rats traité au Propiconazole ce qui confirme notre hypothèse que la toxicité du propiconazole est plus forte dans le mélange utilisé dans cette étude.

D'après certaines études les troubles de l'oxydation des lipoprotéines et l'augmentation de stress oxydatif peuvent également conduire à une nécrose au niveau des hépatocytes (Ratzu et al., 2010; Marra et al., 2008).

Concernant les effets des pesticides sur l'activité rénale nous rappelons que les reins exercent deux fonctions d'importantes majeurs, d'abord, ils excrètent la plupart des produits finals du métabolisme corporel, et deuxièmement, ils contrôlent les concentrations de la plupart des constituants des fluides corporels (Andersson, 1977). Comme marqueurs de la fonction rénale l'acide urique, l'urée et la créatinine sont fait pour l'analyse de routine. L'acide urique est le produit final du catabolisme des acides nucléiques, c'est-à-dire le métabolisme des bases de purine et de pyrimidine (Wolf et al., 1972). L'urée est le produit final azoté principal du catabolisme des protéines et des acides aminés, produit par le foie et distribué à

Discussion

travers le liquide intracellulaire et extracellulaire. Dans les reins, l'urée est filtrée du sang par les glomérules et est partiellement réabsorbée par l'eau (Corbett, 2008). La créatinine est un produit de dégradation du phosphate de créatine dans le muscle, et est habituellement produite à un taux assez constant par le corps en fonction de la masse musculaire (Zuo et al., 2008). La créatinine est connue comme un bon indicateur de la fonction rénale, c'est-à-dire, une augmentation de la créatinine signifie un dommage évident aux néphrons fonctionnels (Liju et al., 2013).

Dans la présente étude des différences significatives dans l'urée, créatinine et l'acide urique ont été trouvées chez les animaux traités par rapport au groupe témoin. Ces résultats suggèrent que le propiconazole et le propineb ainsi que la combinaison des deux pourraient altérer la fonction rénale.

Des études faites par Djefal et al. (2012) ont constaté une augmentation des taux plasmatique en urée et en créatinine chez les rats exposés au méthomyl. Ces résultats sont en accord avec d'autres études dans lesquelles le dommage rénal a été occasionné chez des ouvriers professionnellement exposés au méthomyl (Khan et al., 2008), dans un cas de suicide (Makrides et al., 2005) et chez les animaux d'expérience (Fayez et Bahig, 1991 ; El-Demerdash et al., 2013). Ces observations dans notre étude peuvent être référées indirectement à l'effet hépatotoxique des deux fongicides seuls ou en combinaison (données montrées). En plus, l'augmentation en urée et créatinine plasmatique indiquent la capacité diminuée des reins de filtrer ces déchets du sang et de les excréter dans l'urine. Une association entre l'hyperuricémie et les dommages rénaux a été rapporté par Feig et al. (2006). L'élévation du taux d'acide urique, ainsi que les modifications histologiques des reins rapportés par Radad et al. (2009), EL-Fakharany et al. (2011) et El-Demerdash et al. (2013), indiquent clairement l'induction du dysfonctionnement et des dommages rénaux provoqués par le méthomyl.

Une étude faite par Sherif et al. 2014 sur des rats traité oralement pendant 28 jours par un fongicide triazole le difenoconazole a la dose (10 mg/kg) et un herbicide le diclofop-méthyle a la dose (1 mg/kg) ainsi que la combinaison des deux, Les résultats ont révélé des taux d'urée plus élevés dans tous les groupes traités, tandis que la créatinine plasmatique était plus élevée dans les groupes traité au difenoconazole et diclofop-méthyle, le groupe traité au mélange n'a indiqué aucune changement pour ce paramètre. Ces résultats sont cohérents avec les résultats de Christine et al. (2008), chez des rats Fischer traités avec un fongicide éconazole. Taybe et

Discussion

al. (2011) aussi ont observé que l'administration d'herbicide 2, 4-dichlorophénoxyacétique chez les rats adultes a provoqué une réduction du taux de filtration glomérulaire objectivé par la clairance réduite de la créatinine et une diminution de l'excrétion de créatinine compatible avec l'insuffisance rénale.

Tahir et al. (2009) dans une étude sur deux pesticides propiconazole et triadimefon et leur mélange ont constaté une augmentation significative de l'urée sérique et des niveaux de TGO et la diminution de la protéine totale indiquent un trouble hépatorénal causé par ces fongicides.

L'étude histologique des rats traités au propiconazole, propineb et le mélange a indiqué des altérations histologiques du rein sont représentées essentiellement par des remaniements congestifs, des dilatations tubulaires et d'une dégénérescence des glomérules rénaux. Le stress oxydant causé par les fongicides seuls ou en combinaison peut avoir un impact négatif sur ces tissus. Nos résultats concordent avec ceux d'Ogur et al, 2005, de Tahir et Nour (2009) et Bououza et al. (2016).

Concernant l'effet des fongicides utilisés seuls ou en mélange sur la reproduction, il est important de rappeler que la masse testiculaire et épидидymaire est un indice précieux de la toxicité pour la reproduction chez les animaux mâles (Amann, 1982). Il apparaît alors que l'exposition aux pesticides provoque généralement une diminution du poids des organes d'animaux (Dutta & Sahu, 2013). Ce qui a conduit à nos résultats qui ont montrés une diminution significative du poids des testicules et de l'épididyme des rats traités au propiconazole, propineb et au mélange comparés au témoin.

Les résultats obtenus dans notre expérimentation montrent qu'il y a eu une diminution significative du poids absolu des testicules et épидидymes chez les groupes traité par le propiconazole, propineb et le mélange comparant au groupe témoin.

Selon Ralesh et Kumaran (2013), la réduction de la masse des testicules chez les rats traités avec de l'hexaconazole, fongicide de la famille des triazole comme le propiconazole est peut être due à la réduction de la taille des tubules, et peut être à l'arrêt de la spermatogène suite à l'inhibition de la biosynthèse des stéroïdes (Kaur et Mangat, 1980). L'atrophie des glandes sexuelles accessoires dans l'hypo-androgénie a également été rapportée par Ortiz et al. Al., (1999) et Menjivar et al., (1997). Dans la présente étude, la masse de l'épididyme était significativement réduit, ce qui pourrait être dû à une réduction des androgènes (Sujatha et al.,

Discussion

2001). Des résultats similaires ont été obtenus par Ravikumar et al. (2011), qui ont rapporté que l'hexaconazole à la dose de 55 et 110 mg / kg de poids corporel pendant 30 jours et 60 jours diminuait significativement la masse des testicules et des organes sexuels.

Concernant le propineb nos résultats rejoignent plusieurs études sur les dithiocarbamates ceux de Yahia et al. 2014 qui ont constaté une diminution de la masse des testicules et de l'épididyme chez les différents groupes traités au mancozebe à différentes doses (250, 500,1000mg/kg) par rapport aux témoins. Slimani et al. (2014) ont aussi indiqué une diminution de la masse des testicules des pigeons traités au propineb à la dose de 0.2g/l et 2 g/l. ainsi que les travaux toujours de Slimani et al. (2015) qui ont démontré que le traitement des pigeons par le manebe a la dose de 1g/l induisait une diminution de la masse des gonades males.

Nos résultats correspondent parfaitement avec ceux obtenus par Marty et al. (2004) et Johnson. (2005) et confirment ceux obtenus par El-Gerbed. (2013) qui a enregistré une diminution de la masse des testicules chez les rats traités au parathion méthyl (un pesticide organophosphoré) à une dose de 0.25 mg/kg (équivalente à 1/50 DL₅₀). De nombreuses études consacrées à ce sujet ont abouti aux mêmes constatations que les nôtres (Ogutcu et al., 2006; Kalender et al., 2007). Razi et al. (2012) ont suggéré que la diminution des testicules des rats traités au malathion à une dose de (241mg/kg) peut être due à une atrophie cellulaire. Aussi, l'exposition des rats aux organophosphorés comme le glyphosate à une dose de 125 mg/kg pendant 10, 20, 30 et 40 jours a révélé une diminution significative du poids des testicules et de l'épididyme.

Nos résultats montrent une augmentation significative du taux de cholestérol dans les groupes traités par Pb (G5) et Mix (G6 et G7) comparativement au groupe témoin, une augmentation non significative est observée chez les groupes traités au Pz (G3) et Pb (G4). Des études démontrent que le traitement par Carbendazim provoque une augmentation du taux de cholestérol chez les rats (Muthuviveganandavel et al., 2008) des résultats similaires ont été obtenus chez les chiens (Baron, 1991). Une augmentation significative du taux de cholestérol après l'administration de carbamate chez le rat a été observée par (Rai et al., 2009). Cette augmentation du taux de cholestérol peut être un signe de lésions hépatiques (Igbodih et al., 1992) ou la conséquence de la stimulation de la catécholamine qui stimule la lipolyse et de l'augmentation de la production d'acides gras (Dekundy et al., 2007, Capcarova et al. Al., 2010).

Discussion

Plusieurs études indiquent un déclin global de la fécondité chez les hommes au cours des dernières décennies en raison d'une mauvaise qualité du sperme, d'une diminution suggérée du nombre de spermatozoïdes et de niveaux de testostérone chez les hommes (Andersson et al., 2008 ; Jorgensen et al., 2012 ; Travison et al., 2007).

Nos résultats ont confirmé une baisse de la concentration et de la mobilité des spermatozoïdes. La baisse du nombre et de la mobilité des spermatozoïdes au cours des dernières décennies peut être attribuée à l'exposition accrue aux perturbateurs endocriniens environnementaux (Yuan et al., 2010). Aussi, la faible densité du sperme épидидymaire peut être due à une altération du métabolisme des androgènes (Duty et al., 2003). Des résultats similaires sur la mobilité des spermatozoïdes ont également signalé une baisse chez les rats exposés aux différents carbamates (Gupta, 2001). Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par El-Kashoury et al. (2010), qui ont montré que le traitement des rats au Dicofol (un acaricide) à des doses faibles et fortes pendant 16, 28 et 90 semaines réduit significativement le nombre des spermatozoïdes chez tous les groupes traités; de même que l'exposition des souris à l'endosulfan à une dose de 3 mg/kg pendant 35 jours a révélé des dommages au niveau de la queue des spermatozoïdes et une dégénérescence acrosomiale avec une diminution du niveau de testostérone, signifiant ainsi un dysfonctionnement testiculaire (Ali et al., 2012). En outre, le traitement des rats adultes par l'endosulfan pendant 10 semaines a inhibé les fonctions testiculaires causant une diminution du nombre et de la mobilité des spermatozoïdes ainsi que des changements dans la concentration de la testostérone avec des malformations morphologiques sévères au niveau des spermatozoïdes (Amizadeh & Askari, 2011 ; Modaresi & Seif, 2012). Autre constat relevé, le traitement avec 30 mg/kg de lindane pendant 14 et 28 jours a montré une malformation des spermatozoïdes affectant le nombre et la mobilité (Sharma & Singh., 2010). Enfin, tous les rapports disponibles ont montré que la plupart des fongicides sont des inhibiteurs de la spermatogenèse au niveau des gonades dès lors qu'ils affectent la synthèse de la testostérone (Ranjan & Daundkar., 2014).

Certains chercheurs ont relevé une réduction significative du nombre de spermatozoïdes mobiles avec une augmentation considérable du pourcentage de spermatozoïdes morts, anormaux et immatures dans le cas d'une exposition chronique au mélange d'insecticides (Marmol-Maneiro et al., 2003 ; YuBo et al., 2009). Aussi, Ezeji et al. (2015) ont suggéré que La réduction du nombre des spermatozoïdes chez les rats exposés au dichlorvos peut être due à la réduction de la testostérone qui joue un rôle important dans la spermatogenèse.

Discussion

Chaudhary & Joshi. (2003) ont imputé la faible concentration des spermatozoïdes à l'activité enzymatique altérée, responsable de la spermatogenèse. D'autres carbamates signalés responsables de la réduction du nombre des spermatozoïdes par plusieurs chercheurs (Joshi et al., 2007; Kavlock et al., 2005; Reddy et al, 2006 ; Pareek et al, 2007).

Une étude a rapporté l'effet de dichlorvos sur le nombre des spermatozoïdes et la spermatogenèse chez les souris mâles qui ont été traitées avec (0,1 mg/jour et 0,05 mg/ jour) pour une période de 15 jours; une baisse significative des spermatogonies et spermatocytes primaires a été relevé (Kata., 2008). Des doses de 0, 3.66, 5.50 et 11 mg de diméthoate ont été injectées à des rats pendant 90 jours et les résultats obtenus ont confirmé une diminution significative de la concentration et de la mobilité des spermatozoïdes (Ngoula et al., 2007 ; 2007a). Une autre étude a été menée pour évaluer les effets du malathion sur le système reproducteur mâle des rats Wistar. Des doses de 50, 150 et 250 mg/kg de malathion ont été administrées par voie orale pendant 60 jours ont montré une réduction du nombre de spermatozoïdes ainsi que leur mobilité (Choudhary et al., 2008). Ces constatations ont été observées par Shittu et al. (2013); Olorunshola et al. (2011). Le traitement par le lindane à des concentrations de 9 et 18 mg/kg pendant 60 jours a eu pour effet une diminution de 42% à 50% du nombre des spermatozoïdes (Simic et al., 2012). Plusieurs autres études ont restitué des résultats similaires : des rats mâles traités à une dose de 170 mg/kg de malathion pendant une période de 13 jours, ont révélé une baisse significative du nombre de spermatozoïdes observés au testicule et à l'épididyme (Espinoza-Navarro et al., 2014). Ces pesticides peuvent modifier la lignée germinale des tubes séminifères dans les testicules ce qui diminue la capacitation et la maturation des spermatozoïdes (Jorsaraei et al, 2010; Mathur & D`Cruz, 2011).

Le Propiconazole est en outre un perturbateur endocrinien. Il a en particulier un effet d'inhibition de l'aromatase (CYP19). En fait, ce qui est à considérer ici n'est pas tant l'inhibition de l'aromatase (CYP19) qui demeure relativement modérée par rapport à d'autres fongicides azolés (triazoles), que surtout son effet de potentialisation synergique avec d'autres polluants chimiques (effets cocktail) (ECERI, 2013) ce qui peut expliquer des résultats plus accentués du mélange (Pz+Pb) en ce qui concerne les paramètres de reproduction.

Nos résultats histologiques des testicules ont montré des tubules séminifères avec une faible intensité par rapport au groupe témoin. Le diamètre luminal des tubules séminifères était également plus large et la population de spermatozoïdes était nettement réduite chez les

Discussion

groupes traités comparés au témoin. En général, les cellules spermatogénétiques semblent avoir diminué en nombre par rapport au témoin, et la forme caractéristique des tubules séminifères a été modifiée.

Ces résultats concordent avec ceux de Ravi Kumar et al. (2011) ont observé une diminution significative de la taille des tubes séminifères chez des rats après l'exposition à l'hexaconazole, un fongicide de la famille des triazoles (même famille que le propiconazole) pendant 30 jours. Les lésions observées avec la dose élevée (110 mg/kg) étaient des changements dégénératifs dans les cellules gonadiques, un œdème inter-tubulaire, une altération de la spermatogenèse avec accumulation de cellules rondes dans la lumière et une légère hyperplasie des cellules de Leydig. Une dose moyenne d'hexaconazole (55 mg/kg) administrée pendant 60 jours a causé des dommages au niveau de l'architecture testiculaire, Une dose élevée d'hexaconazole (110 mg/kg) administrée pendant 60 jours a entraîné des lésions graves du testicule. Il y avait des accumulations de grandes cellules rondes et de cellules géantes dans la lumière des tubules séminifères, un épaississement doux de la membrane basale et des changements dégénératifs dans l'épithélium gonadique. L'hypertrophie des cellules de Leydig était plus marquée dans ce groupe et à certains endroits les cellules de Leydig présentaient des modifications dégénératives et nécrotiques.

Nos résultats histologiques pour le propineb ont montré des résultats qui rejoignent ceux de Yahia et al. (2016) chez des rats traités à différentes doses de mancozèbe ont trouvé une altération des étapes de la spermatogenèse avec une dégénérescence des cellules de sertoli.

L'observation histologique des testicules de pigeons traités au propineb dans l'étude de Slimani et al. (2014) ont montré un diamètre uniforme des tubules séminifères avec une épaisse lame basale et l'absence de spermatozoïdes dans la lumière des tubules séminifères marquant ainsi la régression des gonades. L'examen histologique des testicules à partir de 0,2 g/l de pigeons traités a montré un diamètre irrégulier de tubes séminifères avec un petit peu et une fine lame basale allongée. Il est nécessaire de noter la présence de spermatozoïdes dans la lumière de la majorité des tubules. Les observations histologiques des testicules d'oiseaux traités à 2 g / l ont révélé des lésions testiculaires très sévères, réfléchies par des tubules séminiformes allongés, détachement de l'épithélium séminifère et écaillage des cellules germinales dans la lumière des tubules séminifères. Une couleur blanchâtre-gris a également été observée.

Discussion

Des études similaires sur les effets des pesticides sur l'histologie des testicules ont montré que l'exposition des rats mâles au lindane à des doses de 10, 20 et 40 mg/kg a contribué à la suppression de la spermatogenèse par une réduction de la prolifération des cellules germinales ainsi que l'augmentation de l'apoptose des cellules germinales (Yuksel et al., 2009). D'autres recherches publiées sur le traitement des rats par l'endosulfan ont signalé une altération de la spermatogenèse, histologiquement par une diminution du diamètre des tubes séminifères (Jain et al., 2013). En outre, une dose orale de 40 mg/kg du lindane pendant 60 jours a causé un rétrécissement et une déformation des tubes séminifères, des vaisseaux sanguins et une atrophie tissulaire (Nagda & Bhatt., 2011). Des résultats publiés précédemment sur le traitement des souris par des doses sublétales de méthoxychlore ont montré des changements dégénératifs des tubes séminifères conduisant à une augmentation de leurs diamètres et l'apparition d'œdèmes interstitiels (Staub et al., 2001). L'Analyse histologique des testicules des rats exposés à des doses de 3 et 6 mg/kg de dieldrine montre aussi une altération de la spermatogenèse avec une réduction marquée de la production de gamètes combinée à une réduction des diamètres des tubes séminifères (Hallegue et al., 2003). Des troubles histopathologiques similaires ont été également observés chez des rongeurs adultes lors d'une exposition directe à des doses sublétales de diméthoate et d'autres composés carbamates (Huang et al, 2006 ; Farag et al, 2007 ; Joshi et al., 2007 ; Choudhary et al, 2008; Sayim 2007 ; Zidan et al., 2009 ; Elmazoudy et al, 2011). L'examen histologique des testicules chez les rats traités au dichlorvos a encore révélé des dégénérescences cellulaires avec hypertrophie des spermatogonies ce qui a probablement conduit à une réduction de la production des spermatozoïdes (Ezeji et al., 2015). Aussi, L'histologie des testicules d'animaux traités avec de fortes doses de diméthoate ont montré une dégénérescence des cellules de Sertoli avec une désorganisation de l'épithélium germinal ; la lumière des tubes séminifères a révélé de faibles concentrations en spermatozoïdes (Ngoula et al., 2007). L'analyse du tissu testiculaire des rats traités au lindane a montré une désorganisation cellulaire avec des formes irrégulières et un espace intercellulaire plus marqué entre les spermatogonies (Sivic et al., 2012).

L'examen microscopique des sections transversales des épидидymes chez les différents groupes de rats a montré que la densité des spermatozoïdes a diminué dans les groupes expérimentaux traités au propiconazole, propineb et au mélange. Nous observons aussi une densité modérée de spermatozoïdes dans la lumière de section tubulaire après 28 jours de traitement. Ces résultats concordent avec ceux de Bouaza et al. (2014) et Soni et Shrivastava (2013).

Discussion

On sait que de nombreux xénobiotiques, y compris des pesticides, produisent un stress oxydatif par l'augmentation de la production des radicaux libres qui à leur tour génèrent le stress oxydatif dans différents tissus et chez différents organismes (Mehta et al., 2008). Le stress oxydant est une circonstance anormale dans laquelle sont placés les tissus de notre organisme lorsqu'ils font face à un flux accru de radicaux libres et qu'ils n'arrivent plus à les piéger ou à détruire (Agrawal et Sharma, 2010). Évaluer le stress oxydant consiste donc à estimer les mécanismes de défense et analyser les produits secondaires qui peuvent en résulter (Koechlin, 2006). En général, les cellules ont différents mécanismes pour soulager le stress oxydatif et réparer les macromolécules endommagées.

La défense principale se fait par des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques, qui ont été montrés pour récupérer les radicaux libres et ROS. Les enzymes antioxydantes catalase (CAT), la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx) et le glutathion-S-transferase (GST) et les antioxydants non enzymatiques, y compris le glutathion (GSH) affectés par l'exposition aux pesticides (Banerjee et al., 2001).

L'exposition aux pesticides peut induire un état de stress oxydant par : (1) production accrue des radicaux libres qui s'accumulent dans la cellule, (2) altération des mécanismes de défense antioxydante ; y compris la détoxification et les enzymes de balayage, ou (3) augmentation de la peroxydation lipidique suite à l'interaction entre les ERO et les membranes cellulaires ou sous-cellulaires (Abdollahi et al., 2004).

Il existe de plus en plus de preuves expérimentales, *in vitro* et *in vivo*, qui lie l'infertilité masculine et la fonction spermatique défectueuse au stress oxydatif-nitratif. En fait, des niveaux élevés de ROS sont détectés dans jusqu'à 40% des échantillons de sperme d'hommes infertiles (Sharma et al., 1999 ; Suleiman et al., 1996). Les dommages oxydatifs induits par ROS / RNS sont directement impliqués dans l'infertilité masculine. Une production excessive de ROS peut entraîner une altération de la stéroïdogénèse et de la spermatogénèse par plusieurs mécanismes, dont les lésions de l'ADN, la peroxydation lipidique et l'oxydation des protéines (Prahalthan et al., 2006). Le foie comme étant un organe cible spécialisé dans la détoxification est en première ligne de défense contre le stress oxydant.

Dans notre étude expérimentale, les résultats montrent une diminution significative des niveaux de glutathion dans tous les tissus étudiés chez les rats traités par le propiconazole (G2 et G3), par le propineb (G4 et G5) et le mélange des deux fongicides (Mix G6 et G7). Le glutathion est un élément crucial, antioxydant du mécanisme de défense ; il fonctionne

Discussion

comme un réactif direct et anti-radicalaire (Romao et al., 2006 ; Wu et al., 2012). Son épuisement peut avoir comme conséquence la dégénération de cellules due à l'effort oxydant provoqué par des polluants (Zhang et al., 2008). Les niveaux réduits de GSH chez les rats traités pourraient être le résultat de sa participation en tant qu'antioxydant dans la neutralisation des radicaux libres produits par ces pesticides et/ou en raison de l'inhibition des enzymes antioxydantes qui sont impliquées dans sa régénération (Boukerche et al., 2007 ; Li et al., 2010; Chiali et al., 2013).

Dans la présente étude, l'exposition des rats au propiconazole, propineb et le mélange a eu comme conséquence une augmentation significative de la peroxydation lipidique, indiquée par l'augmentation du taux en MDA dans les organes étudiés (foie et testicules). D'après les résultats illustrés dans le tableau 21 et les figures (33-34), nous observons une augmentation hautement significative du taux du MDA hépatique ($P < 0,01$), chez tous les rats traités par le Pz (G2 et G3), Pb (G4 et G5) et le mélange (G6 et G7) par rapport aux rats témoins, et ce taux augmente chez le groupe traité au Pz (G3) et Mix (G7) dans le tissu testiculaire de manière significative et hautement significative respectivement par rapport aux rats témoins, on note aussi une augmentation mais non significative de ce marqueur chez les autres groupes traité de ce même organe. Cela montre bien que les deux fongicides sont capables de promouvoir la génération des ERO, qui se traduit par la peroxydation lipidique (LPO) dans les tissus hépatiques et testiculaires et suggérant leurs effets délétères dans ces tissus (Cemek et al., 2010). L'augmentation du taux des espèces réactives oxydantes à l'intérieur des cellules peut être due soit à une surproduction de ces substances réactives soit à une diminution de la capacité de les neutraliser (Kirschvink et al., 2008). Ces résultats sont en accord avec les études de plusieurs auteurs qui ont démontré l'interaction de l'atrazine (herbicide de la famille des triazines) avec les lipides membranaires entraînant une augmentation du MDA, marqueur de l'oxydation lipidique (Yahia et al., 2016; Srivastava et al., 2012; Aboul-Soud et al., 2011; Bhatti et al., 2011; Singh et al., 2011; Ajiboye., 2010; Nawani et al., 2010). D'autres résultats ont également montré que l'exposition au chlorpyrifos méthyl parathion et au malathion ainsi que leur mixture a généré un stress oxydatif dans les tissus des rats. Les résultats ont montré clairement une augmentation de l'activité de MDA (Ojha et al., 2011).

Les enzymes antioxydantes sont considérées comme la première ligne de la défense cellulaire contre les dommages oxydatifs. Ces enzymes regroupent plusieurs familles ; celle des GPx, des SOD et des GST, la CAT et la GR.

Discussion

Ainsi, l'augmentation du stress oxydant et les dommages cellulaires, provoqués par le traitement avec le propiconazole, propineb et la combinaison des deux par voie orale pendant 28 jours étaient évidentes par les perturbations dans les activités enzymatiques de GPx dans les tissus du foie et des testicules, et de la GST dans le foie des rats.

La famille enzymatique des GST est impliquée dans les processus de la détoxification. En outre, une fonction importante de GST, en réponse au stress oxydant est sa capacité de conjuguer le GSH avec les produits de la peroxydation lipidique (Manawadi et Kaliwal, 2010). Les niveaux de ces antioxydants peuvent fournir une idée claire sur l'ampleur des dégâts qui se produisent dans ces tissus (Sies, 1993).

Les résultats de notre expérimentation permettent de montrer sur le plan hépatique une claire diminution hautement significative ($p < 0,01$) de l'enzyme antioxydante (GPx) et une augmentation significative ($p < 0,05$) du GST chez les rats traités au propiconazole (G3) et une augmentation très hautement significative dans le groupe traité au mélange (G7).

L'analyse de l'activité de l'enzyme GPx au niveau des testicules révèle une légère diminution significative chez le groupe traité Pb (G4), hautement significative chez les groupes traités Pz (G2), Pb (G5) et Mix (G6), le résultat de ce marqueur a été très hautement significative chez les groupes traités Pz (G3) et Mix (G7).

Pour le résultat de la GPx les résultats de notre expérimentation sont similaires à ceux obtenus dans une étude faite sur des rats traités au malathion à une dose de 27 mg/kg pendant 30 jours. Ces résultats ont enregistré des taux inférieurs en GPx hépatique et testiculaire (Al-Othman et al., 2011a). Yahia et al. 2016 ont constaté aussi une diminution de la GPx dans les tissus des testicules et du foie chez les différents groupes traités au mancozebe à différentes doses (250, 500, 1000mg/kg) par rapport aux témoins.

D'autres résultats ont également montré que l'exposition au chlorpyrifos méthyl parathion et au malathion ainsi que leur mixture a généré un stress oxydatif dans les tissus des rats, témoignant d'une accumulation des produits de la peroxydation. Les résultats ont montré clairement une diminution de l'activité de GPx (Ojha et al., 2011). En outre, des rats qui ont été traités par voie orale avec deux doses de thiaclopride (112,5 mg/kg) et de deltaméthrine (15 mg/kg) et leur combinaison pendant 30 jours; Les résultats obtenus montrent une diminution significative de l'activité de GPx chez le groupe traité au mélange (Aydin., 2011). Les travaux de Astriz et al (2009 a,b,c) ont montré également que de l'exposition chronique

Discussion

aux pesticides chez les rats injectés i.p. pendant 5 semaines avec des doses comprises entre 1/50 et 1/250 DL50 de diméthoate, glyphosate et zineb, seuls ou en combinaison ont augmenté l'état de stress oxydatif dans le foie et les testicules ou le résultat de la GPx été plus observe dans les groupes traité aux combinaisons possibles de ces trois pesticides.

Conclusion et perspective

Nos résultats permettent d'affirmer la toxicité à ces fongicides aux doses décrites chez l'animal de laboratoire au niveau du foie, des reins et au niveau des organes de reproduction.

Notons que le groupe traité au mélange même à dose plus faible peut avoir des effets qui peuvent être égale ou plus forte que la dose seul.

Les recherches en termes de santé concernant l'exposition aux pesticides ont bien démontré jusqu'à présent ses effets très néfastes sur l'organisme humain.

En perspective, il serait intéressant de développer ces recherches d'un point de vue opérationnel par approfondissement de la connaissance sur l'appréciation de la détoxification de l'organisme. Ces travaux ouvrent un certain nombre de perspectives qu'il serait souhaitable de :

- ✚ Étudier les capacités de détoxification à travers les dosages de tous les éléments de la cascade enzymatique du système de détoxification notamment le GST, Catalase, SOD et les métallothionines ainsi que les protéines de stress : Heat Shock Protein (HSP).
- ✚ Utilisé de doses faibles proches de la NOAEL.
- ✚ Prolonger la durée d'exposition des animaux afin de savoir si les perturbations fonctionnelles et moléculaires pourraient aboutir à l'apparition des pathologies.
- ✚ Approfondir les recherches du mécanisme d'action du pesticide *in vivo* : des études plus approfondies (étude de génotoxicité pour la recherche d'un dommage de l'ADN ou des études de biologie moléculaire permettant de savoir si une atteinte de l'ADN serait déclenchée de façon directe).
- ✚ Étudier le potentiel de détoxification des pesticides par certaines plantes médicinales et tester leurs propriétés phytothérapeutiques sur un modèle de laboratoire.

Références bibliographiques

A

Abdollahi M, Ranjbar A, Shadina S, Nikfar S, Rezaie A. 2004; Pesticides and oxidative stress: A review. *Medic Sci Monitor.* 10: 141-47.

Abdollahi M, Ranjbar A, Shadina S, Nikfar S, Rezaie A. 2004; Pesticides and oxidative stress: A review. *Medic Sci Monitor.* 10: 141-47.

Abell, A, Juul S, Bonde J P. 2000; Time to pregnancy among female greenhouse workers. *Scandinavian Journal of Work and Environmental Health.* 26: 131–136.

Aboul-Soud M A, Al-Othman A M, El-Desoky G E, Al-Othman Z A, Yusuf K, Ahmad J, Al-Khedhairi A A. 2011; Hepatoprotective effects of vitamin E/selenium against malathion-induced injuries on the antioxidant status and apoptosis-related gene expression in rats. *J Toxicol Sci.* 36: 285-296.

Adhikari S, Sarkar B, Chatterjee A, Mahapatra C T, Ayyappan S. 2004; Effects of cypermethrin and carbofuran on certain hematological parameters and prediction of their recovery in a freshwater teleost, *Labeo rohita* (Hamilton). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 58: 220–226.

Agrahari S, Gopal K, Pandey K. 2006; Biomarkers of monocrotophos in a freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch). *J Environ Biol.* 27: 453-457.

Agrawal A, Sharma B. Pesticides induced oxidative stress in mammalian systems. 2010; *Int J Biol. Med Res.* 1(3): 90-104.

AGRITOX - Base de données sur les substances actives phytopharmaceutiques. PROPINEBE. Dernière mise à jour de la fiche d'information le 21/06/2004. <http://www.agritox.anses.fr/php/sa.php?sa=113>.

AGRITOX - Base de données sur les substances actives phytopharmaceutiques. PROPICONAZOL. Dernière mise à jour de la fiche d'information le 30/11/2010. <http://www.agritox.anses.fr/php/sa.php?sa=153>.

Références bibliographiques

Agrosava. 2017. Emballage Antracol.
<http://www.agrosava.com/en/product/fungicides/Antracol/Antracol.html>.

Ajiboye T O. 2010; Redox status of the liver and kidney of 2,2-dichlorovinyl dimethyl phosphate (DDVP) treated rats. *Chem Biol Interact.* 14; 185-202.

Alavanja M C R, Ross M K, Bonner M R. 2013; Increased cancer burden among pesticide applicators and others due to pesticide exposure. *CA: A Cancer Journal for Clinicians.* 63: 120-142.

Alavanja M C, Hoppin J A, Kamel F. 2004; Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. *Annu. Rev. Public Health.* 25, 155–197.

Al-Awthyan Y S, Al-Douis M A, El-Sokkary G H, Aqlan E M. 2012; Dimethoate-induced oxidative stress and morphological changes in the liver of Guinea pig and the protective effect of vitamin C and E. *Asian J Biol Sci.* 5: 9-19.

Ali M, Mukul S, Gupta D, Singh AK, Kumar R, Nath A, Singh JK, Kumar A. 2012; Endosulfan Exposure Leads to Infertility in Male Mice. *Asian J Exp Biol Sci.* 3(1): 124-128.

Al-Othman AM, Al-Numair KS, El-Desoky GE, Yusuf K, Al Othman ZA, Aboul-Soud MAM, Giesy JP. 2011a; Protection of tocopherol and selenium against acute effects of malathion on liver and kidney of rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 5(8): 1054-1062.

Al-Shinnawy M S. 2008; Assessment of the changes in some diagnostic parameters in male albino rats (*Rattus norvegicus*) toxicated with thiodicarb insecticide. *Egypt Acad J Biol Sci.* 1(2): 157-166.

Amann R P. 1982; A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristic. *Journal of Andrology.* 2: 37-38.

Amizadeh M, Askari SG. 2011; Effects of Endosulfan on Human Health. *Toxicol.* 2(12): 1-9.

Andersen H R, Schmidt I M, Granjean P, Jensen T K, Budtz-Jorgensen E, Kjaerstad M B, Baelum J, Nielsen J B, Skakkebaek N E, Main K M. 2008; Impaired reproductive development in sons of women occupationally exposed to pesticides during pregnancy. *Environmental Health Perspectives.* 116: 566–572.

Références bibliographiques

Andersson A M, Jorgensen N, Main K M, Toppari J, Rajpert-De Meyts E, Leffers H, et al. 2008; Adverse trends in male reproductive health: we may have reached a crucial tipping point', *Int. J. Androl.* 31: 74–80.

Andersson B. 1977; Regulation of body fluids. *Ann Rev Physiol.* 39: 185-200.

Aniagu, S O, Nwinyi F C, Akumka D D, Ajoku G A, Dzarma S, Izebe K S, Ditse M, Nwaneri P, Wambebe C, Gamaniel K. 2005; Toxicity studies in rats fed nature cure bitters. *Afr. J. Biotechnol.* 4: 72–78.

Arcury T A, Grzywacz J G, Barr D B, Tapia J, Chen H, Quandt S A. 2007; Pesticide urinary metabolite levels of children in eastern North Carolina farmworker households. *Environmental Health Perspectives.* 115: 1254-1260.

Aroonvilairat S, Kespichayawattana W, Sornprachum T, Chaisuriya P, Ratanabanangkoon ST. 2015; Effect of Pesticide Exposure on Immunological, Hematological and Biochemical Parameters in Thai Orchid Farmers A Cross-Sectional Study. *Int J Environ Res Public Health.* 12: 5846-5861.

Astiz M, De Alaniz M J T, Marra C A. 2009b; Effect of pesticides on cell survival in rat liver and brain. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 72: 2025–2032.

Astiz M, De Alaniz M J T, Marra C A. 2009c; Antioxidant defense system in rats simultaneously intoxicated with agrochemicals. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 28: 465–473.

Astiz M, De Alaniz M J T, Marra C A. 2009a; The impact of simultaneous intoxication with agrochemicals on the antioxidant defense system in rat. *Pestic. Biochem. Physiol.* 94: 93–99.

Aube M, Larochelle C, Ayotte P. 2011; Differential effects of a complex organochlorine mixture on the proliferation of breast cancer cell lines. *Environ Res.* 111(3) : 337-347.

Aubertot JN, Barbier JM, Carpentier A, Gril JJ, Guichard L, Lucas P, Savary S, Savini I, Voltz M. 2005; Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux. Rapport d'expertise scientifique collective. INRA et Cemagref (France).

B

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

Baltazar M T, Dinis-Oliveira R J, de Lourdes Bastos M, Tsatsakis A M, Duarte J A, Carvalho F. Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases - A mechanistic approach. *Toxicology Letters*. 2014; 230: 85-103.

Banaee M, Sureda A, Mirvaghefi A R, Ahmadi K. 2011; Effects of diazinon on biochemical parameters of blood n rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pest Biochem Physiol*. 99: 1-6.

Banerjee B D, Seth V, Ahmed R S. 2001; Pesticides induced oxidative stress: perspectives and trends, *Rev. Environ. Health*. 16: 1-40.

Basir A, Khan A, Mustafa R, Khan MZ, Rizvi F, Mahmood F, Yousaf A. 2011; Toxicopathological effects of lambda-cyhalothrin in female rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Hum Exp Toxicol*. 30: 591-602.

Bempah C K, Buah-Kwofie A, Enimil E, Blewu B, Agyei-Martey G. 2012; Residues of organochlorine pesticides in vegetables marketed in Greater Accra Region of Ghana. *Food Control*. 25: 537-542.

Bhatti J S, Sidhu I P S, Bhatti G K. 2011; Ameliorative action of melatonin on oxidative damage induced by atrazine toxicity in rat erythrocytes. *Mol Cell Biochem*. 353: 139–149.

Bhatti JS , Sidhu I P S, Bhatti G K. 2011; Ameliorative action of melatonin on oxidative damage induced by atrazine toxicity in rat erythrocytes. *Mol Cell Biochem*. 353: 139–149.

Birkhøj Mia, Christine Nellemann, Kirsten Jarfelta, Helene Jacobsen, Helle Raun Andersen, Majken Dalgaard, Anne Marie Vinggaard. 2004; The combined antiandrogenic effects of five commonly used pesticides, *Toxicology and Applied Pharmacology*. 201: 10– 20.

Bjorling-Poulsen M, Andersen H R, Grandjean P. 2008; Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. *Environmental Health*. 7: 50.

Références bibliographiques

Bjørling-Poulsen M, Andersen H R, Grandjean P. 2008; Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. *Environmental Health*. 7: 50.

Blystone C R, Lambright C S, Cardon M C, Furr J, Rider C V, et al. 2009; Cumulative and antagonistic effects of a mixture of the antiandrogens vinclozolin and iprodione in the pubertal male rat. *Toxicol Sci*. 111: 179-188.

Borges A, Scotti L V, Siqueira D R, Zanini R, Do Amaral F, Jurinitz D F, Wasserman G F. 2007; Changes in hematological and serum biochemical values in jundia *Rhamdia quelen* due to sub-lethal toxicity of cypermethrin. *Chemosphere*. 69: 920–926.

Bououza F, Mallem L, Boulakoud MS. 2014; Evaluation of Methyl Thiophanate Toxicity on Fertility Andhistology of Testis And Epidydim In Male Rabbit. *Advances in Environmental Biology*. 8(5): 1196-1204.

Bououza S. 2016. Toxicity evaluation of some phytosanitary products widely used in the field of agriculture in algeria on laboratory animals. Thèse de doctorat. Université d'Annaba.

Bouziani M. 2007; L'usage immodéré des pesticides: De graves conséquences sanitaires. *Santé maghreb. Le guide de la médecine et de la santé*. pp8.

Bradford M M. 1976 ; A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72: 248-54.

Bucolo G, David H. 1973; Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem*. 19(5): 476–82.

Burtis C, Ashwood E, Bruns D. 2005; *Tiets textbook of clinical chemistry*. 4th ed. Washington, DC : Saunders.

C

Canas-Gutierrez GP, Angarita-Velasquez MJ, Restrepo-Florez JM, Rodriguez P, Moreno, CX, Arango R. 2009; Analysis of the *CYP51* gene and encoded protein in propiconazole resistant isolates of *Mycosphaerella fijiensis*. *Pest Management Science*. 65: 892-899.

Références bibliographiques

Canistro D, Pozzetti L, Sapone A, Broccoli M, Affatato A A, et al. 2008; Perturbation of murine liver cyp-superfamily of isoforms by different combinations of pesticide mixtures. *Food Chem Toxicol.* 46 : 34-42.

Canistro D, Pozzetti L, Sapone A, Broccoli M, Affatato A A, Stradiotti A, Longo V, Menichini P, Barale R, and Paolini M. 2008; Perturbation of murine liver cyp-superfamily of isoforms by different combinations of pesticide mixtures. *Food and Chemical Toxicology.* 46(1): 34-42.

Carpy S A, Kobel W, and Doe J. 2000; Health risk of low-dose pesticides mixtures: a review of the 1985-1998 literature on combination toxicology and health risk assessment. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews.* 3(1): 1-25.

Cassault-Meyer E, Gress S, Séralini G, Galeraud-Denis I. 2014; An acute exposure to glyphosate-based herbicide alters aromatase levels in testis and sperm nuclear quality. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 38: 131-140.

CEC, 2003; A European environment and health strategy. Commission of the European community.

Cedergreen, N. 2014; Quantifying synergy: a systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. *PLoS One.* 9.

Cemek M, Büyükben A, Büyükkuroğlu ME, Aymelek F, Tür L. 2010; Protective roles of vitamin E (α -tocopherol), selenium and vitamin E plus selenium in organophosphate toxicity in vivo: A comparative study. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 96: 113-118.

Chade A R, Kasten M, Tanner C M. 2006; Nongenetic causes of Parkinson's disease. *J. Neural. Transm. Suppl.* 147-151.

Choudhary N, Goyal R, Joshi SC. 2008; Effect of malathion on reproductive system of male rats. *Journal of Environmental Biology.* 29(2): 259-262.

Choudhary N, Joshi SC. 2003; Reproductive toxicity of Endosulfan in Male Albino Rats. *Bull Environ Contami Toxicol.* (70): 285-289.

Références bibliographiques

Christiansen S, Scholze M, Dalgaard M, Vinggaard A M, Axelstad M, et al. 2009; Synergistic disruption of external male sex organ development by a mixture of four antiandrogens. *Environ Health Perspect.* 117 : 1839-1846.

Christine M C, Niti N Patel, Ruy, Tchao R, Peter J H. 2008; Role of biotransformation in 3-(3, dichloro-phenyl)-2,4- thiazolidinedione-induced hepato-toxicity in Fischer 344 rats. *Toxicology.* 250: 100-108.

Cicchetti F, Lapointe N, Roberge-Tremblay A, Saint-Pierre M, Jimenez L, et al. 2005; Systemic exposure to paraquat and maneb models early Parkinson's disease in young adult rats. *Neurobiol Dis.* 20 : 360-371.

Claeys W L, Schmit J-F, Bragard C, Maghuin-Rogister G, Pussemier L, Schiffers B. 2011; Exposure of several Belgian consumer groups to pesticide residues through fresh fruit and vegetable consumption. *Food Control.* 22: 508-516.

Claudio L. 2002; The Hudson: a river runs through an environmental controversy. *Environ Health Perspect.* 110(4): A184-187.

Cole M B, Arnold D E, Watten B J, Krise W F. 2001; Haematological and physiological responses of brook charr, to untreated and limestone-neutralized acid mine drainage. *J. Fish Biol.* 59: 79-91.

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.

Colosio C, Birindelli S, Corsini E, Galli C L, Maroni M. 2005; Low level exposure to chemicals and immune system. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207, 320-328.

Commission européenne. 2003 ; Les produits phytosanitaires, la santé et l'environnement. Luxembourg: Office des publications officielles des Communautés européennes.

Commission of the European Communities. 2007; Monitoring of pesticides residues in products of plant origin in the European Union, Norway, Iceland and Liechtenstein 2005.

Références bibliographiques

Corbett J V. 2008; Laboratory tests and diagnostic procedures: with nursing diagnoses. 7th ed. USA: Pearson/Prentice Hall.

Corsini E, Sokooti M, Galli C L, Moretto A, Colosio C. 2013; Pesticide induced immunotoxicity in human: a comprehensive review of the existing evidence. *Toxicology*. 307: 123-135.

Couvreur F. 2002; Fongicides des céréales et protéagineux. France : ITCF avec la participation de l'ANDA. p.216.

Crepet A, Heraud F, Bechaux C, Gouze M E, Suzanne, et al. 2012; The PERICLES research program: an integrated approach to characterize the combined effects of mixtures of pesticide residues to which the French population is exposed. *Toxicology*.

D

Das P P, Shaik A P, Jamil K. 2007; Genotoxicity induced by pesticide mixtures: in-vitro studies on human peripheral blood lymphocytes. *Toxicol Ind Health*. 23: 449-458.

Djeffal A, Messarah M, Boumendjel A, Kadeche L, El Feki A. 2012; Protective effects of vitamin C and selenium supplementation on methomyl-induced tissue oxidative stress in adult rats. *Toxicology and Industrial Health*. 3(1): 31-43.

Douane Algérienne. 2010 ; Disponible sur : <http://www.douane.gov.dz/>.

Dutta A L, Sahu C R. 2013; *Embllica officinalis* Garten fruits extract ameliorates reproductive injury and oxidative testicular toxicity induced by chlorpyrifos in male rats. *SpringerPlus*. 2: 541.

Duty S M, Silva MJ, Barr D B, Brock J W, Ryan L, Chen Z, Herrick RF, Christiani DC, Hauser R. 2003; Phthalate exposure and human semen parameters. *Epidemiology*. 114: 269-277.

E

ECERI, l'European Cancer and Environment Research Institute. Expertise toxicologique concernant cinq produits phytosanitaires utilisés par épandage aérien en Martinique et en Guadeloupe (Antilles françaises). 30 Octobre 2013; ECERI, Bruxelles.

Références bibliographiques

El-Demerdash F M, Dewer Y, Elmazoudy R H, Attia A A. 2013; Kidney antioxidant status, biochemical parameters and histopathological changes induced by methomyl in CD-1 mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 65: 897-901.

El-Demerdash F M. 2011; Oxidative stress and hepatotoxicity induced by synthetic pyrethroids-organophosphate insecticides mixture in rat. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 29: 145-158.

El-Demerdash F M, Yousef M I, Kedwany F S, Baghdadi H H. 2004; Role of alfa-tochopherol and betacarotene in ameliorating the fenvalerate-induced changes in oxidative stress, hemato-biochemical parameters and semen quality of male rats. *J Environ Sci Health B*. 39: 443-459.

El-Demerdash F M. 2004; Antioxidant effect of vitamin E and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rats exposed to aluminium. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 18: 113-121.

El-Fakharany I I, Massoud A H, Derbalah A S, Saad Allah M S. 2011; Toxicological effects of methomyl and remediation technologies of its residues in an aquatic system. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*. 3(13): 332-339.

El-Kashoury A A, Salama A F, Selim A I, Mohamed R A. 2010; Chronic Exposure Of Dicofol Promotes Reproductive Toxicity In Male Rats. *Life Science Journal*. 7(3): 5-19.

Elmazoudy R H, Attia A A, El-shenawy N S. 2011; Protective role of propolis against reproductive toxicity of chlorpyrifos in male rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 101: 175-181.

Enoch R R, Stanko J P, Greiner S N, Youngblood G L, Rayner J L, and Fenton S E. 2007; Mammary gland development as a sensitive end point after acute prenatal exposure to an atrazine metabolite mixture in female Long-Evans rats. *Environmental Health Perspectives*. 115(4): 541-547.

Espinoza-Navarro O, Bustos-Obregón E. 2014; Effects of malathion on cellularity and sperm differentiation in testis and epididymis of adult rats. *Int J Morphol*. 32(1): 119-124.

European Commission. 2011; Opinion on the Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures. 45p.

European Food Safety Authority (EFSA). 2015; The 2013 European Union report on pesticide residues in food. EFSA J. 13 (3): 4038 pp. 169.

Ezeji E U, Ogueri O D, Udebuani A C, Josephath N O, Kalu O. 2015; Effect of Dichlorvos on the fertility of adult male albino rats. Nature and Science. 13(12): 1-5.

F

Fan S, Zhang F, Deng K, Yu C, Liu S M, Zhao P, Pan C. 2013; Spinach or Amaranth contains highest residue of metalaxyl, fluazifop-p-butyl, chlorfyrifos, and lamda-cyhalothrin on six leaf vegetables upon open field application. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 61: 2039-2044.

FAO (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture). 2002; Les perspectives à long terme. Perspectives agricoles. In : Agriculture mondiale: horizon 2015/2030 [Rapport abrégé].

FAO (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture). 2010; La situation mondiale de l'alimentation et de l'agriculture. ISSN 0251-1460.

FAOSTAT en ligne. 2016 ; Disponible sur : <http://faostat.fao.org/>.

Farag A T, El-Aswad A F, Shaaban N A. 2007; Assessment of reproductive toxicity of orally administered dimethoate in male mice. Reprod Toxicol. 23: 232–238.

Fayez V, Bahig M. 1991; Short term toxicity of methomyl in rats. Chemosphere. 23(3): 375-381.

Feig D I, Mazzali M, Kang D H, Nakagawa T, Price K, Kannelis J, et al. 2006; Serum uric acid: a risk factor and a target for treatment? Journal of the American Society of Nephrology. 17: S 69-73.

Fenik J, Tankiewicz M, Biziuk M. 2011; Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. Trends in Analytical Chemistry. 30: doi:10.1016/j.trac.2011.02.008.

Références bibliographiques

Feron V J, Cassee F R, and Groten J P. 1998; Toxicology of chemical mixtures: international perspective. *Environmental Health Perspectives*. 106(6): 1281-1289.

Flohé L, Günzler W A. 1984; Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, 105: 114-21.

Freire C, Koifman S. 2012; Pesticide exposure and Parkinson's disease: Epidemiological evidence of association. *Neurotoxicology*. 33: 947-971.

G

Garg D P, Bansal A K, Malhotra A, Kiran R, Dhawan D K. 2009; Methomyl induced hematological and biochemical alterations protection by vitamin E. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 93(3): 127-132.

Garg D P, Bhalla P, Kiran R, Bansal A K, Dhawan D K. 2009a; Vitamin E-mediated protection in methomyl induced alterations in rat liver. *Toxicological and Environmental Chemistry*. 91(4): 685-698.

Garoui E M, Fetoui H, Ayadi Makni F, Boudawara T, Zeghal N. 2011; Cobalt Chloride induces hepatotoxicity in adult rats and their suckling pups. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 9-15.

Gasnier C, Dumont C, Benachour N, Clair E, Chagnon M-C, Séralini G-E. 2009; Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology*. 262: 184-191.

Gatignol M C, Étienne M J C. 2010; Pesticides et santé. Assemblée nationale sénat, constitution du 4 octobre 1958. Rapport n° 2463.

Goldner W S, Sandler D P, Yu F, Hoppin J A, Kamel F, LeVan T D. 2010; Pesticide use and thyroid disease among women in the Agricultural Health Study. *American Journal of Epidemiology*. 171: 455-464.

Graillot V, Takakura N, Hegarat L L, Fessard V, Audebert M, Cravedi J P. 2012; Genotoxicity of pesticide mixtures present in the diet of the French population. *Environ Mol Mutagen*. 53: 173-184.

Références bibliographiques

Gray Jr L E, Ostby J, Furr J, Wolf C J, Lambright C, Parks L, Veeramachaneni D N, Wilson V, Price M, Hotchkiss A, Orlando L, Guillette L. 2001; Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. *Hum. Reprod.*, 7: 248–264.

Greenpeace. SANTÉ : LES PESTICIDES SÈMENT LE TROUBLE. 2015 ; greenpeace.fr.

Gunnell D, Eddleston M, Phillips M R, Konradsen F. 2007; The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: systematic review. *BMC Public Health*. 7: 357–371.

Guobin Sun, Sheau-Fung Thai, Douglas B. Tully, Guy R. Lambert, Amber K. Goetz, Douglas C. Wolf, David J. Dix, Stephen Nesnow. 2004; Propiconazole-induced cytochrome P450 gene expression and enzymatic activities in rat and mouse liver. *Toxicology Letters*. 155: 277–287.

Gupta R C. 2001; Depletion of energy metabolites following acetylcholinesterase inhibitor induced status epilepticus: protection by antioxidants. *Neurotoxicology*. 22: 271-282.

Guyton K, Loomis D, Grosse Y, El Ghissassi F, Brenbrahim-Tallaa L, Guha, N, Scoccianti C, Mattock H, Straif K. 2015; Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *Lancet Oncology*. Published online, March 20. [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70134-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70134-8).

H

Habig W H, Pabst M J, Jakoby W B. 1974; Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*. 249(22): 7130-9.

Hagar H, Fahmy A. 2009; A biochemical, histological, and ultrastructural evaluation of the effect of Dimethoate intoxication on rats pancreas. *Toxicol Lett*. 133: 161-170.

Haider MJ, Rauf A. 2014; Sub-lethal Effects of Diazinon on Hematological Indices and Blood Biochemical Parameters in Indian Carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *Braz Arch Biol Technol*. 57: 947-953.

Hallegue D, Ben Rhouma K, Tebourbi O, Sakly M. 2003; Impairment of Testicular Endocrine and Exocrine Functions after Dieldrin Exposure in Adult Rats. *Pol J Environ Stud*, 12(5): 557-561.

Références bibliographiques

Harnley M E, Bradman A, Nishioka M, McKone T E, Smith D, Mclaughlin R, Kavanagh-Baird G, Castorina R, Eskenazi B. 2009; Pesticides in dust from homes in agricultural area. *Environmental Science and Technology*. 43: 8767-8774.

Hass U, Boberg J, Christiansen S, Jacobsen P R, Vinggaard A M, Taxvig C, Poulsen M E, Herrmann S S, Jensen B H, Petersen A, Clemmensen L H, Axelstad M. 2012; Adverse effects on sexual development in rat offspring after low dose exposure to a mixture of endocrine disrupting pesticides. *Reprod. Toxicol*. 34: 261–274.

Hayes T B, Case P, Chui S, Chung D, Haefele C, et al. 2006; Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact?. *Environ Health Perspect*. 114 (suppl 1): 40-50.

Heikal T M, Abdel- tawab H, Mossa M A, Abdel R, Marei J I K. 2013; The ameliorating effects of green tea extract against cyromazine and chlorpyrifos induced liver toxicity in male rats. *Asian J Pharm Clin Res*. 6: 48-55.

Henneberger P K, Liang X, London S J, Umbach D M, Sandler D P, Hoppin J A. 2014; Exacerbation of symptoms in agricultural pesticide applicators with asthma. *International Archives of Occupational and Environmental Health*. 87: 423-432.

Hernandez A F, Gil F, Lacasaña M, Rodríguez-Barranco M, Tsatsakis A M, Requena M. 2013a; Pesticide exposure and genetic variation in xenobiotic-metabolizing enzymes interact to induce biochemical liver damage. *Food and Chemical Toxicology*. 61: 144–51.

Hewitt R, Forero A, Luncsford P J, Martin F L. 2007; Enhanced micronucleus formation and modulation of BCL-2:BAX in MCF-7 cells after exposure to binary mixtures. *Environ Health Perspect*. 115 (suppl 1): 129-136.

Holland N, Furlong C, Bastaki M, Richter R, Bradman A, Huen K. 2006; Paraoxonase polymorphisms, haplotypes, and enzyme activity in Latino mothers and newborns. *Environmental Health Perspectives*. 114: 985-991.

Hoppin J A, Umbach D M, London S J, Henneberger P K, Kullman G J, Coble J, Alavanja M C, Bean Freeman L E, Sandler D P. 2009; Pesticide use and adult-onset asthma among male farmers in the Agricultural Health Study. *European Respiratory Journal*. 34: 1296–1303.

Références bibliographiques

Huang L G, Lin P, Gong C Y, Zhang J, Zhou Q, Gong X D, Zeng L. 2006; Pathological changes in the testes of the rats with hypospadias induced by dichlorvos. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 12, 693–695.

I

INCHEM. 1987; Monograph No 768. Propiconazole (Pesticide residues in food: 1987 evaluations Part II Toxicology)p.19. [www.inchem.org/ documents/jmpr/jmpmono/v87pr13.htm](http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v87pr13.htm)

Index des produits phytosanitaires à usage agricole. 2015; Ministère de l'agriculture du développement durable et de la pêche (Algérie).

INERIS (Institut national de l'environnement industriel et des risques). juillet 2014; VALEUR GUIDE ENVIRONNEMENTALE. PROPICONAZOLE – n° CAS : 60207-90-1.

Inserm. juin 2013; Pesticides Effets sur la santé. Editions Inserm. Collection Expertise collective. ISBN 978-2-85598-905-1.

IPCS, I.P.o.C.S. 2002; Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors. In: Damstra, T., Barlow, S., Bergman, A., Kavlock, R., van der Kraak, G. (Eds.), World Health Organization, Geneva.

Ito N, Hagiwara A, Tamano S, Hasegawa R, Imaida K, Hirose M, and Shirai T. 1995; Lack of carcinogenicity of pesticide mixtures administered in the diet at acceptable daily intake (ADI) dose levels in rats. *Toxicology Letters.* 82-83(5): 13-520.

J

Jain N, Srivastava P, Joshi S C. 2013; Testicular Dysfunction in Male Rat Following Endosulfan Exposure. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 19(2): 108-113.

Jardim A N O, Caldas E D. 2012; Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food – results from 2001 to 2010. *Food Control.* 25: 607-616.

Jennifer L, Rayner AC, Rolondo R, Enoch C L, Douglas C, Wolf B, Suzanne E, Fenton. 2007; Atrazine-induced reproductive tract alterations after transplacental and/or lactational exposure in male Long–Evans rats. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 218: 238–248.

Références bibliographiques

Johnson K A. 2005; Toxicology & Environmental Research and Consulting, Midland, MI; Laboratory Project Study. 1-35.

Jonker D, Jones M A, Van Bladeren P J, Woutersen R A, Til H P, and Feron V J. 1993; Acute (24 hr) toxicity of a combination of four nephrotoxicants in rats compared with the toxicity of the individual compounds. *Food and Chemical Toxicology*. 31(1): 45-52.

Jonker D, Woutersen R A, and Feron V J. 1996; Toxicity of mixtures of nephrotoxicants with similar or dissimilar mode of action. *Food Chem Toxicol*. 34(11-12): 1075-1082.

Jorgensen N, Joensen U N, Jensen T K, Jensen M B, Almstrup K, Olesen I A, et al. 2012; Human semen quality in the new millen-nium: a prospective cross-sectional population-based study of 4867 men, *BMJ Open* 2. <http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2012-000990>.

Joshi S C, Bansal B, Jasuja N D. 2011; Evaluation of reproductive and developmental toxicity of Cypermethrin in male albino rats. *Toxicol Environmen Chem*. 93: 593-602.

Joshi S C, Mathur R, Gulati N. 2007; Testicular toxicity of chlorpyrifos (an organophosphate pesticide) in albino rat. *Toxicol Ind Health*. 23: 439–444.

K

Kalender S, Kalender Y, Durak D, Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Cevrimli B S. 2007; Methyl parathion induced nephrotoxicity in male rats and protective role of vitamins C and E. *Pestic Biochem Phys*. 88: 213–8.

Kalender S, Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Acikgoz F, Durak D, Ulusoy Y, Kalender Y. 2005; Diazinon-induced hepatotoxicity and protective effect of vitamin E on some biochemical indices and ultrastructural changes. *Toxicology*. 211(3): 197–206.

Kaplan L A, Rubaltelli F F, Hammerman C, Vilei M T, Leiter C, Abramov A. 1984b; Bilirubin. In: Kaplan L A and Pesce AJ. Eds. *Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation*. St Louis. Toronto. Princeton: The C. V. Mosby Company. 1238-41.

Kaplan LA. Urea. In: Kaplan LA and Pesce AJ. 1984; Eds. *Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation*. St Louis. Toronto. Princeton: The C. V. Mosby Company. 1257-60.

Références bibliographiques

Karami-Mohajeri S, Abdollahi M. 2011; Toxic influence of organophosphate, carbamate and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: a systematic review. *Human and Experimental Toxicology*. 30(9): 1119-1140.

Kata F S. 2008; Effect Of Dichlorvos Pesticide On Fertility Of Laboratory Male Mice (*Mus Musculus L*). *Bas J Vet Res*. 7(1): 9-18.

Kaur C and Mangat H K. 1980; Effects of estradiol dipropionate on the biochemical composition of testis and accessory sex organs of adult rats. *Andrologia*. 12(4): 373-378.

Kavlock R, Cumming A. 2005; Mode of action vinclozolin: inhibition of androgen receptor function induced malformation in reproductive development. *Crit Rev Toxicol*. 35(8-9): 721-726.

Keikotlhaile B M, Spanoghe P, Steurbaut W. 2010; Effects of food processing on pesticide residues in fruits and vegetables: A meta-analysi approach. *Food and Chemical Toxicology*. 48: 1-6.

Key P, Chung K, Siewicki T, Fulton M. 2007; Toxicity of three pesticides individually and in mixture to larval grass shrimp (*Palaemonetes pugio*). *Ecotoxicol Environ Saf*. 68 : 272-277.

Khan D A, Bhatti M M, Khan F A, Naqvi S T, Karam A. 2008; Adverse effects of pesticides residues on biochemical markers in Pakistani tobacco farmers. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 1: 274-282.

Khan D A, Bhatti MM, Khan FA, Naqvi S T & Karam A. 2008; Adverse effects of pesticides residues on biochemical markers in Pakistani tobacco farmers. *Internat J Clinic Exp Med*. 1: 274-282.

Khan D A, Hashmi I, Mahjabeen W, Naqvi T A. 2009; Monitoring health implications of pesticide exposure in factory workers in Pakistan. *Environ Monit Assess*. 168: 231-240.

Khan D A, Saira S, Mahwish M B, Farooq A K, Naqvi T A. 2010; Risk assessment of pesticide exposure on health of Pakistani tobacco farmers. *J Expo Sci& Environ Epidemiol*. 20: 196–204.

Références bibliographiques

Kimura-Kuroda J, Komuta Y, Kuroda Y, Hayashi M, Kawano H. 2012; Nicotine-like effects of the neonicotinoid insecticides acetamiprid and imidacloprid on cellular neurons from neonatal rats. *PLoS ONE*. 7: e32432.

Kirschvink N, Moffarts B, Lekeux P. 2008; The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *The Veter J*. 177: 178-191.

Kjeldsen L S, Ghisari M, Bonfeld-Jørgensen E C. 2013; Currently used pesticides and their mixtures affect the function of sex hormone receptors and aromatase enzyme activity. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 272: 453-464.

Koechlin R C. 2006; Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*. 20: 165–177.

Köhler H R, Triebkorn R. 2013; Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond?. *Science*. 341: 759-765.

Koller A. Total serum protein. *Clin Chem*. Toronto : Princeton. 1984; 1316-1324.

Kortenkamp A, Faust M, Scholze M, and Backhaus T. 2007; Low-level exposure to multiple chemicals: reason for human health concerns? *Environmental Health Perspectives*. 115 Suppl 1:106-114.

Kortenkamp A. 2014; Low dose mixture effects of endocrine disrupters and their implications for regulatory thresholds in chemical risk assessment. *Curr. Opin. Pharmacol*. 19: 105–111.

Kortenkamp A. 2008; Low dose mixture effects of endocrine disrupters: implications for risk assessment and epidemiology. *Int J Androl*. 31:233-24.

Koureas M, Tsakalof A, Tsatsakis A, Hadjichritodoulou C. 2012; Systematic review of biomonitoring studies to determine the association between exposure to organophosphorus and pyrethroid insecticides and human health outcomes. *Toxicology Letters*. 201: 155-168.

Ksheerasagar L R, Kaliwal B B. 2010; Effect Of Mancozeb On Thyroid, Testis, Accessory Reproductive Organs And Biochemical Constituents In Albino Mice. *Recent Research in Science and Technology*. 2(8): 07-17.

Références bibliographiques

Ksheerasagar L R, Kaliwal B B. 2006; Histological and biochemical changes in the liver of albino mice on exposure to insecticide, carbosulfan. *Caspian J Env Sci.* 4: 67-70.

L

Laetz C A, Baldwin D H, Collier T K, Hebert V, Stark J D, et al. 2009; The synergistic toxicity of pesticide mixtures: implications for risk assessment and the conservation of endangered Pacific salmon. *Environ Health Perspect.* 117 : 348-353.

Latifah Y, Sherazi S T F, Bhangar M I. 2011; Assessment of pesticide residues in commonly used vegetables in Hyderabad, Pakistan. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 74: 2299-2303.

LeDoux, M. 2011; Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin: A review of the past two decades. *Journal of Chromatography A* 1218:1021-1036.

Lepoivre, P. 2003; *Phytopathologie: bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte.* De Boeck Supérieur.

Leptiblog. 2017; tavelure pommier. <http://www.lepotiblog.com/fruits/la-pomme/maladies-pommier/>.

Leroux P, Gardan L. 2003; *La lutte chimique en phytopathologie.* Bruxelles : De Boeck et Larcier.

Li W, Tai L, Liu J, Gai G, Ding G. 2014; Monitoring of pesticide residues levels in fresh vegetable from Heibei Province, North China. *Environmental Monitoring Assessment.* doi: 10.1007/s10661-014-3858-7.

Liju V B, Jeena K, Kuttan R. 2013; Acute and subchronic toxicity as well as mutagenic evaluation of essential oil from turmeric (*Curcuma longa* L). *Food. Chem. Toxicol.* 53: 52–61.

Lissalde S. 2010; Application et validation des échantillonneurs passifs de type POCIS pour l'échantillonnage passif des pesticides dans les eaux du bassin versant charentais. In: Thèse de Doctorat: Université de Poitiers.

Références bibliographiques

Liu B, Gao H M, Hong J S. 2003; Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: role of neuroinflammation. *Environ. Health Perspect.* 111, 1065–1073.

Lodovici M, Aiolfi S, Monserrat C, Dolara P, Medica A, and Di Simplicio P. 1994; Effect of a mixture of 15 commonly used pesticides on DNA levels of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine and xenobiotic metabolizing enzymes in rat liver. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 13(3): 163-168.

Lodovici M, Casalini C, Briani C, Dolara P. 1997; Oxidative liver DNA damage in rats treated with pesticide mixtures. *Toxicology.* 117 : 55-60.

Lozowicka B, Jankowska M, Kaczyński P. 2012; Pesticide residues in Brassica vegetables and exposure assessment of consumers. *Food Control.* 25: 561-575.

M

Ma Z, Michailides T J. 2005; Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection.* 24: 853-863.

Mahajan R, Blair A, Lynch C F, Schroeder P, Hoppin J A, Sandler D P, Alavanja M C. 2006; Fonofos exposure and cancer incidence in the agricultural health study. *Environ. Health Perspect.* 114, 1838–1842.

Makrides C, Koukouvas M, Achillews G, Tsikkos S, Vounou E, Symeonides M, Christodoulides P, Ioannides M. 2005; Methomyl-induced severe acute pancreatitis: possible etiological association. *Journal of Pancreas.* 6(2): 166-171.

Mallem I, Keck G, Franck M, Boulakoud M S. 2007; Effets du Manèbe sur la thyroïde et la fertilité du lapin. *Revue Méd Vét.* 158: 452-457.

Manal E A Elhalwagy and Nashwah Ismail Zaki, Dec. 2008; Comparative study on pesticide mixture of organophosphorus and pyrethroid in commercial formulation, *Egyptian Journal of Natural Toxins.* Vol. 5(1,2): 36-55.

Manawadi S I, Kaliwal B B. 2010; Methomyl-induced alteration in mice hepatic-oxidative status. *Inter. J. Biotech. App.* 2(2): 11-19.

Références bibliographiques

- Mandrich L. 2014; Endocrine disrupters: The hazards for human health. *Cloning & Transgenesis*. 3: 1.
- Marcheterre L, Choudhry G, Webster G. 1988; Environmental Photochemistry of Herbicides. *Reviews of Environmental Contaminations and Toxicology*. 103: 61-126.
- Marin DH, Romero R, Guzman M, Sutton TB. 2003; Black sigatoka: an inceasing threat to banana cultivation. *Plant disease*. 87: 208-222.
- Marinovich M, Ghilardi F, and Galli C L. 1996; Effect of pesticide mixtures on in vitro nervous cells: comparison with single pesticides. *Toxicology*. 108(3): 201-206.
- Marmol-Maneiro L, Fernandez-D'Pool J, Sanchez B J Sirit Y. 2003; Seminal profile in workers exposed to cholinesterase inhibitor insecticides. *Invest Clin*. 44: 105- 117.
- Marra F, Gastaldelli A, Svegliati Baroni G, Tell G, Tiribelli C. 2008; Molecular basis and mechanisms of progression of nonalcoholic steatohepatitis. *Trends Mol Med*. 14: 72–81.
- Martoja & Martoja M. 1967; *Initiation aux techniques de l'histologie animale*. Edition MASSON, 346.
- Marty M S, Zablony C L, Liberacki A B, Yano B L. 2004; *Toxicology & Environmental Research and Consulting*. The Dow Chemical Company, Midland, MI; Laboratory Project Study. 221.
- Mehta A, Verma R S, Srivastava N. 2008; Chlorpyrifos-induced DNA damage in rat liver and brain. *Environ Mol Mutagen*. 49: 426-433.
- Mendola P, Selevan S G, Gutter S, Rice D. 2002; Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 8, 188–197.
- Menjivar, Vilchis F, Cardenas M, Cruz C, Pedraza-Chaverri J, and Perz-palaios. 1997; Transient alteration of the reproductive function in nephritic rats.
- Merhi M. 2008; *Etude de l'impact de l'exposition à des mélanges de pesticides à faibles doses: caractérisation des effets sur des lignées cellulaires humaines et sur le système hématopoïétique murin*. Thèse de doctorat. Université de Toulouse.

Références bibliographiques

Meyer-Baron M, Knapp G, Schäper M, van Thriel C. 2015; Meta-analysis on occupational exposure to pesticides–Neurobehavioral impact and dose–response relationships. *Environmental Research*. 136: 234-245.

Mnif W, Hassine A, Bouaziz A, Bartegi A, Thomas O, Roig B. 2011; Effect of endocrine disruptor pesticides: A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 8: 2265-2303.

Modaresi M, Seif M R. 2011; Effects of Endosulfan on the Reproductive Parameters of Male Rats. *J Reprod Infertil*. 12(2): 117-122.

Morais S, Dias E, Pereira M L. 2012; Carbamates: human exposure and health effects. M. Jokanovic (ed.). *The Impact of Pesticides*, WY Academy Press, Cheyenne. pp. 21–38.

Morgan M K, Sheldon L, Croghan C, Jones P, Chuang J, Wilson N. 2007; An observational study of 127 preschool children at their homes and daycare centers in Ohio: environmental pathways to cis-and trans-permethrin exposure. *Environmental Research*. 104: 266-74.

Morgan M K, Wilson N K, Chuang J C. 2014; Exposures of 129 Preschool Children to Organochlorines, Organophosphates, Pyrethroids, and Acid Herbicides at Their Homes and Daycares in North Carolina. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 11: 3743-3764.

Mossa A H, Abbassy M A. 2012; Adverse Hematological and Biochemical of certain formulated insecticides in male rats. *Research Journal of Environmental Toxicology*. 6(4): 160-168.

Mossa A T H, Heikal T M, Omara E A Z. 2014; Liver damage associated with exposure to aspirin and diazinon in male rats and the ameliorative effect of selenium. *Biomed Aging Pathol*. 4(2): 137-145.

Mostafalou S, Abdollahi M, 2013; Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 268, 157–177.

Mukinda, J T, Eagles P F. 2010; Acute and sub-chronic oral toxicity profiles of the aqueous extract of *Polygala fruticosa* in female mice and rats. *J.Ethnopharmacol*. 128: 236–240.

Références bibliographiques

Muñoz-Quezada M T, Iglesias V, Lucero B, Steenland K, Barr D B, Levy K, Ryan P, Alvarado S, Concha C. 2012; Predictors of exposure to organophosphate pesticides in schoolchildren in the Province of Talca, Chile. *Environment International*. 47: 28-36.

Murray R L. 1984a; Creatinine. In: Kaplan L A and Pesce A J. Eds. *Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation*. St Louis. Toronto. Princeton: The C. V. Mosby Company. 1261-6.

N

Naeher L P, Tulse N S, Egeghy P P, Barr D B, Adetona O, Fortmann R C, Needham L, Bozeman E, Hilliard A, Sheldon L S. 2010; Organophosphorus and pyrethroid insecticide urinary metabolite concentrations in young children living in a southeastern United States city. *Science of the Total Environment*. 408:1145-1153.

Naeher L P, Tulse N S, Egeghy P P, Barr D B, Adetona O, Fortmann R C, Needham L, Bozeman E, Hilliard A, Sheldon L S. 2010; Organophosphorus and pyrethroid insecticide urinary metabolite concentrations in young children living in a southeastern United States city. *Science of the Total Environment*. 408:1145-1153.

Nagda G, Bhatt D K. 2011; Alleviation of lindaneinduced toxicity in testis of swiss mice (*Mus musculus*) by combined treatment with vitamin, vitamin E and α - lipoic acid. *Ind J Exp Sci*. 49: 191-199.

Naito H K. 1984; Cholesterol. In: Kaplan L A and Pesce A J. Eds. *Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation*. St Louis. Toronto. Princeton: The C. V. Mosby Company. 1194-11206.

Nawani C D, Lakra W S, Nagpure N S, Kumar R, Kushwaha B, Srivastava S K. 2010; Toxicity of the herbicide atrazine: effects on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the fresh waterfish *Channa punctatus* (Bloch). *Int J Environ Res PublicHealth*. 7: 3298–3312.

Ngoula F, Pierre W, Dongmo M, Kenfack A, Kamtchouing P, Tchoumboué J. 2007; Effects of pirimiphos-methyl (an organophosphate insecticide) on the fertility of adult male rats. *Afr Health Sci*. 7: 3–9.

Références bibliographiques

Ngoula F, Watcho P, Bouseko TS, Kenfack A, Tchoumbouéa J, Kamtchouing P. 2007a; Effects of Propoxur on the Reproductive System of Male Rats. *African Journal of Reproductive Health*. 11(1): 125-132.

O

O.M.S. (Organisation Mondiale de la Santé). 1993; Analyse du sperme humain et de l'interaction des spermatozoïdes avec le mucus cervical, éd. INSERM. 55-56.

Ogur R, Coskun O, Korkmaz A, Oter S, Yaren H, Hasde M. 2005; High nitrate intake impairs liver functions and morphology in rats; protective effects of α -tocopherol. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 20 (1): p. 161.

Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Kalender S, Durak D, Bayrakdar F, Kalender Y. 2006; The effects of organophosphate insecticide diazinon on malondialdehyde levels and myocardial cells in rat heart tissue and protective role of vitamin E. *Pestic Biochem Phys*. 86:93–98.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979; Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 95(2): 351-8.

Ohlsson A, Cedergreen N, Oskarsson A, Ulleras E. 2010; Mixture effects of imidazole fungicides on cortisol and aldosterone secretion in human adrenocortical H295R cells. *Toxicology*. 275: 21-28.

Ojha A, Yaduvanshi S K, Pant S C, Lomash V, Srivastava N. 2011; Evaluation of DNA damage and cytotoxicity induced by three commonly used organophosphate pesticides individually and in mixture, in rat tissues. *Environ Toxicol*.

Ojha A, Yaduvanshi S K, Srivastava N. 2011; Effect of combined exposure of commonly used organophosphate pesticides on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat tissues. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 99(2): 148–156.

Olgun S, Misra H P. 2006; Pesticides induced oxidative stress in thymocytes. *Mol Cell Biochem*. 290: 137-144.

Oliva A, Spira A, Multigner A. 2001; Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. *Human Reproduction*. 16: 1768–1776.

Références bibliographiques

Olorunshola K V, Achie L N, Akpomimie M L. 2011; Ascorbic acid ameliorates toxic effects of chlorpyrifos on testicular functions of albino rats. *British Journal of Pharmacology and Toxicology*. 2(5): 262-269.

Ortiz G, Vilchis F, Cardenas M, Cruz C, Pedraza-Chaverri J, and Menjivar M. 1999; Reproductive function in male rats with chronic nephrosis. *Journal of Reproduction and Fertility*. 117: 223-228.

Orton T G, Arrouays D, Jolivet C C, Villanneau E J, Marchant B P, Caria G, Barriuso E, Bispo A, Briand O. 2013; Spatial distribution of Lindane concentration in topsoil across France. *Science of the Total Environment*. 443: 338-350.

P

Padhi B K, Pelletier G, Williams A, Berndt-Weis L, Yauk C, Bowers W J, and Chu I. 2008; Gene expression profiling in rat cerebellum following in utero and lactational exposure to mixtures of methylmercury, polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides. *Toxicological Letters*. 176(2): 93-103.

Padhi B K, Pelletier G, Williams A, Berndt-Weis L, Yauk C, et al. 2008; Gene expression profiling in rat cerebellum following in utero and lactational exposure to mixtures of methylmercury, polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides. *Toxicol Lett*. 176 : 93-103

Pareek T K, Joshi A R, Sanyal A, Dighe R R. 2007; Insights into male germ cell apoptosis due to depletion of gonadotrophin caused by GnRH antagonists. *Apoptosis*. 12(6): 1085-1100.

Parks C G, Wallit B T, Pettinger M, Chen J C, de Roos A G, Hunt J, Sarto G, Howard B V. 2011; Insecticide use and risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in the Women's Health Initiative Observational Study. *Arthritis Care Research (Hoboken)*. 63: 184–194.

Parrón T, Requena M, Hernández A F, Alarcón R. 2013; Environmental exposure to pesticides and cancer risk in multiple human organ systems. *Toxicology Letters*. 230: 157-165.

Références bibliographiques

Patil J A, Patil A J, Govindwar S P. 2003; Biochemical effects of various pesticides on sprayers of grape gardens. *Indian J Clin Biochem.* 18: 16-22.

Payne J, Scholze M, and Kortenkamp A. 2001; Mixtures of four organochlorines enhance human breast cancer cell proliferation. *Environmental Health Perspectives.* 109(4): 391-397.

Payne J, Scholze M, Kortenkamp A. 2001; Mixtures of four organochlorines enhances human breast cancer cell proliferation. *Environ Health Perspect.* 109 : 391-397.

Pedraza-Chaverri J, Murali N S, Croatt A J, Alam J, Grande J P, Nath K A. 2006; Proteinuria as a determinant of renal expression of heme oxygenase-1: studies in models of glomerular and tubular proteinuria in the rat. *Am J Physiol Renal Physiol.* 290: 196–204.

Perez-Carreón J I, Dargent C, Merhi M, Fattel-Fazenda S, ARCE-POPOCA E, et al. 2009; Tumor promoting and co-carcinogenic effects in medium-term rat hepatocarcinogenesis are not modified by co-administration of 12 pesticides in mixture at acceptable daily intake. *Food Chem Toxicol.* 47: 540-546

Perobelli J E, Martinez M F, Da Silva FRANCHI C A, Fernandez C D, De Camargo J L, et al. 2010; Decreased sperm motility in rats orally exposed to single or mixed pesticides. *J Toxicol Environ Health A.* 73: 991-1002.

Perry L, Adams R D, Bennett A R, Lupton D J, Jackson G, Good A M, Thomas S H, Vale J A, Thompson J P, Bateman D N, Eddleston M. 2014; National toxicovigilance for pesticide exposures resulting in health care contact – An example from the UK's National Poisons Information Service. *Clinical Toxicology.* 52: 549-555.

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

Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance ; lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest.* 118: 829-838.

Postic C, Girard J. 2008; Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance ; lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest.* 118: 829-838.

Références bibliographiques

Prahalathan C, Selvakumar E, Varalakshmi P. 2006; Lipoic acid ameliorates adriamycin-induced testicular mitochondriopathy. *Reprod Toxicol.* 20: 111–116.

Price P, Ostby J, Furr Jr J, Gray L E. 2000; Combined effects of antiandrogenic pesticides vinclozolin and procymidone on androgendependent tissues in the Hershberger assay using Sprague–Dawley rats. *Biol. Reprod.* 62(1): 186.

Pruss-Ustun A, Vickers C, Haefliger P, Bertollini R. 2011; Knowns and unknowns on burden of disease due to chemicals: a systematic review. *Environmental Health.* 10: 9–24.

Purdue M P, Hoppin J A, Blair A, Dosemeci, M, Alavanja M C. 2007; Occupationalexposure to organochlorine insecticides and cancer incidence in the agricultural health study. *Int. J. Cancer.* 120 (3), 642–649.

R

Radad K, Hashim A, EL-Sharqawy E E G, EL-Din Youssef M S. 2009; Histopathological effects of methomyl on sprague-dawley rats after repeated application. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine.* 12(2): 149-157.

Rai D K, Rai P K, Rizvi S I, Watal G, Sharma B. 2009; Carbofuran-induced toxicity in rats: Protective role of vitamin C. *Experimental and Toxicologic Pathology.* 61(6): 531-535.

Ramade F. 2011; Introduction à l'écochimie: Les substances chimiques de l'écosphère à l'homme. *Lavoisier Librairie.* p. 311-312.

Ranjan B, Daundkar P S, Rampal S. 2014; Ameliorative effect of selenium on carbendazim induced oral sub chronic testicular toxicity in bucks. *Small Ruminant Research.* 119 (1-3): 107-113.

Rao M V, Sundar R sand Chawla S L. 2005; Reproductive toxicity of a fungicide combination (metalaxyl + mancozeb) in adult male rats, *Journal of Cell and Tissue Research.* 5(1): 299-302.

Rapilly F. 1991; L'épidémiologie en pathologie végétale: mycoses aériennes. Paris.

Ratziu V, Bellentani S, Cortez-Pinto H, Day C, Marchesini G. 2010; A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *J Hepatol.* 53: 372–384.

Références bibliographiques

Ravikumar P, Kanniappan M, Mathuram L N, Selvasubramanian S, and Sriram P. 2011; Alterations in gonad somatic index, seminogram and testosterone profiles in rats treated with hexaconazole. *Research opinions in Animal and Veterinary sciences*. 1(2): 78-82.

Razi M, Golamreza N, Sajad F, Karimi A, Shahmohamadloo S, Nejati V. 2012; Histological and histochemical effects of Gly-phosphate on testicular tissue and function. *Iran J Reprod Med*. 10(3): 181–192.

Reddy P S, Pushpalatha T, Reddy P S. 2006; Reduction in spermatogenesis and steroidogenesis in mice after fentin and fenbutalin administration. *Toxicol Lett*. 166(1): 53-59.

Reeves R, Thiruchelvam M, Baggs R B, Cory-Slechta D A. 2003; Interactions of paraquat and triadimefon: behavioral and neurochemical effects. *Neurotoxicology*. 24 : 839-850

Reffstrup T K, Larsen J L, Meyer O. 2010; Risk assessment of mixtures of pesticides: Current approaches and future strategies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 56: 174-192.

Reffstrup T K, Larsen J L, Meyer O. 2010; Risk assessment of mixtures of pesticides: Current approaches and future strategies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 56: 174-192.

Rety J, B O, Merlo M, Volatier J L. 2012; Estimation de la contribution de l'exposition hydrique aux résidus de pesticides en France métropolitaine au regard de l'exposition alimentaire totale/ Estimation of the contribution of drinking water exposure to pesticide residues in metropolitan France in relation to the total dietary exposure. *Environnement, risques et santé*. 11(84).

Rezg R, Mornagui B, El-Fazaa S, Gharbi N. 2008; Biochemical evaluation of hepatic damage in subchronic exposure to malathion in rats: effect on superoxide dismutase and catalase activities using native PAGE. *C R Biol*. 331: 655-662.

Rieke S, Koehn S, Hirsch-Ernst K, Pfeil R, Kneuer C, Marx-Stoelting P. 2014; Combination effects of (tri)azole fungicides on hormone production and xenobiotic metabolism in a human placental cell line. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 11: 9660–9679.

Ritz P, Sallé A, Couet C. 2007; How can we explain weight stability following weight loss?. *Revue Obésité*. 1: 72-78.

Références bibliographiques

Romao P R, Tovar J, Fonseca S G, Morales R H, Cruz A K, Hothersall J S. 2006; Glutathione and the redox control system trypanothione/trypanothione reductase are involved in the protection of *Leishmania* spp. Against nitrosothiol-induced cytotoxicity. *Braz J Med Biol Res.* 39: 355–363.

Rouimi P, Zucchini-Pascal N, Dupont G, Razpotnik A, Fouche E, et al. 2012; Impacts of low doses of pesticide mixtures on liver cells defense systems. *Toxicology in Vitro.* 26: 718-726.

Rude I, 2007 ; creativecommons.org. Feuille de vigne parasitée par le mildiou.

Ruder A M, Waters M A, Carreon T, Butler M A, Davis-King K E, Calvert G M, Schulte P A, Ward E M, Connally L B, Lu J, Wall D, Zivkovich Z, Heineman E F, Mandel J S, Morton R F, Reding D J. 2006; BrainCancer Collaborative StudyGroup. The Upper Midwest Health Study: a case-control study of primary intracranial gliomas in farmland rural residents. *J. Agric. Saf. Health.* 12 (4), 255–274.

S

Saoudi M, Messarah M, Boumendjel A, Jamoussi K, El Feki A. 2011; Protective effects of vitamin C against haematological and biochemical toxicity induced by deltamethrin in male Wistar rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 74: 1765-1769.

Sauna Z E, Shukla S, Ambudkar S V. 2005; Disulfiram, an old drug with new potential therapeutic uses for human cancers and fungal infections. *Mol. Biosyst.* 1: 127–134.

Sayim F. 2007; Histopathologic effects of dimethoate on testis in rats. *Bull. Environ. Contam Toxicol.* 78: 479–484.

Schenck F J, Donoghue D J. 2000; Determination of organochlorine and organophosphorus pesticide residues in eggs using a solid phase extraction cleanup. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 48: 6412-6415.

Schultz A. 1984; Uric acid. In: Kaplan LA and Pesce AJ. Eds. *Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation.* St Louis. Toronto. Princeton: The C. V. Mosby Company. 1261-6.

Schummer B C, Briand O, Millet M, Appenzeller B M R. 2012; Determination of farm workers' exposure to pesticides by hair analysis. *Toxicology letters.* 210(2): 203-210.

Références bibliographiques

Schummer C, Briand O, Appenzeller B M, Millet M. 2012; Application of XAD-2 resin-based passive samplers and SPME-GC-MS/MS analysis for the monitoring of spatial and temporal variations of atmospheric pesticides in Luxembourg. *Environnemental Pollution*. 170: 88-94.

Schummer C, Salquèbre G, Briand O, Millet M, Appenzeller B M. 2012; Determination of farm workers' exposure to pesticides by hair analysis. *Toxicology Letters*. 210: 203-210.

Sharma H, Zhang P, Barber D S, Liu B. 2010; Organochlorine pesticides dieldrin and lindane induce cooperative toxicity in dopaminergic neurons: role of oxidative stress. *Neurotoxicology*. 31: 215-222.

Sharma P, Singh R. 2010; Protective role of curcumin on lindane induced reproductive toxicity in male Wistar rats. *Bull Environ Contam Toxicol*. 84(4): 378-84.

Sharma R, Pasqualotto F, Nelson D, Thomas A Jr, Agarwal A. 1999; The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. *Hum Reprod*. 14: 2801-2807.

Sherif H Abd-Alrahman, Manal EA Elhalwagy, Gamila Ahmed Kotb, Hoda Farid, Ahmed AG Farag, Hossam M Draz, Ahmed M Isa, S Sabico. 2014; Exposure to difenoconazole, diclofop-methyl alone and combination alters oxidative stress and biochemical parameters in albino rats. *Int J Clin Exp Med*. 7(10):3637-3646.

Shittu M, Ambali S F, Ayo J O, Fatihu M Y, Sulaiman M M, Yaqub L S. 2013; Evaluation of chronic chlorpyrifos-induced reproductive toxicity in male Wistar rats: Protective effects of vitamin C. *Journal of Experimental and Integrative Medicine*. 3(1): 23-30.

Sies H. 1993; Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic. *Free Radic Biol Med*. 14(3): 313-323.

Šimić B, Kmectič I, Murati T, Kniewald J. 2012; Effects of lindane on reproductive parameters in male rats. *Veterinarski Arhiv*. 82(2): 211-220.

Singh M, Rajat S, Ravi K. 2011; Effects on antioxidant status of liver following atrazine exposure and its attenuation by vitamin E. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 63: 269-276.

Références bibliographiques

Singh M, Sandhir R, Kiran R. 2010; Oxidative stress induced by atrazine in rat erythrocytes: mitigating effect of vitamin E. *Toxicol Mech Methods*. 20: 119-126.

Slager R E, Simpson S L, Levan T D, Poole J A, Sandler D P, Hoppin J A. 2010; Rhinitis associated with pesticide use among private pesticide applicators in the agricultural health study. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. A73: 1382–1393.

Srivastava A K, Srivastava P K, Al-Khedhairi A A, Musarrat J, Shukla Y. 2012; Alléthrine la génotoxicité et du stress oxydatif dans des souris albinos suisses. *Mutat Res*. 747: 22-28.

Srivastava P A, Narain A S. 1985; Catfish blood chemistry under environmental stress. *Experimentia*. 41: 855–857.

Starr J, Graham S, Stout I. 2008; Pyrethroid pesticides and their metabolites in vacuum cleaner dust collected from homes and day-care centers. *Environmental Research*. 108:271-9.

Staub C, Chapin R E, Harris M W, Johnson L. 2001; Perinatal/ juvenile exposure to methoxychlor reduced daily sperm production that parallels reduction in sertoli cell number in adult rats. *XVIth Testis work-shop*. New port Beach. California. 127(2): 241-249.

Stork L G, Gennings C, Carchman R A, Carter W H Jr, Pounds J, and Mumtaz M. 2006; Testing for additivity at select mixture groups of interest based on statistical equivalence testing methods. *Risk Analysis*. 26(6): 1601-1612.

Sudova E, Piackova V, Kroupova H, Pijacek M, Svobodova Z. 2009; The effect of praziquantel applied per os on selected haematological and biochemical indices in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Physiol. Biochem*. 35: 599–605.

Sujatha R, Chitra, K C, Latchoumycandane C, and Mathur. Effect of lindane on testicular antioxidant system and steroidogenic enzymes in adult rats. *Asian J. Androl.*, 3: 135-138.

Suleiman S A, Ali M E, Zaki Z M S, et al. 1996; Lipid-peroxidation and human sperm motility – protective role of vitamin E. *J. Androl*. 17: 530-537.

Sutton P, Perron J, Giudice L C, Woodruff T J. 2011; *Pesticides Matter. A primer for reproductive health physicians*. University of California, San Francisco, Program on Reproductive Health and the Environment.

Références bibliographiques

Syngenta. 2016. Emballage Tilt 250EC. <https://www.syngenta.co.ke/product/crop-protection/fungicides/tilt-250-ec>.

T

Tahir Y.F. and Nour S. M. 2009; Oral Toxicity of Agro-Fungicides: Tilt (Propiconazole), Bayleton (Triadimefon) And Their Mixture to Nubian Goats. Sudan JMS. 4(3): 213-221.

Tahir Y F and Nour S M. 2009; Oral Toxicity of Agro-Fungicides: Tilt (Propiconazole), Bayleton (Triadimefon) And Their Mixture to Nubian Goats. Sudan JMS Vol. 4,No. 3.213-221.

Talas Z S, Gulhan M F. 2009; Effects of various propolis concentrations on biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Ecotoxicol. Environ. Saf. 72, 1994–1998.

Taxvig C, Vinggaard A M, Hass U, Axelstad M, Metzdorff S and Nellemann C. 2008; Endocrine-disrupting properties in vivo of widely used azole fungicides. International Journal of Andrology. 31: 170–177.

Taybe W, Amel N, Issam C, Imed I, Abdelhedi M, Mohamed H. 2011; Subacute effects of 2,4-di-chlorophenoxyacetic herbicide on antioxidant defense system and lipid peroxidation in rat erythrocytes. Pesticide Biochemistry and Phy-siology. 99: 256-264.

Thiruchelvam M, Richfield E K, Baggs R B, Tank A W, Cory-Slechta D A. 2000; The nigrostriatal dopaminergic system as a preferential target of repeated exposures to combined paraquat and maneb: implications for Parkinson's disease. J Neurosci. 20 : 9207-9214.

Travison T G, Araujo A B, O'Donnell A B, Kupelian V, McKinlay J B. 2007; A population-level decline in serum testosterone levels in American men, J. Clin. Endocrinol. Metab. 92: 196–202.

Tsatsakis A M, Bertsiyas G K, Mammias I N, Stiakakis I, Georgopoulos D B. 2001; Acute fatal poisoning by methomyl caused by inhalation and transdermal absorption. Bull Environ. Contam. Toxicol. 66: 415-420.

U

UIPP (Union des industries de la protection des plantes données). 2010; Brochure: l'utilité des produits phytopharmaceutiques. www.uipp.org.

USDA (United States Department of Agriculture). 2010; Production, Supply and Distribution online (PSD), <http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdhome.aspx> (15.02.2010), USDA, USA.

V

Valeron P F, Pestano J J, Luzardo O P, Zumbado M L, Almeida M, et al. 2009; Differential effects exerted on human mammary epithelial cells by environmentally relevant organochlorine pesticides either individually or in combination. *Chem Biol Interact.* 180 : 485-491.

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

Viau C. 2002; Biological monitoring of exposure to mixtures. *Toxicol Lett.* 134 : 9-16.

Vinuela A, Snoek L B, Riksen J A, Kammenga J E. 2010; Genome-wide gene expression analysis in response to organophosphorus pesticide chlorpyrifos and diazinon in *C. elegans*. *PLoS One.* 5: e12145.

W

Wade M G, Foster W G, Younglai E V, McMahon A, Leingartner K et al. 2002; Effects of subchronic exposure to a complex mixture of persistent contaminants in male rats: systemic, immune, and reproductive effects. *Toxicol Sci.* 67: 131-143.

Weckbecker G, Cory J G. 1988; Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione depended mouse leukaemia L 1210 cells in vitro. *Cancer Lett.* 40: 257-64.

Weiss B. 2000; Vulnerability of children and the developing brain to neurotoxic hazards. *Environmental Health Perspectives.* 108: 375-381.

Références bibliographiques

Wenger C. 1984; Alkaline phosphatase. In: Kaplan L A and Pesce A J. Eds. Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation. St Louis. Toronto. Princeton: The C. V. Mosby Company. 1094-8.

WHO. 1998; Dithiocarbamate pesticides, ethylthiourea and propylthiourea: a general introduction. Environmental Health Criteria.

WHO (World Health Organisation). 2008; The global burden of disease: 2004 update. Geneva.

Wilkowska A, Biziuk M. 2011; Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. Food Chemistry. 125: 803-812.

Willet K L, Ulrich E M, Hites A. 1998; Differential toxicity and environmental fates of hexachlorocyclohexane isomers. Environmental Science and Technology. 32: 2197-2207.

Wohlfahrtn Veje C, Andersen H R, Schmidt I M, Aksglaede L, Sørensen K, Juul A, Jensen T, Grandjean P, Sakkebæk N, Main K M. 2012; Early breast development in girls after prenatal exposure to nonpersistent pesticides. International Journal of Andrology. 35: 273-282.

Wolf PL, Williams D, Tsudaka T, Acosta L. 1972; Methods and techniques in clinical chemistry. New York: Wiley-Interscience, a division of John Wiley and Sons, Inc.

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

Wu Y H, Jia J, Li Y B, Shi Z X, Zhou X Q, Sun Z W. 2012; Crry receptor and oxidative stress involved in erythrocyte immune toxicity of mice caused by endosulfan and protective effects of vitamin E. J Toxicol Sci. 37: 1225–1237.

Y

Yahia E. 2016 ; Effet de certains perturbateurs endocriniens (pesticides) sur la reproduction chez le rat Wistar. Thèse de doctorat. Université d'Annaba.

Yanez 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.

Références bibliographiques

Yi A X, Leung K M, Lam M H, Lee J S, Giesy J P. 2012; Review of measured concentrations of triphenyltin compounds in marine ecosystems and meta-analysis of their risks to humans and the environment. *Chemosphere*. 89: 1015-1025.

Yu Y, Yang A M, Zhang J H, Hu S K, Yan H. 2011; Synergistic effect of dichlorvos, dimethoate and malathion mixture on reproduction toxicity in male mice. *Chin J Prev Med*. 45(09): 810-814.

Yuan C, Wang C, Gao SQ, Kong T T, Chen L, Li X F, Song L, Wang Y B. 2010; Effects of permethrin, cypermethrin and 3-phenoxybenzoic acid on rat sperm motility in vitro evaluated with computer-assisted sperm analysis. *Toxicol In Vitro*. 24: 382-386.

Yuan Y, Chen C, Zheng C, Wang X, Yang G, Wang Q, Zhang Z. 2014; Residue of chlorpyrifos and cypermethrin in vegetables and probabilistic exposure assessment for consumers in Zhejiang Province, China. *Food Control*. 36: 63-68.

YuBo Z, JiZhou S, RongRong Z, Ming L, JiaHui H. 2009; Effect of organophosphorus pesticides omethoate and dichlorovos on the sperm motility of *Carassius auratus*. *Journal of Economic Animal*. 13(1): 46-50.

Yuksel H, Karadas E, Keles H, Demirel H H. 2009; Effects of Hexachlorocyclohexane (HCH- γ -Isomer, Lindane) Intoxication on the Proliferation and Apoptosis in Rat Testes). *Acta Veterinaria Brno*. 78: 615-620.

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.

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.

Zhang X, Qi R, Xian X, Yang F, Blackstein M, Deng X, Fan J, Ross C, Karasinska J, Hayden MR, Liu G. 2008; Spontaneous atherosclerosis in aged lipoprotein lipase-deficient mice with severe hypertriglyceridemia on a normal chow diet. *Circ Res*. 102(2): 250-6.

Références bibliographiques

Zhi-Hua Li, Josef Velisek, Roman Grabic, Ping Li, Jitka Kolarova, Tomas Randak. 2011; Use of hematological and plasma biochemical parameters to assess the chronic effects of a fungicide propiconazole on a freshwater teleost. *Chemosphere*. 83: 572–578.

Zidan N A. 2009; Evaluation of the reproductive toxicity of chlorpyrifos methyl, diazinon and profenofos pesticides in male rats. *International Journal of Pharmacology*. 5(1): 51-57.

Zou G, Ying S H, Shen Z C, Feng M G. 2006; Multi-sited mutations of beta-tubulin are involved in benzimidazole resistance and thermotolerance of fungal biocontrol agent *Beauveria bassiana*. *Environmental microbiology*. 8(12): 2096-2105.

Zuo Y, Wang C, Zhou J, Sachdeva A, Ruelos V C. 2008; Simultaneous determination of creatinine and uric acid in human urine by high performance liquid chromatography. *Anal Sci*. 24 : 1589-1592.

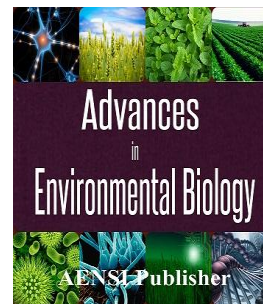
PRODUCTION SCIENTIFIQUE



AENSI Journals

Advances in Environmental Biology

ISSN-1995-0756 EISSN-1998-1066

Journal home page: <http://www.aensiweb.com/AEB/>

Toxicity of Subchronic Doses of Propiconazole, Propineb and Their Mixture on Reproductive Parameters in Male Rats

¹Mohamed Amine Aiche, ^{1,2}Leila Mallem, ¹Elkhansa Yahia, ¹Mohamed Salah Boulakoud

¹Animal Ecophysiology Laboratory, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University, BP 12, 23005 Sidi Amar, Annaba, Algeria

²Faculty of Medicine, Department of dentistry, Badji Mokhtar University, El Zaafrania, B.P 205, 23000 Annaba, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 November 2014

Received in revised form 4 December 2014

Accepted 3 January 2015

Available online 28 January 2015

Keywords:

Propiconazole, Propineb, Pesticides mixtures, Rats, Fertility, Histological studies.

ABSTRACT

The present study has been carried out to elucidate the toxic effects of two commonly used pesticides, propiconazole, propineb and their mixture on reproductive parameters in male wistar rats. Twenty eight male rats were randomly divided into four groups. Rats in groups 2, 3, and 4 received propiconazole 60 mg/Kg, Propineb 100 mg/Kg and their mixture 30 mg/kg Propiconazole + 50 mg/kg Propineb, respectively, while those of group one served as control, and that throughout the 4 weeks experimental period. Animals were observed for clinical toxicity. At the end of treatment, all groups of animals were scarified and samples of different organs were fixed in the formal 10% for histopathological study. The semen study showed a decrease in the count and mobility of spermatozoa, accompanied with a significant decrease in morphological changes of flagellum in the treated groups especially with mixture compared to control group. It was also a decrease in the weight of the testis and epididymis in the treated groups compared to the control. Histological changes were observed in the testis and epididymis in all treated groups. In conclusion this paper shows clearly that the treatment with these pesticides alone or in combination for 4 weeks can induce a decrease in the quality of the sperm with histopathological changes in the testes and epididymis.

© 2015 AENSI Publisher All rights reserved.

To Cite This Article: Mohamed Amine Aiche, Leila Mallem, Elkhansa Yahia, Mohamed Salah Boulakoud., Toxicity of Subchronic Doses of Propiconazole, Propineb and Their Mixture on Reproductive Parameters in Male Rats. *Adv. Environ. Biol.*, 9(3), 885-891, 2015.

INTRODUCTION

Pesticides are ubiquitous in our environment and have a significant impact on the economy, the environment and public health. Pesticide use was crucial for agricultural development and improves human nutrition through increased availability, the lifetime of storage and reduces feed costs. Pesticides also reduce human labor requirements and concomitant of industrial accident risks. These agents actively assist in the control of food-borne and vector-borne diseases [1]. Humans are exposed to complex mixtures of toxic compounds every day in their residential and occupational environments [2,3]. In particular, agrochemicals are continuously used on a massive scale and persist as residues in food of both vegetable and animal origin, as well as in the air and water [4]. Exposure to pesticides can be done by different routes (food, drinking water, housing, work) and different routes (oral, respiratory, dermal) [5, 6, 7].

The incidence of male fertility decay has increased alarmingly since 1980s as a result of multi-factorial events including environmental pollution. The number of experimental studies on the effect of agrochemicals on the reproductive system has grown in recent years and some possible mechanisms of toxicity have been suggested. The most widely accepted effect is pesticide induced endocrine-disrupting effects [8]. Several studies have indicated a correlation between pesticide exposure and reduced male fertility [9, 10, 11, 12].

In this work we studied two of the most used pesticides not only in our country but also in different part of the world. Propineb is a fungicide with the propylene-bis-dithiocarbamate. Dithiocarbamates form lipophilic complexes with di- and trivalent metallic cations, bonding through the sulfur atoms. Propineb has a low acute toxicity with a specific goitrogenic effect in rats. It has been reported that the exposure of Propineb in repeated dose toxicity studies, in addition can have an effects on the thyroid gland and reversible effects on skeletal muscles [13, 14, 15, 16, 17]. Propiconazole is a triazole containing antifungal agent widely used in agriculture

Corresponding Author: Mohamed Amine AICHE, Animal Ecophysiology Laboratory, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University, BP 12, 23005 Sidi Amar, Annaba, Algeria.
Tel: +213 554 56 07 22; E-mail: amine_aiche@live.fr.

[18, 19]. It used to slow or stop the growth of fungus infecting agricultural fields [20]. Studies conducted for safety and risk assessments have tested the *in vivo* effects of these triazoles in rodents and other species, demonstrating hepatotoxicity for all Propiconazole, and even possible adverse effects in oncogenicity tests in mice [21].

Present study was aimed to evaluate the adverse effects of propiconazole and propineb in the male rat when given alone or in combination. This may contribute to the understanding of the effect of a simultaneous exposition, and it may have interest in the evaluation of the damage degree to which humans are potentially exposed due to environmental pollution.

MATERIAL AND METHODS

Animals and exposure:

In this present experiment, twenty eight (28) male wistar rats were used, each weighing 250–300 g were purchased from the Pasteur Institute (Algiers). Animals were housed in polypropylene cages and maintained at ambient temperature of $22 \pm 3^\circ\text{C}$ in natural photoperiod with relative humidity of 40-60%. The animals had free access to diet and water *ad libitum*. After 2 weeks of acclimatization period they were divided into four groups (seven animals for each exposure groups and control group). The first group (G1) served as control and received water as vehicle. In groups 2 and 3, rats were treated orally with Propiconazole at a dose of 60 mg/kg body weight, and Propineb with the dose 100 mg/Kg body weight propineb respectively. The last group (G4) animals were given the mixture of the two fungicides 30 mg/kg Propiconazole and 50 mg/kg Propineb. At 28 day of the treatment, the animals were sacrificed, blood and semen was collected. The organs (testes and epididymis) were removed and weighted.

Biological study of spermatozoa:

To estimate the effect of fungicides used on the fertility of rats through the characteristics of sperm and semen quality, we proceeded to biology of spermatozoa by the method of the OMS 1993 [22]. After dissecting the semen collected from a small opening at the head of the epididymis to study the concentration, motility and spermatozoa vitality. Then 1 μl of semen was preleved and diluted in 49 μL of NaCl 0.9% then placed in an oven at a temperature of 37°C .

Histology study:

The testes and epididymis samples were examined for histopathological changes. The samples were placed in 10% formole and dehydrated in 70–100% ethanol series. They were then placed in paraffin baths at 58°C for paraffin inclusion. Sections of 4–6 mm were prepared from paraffin blocks using a rotary microtome. These sections were then stained with Hematoxylin-Eosin (H-E) according to the criteria of the method of Martoja and Martoja [23], then photographed using a Leica photomicroscope.

Statistical analysis:

Data are presented as mean \pm standard deviation (SD). The analysis of data was performed using *t*-Student test to compare the statistical significance of the differences between the treated and control groups with Minitab program (version 16). $P < 0.05$ was considered significant.

Results:

Organs weight:

Table 1 show the weight of the organs in the treated groups and control. It demonstrated a decrease in the weight of testis and epididymis of animals treated with propiconazole, propineb and mixture as compared to control.

Table 1: Changes in absolute and relative testes and epididymis weights of control and rats treated with propiconazole, Propineb and mixture after 28 days of treatment.

Parameters	Treatment groups			
	Control	Propiconazole	Propineb	Mixture
Absolute testes weight (g)	1,692 \pm 0,060	1,541 \pm 0,100*	1,587 \pm 0,097	1,551 \pm 0,092*
Relative testes weight (g/100g b.w.)	0,598 \pm 0,045	0,540 \pm 0,064	0,530 \pm 0,071	0,526 \pm 0,060*
Absolute epididymis weight (g)	0,631 \pm 0,039	0,524 \pm 0,074*	0,546 \pm 0,052*	0,575 \pm 0,041*
Relative epididymis weight (g/100g b.w.)	0,216 \pm 0,018	0,182 \pm 0,020*	0,181 \pm 0,015**	0,194 \pm 0,021

Values are given as mean \pm SD for group of 7 animals each.

* $P < 0.05$, compared to controls.

** $P < 0.01$, compared to controls.

Semen study:

The results in Fig 1 show that there is a decrease but no significant change ($P > 0.05$) in the concentration of spermatozoa in the treated animals with propiconazole and group propineb as compared to control group. However, there is a significant decrease ($P \leq 0.05$) in the group treated with the mixture of Propineb and Propiconazole group as compared to the no treated animals.

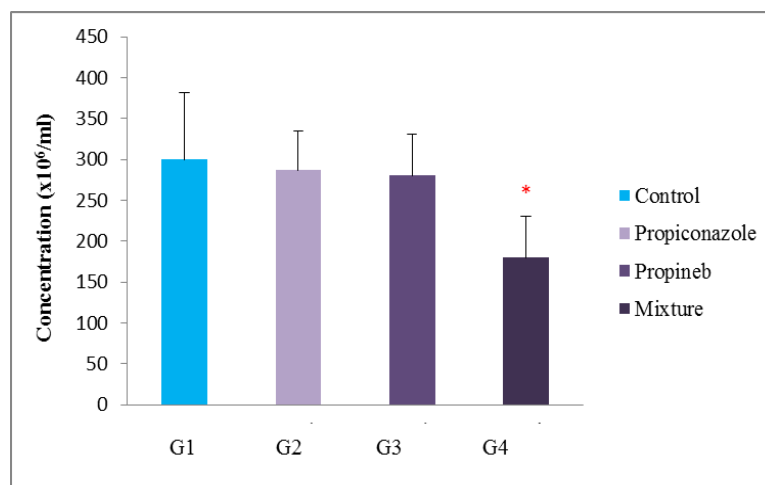


Fig. 1: Epididymal sperm concentration of control and treated groups (x10⁶/ml). (M ± SD, n = 7) $P < 0.05^*$.

The results in Figure 2 show that there is a highly significant decrease ($P \leq 0.01$) in the motility of the spermatozoa treated with propiconazole compared to controls. Similarly, a highly significant decrease was noted in the treated groups with propineb and the mixture as compared to those of control individuals.

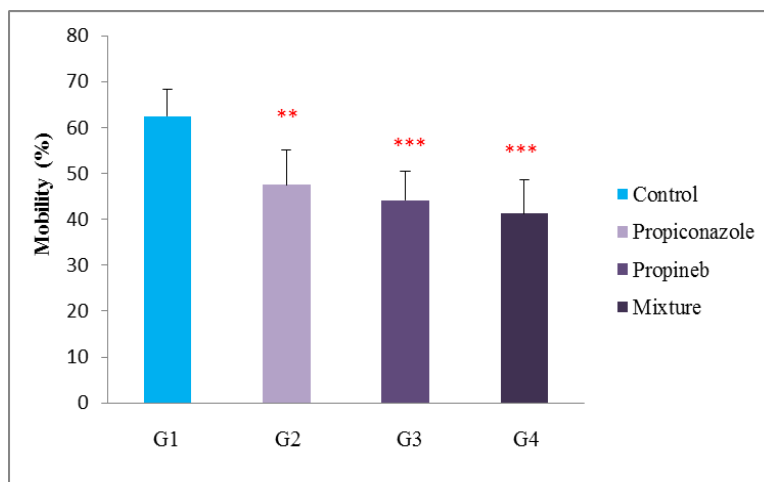


Fig 2: Epididymal sperm motility of control and treated groups (%). (M ± SD, n = 7) $P < 0.01^{**}$, $P < 0.001^{***}$

The morphological changes characteristic of sperm exposed to hypo-osmotic stress are presented in (Table 2). We founded a significant reduction in the modification of flagellum of sperm category (A and B) between the treatment groups compared with the control group. However, the normal sperm was increased in the treatment groups compared to control group. The reduction in morphological changes of flagellums in the treatment groups indicates the adverse effect of Propiconazole, Propineb and mixture in sperm vitality by causing injury in the membrane of flagellum.

*Histology study:**Testes section:*

Observation from the histological sections (Figure 3, A to D) demonstrated apparently normal seminiferous tubules in controls with sperm cell series at different stages of development. The lumens were filled with a good population of mature sperm cells spermatozoa and a healthy interstitium was also demonstrable (Fig 3 A). The

testes of rats that received Propiconazole showed seminiferous tubules with poor intensity compared with the control group. The luminal diameter of the seminiferous tubules was also wider and the population of spermatozoa was markedly reduced. Generally, the spermatogenic cells appeared to have decreased in number compared to the control, and the characteristic shape of the seminiferous tubules was lost (Figure 3 B). Although tissue staining of the testes of rats administered with 100 mg/kg body weight Propineb was better than the low treated group with Mixture and Propiconazole as compared with the no treated the transverse section of testis in control animals, presence of wider luminal diameter and reduced interstitial spaces were noted, and the population of sperm cells was also reduced in the lumen.

Table 2: The morphological changes characteristic of sperm of control and experimental groups after 28 days of treatment.

Morphological changes	Treatment groups			
	Control	Propiconazole	Propineb	Mixture
A	25,56 ± 2,08	18,95 ± 4,70*	16,31 ± 5,27*	18,87 ± 4,61*
B	15,09 ± 3,15	17,01 ± 8,34	11,79 ± 2,03*	09,62 ± 3,27*
C	13,65 ± 4,4	15,70 ± 3,36	16,76 ± 5,49	13,24 ± 5,34
N	45,68 ± 3,17	47,75 ± 8,41	55,50 ± 10,7	58,27 ± 7,55*

Abbreviation: A, low modification in flagellum; B, significant modification in flagellum; C, modification important of flagellum and middle piece; N: normal (death) sperm. Values are mean ± SD (n = 7), P < 0.05*, P < 0.01**, P < 0.001*** compared to control.

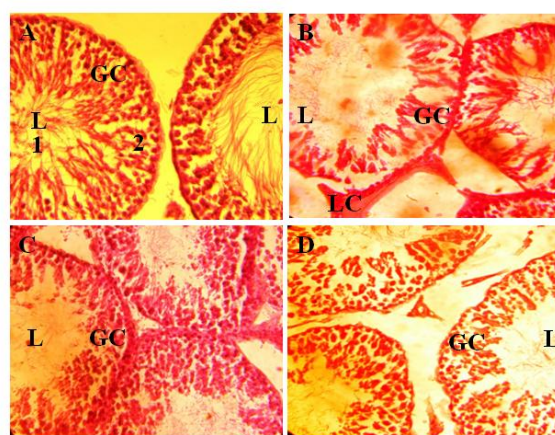


Fig. 3 A to D: (A) Photomicrograph of the seminiferous tubules of the testis of rats in the control group showing apparently normal architecture: spermatogonia (white arrow), lumen (L) filled with mature sperm cells. (B) Photomicrograph of the seminiferous tubules of the testis of rats in the group 2 administered with 60 mg/kg Propiconazole showing reduced population of mature sperm cells in the lumen. (C) and (D) Transverse section of testis in the groups 3 and 4 treated with Propineb and the combination of the two fungicides 50/50% demonstrating wider luminal diameter, with reduced population of mature sperm cells in the lumen. L: Lumen of seminiferous tubules, GC: germinal cells, LC: Leydig cells. H&E stain (400x).

Epididymis section:

The examination transverse section of the epididymes from the control animals (Fig 4 A) of all groups showed normal structure and normal sperm density (+++) in the lumina of tubular sections. However, sperm density was found to be decreased in the experimental groups we observe moderate density of sperm in lumina of tubular section in the exposed rats to Propineb of 100 mg/kg after 28 days (Fig 4 C). The density sperm is low in the treated animals with the Propiconazole and many tubules are empty in the exposed animals with the mixture Propineb and Propiconazole.

From control rat showing sperm (+++) in the lumina completely filled. H&E, 400x; B. From rat exposed to Propiconazole of 60 mg/kg after 28days. Note that sperm density is moderate low (++) . H&E, 400x; C. From a rat exposed to Propineb treatments of 100 mg/kg body weight after 28 days. Note that many tubules are empty and others have fewer spermatozoa. H&E, 400x; D. From a rat exposed to mixture of fungicides Propiconazole/Propineb 50/50 % showing low (+) sperm density after 28 days. H&E, 400x. LT: Lumina Tubular.

Discussion:

Exposure to pesticides affects many body organs including reproductive system. Disorder of the reproductive system leads to infertility and therefore has been in the center of attention within the recent decades. Adverse effects of pesticides on the male reproductive system especially semen characteristics are an

important health problem in the all the world. Several international studies have been conducted on causes of endocrine disrupters, one of the most famous are pesticides, showing evidence of reduction in semen quality due to agricultural pesticides [24, 25].

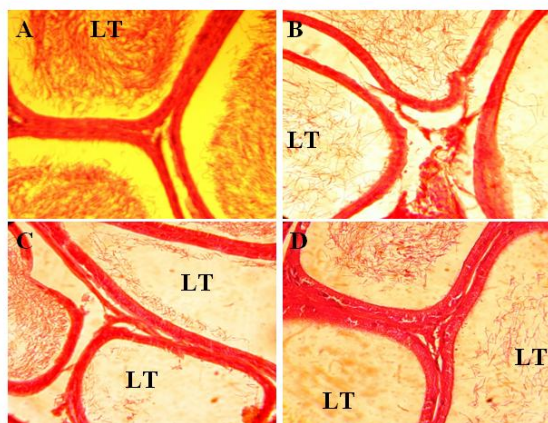


Fig. 4 A to D: Photomicrographs of epididymes showing sperm density in the lumina of tubular sections; A.

The testes and epididymis weight of the treated animals decreased considerably in the three treated groups especially those treated with the Propiconazole and the mixture as compared to control. It has been reported that the gonads are target bodies of pesticides and which might be due to lowered bioavailability of androgens [26, 27]. The reduction in the weight of the testis could be due to inhibition of seminiferous tubule fluid formation and loss of germ cell by direct inhibition on spermatogenesis [28, 29]. Then, the data of this study demonstrated that Propiconazole, Propineb and the mixture could have an effect on the histological constitution of the cells of the testes. Many studies have been conducted to elucidate that the exposure to pesticides interferes with spermatogenesis by damaging the testes. The severity of affection depends on the stage of differentiation, can be reversible or irreversible, and may even temporarily lead to decreased fertility by modifying sperm count, structure motility, or viability of spermatozoa. These effects are transient because spermatogenesis is restored from stem cell populations after removal of the off ending chemical [30].

The used fungicides can act on the hypothalamic and hypophyseal hormones [31] by disturbing the secretion of GnRH which stimulates adenohypophysis to secrete LH (Luteinizing Hormone) and FSH (Follicle Stimulating Hormone) by modification of the receiving sites of LH on the level of the cells of Leydig [32] competition of the mixture and Propiconazole with LH affecting testosterone output [33, 34]. In addition, the treatment by maneb also can modify the secretion of FSH released by the cells of Sertoli which are necessary to the development of the seminiferous tubules through its role of nutrition [35].

The data of this study indicate that the exposure of the rats with Propiconazole, Propineb and Mixture of both caused a decrease in the concentration, motility and the vitality of the spermatozoa with anomalies in the histology study in the all treated groups as compared to the control animals. Similar effects have been observed that the testicular atrophy with damaged germinal epithelium and reduced sperm motility and viability were major findings in male adult rats exposed to maneb and zineb [36]. The decrease observed in the quantity and quality of the sperm can be explained by the effect of the used fungicide and also their mixture in spermatogenesis because it has already been reported that the sperms acquire motility and fertilizing ability only during their epididymal transit; Testosterone and Dihydrotestosterone are involved in the maturation of sperm within the epididymis as well as the transit of sperm through the duct [37, 38]. Any alteration in epididymal sperm count and motility provides a direct measure of fertility [39].

Conclusion:

In conclusion, we think that the repeated administration of fungicides used alone or in combination with the used doses in the same conditions by gavage may cause structural and functional disorders in the hormonal system.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the members of the Animal Ecophysiology research group, especially Pr. Boulakoud Mohamed Salah for the technical and scientific support. The present study was part of the research project (Endocrine Disrupting Effects of Currently used Pesticides) aiming for assessment of the potential effects of currently used pesticides in Algeria from different pesticide groups.

REFERENCES

- [1] Weiss, B., S. Amler, R.W. Amler, 2004. Pesticides. *Pediatrics*, 113 : 1030–1036.
- [2] Di Monte, D., 2003. The environment and Parkinson's disease: is the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins? *Lancet Neurol*, 2: 531-537.
- [3] Liu, B., H.M. Gao, J.S. Hong, 2003. Parkinson's disease and exposures to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: role of neuroinflammation. *Environ. Health Persp*, 111: 1065–1073.
- [4] Bolognesi, C., G. Morasso, 2000. Genotoxicity of pesticides: potential risk for consumers. *Trends Food Sci. Tech*, 11: 182–187.
- [5] Lu, C., R.A. Fenske, N.J. Simox, D. Kalman, 2000. Pesticide exposure of children in agricultural community: evidence of household proximity to farmland and take home exposure pathways. *Environ. Res. Sect. A* 84, 290–302.
- [6] Quandt, S.A., T.A. Arcury, P. Roa, B.M. Snively, D.E. Camann, A.M. Doran, A.Y. Yau, J.A. Hoppin, D.S. Jackson, 2004. Agricultural and residential pesticides in wipe samples from farm worker family residences in North Carolina and Virginia. *Environ. Health Perspect*, 112(3): 382-387.
- [7] EFSA (European Food Safety Agency), 2008. Opinion of the Scientific Panel on Plant Protection products and their Residues to evaluate the suitability of existing methodologies and, if appropriate, the identification of new approaches to assess cumulative and synergistic risks from pesticides to human health with a view to set MRLs for those pesticides in the frame of Regulation (EC) 396/2005, 704: 1-84.
- [8] Sarkar, R., K.P. Mohanakumar, M. Chowdhury, 2000. Effects of an organophosphate pesticide, quinalphos, on the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in adult male rats. *J. Reprod. Fertil*. 118: 29–38.
- [9] Lifeng, T., W. Shoulin, J. Junmin, S. Xuezhao, L. Yannan, W. Qianli, C. Longsheng, 2006. Effects of fenvalerate exposure on semen quality among occupational workers. *Contraception*, 73: 92–96.
- [10] Oliva, A., A. Spira, L. Multigner, 2001. Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. *Hum. Reprod*, 16: 1768–1776.
- [11] Padungtod, C., D.A. Savitz, J.W. Overstreet, D.C. Christiani, L.M. Ryan, X. Xu, 2000. Occupational pesticide exposure and semen quality among Chinese workers. *J. Occup. Environ. Med*, 42: 982–992.
- [12] Swan, S.H., R.L. Kruse, F. Liu, D.B. Barr, E.Z. Drobnis, J.B. Redmon, C. Wang, C. Brazil, J.W. Overstreet, 2003. Semen quality in relation to biomarkers of pesticide exposure. *Environ. Health Perspect*. 111, 1478–1484.
- [13] IPCS (International Programme on Chemical Safety), 1993. Propineb. In: *Pesticide residues in food – 1993 toxicology evaluations*. WHO/PCS/94.4. World Health Organization, Geneva, 369-381.
- [14] IPCS (International Programme on Chemical Safety), 1999. Propineb. In: *Pesticide residues in food – 1999 Toxicology evaluations*.
- [15] Jones, R.D., 1999. Technical grade Antracol. A subchronic toxicity feeding study in beagle dog. Bayer Corp. Report No. BC8735 (EU Monograph in preparation).
- [16] Pauluhn, P., 1999. Pilot study of the subacute inhalation toxicity in rats (exposure 5-6 hours). LH30/Z 80VM 00705/1096 (c.n.: propineb). Bayer AG Report No. 28915 (EU Monograph in preparation).
- [17] Pauluhn, P., 2001. Subacute inhalation toxicity in rats – analysis of pulmonary toxicity (exposure 7-6 hours/day for 1 week). LH30/ Z 80VM 00705/1096 (c.n.: propineb). Bayer AG Report No. PH 30789 (EU Monograph in preparation).
- [18] Vanden Bossche, H., P. Marichal, J. Gorrens, M.C. Coene, G. Willemsens, D. Bellens, I. Roels, H. Moereels and P.A. Janssen, 1989. Biochemical approaches to selective antifungal activity. Focus on azole antifungals. *Mycoses* 32(Suppl. 1), 35-52.
- [19] Warmerdam, M.A., 2008. California Department of Pesticide Regulation Summary of Pesticide Use Report Data 2008 Indexed by Chemical, pp. 547, Sacramento, CA.
- [20] Van De Steene, J.C., W.E. Lambert, 2008. Validation of a solid-phase extraction and liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometric method for the determination of nine basic pharmaceuticals in waste water and surface water samples. *J. Chromatogr. A*, 1182: 153–160.
- [21] California, E.P.A., 2003. Summary of toxicology data. California Environmental Protection Agency, Department of Pesticide Regulation. In: <http://www.cdpr.ca.gov/docs/toxsums/toxsumlist.htm>
- [22] Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S), 1993. Analyse du sperme humain et de l'interaction des spermatozoïdes avec le mucus cervical. Ed.INSERM, 55-56.
- [23] Martoja, R. and M. Martoja, 1967. Initiation aux techniques de l'histologie animale. Ed Masson and Cie, Paris, 345-346.
- [24] Tuc, V.P., V. Wangsuphachart, P. Tasanapradit, W. Fungladda, P. Van Trong, N.T. Nhung, 2007. Impacts of pesticide use on semen characteristics among rice farmers in Kienxuong District, Thaibinh Province, Vietnam. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 38: 569–575.
- [25] Hossain, F., O. Ali, U.J. D'Souza, D.K. Naing, 2010. Effects of pesticide use on semen quality among farmers in rural areas of Sabah, Malaysia. *J. Occup. Health*, 52: 353–360.

- [26] Kojima, S., Y. Sugimura, H. Hirukawa, M. Kiyozumi, H. Shimada, T. Funakoshi, 1992. Effect of dithiocarbamates on testicular toxicity in rats caused by exposure to cadmium. *Toxicology. Applied Pharmacology*, 116: 24-29.
- [27] Sujatha,, R., K.C. Chitra, C. Latchoumycandane and Mathur, 2001. Effect of lindane on testicular antioxidant system and steroidogenic enzymes in adult rats. *Asian J. Androl.*, 3: 135-138.
- [28] Joshi, S.C., N. Gulati and A. Gajraj, 2005. Evaluation of toxic impacts of mancozeb on testis in rats. *Asian J. Exp. Sci.*, 19(1): 73-83.
- [29] Ramesh, V. and B. Kumaran, 2013. Spermatotoxic Effect of Hexaconazole in Adult Rats. *Int. Arch. App. Sci. Technol.*, 4(2): 56-61.
- [30] Bretveld, R., M. Brouwers, I. Ebisch, N. Roeleveld, 2007. Influence of pesticides on male fertility. *Scand. J. Work Environ. Health*, 33: 13–28, Review.
- [31] Chapin, R.E., M.W. Haris and S.M. David, 1997. The effects of perinatal juvenile methoxychlor exposure on adult rat nervous, immune and reproductive system function; *Fundam. Appl. Toxicol.*, 40: 138-157.
- [32] Ksheerasagar, R.L. and B.B. Kaliwal, 2003. Temporal effects of mancozeb on testes, accessory reproductive organs and biochemical constituents in albino mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 15: 9-17.
- [33] W.W.F (World Wildlife Fund) Canada, 1998. Resolving the DDT, World Wildlife Fund, USA, 52.
- [34] Schardein, J., 1993. Hormones and Hormone antagonists. In *chemically induced birth Defects*. 2nd ed. Chap.9: Dekker. New York, 271- 339.
- [35] C.P.P (Comité de la Prévention et de Précaution), 2001. Risques sanitaires liés à l'utilisation des produits phytosanitaires.
- [36] Lucier, G.W., I.P. Lee, R.L. Dixon, 1977. Effects of environmental agents on male reproduction in "The testis" vol-IV. Eds. By Johnson AD, Grames WR, 577 Academic Press, New York.
- [37] Bedford, J.M., 1979. Evolution of the sperm maturation and sperm storage functions of the epididymis in the spermatozoan (D.W. Fawcett and J.M. Bedford. Eds.). 7-21. Urban & Schwarzenberg, Baltimore.
- [38] Brooke, D.E., 1979. Biochemical environment of maturing spermatozoa in the spermatozoa (D.W. Fawcett and J.M. Bedford. Eds.), 23-24. Urban & Schwarzenberg, Baltimore.
- [39] Lemasters, G.K. and S.G. Selevan, 1993. Toxic exposures and reproduction: a view of epidemiology and surveillance. In: Scialli, A.R and Zinaman, M.J. (editors). *Reproductive Toxicology and Infertility*. McGraw Hill, 307-321.

1^{er} Congrès International de Biotoxicologie et Bioactivité

Du 26 et 27 Novembre 2014

Hôtel Eden Phoenix, Oran - Algérie

ATTESTATION DE PARTICIPATION

Le Comité d'Organisation Certifie que

AICHE MOHAMED AMINE

A participé au Premier Congrès International de Biotoxicologie et Bioactivité, par une communication Affichée Intitulée : Effets toxiques de deux fongicides : propinebe, propiconazole et leur mélange chez le rat male wistar

Co-Auteurs : Mallem Leila, Yahia Elkhansa, Boulakoud Mohamed Salah

**FIRST INTERNATIONAL CONGRESS
OF BIOTOXICOLOGY AND BIOACTIVITY**

November 26th-27th, 2014

Oran - Algeria.

BP 1524, El M'naour es senia Oran

Président du Congrès

Dr. KHAROUBI OMIAR



45ÈME CONGRÈS DU GROUPE FRANÇAIS DES PESTICIDES

Aiche Mohamed Amine

Objet : certificat de présence

Versailles, le 1er juillet 2015

Au nom du Comité Scientifique du "45^{ème} Congrès de Groupe Français des Pesticides" qui s'est tenu à Versailles (France) du 27 au 29 Mai 2015, je certifie que Aiche Mohamed Amine, était présent et a présenté un poster écrit avec les co-auteur : Mallem Leila, Yahia Elkhansa et Boulakoud Mohamed Salah intitulé « Modifications biochimiques et histologiques de l'intoxication orale par deux pesticides utilisés seuls ou en combinaison chez le rat mâle ».

Fait à la demande de l'intéressée pour servir et faire valoir ce que de droit.

Sophie Formisano

Co-organisatrice du 45^{ème} Congrès de Groupe Français des Pesticides,
<http://www.gfpesticides.org/>

UMR 1402 INRA AgroParisTech ECOSYS
Route de la ferme
78850 Thiverval-Grignon FRANCE
Tel: +33(0)1.30.81.55.77
Email: sophie.formisano@grignon.inra.fr

UMR 1402 ECOSYS Inra-AgroParisTech
Route de la Ferme
F-78850 THIVERVAL-GRIGNON (France)
Tél. 33 (0)1 30 81 55 55 - Fax 33 (0)1 30 81 55 63

UMR EcoSys INRA - AgroParisTech, Route de la ferme 78850 Thiverval-Grignon FRANCE
Tel. : + 33(0)1 30 81 55 55 Fax : + 33(0)1 30 81 55 63

Mail: umr_ecosys@grignon.inra.fr Etablissement public à caractère scientifique et technologique placé sous la tutelle conjointe des ministres chargés de la Recherche et de l'Agriculture



BIO ENG '14
BIOENGINEERING ENCONFERENCE
27-29 NOV, ISTANBUL

DAKAM
EASTERN MEDITERRANEAN ACADEMIC RESEARCH CENTER
DOĞU AKDENİZ AKADEMİK ARAŞTIRMALAR MERKEZİ

Mallem Leila
Poster Presentation

ORAL TOXICITY OF LOW DOSES OF FUNGICIDES: PROPINÈBE, PROPI-
CONAZOLE AND THEIR MIXTURES IN THE MALE RAT

Hereby, we confirm that
you have participated at the BIO ENG '14 Conference
organised by DAKAM (Eastern Mediterranean Academic Research Center) and presented
your work on November 27-29, 2014.

Kind Regards,

DAKAM
EASTERN MEDITERRANEAN ACADEMIC RESEARCH CENTER
DOĞU AKDENİZ AKADEMİK ARAŞTIRMALAR MERKEZİ

Prof. Dr. Ibrahim Isildak
BIO ENG '14 Conference
Organization Team



Aix-Marseille Université
Campus Etoile, Faculté de St. Jérôme
Avenue Escadrille Normandie Niémen – Case 421
F-13397 Marseille cedex 20, France
Tel. : +33-4-42-90-84-78 / Fax : +33-4-42-90-84-48

International Conference on Ecological Sciences

24 - 28 October 2016, Marseille, Palais du Pharo



sfecologie2016.sciencesconf.org

Je soussignée Cécile Albert, présidente du comité d'organisation de la Sfécologie 2016 certifie que

Aiche Mohamed Amine

a présenté ses travaux de recherche au cours du colloque Sfécologie2016 du 24 au 28 octobre 2016 à
Marseille

*Adverse effect on fertility in male rat after exposure to
a mixture of endocrine disrupting pesticides*
Délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Cécile Albert

Institut Méditerranéen de
Biodiversité et d'Ecologie - IMBE
UMR CNRS 7266 - IRD 237
Aix Marseille Université
Campus Etoile, Faculté de St Jérôme
Avenue Escadrille Normandie Niémen - Case 421
F-13397 Marseille cedex 20, France

ASSOCIATION TUNISIENNE
DES SCIENCES BIOLOGIQUES

Membre de IUBMB / FASBMB / IUSB / FEBS



TUNISIAN ASSOCIATION
OF BIOLOGICAL SCIENCES

Member of : IUBMB / FASBMB / IUSB / FEBS

ATTESTATION DE PARTICIPATION

Le comité d'organisation du 27^{ème} forum international des sciences biologiques et de biotechnologie de l'ATSB, tenu à l'hôtel Laico, Tunisie, du 28 au 31 mars 2016, atteste que :

AICHE MOHAMED AMINE

a participé activement aux journées et a présenté la communication par affiche n°: 2.
intitulée :

EVALUATION DES EFFETS TOXIQUES POTENTIELS D'UN MELANGE DE PESTICIDES
SUR LES REPNSES BIOCHIMIQUES ET HISTOLOGIQUES CHEZ LE RAT MALE WISTAR

AICHE MOHAMED AMINE , MALLEM LEILA, YAHIA ELKHANSA
ET BOULAKOUD MOHAMED SALAH

Pour le comité d'organisation

Association Tunisienne
des Sciences Biologiques
الجمعية التونسية لعلم الأحياء

Le vice trésorier : Nabit SOUISSI

IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) - FASBMB (Federation of African Societies of Biochemistry and Molecular Biology)
IUSB (International Union of Biological Sciences) FEBS (Federation of European Biochemical Societies)



Association Tunisienne

de Physiologie et Bio-surveillance de l'Environnement



جمعية التونسية
للمراقبة البيولوجية للبيئة

Certificate of participation

We affirm that

Mohamed Amine Aiche

has presented a Poster presentation entitled

« Modifications biochimiques et histologiques de l'intoxication orale par un mélange de pesticides sur la reproduction chez le rat male »

At the IXth International Congress of Physiology and Environmental Biomonitoring

20-23 December 2015, Tabarka, Tunisia



Tempus



AGENCE
UNIVERSITAIRE
DES PARCOURS



INSTITUT
FRANÇAIS
TUNISIE



ASSOCIATION TUNISIENNE
DE BIOTECHNOLOGIE ET VALORISATION
DES BIORESSOURCES



Congrès International de Biotechnologie et
Valorisation des Bio-ressources

الجمعية التونسية لتكنولوجيا وتقييم الموارد الطبيعية
والقيمة المضافة للمنتجات البيوتكنولوجية

TUNISIAN ASSOCIATION
OF BIOTECHNOLOGY AND
BIORESOURCES VALORISATION

ATTESTATION DE PARTICIPATION

Le comité d'organisation du III^{ème} congrès international de Biotechnologies et Valorisation des Bio-Ressources (AT-BVBR), tenu à l'hôtel Itrópika, Tabarka, Tunisie, du 20 au 23 mars 2015, atteste que :

AICHE Mohamed Amine

a participé activement aux journées et a présenté la communication par affiche intitulée :

AF2 : EFFETS TOXIQUES D'UN MELANGE DE DEUX PESTICIDES PROPICONAZOLE ET PROPINEB SUR LA FONCTION HEPATIQUE CHEZ LE RAT MALE WISTAR

Aiche Mohamed Amine, Mallem Leila, Yahia El Khansa, Boulakoud Mohamed Salah

Pour le comité d'organisation

Tunisian Association of Biotechnology
and Valorisation of Bioresources
الجمعية التونسية لتكنولوجيا
وتقييم الموارد الطبيعية

Le président: M^{eq}Lamjed MARZOUKI