

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR – ANNABA



FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

LABORATOIRE DE BIOSURVEILLANCE ENVIRONNEMENTALE

Thèse En vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat

Domaine : SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE

Filière : Sciences biologiques

Option : Physiologie cellulaire et physiopathologie

Intitulé

Evaluation des effets secondaires d'un agoniste des récepteurs androgéniques le linuron chez le rat wistar .Effet prophylactique d'une molécule bioactive enzymo mimétique.

Présentée par : Mlle Sakina CHAIB

Directeur de thèse : Kheireddine Ouali (Pr, Université Badji Mokhtar - Annaba)

Devant un jury composé de :

Pr. Kadri Skander	Président	Université Badji Mokhtar -Annaba
Dr. LAKBAR Chanez	Examinatrice	Université Badji Mokhtar -Annaba
Dr. BABA-Ahmed Fedia	Examinatrice	Université Chadli Bendjedid, El-Taref
Pr. MERGHAD Amina	Examinatrice	Université Cherif Messaidia, Souk Ahras

Année universitaire : 2023/2024



## Table des matières

Remerciements

Résumé

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Chapitre I : LE SYSTEME ENDOCRINIEN</b> .....	4
1. Rappel sur le système endocrinien .....	4
1.1 Définition .....	4
2. Les glandes endocrines .....	5
2.1 Généralités .....	5
2.2 Les glandes majeures du système endocrinien .....	5
2.2.1 Le complexe hypothalamo-hypophysaire .....	6
1.2.1.1. Epiphyse .....	6
1.2.1.2. Hypophyse .....	7
1.2.2. La glande thyroïde .....	10
1.2.3. Les glandes parathyroïdes .....	11
1.2.4. Les glandes surrénales .....	11
1.2.5. Le pancréas .....	13
1.2.6. Les ovaires .....	13
1.2.7. Les testicules .....	14
3. Les perturbateurs endocriniens .....	14
3.1 Historique et définition .....	14
3.1.1 Mode d'action des perturbateurs endocriniens .....	15
3.1.2 Classification des perturbateurs endocriniens .....	16
3.1.2.1. Les hormones naturelles .....	16
3.1.2.2. Les hormones de synthèse .....	16
3.1.2.3. Les polluants chimiques anthropiques .....	17
<b>Chapitre II : LES PESTICIDES</b> .....	18
1 Généralités sur les pesticides .....	18

1.1	Histoire des pesticides .....	18
1.2	Définition d'un pesticide .....	19
1.3	Classification des pesticides .....	20
1.3.1	Selon leurs cibles.....	58
1.3.1.1.	Les insecticides.....	20
1.3.1.2.	Les fongicides.....	20
1.3.1.3.	Les herbicides.....	20
1.3.2.	Selon leur nature chimique.....	21
1.3.2.1.	Les organochlorés.....	21
1.3.2.2.	Les organophosphorés.....	21
1.3.2.3.	Les carbamates.....	21
1.3.2.4.	Les phénoxyacides.....	21
1.3.2.5.	Autres.....	21
1.3.3.	Selon leurs utilisations.....	22
1.4	Devenir des pesticides dans l'environnement .....	23
1.5	Modes d'exposition de l'homme aux pesticides .....	24
1.5.1.	Exposition professionnelle.....	24
1.5.2.	Exposition non professionnelle.....	25
1.6.	Impact des pesticides sur l'environnement et la santé.....	26
1.6.1.	Impact sur les écosystèmes.....	26
1.6.2.	Impact sur l'homme.....	27
1.6.2.1.	Effet cancérigène.....	28
1.6.2.2.	Effet reprotoxique.....	29
	<b>Chapitre III : LE LINURON.....</b>	<b>31</b>
1.	Le Linuron (3-(3,4-chlorophényl)-1-méthoxy-1-méthylurée) .....	31
2.	Les formes du Linuron disponibles en Algérie .....	32
2.1.	La toxicité du Linuron .....	32
2.1.1.	Toxicocinétique.....	33
2.1.2.	Mécanisme de toxicité .....	33
2.1.3.	Toxicité aiguë et à court terme .....	33
2.1.4.	Toxicité chronique.....	33
2.1.5.	Elimination .....	34
2.2.	Le linuron, potentiel antagoniste des récepteurs androgéniques .....	34
2.3.	Le Linuron et le stress oxydant .....	35
	<b>Chapitre IV : LE STRESS OXYDANT .....</b>	<b>37</b>
1	Le stress oxydant .....	37

1.1.Définition.....	37
1.2. Les radicaux libres biologiques.....	37
1.3. Les sources cellulaires des radicaux libres.....	38
1.4.Les effets du stress oxydant sur les macromolécules biologiques.....	39
1.4.1. Peroxydation lipidique.....	39
1.4.2. L'oxydation des protéines.....	40
1.4.3. Les dommages oxydatifs de l'ADN.....	41
1.5. Pathologies chroniques liées à un excès d'EROs.....	42
2 Les systèmes de défenses antioxydants .....	43
2.1 . Les mécanismes d'actions des antioxydants.....	43
2.2 Les systèmes antioxydants enzymatiques .....	44
2.2.1. Les superoxydes dismutases (SOD EC 1.15.1.11).....	44
2.2.2. La glutathion peroxydases (GPx :EC 1.11.1.9).....	44
2.2.3. Les Glutathion-S-Transférases (GST, EC 2.5.1.18).....	45
2.2.4. La catalase (CAT : EC 1.11.1.6).....	45
2.2.5. Les thiorédoxines (TRx) et la thiorédoxine réductase (TRxR).....	46
2.3 Les systèmes antioxydants non enzymatiques .....	46
2.3.1. Le glutathion.....	46
2.3.2. L'acide alpha-lipoïque.....	47
2.3.3. La mélatonine.....	47
2.3.4. L'acide urique.....	47
2.3.5. Le Coenzyme Q 10.....	47
2.3.6. L'acide ascorbique.....	47
2.3.7. La vitamine E (tocophérol).....	48
2.3.8. Les oligo-éléments.....	48
2.3.9. . Les polyphénols.....	49
2.3.10. Les polyphénols et la santé.....	49

## **Chapitre V : LA MELATONINE.....51**

1. La Mélatonine .....	51
2. Synthèse de la Mélatonine.....	51
3. Métabolisme de la mélatonine.....	53
4. Mélatonine et reproduction.....	54
5. Mélatonine et stress oxydatif .....	55

## **Chapitre VI. MATERIEL ET METHODES.....57**

1. Les produits chimiques .....	57
2. Matériel Biologique.....	57
2.1. Présentation .....	57

2.2. Animaux et conditions d'élevage.....	57
3. Protocole expérimental.....	57
3.1. Répartition et traitement des rats.....	57
3.2. Sacrifices des animaux.....	58
3.2.1. Prélèvement sanguin.....	58
3.2.2. Prélèvement des organes.....	58
3.2.3. Dosage des paramètres biochimiques : hépatique.....	58
3.2.4. Analyse ELISA des hormones hypophyso-testiculaires.....	60
3.3. Dosage des paramètres du stress oxydant.....	60
3.3.1. Préparation de l'homogénat de tissus.....	60
3.3.2. Dosage des protéines.....	60
3.3.3. Dosage de quelques paramètres du stress oxydant tissulaire.....	61
3.3.3.1. Dosage du glutathion.....	61
3.3.3.2. Détermination de la peroxydation lipidique par la mesure du taux de malondialdéhyde (MDA) au niveau tissulaire.....	62
3.3.3.3. Dosage des protéines carbonylées.....	64
3.3.3.4. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPX : E.C.1.11.1.9).....	65
3.3.3.5. Dosage de l'activité enzymatique de la catalase (E.C.1.11.1.6).....	66
3.3.3.6. Dosage de l'activité de la superoxyde dismutase (E.C.1.15.1.1).....	67
3.3.3.7. Dosage de l'activité de glutathion-s-transférase (GSTs).....	68
3.4. Étude histopathologique.....	69
3.5. Détection par immunohistochimie de la glycoprotéine CD45 et CD 117.....	70
3.6. Etude statistique.....	70
<b>Chapitre VII. RÉSULTATS &amp; DISCUSSION.....</b>	<b>72</b>
1. Effets du traitement sur la santé générale des rats.....	72
2. Evaluation du poids corporel et du poids des organes.....	72
2.1. Poids corporel.....	72
2.2. Poids absolus et relatif des organes : Foie, testicules.....	72
2.3. Etude des paramètres biochimiques.....	76
2.3.1. Effet du traitement sur les réponses des marqueurs biochimiques de la fonction hépatique.....	76
2.3.2. Effet du traitement sur le métabolisme lipidique.....	76
2.3.3. Effets du traitement sur les hormones de l'axe hypophyse-testicule.....	77
2.4. Stress oxydant induit par le Linuron : Effets protecteurs de la supplémentation en Mélatonine	80
2.4.1. Effet du traitement sur les paramètres non-enzymatiques.....	80
2.4.1.1. Taux du glutathion réduit (GSH).....	80
2.4.1.2. Peroxydation lipidique (MDA).....	80
2.4.1.3. Taux de protéines carbonylées.....	80
2.4.2. Effet du traitement sur les paramètres enzymatiques.....	81
2.4.2.1. La superoxyde dismutase (SOD).....	81
2.4.2.2. La catalase (CAT).....	81
2.4.2.3. La glutathion peroxydase (GPx).....	81
2.4.2.4. Glutathion - S- transférase (GST).....	81
2.5. Etude histologique.....	86

2.5.1. Etude histologique du foie.....	86
2.5.2. Etude histologique des testicules.....	86
2.5.3. Immunohistochimie.....	87
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>96</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>99</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>131</b>

## **Remerciements**

*J'aimerais tout d'abord exprimer toute ma reconnaissance à mon directeur de thèse **Professeur Ouali kheireddine** pour m'avoir appris à être moins « bonne élève » et plus autonome tout au long de ce travail de recherche. Je vous remercie pour vos conseils, votre patience, ainsi que pour la rigueur et l'enthousiasme scientifique que vous m'avez transmis. Votre aide m'a permis de mener à bien ce travail et je vous réitère ici toute ma gratitude et ma sympathie.*

***Docteur Trea Fouzia (MCA)** d'avoir co-dirigé ma thèse, de m'avoir accompagné tout au long de cette aventure. Votre expérience, connaissances et votre appétence pour le domaine ont très fortement contribué à la réussite de ma thèse. Que vous trouviez ici les marques de ma reconnaissance et de mon profond respect.*

*Je tiens à remercier chaleureusement l'ensemble des membres du jury. Je suis infiniment sensible à l'honneur que vous nous faites en acceptant de siéger parmi notre jury de thèse. J'espère que vous avez pris plaisir à la lecture de la thèse et que vous apprécierez la présentation orale*

***Professeur Kadri Skander** Je vous remercie, Pour m'avoir fait l'honneur et le plaisir d'accepter de présider cette thèse, Pour avoir relu avec attention mon travail.*

***Professeur Merghad Amina**, qui m'a fait le grand honneur d'accepter de juger ce travail.*

*Je vous exprime ici toute ma gratitude et mon profond respect.*

***Docteur BABA-Ahmed Fedia (MCA)** Pour l'attention que vous avez porté à ce travail en acceptant de le juger. Je vous exprime ici toute ma gratitude et mon profond respect.*

***Docteur Lakbar Chanez (MCA)** d'avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examinatrice Je vous exprime ici toute ma gratitude et mon profond respect.*

*Je remercie vivement tous les membres de **l'équipe LBSE** :*

*Je tiens à remercier tout particulièrement **Soumaia**, je te remercie pour tes compétences, ta disponibilité, ta gentillesse, ta loyauté, tes conseils lors des manips, ta décontraction et ton petit cahier de protocoles « old school » qu'il va bientôt falloir mettre sous verre pour le protéger des assauts du temps et des étudiants. Grâce à toi, je pense avoir passé ces sept années sans trop de problèmes. Je te souhaite beaucoup de courage.*

*Merci à l'ensemble des membres du laboratoire pour leur aide et leur bonne humeur et notamment à mes collègues de promo, singulièrement **Asma** avec qui j'aurai passé une bonne partie de mes études. Pour avoir rendu ce chemin tellement facile, Pour nos révisions qui me manqueront tant, nos heures d'enseignements, notre voyage ensemble lors du stage courte durée, entre autres...Pour ta présence à mes côtés au quotidien, Pour cette amitié qui nous accompagnera toujours.*

*Sans oublier la technicienne du LBSE **Khawla**, Merci d'avoir su gérer à ta manière le déroulement du travail au sein de notre laboratoire avec enthousiasme et une ambiance bonne enfant.*

*J'adresse mes sincères remerciements à tous les professeurs, intervenants, staff technique et toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé mes réflexions et ont accepté de me rencontrer et de répondre à mes questions durant mes recherches, expressément **Docteur Taha Khaldi**, qui a souffert de mes cataclysmes d'impatience, de désespoir ou de folle excitation, je te remercie d'avoir été présent à mes côtés, je tiens à te témoigner toute ma sympathie.*

*À tous mes chers amis, par-dessus tout **Basma**, les quelques mots ne représenteront jamais assez toutes mes pensées mais je te remercie pour m'avoir soutenue tout au long de mon parcours, Merci, Pour tous ces moments passés ensemble, pour tous ces instants de vie, de rire et de bonheur, Pour notre si belle amitié.*

*Je ne citerai pas, mais ils se reconnaitront, tous mes amis et collègues, qui m'ont soutenu, même de loin. Je leur suis reconnaissante.*

*Un immense merci à mes chers parents, à mes frères Sofiane, Belkacem, Hayet, les deux petites créatures : Racim et Liana et mes chères tantes. La route fut longue et parfois difficile, mais vous avez participé chacun à sa manière à ce travail et toujours avec bienveillance. En témoignage de mon amour inconditionnel.*

*Je dédie ce travail à ma résilience.*

**“J'ai appris que la voie du progrès n'était ni rapide ni facile.”**

**“Nous devons croire que nous sommes doués pour quelque chose, et que cette chose, à n'importe quel prix, doit être atteinte. ”**

*Marie Curie*

*Physicienne, Scientifique (1867 - 1934)*

**“ Dans le domaine de la science, nous apprenons combien vaste est l'étrangeté du monde. ”**

*Robert Oppenheimer*

*Physicien, Scientifique (1904 - 1967)*

## **Résumé**

De nombreuses études ont démontré que les antioxydants naturels protègent les cellules des effets toxiques des contaminants. Cette étude vise à étudier les effets protecteurs potentiels de la mélatonine (MLT) contre la toxicité testiculaire et les dommages à la spermatogenèse induits par le linuron. Les rats ont été divisés en quatre groupes : le lot témoin (pas de traitement), le lot MLT qui a reçu de la MLT (10 mg/kg /p.c), le lot LIN qui a reçu du LIN (120 mg/kg/p.c), et le lot (LIN+MLT) traité avec du LIN et de la MLT.

Les substances étudiées, mélatonine (MLT) et linuron (LIN), ont été administrées par voie orale aux animaux pendant 30 jours. Les résultats ont montré que les dysfonctionnements testiculaires induits par le traitement au linuron ont provoqué une inhibition significative de la synthèse des hormones de l'axe hypophyse-testicule (diminution des niveaux sériques de testostérone, FSH et LH) associée à des lésions de la spermatogenèse améliorées par de faibles scores de Johnsen et une augmentation de l'expression du CD117 dans les testicules. En outre, les activités de la superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase (CAT) ainsi que la teneur en glutathion réduit (GSH) ont diminué de manière significative. En revanche, l'activité de la glutathion S-transférase (GST), de la glutathion peroxydase (GPx), du malondialdéhyde (MDA) et du carbonyle des protéines (PCO) a considérablement augmenté. Nos résultats ont établi que la supplémentation orale en MLT chez les rats traités au LIN a rétabli les niveaux d'hormones plasmatiques et a atténué les effets cytotoxiques négatifs du LIN.

Selon les conclusions, la MLT a démontré son potentiel en tant qu'antioxydant endogène, atténuant efficacement les effets cytotoxiques du LIN.

**Mots clés :** Testicule, expression CD117, Linuron , Mélatonine ,Stress oxydatif , Antioxydant.

## **Abstract**

Numerous studies have demonstrated that natural antioxidants protect cells from contaminants' toxic effects. This study aims to investigate the potential protective effects of melatonin (MLT) against linuron-induced testicular toxicity and spermatogenesis damage. Rats were divided into four groups: the control group (no treatment), the MLT group that received MLT (10 mg/kg b.w), the LIN group that received LIN (120 mg/kg b.w), and (LIN/MLT) group treated with LIN and MLT. The investigated substances MLT and linuron (LIN) were given orally to the animals for 30 days. The results showed that linuron treatment-induced testicular dysfunctions demonstrated significant inhibition of pituitary–testicular axis hormone synthesis (diminution serum levels of testosterone, FSH, and LH) associated with spermatogenesis injury improved by low Johnsen scores and increased in testis CD117 expression. Furthermore, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities, as well as reduced glutathione (GSH) content, were significantly decreased. In contrast, there was a considerable rise in the activity of glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx), malondialdehyde (MDA), and protein carbonyl (PCO). Our results established that oral MLT supplementation in LIN-treated rats restored plasma hormone levels and alleviated the adverse cytotoxic effects of LIN. According to the findings, MLT demonstrated potential as an endogenous antioxidant, effectively alleviating linuron-induced testicular oxidative injury.

**Keywords Testis :** CD117 expression, Linuron, Melatonin, Oxidative stress, Antioxidant.

## الملخص

أثبتت العديد من الدراسات أن مضادات الأكسدة الطبيعية تحمي الخلايا من التأثيرات السامة للملوثات. تهدف هذه الدراسة ضد سمية الخصية الناجمة عن اللينورون وتلف تكوين الحيوانات (MLT) إلى دراسة التأثيرات الوقائية المحتملة للميلاتونين MLT التي تلقت MLT المنوية. تم تقسيم الجرذان إلى أربع مجموعات: المجموعة الضابطة (بدون علاج)، ومجموعة (120 ملغم/كغم من وزن الجسم)، ومجموعة LIN التي تلقت LIN (10 ملغم/كغم من وزن الجسم)، ومجموعة عن طريق الفم (LIN) linuron و MLT تم إعطاء المواد التي تم فحصها. MLT و LIN تعامل مع (LIN/MLT) للحيوانات لمدة 30 يومًا. أظهرت النتائج أن اختلالات الخصية الناجمة عن علاج اللينورون أظهرت تشبيهاً كبيراً لتخليق المرتبط بإصابة تكوين (LH و FSH تناقص مستويات مصل هرمون التستوستيرون و) هرمون الغدة النخامية - الخصية علاوة على ذلك، CD117 الحيوانات المنوية التي تحسنت بسبب انخفاض درجات جونسن وزيادة في تعبير الخصية ، وكذلك انخفاض محتوى الجلوتاثيون (CAT) والكاتالاز (SOD) انخفضت بشكل كبير أنشطة ديسموتاز الفائق أكسيد ، الجلوتاثيون بيروكسيداز (GST) ترانسفيراز-S في المقابل، كان هناك ارتفاع كبير في نشاط الجلوتاثيون (GSH) ، عن طريق الفم في MLT أثبتت نتائجنا أن مكملات (PCO) ، والبروتين كاربونيل (MDA) ، المالونديالدهيد (GPx) وفقاً LIN أعادت مستويات هرمون البلازما وخففت من التأثيرات الضارة السامة للخلايا للـ LIN الفئران المعالجة بـ إمكانات كمضاد للأكسدة داخلي، مما يخفف بشكل فعال من الإصابة التأكسدية الخصية الناجمة عن MLT للنتائج، أظهر اللينورون.

**الكلمات المفتاحية: الخصية : تعبير ، لينورون، ميلاتونين، الإجهاد التأكسدي، مضادات الأكسدة CD117.**

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Schéma des grandes glandes endocrines du corps humain (Gore <i>et al.</i> , 2009)	<b>04</b>
<b>Figure 2.</b> Mécanismes d'action des hormones (Ludwig, 2011).	<b>05</b>
<b>Figure 3.</b> Hypothalamus et hypophyse ( <a href="http://www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/allemand/biochemie/endokrin/images/hypophyse_mod_ohne.gif">http://www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/allemand/biochemie/endokrin/images/hypophyse_mod_ohne.gif</a> )	<b>07</b>
<b>Figure 4.</b> Cibles des hormones hypophysaires (D'après Turquetil <i>et al.</i> , 2019).	<b>08</b>
<b>Figure 5.</b> Les glandes surrénales (Turquetil et Reznik, 2019).	<b>11</b>
<b>Figure 6.</b> Mécanisme d'action des perturbateurs endocriniens (Chevrier <i>et al.</i> , 2011).	<b>16</b>
<b>Figure 7.</b> Devenir des pesticides dans l'environnement (Lissalde, 2010).	<b>24</b>
<b>Figure 8.</b> Modes d'exposition de l'homme aux pesticides (CPP, 2002).	<b>26</b>
<b>Figure 9.</b> Structure chimique du linuron.	<b>32</b>
<b>Figure 10.</b> Les principaux sites cellulaires de productions des ERO.	<b>39</b>
<b>Figure 11.</b> Les différentes cibles des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Monteil, 2004).	<b>42</b>
<b>Figure 12.</b> Les défenses antioxydantes dans l'organisme (Kurutas, 2015).	<b>43</b>
<b>Figure 13.</b> Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (Favier, 2003).	<b>46</b>
<b>Figure 14.</b> Vitamine C.	<b>48</b>

<b>Figure 15.</b> Vitamine E.	<b>48</b>
<b>Figure 16.</b> Structure chimique de la mélatonine.	<b>51</b>
<b>Figure 17.</b> Schéma représentatif de la synthèse de la mélatonine.	<b>52</b>
<b>Figure 18.</b> Schéma récapitulatif de l'expérimentation.	<b>59</b>
<b>Figure 19.</b> Principe de dosage du glutathion.	<b>61</b>
<b>Figure 20.</b> Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique.	<b>63</b>
<b>Figure 11.</b> Réaction entre les protéines carbonylées et le DNPH.	<b>64</b>
<b>Figure 22.</b> Variation de l'activité enzymatique de la GST (nmoles de conjugué C-DNB formé/min/mg de protéine) (a) ; GPx ( $\mu\text{mol GSH/mg}$ de protéine) (b) ; CAT (nmol $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min/mg}$ de protéine) (c) et SOD (U/mg de protéine) (d) dans le foie chez les rats témoins et traités pendant 30 jours.	<b>82</b>
<b>Figure 23.</b> Variation de l'activité de la GSH ( $\mu\text{mol/mg}$ de protéine) (e) ; MDA ( $\mu\text{mol GSH/mg}$ de protéine) (f) et PCO ( $\mu\text{mol/mg}$ de protéine) (g) dans le foie chez les rats témoins et traités pendant 30 jours.	<b>83</b>
<b>Figure 24.</b> Activité enzymatique de la GST (nmoles de conjugué C-DNB formé/min/mg de protéine) (a) ; GPx ( $\mu\text{mol GSH/mg}$ de protéine) (b) ; CAT (nmol $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min/mg}$ de protéine) (c) et SOD (U/mg de protéine) (d) dans le foie chez les rats témoins et traités pendant 30 jours.	<b>84</b>
<b>Figure 25.</b> GSH ( $\mu\text{mol/mg}$ de protéine) (e) ; MDA ( $\mu\text{mol GSH/mg}$ de protéine) (f) et PCO ( $\mu\text{mol/mg}$ de protéine) (g) dans le foie chez les rats témoins et traités pendant 30 jours.	<b>85</b>
<b>Figure 26.</b> Coupes de foie colorées à l'hématoxyline et à l'éosine de rats témoins (A), de rats traités à la mélatonine (B) ou au linuron (C, D, E) et à la mélatonine/linuron (F) pendant 30 jours.	<b>88</b>
<b>Figure 27.</b> Coupes histologiques des testicules de rats avec coloration H& E. Contrôle et rats traités à la mélatonine (A et B) pendant 30 jours.	<b>90</b>
<b>Figure 28.</b> Marquage immunohistochimique de l'expression du CD117 dans le foie de rats témoins (A), de rats traités à la mélatonine (B), au linuron (C) et au linuron/mélatonine (D) pendant 30 jours à un grossissement de x 300.	<b>91</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Croisements entre la classification chimique et la classification biologiques des pesticides (Calvet, 2005).	<b>22</b>
<b>Tableau 2.</b> Propriétés physico-chimiques et données de toxicité du linuron.	<b>32</b>
<b>Tableau 3.</b> Principales ERO radicalaires et non-radicalaires (Dwassy, 2014).	<b>38</b>
<b>Tableau 4.</b> Structure des squelettes des polyphénols (Crozier <i>et al.</i> , 2008).	<b>49</b>
<b>Tableau 5.</b> Les réactifs utilisés lors du dosage de l'activité de la GST.	<b>68</b>
<b>Tableau 6.</b> Variation de poids corporel, poids absolu (g) et relatif (g/100g de PC) du foie et des testicules chez les rats témoins et traités après 30 jours du traitement.	<b>73</b>
<b>Tableau 7.</b> Effets des traitements sur les paramètres biochimiques sériques chez les rats témoins et traités après 30 jours du traitement.	<b>76</b>
<b>Tableau 8.</b> Effets des traitements sur la réponse de l'axe gonadotrope sérique chez les rats témoins et traités après 30 jours du traitement.	<b>77</b>

## Liste des abréviations

- ACTH:** Adrenocorticotropie hormone.
- AGPI:** acides gras polyinsaturés.
- ADH:** Antidiurétique hormone.
- ADN :** Acide désoxyribonucléique.
- ASAT :** Aspartate Aminotransférase.
- ALAT :** Alanine Aminotransférase.
- BSA :** Sérum albumine bovine.
- CAT :** Catalase.
- CDNB :** 1-chloro, 2,4-dinitrobenzène.
- CD117 :** cluster of differentiation 117.
- CL 50 :** Dose létale Médiane
- CRF:** Corticotropin-releasing factor.
- CRH:** Corticotropin-releasing hormone.
- DDT:** Dichlorodiphényl trichloréthane.
- DHT:** Dihydrotestostérone.
- DL 50 :** Concentration létale médiane.
- DO :** densité optique.
- DPPH :** 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle.
- DTNB :** dithio- dis-2-nitrobenzoïque.
- EROs :** espèces réactive de l'oxygène.
- FNS :** formule de numération sanguine.
- FSH :** Follicle-stimulating hormone.
- GH:** Growth hormone.
- GH-RH:** Growth Hormone Releasing Hormone.
- GH-IH:** growth hormone-inhibiting hormone.
- GnRH:** gonadotrophin releasing hormone.
- GPx :** glutathion peroxydase.
- GSH :** glutathion.
- GSSG :** Le disulfure de glutathion.
- GST :** glutathion S – transférase.

**HIOMT** : l'hydroxyindole-O-méthyltransférase.

**Keap1**: Kelch-like ECH-associated protein 1.

**LDH**: lactate déshydrogénase.

**LH**: Luteinizing Hormone.

**LHRH**: Luteinizing hormone-releasing hormone.

**LIN**: Linuron.

**LPO** : peroxydation des lipides.

**MDA** : Malondialdéhyde.

**MLT** : Mélatonine.

**MSH**: melanocyte-stimulating hormones.

**NaCl**: Chlorure de sodium.

**NAS** : N-acetyl-sérotonine

**NAT** : N-acetyl-transférase

**Nrf2**: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2.

**NFS** : Numération formule sanguine.

**PE** : perturbateurs endocriniens.

**PRL** : Prolactine.

**PTH**: Parathyroid hormone.

**ROS**: reactive oxygen species.

**SH** : Groupement thiol.

**SO** : système oxydatif

**SOD** : Superoxyde dismutase.

**SSA** : Sulfosalicylique.

**TBA** : Acide thiobarbiturique.

**TBS** : Tris buffer saline.

**TCA** : Trichloracétique.

**TSH**: Thyroid-stimulating hormone.

**TRH**: Thyrotropin Releasing Hormone.

**T3**: triiodothyronine.

**T4**: Thyroxine.

## **Unités/Divers :**

**°C** : Degré Celsius

**DO** : Densité optique

**mol** : Mole

**pH**: Potentiel hydrogène

**pKa**: Constante d'acidité

**U/l** : Unité internationale / litre

**µl** : Microlitre

**µg/L** : Microgramme/ litre



## **Introduction :**

Il est indéniable que la préoccupation concernant les perturbateurs endocriniens (PE) est devenue de plus en plus importante au fil des années, tant dans les sphères politiques que scientifiques. Leur présence dans l'environnement, qu'elle soit d'origine naturelle ou synthétique, soulève des inquiétudes quant à leurs effets à long terme.

Il est préoccupant de constater que plus de 480 pesticides sont enregistrés en Algérie, ce qui souligne l'ampleur de leur utilisation dans le pays. Cependant, il est important de noter que l'utilisation de ces produits chimiques comporte des risques pour la santé humaine et l'environnement. Les pesticides peuvent contaminer les sols, les eaux souterraines et de surface, ainsi que les produits agricoles eux-mêmes. De plus, ils peuvent avoir des effets néfastes sur la santé des travailleurs agricoles et des populations vivant à proximité des zones traitées.

Effectivement, les pesticides sont parmi les polluants les plus préoccupants pour l'environnement en raison de leur stabilité, de leur mobilité et de leurs effets à long terme sur les organismes vivants. Leur devenir dans l'environnement est un sujet complexe qui concerne tous les compartiments naturels, à savoir le sol, l'eau et l'air.

Cependant, le sol joue un rôle particulièrement important car une grande proportion des pesticides appliqués lors du traitement des cultures finit par s'y retrouver, que ce soit par une application directe au sol ou par lessivage à partir du feuillage des plantes traitées (Calvet *et al.*, 2005).

La présence persistante de résidus de pesticides dans l'environnement souligne l'importance de prendre des mesures pour minimiser leur utilisation, promouvoir des alternatives plus sûres et plus durables, et mettre en œuvre des pratiques de gestion intégrée des pesticides. De plus, il est essentiel de surveiller régulièrement la qualité de l'environnement pour détecter la présence de résidus de pesticides et prendre les mesures nécessaires pour minimiser leur impact sur la santé humaine et l'écosystème dans son ensemble (Ali Tor *et al.*, 2006).

La structure chimique du linuron correspond à celle d'une phénylurée substituée sélective, avec une formule chimique de  $C_9H_{10}Cl_2N_2O_2$ . Plus précisément, il s'agit de la 3-(3,4-dichlorophényl)-1-méthoxy-méthylurée. Cette structure confère au linuron ses propriétés herbicides, lui permettant de cibler spécifiquement les mauvaises herbes tout en minimisant les effets sur les cultures désirées, ce dernier est considéré comme étant modérément ou hautement toxique pour les organismes aquatiques, se traduisant par une peroxydation lipidique et des dommages oxydatifs qui jouent un rôle majeur dans les lésions des organes cibles (J Fenoll *et al.*, 2013).

En outre, des études ont également suggéré que l'exposition au linuron pourrait entraîner une diminution de la capacité antioxydante totale de l'organisme. Les antioxydants sont des composés qui aident à protéger les cellules contre les dommages causés par les radicaux libres et d'autres espèces réactives de l'oxygène.

Une diminution de la capacité antioxydante peut accroître la vulnérabilité des cellules et des tissus à diverses formes de stress oxydatif, ce qui peut contribuer au développement de diverses maladies et affections.

Il est indéniable que les plantes sont une source importante de molécules naturelles bioactives, dont beaucoup possèdent des propriétés antioxydantes puissantes. Ces molécules, telles que les polyphénols, les flavonoïdes, les caroténoïdes, les vitamines C et E, entre autres, peuvent aider à protéger les cellules contre les dommages causés par le stress oxydatif en neutralisant les radicaux libres et en réduisant les processus inflammatoires. (Puttanna *et al.*,2016 ; Al-Attar *et al.*,2017 ).

Dans ce contexte, la glande pinéale produit régulièrement de la mélatonine (N-acétyl-5-méthoxy tryptamine), une hormone animale bien connue aux multiples actions biologiques (Reiter *et al.*, 2010).

La mélatonine surnommée l'hormone du sommeil est une hormone produite naturellement par l'organisme principalement par la glande pinéale ou épiphyse elle est aussi fabriquée en laboratoire sous forme de médicaments ou de compléments alimentaire.

Son effet majeur reste la synchronisation du cycle veille / sommeil, elle règle le rythme de sommeil de 24h et est couramment utilisé pour prévenir le décalage horaire et pour guérir les troubles du sommeil, elle est également un antioxydant puissant et peut être utilisée pour prévenir es stress oxydatif et elle avoir un effet protecteur contre les dommages cellulaires et les radicaux libres (Reiter, R.J *et al.*, 2009).

Des études récentes ont démontré que cet élément pourrait avoir la capacité d'inverser les déficits fonctionnels liés à une variété de maladies du système reproducteur masculin (Rocha *et al.*, 2015).

Ce travail a pour objectif comme suit :

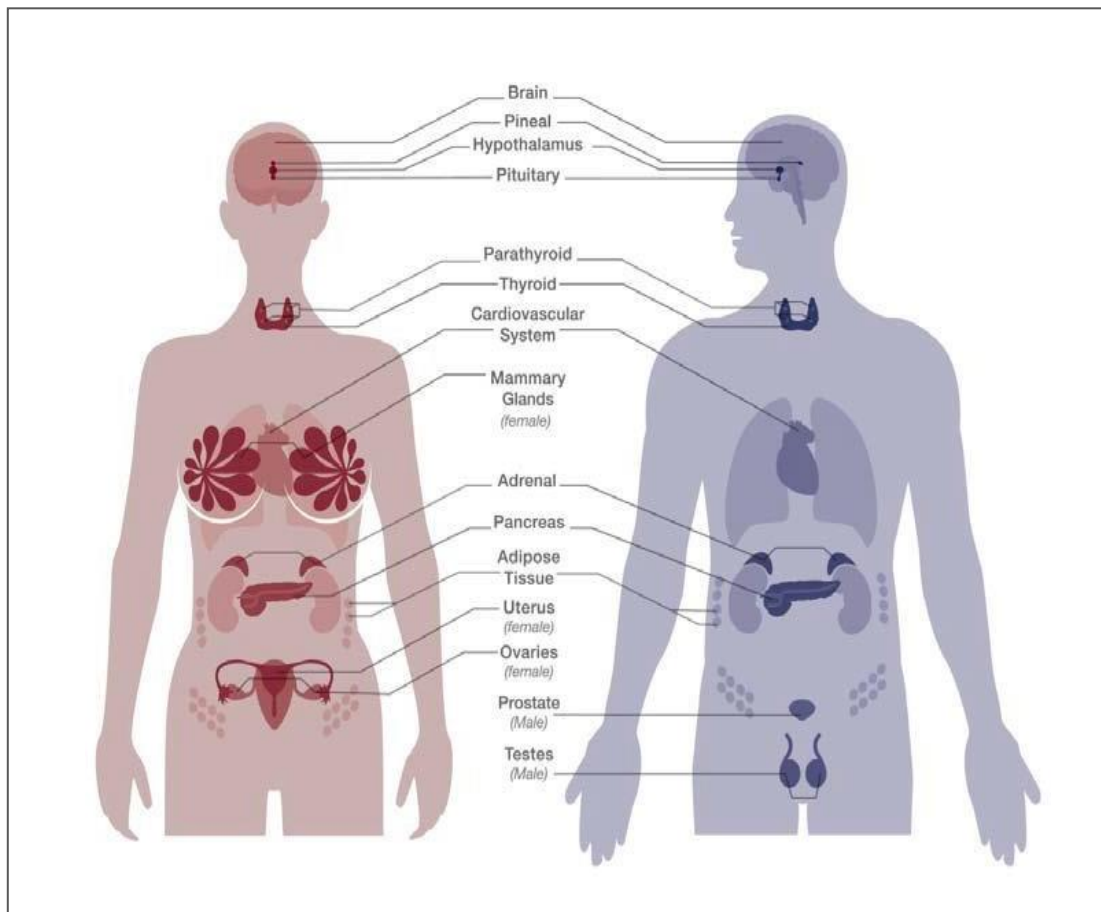
- Détermination de quelques paramètres de croissance : Cette section pourrait inclure des mesures telles que le poids corporel, la prise alimentaire et d'autres indicateurs de croissance pour évaluer l'effet du traitement sur le développement des rats.
- Étude de quelques paramètres biochimiques et hématologiques : Cette partie comprendrait des analyses sanguines et biochimiques pour évaluer les effets du traitement sur les paramètres hématologiques (comme le nombre de globules rouges, le taux d'hémoglobine, etc.) ainsi que sur les niveaux de diverses enzymes et substances biochimiques dans le sang.
- Évaluation du système pro/anti-oxydant : Cette section impliquerait l'analyse des activités enzymatiques impliquées dans la défense contre le stress oxydatif, telles que la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx), la catalase (Cat), la glutathion S transférase (GST) ainsi que des éléments non enzymatiques comme le glutathion réduit et les protéines carbonylées. Ces mesures aideraient à évaluer l'efficacité de la mélatonine dans la protection contre les dommages oxydatifs induits par le linuron.
- Étude histologique des organes cibles : Cette partie impliquerait l'examen microscopique des tissus du foie et des testicules pour évaluer les effets du traitement sur la structure et l'intégrité des organes cibles.
- Étude immunohistochimique des récepteurs membranaires : Cette section pourrait inclure des analyses immunohistochimiques pour évaluer l'expression des récepteurs membranaires spécifiques dans les tissus examinés, ce qui pourrait fournir des informations supplémentaires sur les mécanismes d'action impliqués dans les effets du traitement.
- Discussion des résultats : Chaque section des résultats serait discutée en détail, en mettant en évidence les principales observations et leurs implications pour l'objectif de l'étude.
- Conclusion générale et perspectives : Le document se terminerait par une conclusion récapitulant les principales découvertes de l'étude, ainsi que des suggestions pour des recherches futures dans ce domaine.

# CHAPITRE I : LE SYSTEME ENDOCRINIEN

## 1. Rappel sur le système endocrinien

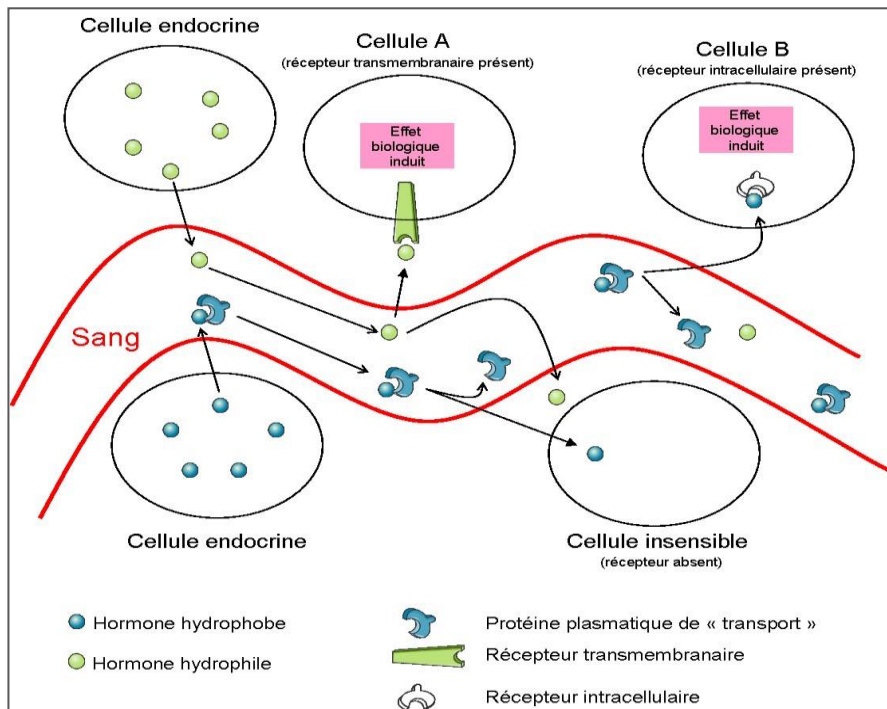
### 1.1. Définition

Le système endocrinien est l'ensemble de glandes qui sont distribuées dans tout le corps et qui produisent une ou plusieurs hormones. Ces dernières sont des substances chimiques naturelles libérées dans le système circulatoire et véhiculées par le sang jusqu'à ce qu'elles atteignent un tissu ou un organe cible. Là, elles se lient à des récepteurs spécifiques, déclenchant une réponse telle que la production d'une autre hormone, un changement dans le métabolisme, une réponse comportementale, ou d'autres réponses, en fonction de l'hormone spécifique et sa cible (Counis *et al.*, 2005).



**Figure 1.** Schéma des grandes glandes endocrines du corps humain (Gore *et al.*, 2009).

Pour réagir à une hormone, une cellule cible doit posséder des récepteurs auxquels l'hormone peut se lier de manière complémentaire. En d'autres termes, c'est la présence du récepteur hormonal qui confère à la cellule cible sa sensibilité vis-à-vis de l'hormone (Ludwig, 2011). Ces récepteurs sont présents soit dans la membrane plasmique pour les hormones peptidiques (Figure 02, cellule cible A), soit dans la cellule pour les stéroïdes et les hormones thyroïdiennes (Figure 02, cellule cible B). (Nussey et Whitehead, 2006).



**Figure 2.** Mécanismes d'action des hormones (Ludwig, 2011).

## 2. Les glandes endocrines

### 2.1 Généralités

Les glandes endocrines, également appelées glandes à sécrétion interne, ont la capacité de libérer leurs hormones directement dans la circulation sanguine ou la lymphe. Elles sont généralement richement vascularisées, ce qui facilite la distribution rapide des hormones dans tout le corps.

### 2.2 Les glandes majeures du système endocrinien

Les glandes endocrines, aussi appelées glandes à sécrétion interne, libèrent des hormones dans le sang ou dans la lymphe, et sont généralement pourvues d'un abondant drainage vasculaire. Les principales glandes endocrines sont l'épiphyse, l'hypophyse, la thyroïde, les parathyroïdes, les surrénales, le pancréas et les gonades.

## **2.2.1. Le complexe hypothalamo-hypophysaire**

### **2.2.1.1. Epiphyse**

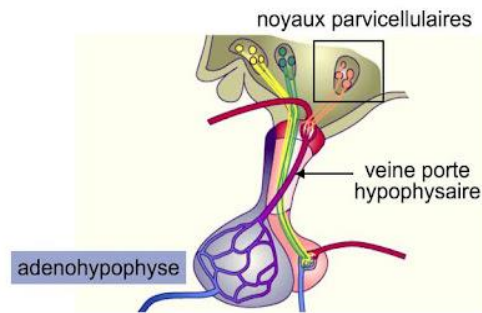
Appelée notamment glande pinéale, est située à l'extrémité postérieure du toit du troisième ventricule cérébral. Cette glande est constituée de masses de cellules gliales et de cellules sécrétrices appelées pinéalocytes. Ces dernières sont responsables de la synthèse de la mélatonine à partir de la sérotonine, et ce, sous la dépendance de l'intensité lumineuse.

La mélatonine est sécrétée la nuit et contribue à régler l'horloge biologique du corps humain (cycle nyctéméral) (Schuster, C,2007). Cette hormone régulatrice du cycle du sommeil intervient également dans différents processus biologiques dont la reproduction, la croissance cellulaire, et contrôle le poids corporel et la balance énergétique (Reiter, R.J. *et al.*,2009).

Par ailleurs, la mélatonine affecte la synthèse et la fonction des stéroïdes, tels que les œstrogènes, la testostérone, et la progestérone. Enfin, il a été largement établi que cette neuro-hormone inhibe l'angiogénèse et la prolifération tumorale, via l'inhibition de l'absorption des acides gras par les cellules cancéreuses ; l'inhibition de l'activité télomérase, entraînant l'apoptose de cellules cancéreuses ; l'inhibition de la synthèse d'endothéline-1, un facteur angiogénique ; des mécanismes épigénétiques ; et l'induction de l'apoptose, ainsi que la modulation du cycle cellulaire (Mediavilla, M.D., *et al.*,2010).

L'ensemble constitué par l'hypothalamus, l'hypophyse (Figure 3) et les organes situés au pourtour du troisième ventricule cérébral constitue un relais. Son but est de recueillir une multitude d'informations provenant tant de l'environnement que de l'organisme sous forme d'afférences sensorielles (visuelles, olfactives, viscéro-somatiques,...), de les analyser, d'intégrer les variations, de les filtrer ou de les renforcer (Schuster, C,2007). Après ce travail de tri et de synchronisation principalement réalisé par le système limbique, des signaux sont transmis par voie nerveuse et par des neurotransmetteurs à des régions spécialisées de l'hypothalamus.

A son tour, l'hypothalamus règle par l'intermédiaire d'hormones hypophysiotropes, l'activité des cellules hypophysaires en modulant directement leur sécrétion, ou en modifiant leur consigne. Enfin, les hormones hypophysaires, agissent au niveau de l'organisme dans le but de maintenir l'homoéostasie (Schuster, C,2007). Pour cette raison, le complexe hypothalamo-hypophysaire représente à lui seul l'essentiel des processus d'intégration neuro-endocrinienne de l'organisme.



**Figure 3.** Hypothalamus et hypophyse

([http://www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/allemand/biochemie/endokrin/images/hypophyse\\_mod\\_ohne.gif](http://www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/allemand/biochemie/endokrin/images/hypophyse_mod_ohne.gif)).

L'hypothalamus, formé par les parois du troisième ventricule est considéré comme le lien entre le système nerveux et le système endocrinien. Il produit deux hormones qui sont stockées dans l'hypophyse avant d'être libérées dans le sang : l'hormone antidiurétique (ADH) ou vasopressine, et l'ocytocine. L'hypothalamus sécrète aussi des libérines, hormones régulant les sécrétions de l'hypophyse (Guillemin, R., 2005), dont les principales sont :

La gonadolibérine (GnRH ou LHRH). En phase de repos, cette hormone est libérée de façon pulsatile toutes les 30 à 120 minutes, par les neurones du noyau arqué ou de l'aire pré-optique hypothalamique, en fonction de l'espèce. Son récepteur est exprimé par les cellules gonadotropes de l'hypophyse antérieure. Il appartient à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires, liés à des protéines G. Sa stimulation par la GnRH induit une augmentation de la transcription de son propre gène, et des gènes codant pour les hormones FSH et LH (Counis, R., *et al.*, 2005);

-La thyroélibérine (TRH) stimule la sécrétion de la thyrotrophine (TSH) ;

-La dopamine inhibe la sécrétion de la prolactine ;

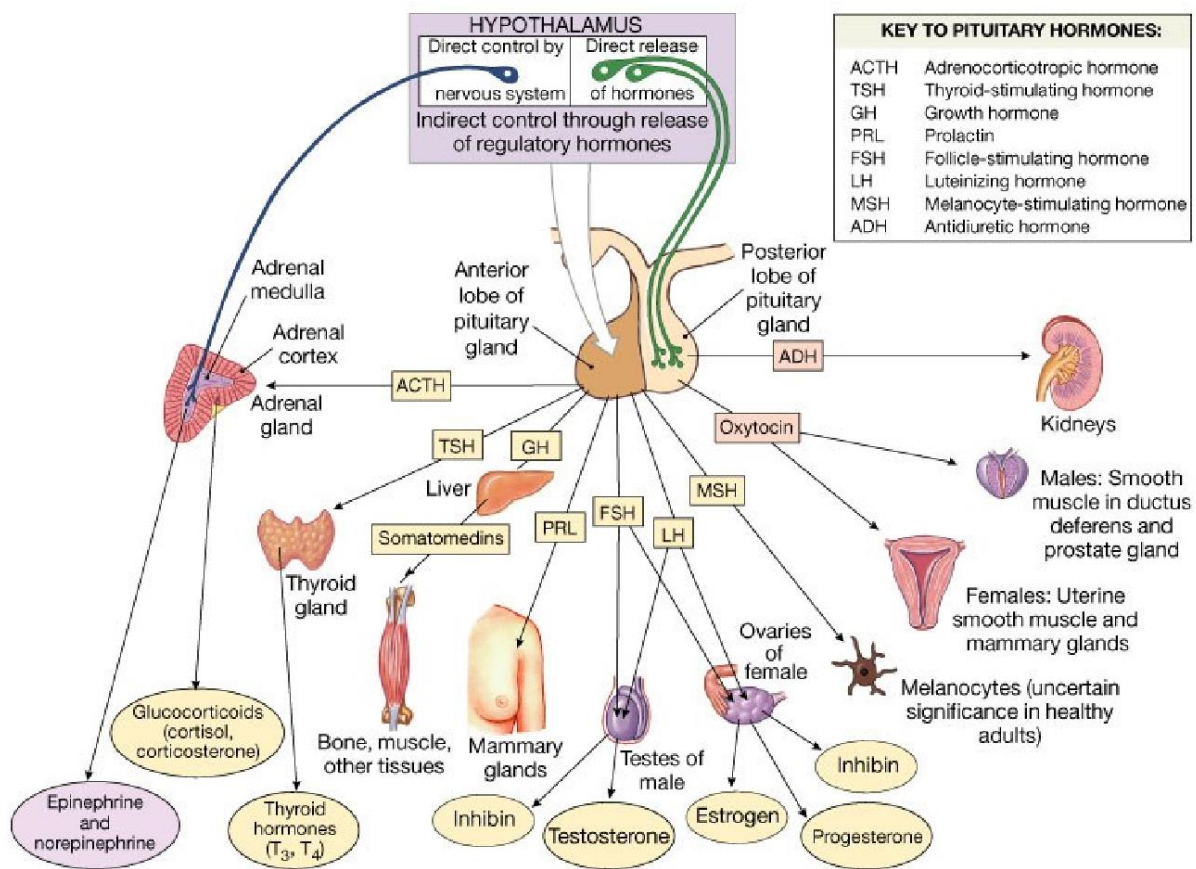
-La somatocitrine (GH-RH) provoque la libération de l'hormone de croissance, tandis que la somatostatine (GH-IH) l'inhibe ;

-La corticolibérine (CRF) stimule la sécrétion de la corticotrophine. La sécrétion des hormones hypothalamiques (sauf de la dopamine) est soumise à un phénomène de rétrocontrôle exercé par les hormones hypophysaires correspondantes.

### **2.2.1.2. Hypophyse**

L'hypophyse, appelée aussi glande pituitaire, est appendue à la base du cerveau au niveau de la selle turcique. Divisée en deux lobes, elle est sous le contrôle de l'hypothalamus.

Le lobe postérieur, neurohypophyse ou posthypophyse, se forme à partir d'une excroissance du tissu hypothalamique, et reste uni à l'hypothalamus par un réseau de neurofibres. La neurohypophyse est composée principalement de cellules gliales, d'axones et de terminaisons axonales. Ces dernières emmagasinent l'ocytocine et l'ADH synthétisées et libérées par les neurones hypothalamiques (Figure 4). Par conséquent, en libérant des neurohormones qu'elle reçoit "préfabriquées" de l'hypothalamus, la neurohypophyse est bien plus un site de stockage qu'une glande endocrine. Ces hormones sont sécrétées lorsque les terminaisons axonales sont stimulées par un influx nerveux. L'ADH influe sur l'équilibre hydrique, tandis que l'ocytocine stimule la contraction des muscles lisses de l'utérus et des cellules myoépithéliales des glandes mammaires (Lohmeier, T.E.,2003).



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

**Figure 4.** Cibles des hormones hypophysaires (D'après Turquetil *et al.*, 2019)

Le lobe antérieur, antéhypophyse ou adénohypophyse, est composé de cellules hormonopoïétiques. Contrairement au lobe postérieur, il produit et libère de nombreuses hormones. Six hormones adénohypophysaires, ayant chacune des effets physiologiques distincts sur l'organisme, ont été décrites (Figure 4) (Marieb, E., 1993) :

Stimulines, régissant le fonctionnement hormonal d'autres glandes endocrines :

-Les gonadotrophines, la FSH et la LH, régissent le fonctionnement des gonades.

Ces deux hormones sont des hétérodimères constitués d'une sous-unité commune, la glycoprotéine  $\alpha$  (gp  $\alpha$ ), et d'une sous-unité  $\beta$  spécifique de chacune des deux hormones (FSH  $\beta$ , LH  $\beta$ ). Les récepteurs des gonadotrophines LH et FSH font partie de la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. La fixation du ligand sur ce récepteur permet in fine l'activation de la transcription des gènes cibles (Don, J. et G. Stelzer, 2002).

Chez les deux sexes, la FSH stimule la production de gamètes (spermatozoïdes et ovules), tandis que la LH favorise la production des hormones gonadiques. Enfin, quand le taux sanguin d'hormones gonadiques s'élève, la sécrétion de LH ou de FSH est inhibée par rétrocontrôle.

-La thyrotrophine (TSH) ou hormone thyroïdienne, est une glycoprotéine qui stimule le développement normal et l'activité sécrétrice de la thyroïde.

-La corticotrophine (ACTH) ou hormone corticotrope, amène la corticosurrénale à libérer les hormones corticostéroïdes formées à partir du cholestérol, et plus particulièrement les glucocorticoïdes, qui aident l'organisme à résister aux facteurs de stress.

Hormones adénohypophysaires agissant principalement sur des cibles non endocriniennes :

-La prolactine (PRL) (pro = en faveur de ; lactus = lait) est une hormone protéique semblable, du point de vue structural, à l'hormone de croissance. Son principal effet consiste en la stimulation et le maintien de la lactation. L'élévation transitoire du taux de PRL précédant la menstruation est une des causes du gonflement et de la sensibilité des seins que certaines femmes éprouvent ; cependant, le séjour de la PRL dans le sang est trop bref pour déclencher la lactation. En revanche, son taux sanguin s'élève énormément à la fin de la grossesse et provoque cette fois la lactation. Ce taux sanguin élevé est également à l'origine de la réduction de l'incidence de la conception durant la lactation. Le rôle de la PRL chez l'homme n'est pas totalement élucidé, bien qu'une hyperprolactinémie entraîne l'impuissance (Wagner *et al.*, 2009).

- L'hormone de croissance (GH), aussi appelée somatotrophine, est l'hormone protéique la plus abondante des hormones sécrétées par l'adénohypophyse. Bien que la GH provoque la croissance et la division de la plupart des cellules de l'organisme, ses principales cibles sont les os et les muscles squelettiques.

Elle contrôle également certains métabolismes dans de nombreux organes, dont le foie, l'intestin et le pancréas ; elle stimule la synthèse protéique, le catabolisme des graisses, et augmente le taux sanguin de glucose. Chez le mâle, la GH a des fonctions extragonadiques, comme l'accroissement et le maintien de la taille du pénis, la différenciation des canaux spermatiques chez l'adolescent, et la stimulation de la synthèse d'enzymes dans certaines glandes annexes. Enfin, cette hormone possède aussi des effets sur les fonctions gonadiques comme la spermiogénèse, la stimulation de la synthèse des androgènes et l'accroissement de la mobilité des spermatozoïdes (Marieb, E., 1993).

Enfin, une troisième structure a été identifiée entre le lobe postérieur et antérieur de l'hypophyse : l'hypophyse intermédiaire. Celle-ci sécrète la mélanostimuline (MSH) qui dérive de l'ACTH par clivage enzymatique. La MSH agit notamment sur les mélanocytes de la peau, en induisant la synthèse de mélanine en réponse aux rayons UVA (Don, J. et G. Stelzer, 2002).

### **2.2.2. La glande thyroïde**

La thyroïde ou glande thyroïde est la plus volumineuse des glandes purement endocrines chez l'être humain. En forme de papillon, elle est située dans la partie antérieure du cou ; elle repose sur la trachée, juste en-dessous du larynx. Cette glande sécrète la triiodothyronine (T3), la thyroxine (T4) et la calcitonine (Wagner *et al.*, 2009). Les hormones thyroïdiennes (T3 et T4), de structure similaire et contenant de l'iode, agissent sur les cellules de presque tous les tissus (hormis la rate, l'utérus et la glande thyroïde elle-même). La production de ces hormones est régie par la TSH, produite par l'hypophyse. La thyroïde ne produit de la T3 directement qu'en très faible quantité. La plus grande production de la T3 est obtenue par la conversion de la T4 au niveau du foie, et les intestins pour le reste (Maran, R.R., 2003). En règle générale, ces hormones stimulent les enzymes effectuant l'oxydation du glucose. En conséquence, elles accélèrent le métabolisme basal et augmentent la consommation d'oxygène ainsi que la production de chaleur. Par ailleurs, les hormones thyroïdiennes influent sur la croissance et le développement des tissus. Elles sont essentielles au développement du système squelettique et du système nerveux, ainsi qu'aux fonctions de reproduction (O'Shea, P.J. et G.R. Williams, 2002). Enfin, il semblerait qu'elles soient impliquées dans la régulation de la spermatogénèse, le développement testiculaire (Wagner *et al.*, 2009) et la stéroïdogénèse (Maran, R.R., 2003).

La calcitonine, aussi appelée thyrocalcitonine, est une hormone polypeptidique dont l'effet principal est d'abaisser le taux sanguin de calcium en inhibant la résorption osseuse (Inzerillo *et al.*, 2002).

La calcitonine est un antagoniste direct de la parathormone élaborée par les glandes parathyroïdes (de Paula, F.J. et C.J. Rosen,2010).

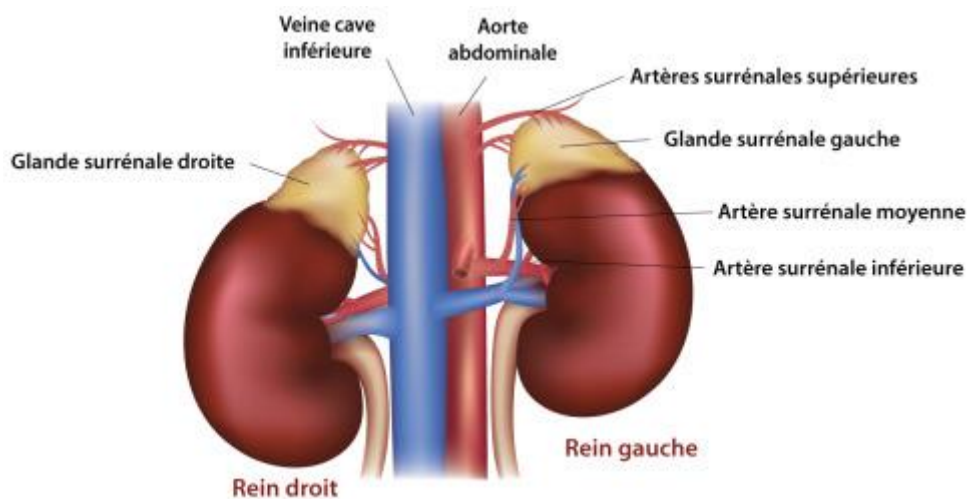
### 2.2.3. Les glandes parathyroïdes

Les glandes parathyroïdes sont de petites glandes rattachées à la face postérieure de la glande thyroïde, généralement au nombre de quatre. Elles sécrètent la parathormone (PTH), ou hormone parathyroïdienne, qui favorise le maintien de l'équilibre calcique dans le sang.

La PTH a pour principal effet d'élever le taux de calcium en stimulant trois organes cibles : le squelette, les reins et les intestins (Talmage, R.V. et H.T. Mobley,2008). La sécrétion de cette hormone est indépendante de l'hypophyse. En effet, la diminution du taux sanguin de calcium provoque sa libération, et l'hypercalcémie l'inhibe.

### 2.2.4. Les glandes surrénales

Les deux glandes surrénales coiffant chacune respectivement un rein (Figure 5), ont une forme pyramidale aplatie. Durant le développement embryonnaire, les glandes surrénales se différencient en deux régions distinctes sur les plans structural et fonctionnel : un grand cortex surrénal situé en périphérie qui constitue 80 à 90% de la masse de la glande, et une petite médullosurrénale localisée au centre (Figure 5). (Rosol, T.J., et al.,2001).



**Figure 5.** Les glandes surrénales (Turquetil et Reznik, 2019).

Le cortex surrénal est divisé en trois couches, ou zones, qui sécrètent des hormones distinctes. La couche externe, située immédiatement sous la capsule de tissu conjonctif, est appelée zone glomérulée. Ses cellules sécrètent des hormones nommées minéralocorticoïdes parce qu'elles influent sur l'homéostasie de sels minéraux, tels que le sodium ou le potassium. La couche intermédiaire, appelée zone fasciculée, est la plus large des trois couches. Ses cellules sécrètent principalement des glucocorticoïdes, ainsi nommés parce qu'ils influent sur l'homéostasie du glucose. Enfin, les cellules de la couche interne, appelée zone réticulée, synthétisent de petites quantités d'androgènes. (Kemppainen, R.J. et E.N. Behrend, 1997).

-Minéralocorticoïdes : ils constituent un groupe d'hormones dont l'aldostérone est la plus importante (95%). Le maintien de l'équilibre des ions sodium est le but premier de cette hormone. L'aldostérone a pour cible principale la partie distale des tubules rénaux, où elle stimule la réabsorption des ions sodium de l'urine (s'accompagnant de rétention d'eau). Leur retour dans la circulation sanguine entraîne l'élimination des ions potassium, et dans une certaine mesure, la régulation de l'équilibre acido-basique du sang. La libération d'aldostérone a peu de rapport avec l'hypothalamus ou l'hypophyse : elle dépend de la concentration des ions dans le sang, de l'osmolarité sanguine et de la pression artérielle. (Connell, J.M. et E. Davies, 2005).

-Glucocorticoïdes : ils influent sur le métabolisme de la plupart des cellules et contribuent à leur résistance face au stress. Les glucocorticoïdes permettent à l'organisme de s'adapter aux changements de l'environnement et à l'intermittence de l'apport alimentaire en stabilisant la glycémie. De plus, ils maintiennent l'équilibre du volume sanguin en empêchant l'eau de pénétrer dans les cellules. Les glucocorticoïdes sont le cortisol, la cortisone et la corticostérone ; parmi ces hormones, seul le cortisol est sécrété en quantité notable chez l'être humain. Ce dernier possède une action hyperglycémiant, favorise la formation de glucose par le foie et la rétention de sodium, inhibe la lipolyse, et intervient dans la production d'anticorps. La régulation de la sécrétion des glucocorticoïdes répond à une rétro-inhibition typique par l'ACTH, basée sur l'apport alimentaire et le degré d'activité. (Buckingham, J.C., 2006).

-Gonadocorticoïdes : dans ce groupe, les androgènes et particulièrement l'androstènedione, sont les plus abondants. La quantité des hormones stéroïdes fabriquée par le cortex surrénal, dont la testostérone, est négligeable comparativement à celle qu'élaborent les gonades (Rosol, T.J., *et al.*, 2001). Le rôle précis de ces gonadocorticoïdes demeure obscur. La médullosurrénale élabore deux catécholamines dont la sécrétion est induite par le système nerveux sympathique, impliqué dans les mécanismes de réponse au stress.

L'adrénaline et la noradrénaline induisent des effets identiques comprenant une augmentation de la fréquence cardiaque, une vasoconstriction, une augmentation de la pression artérielle, une dérivation du sang vers les organes vitaux, une augmentation de la glycémie, une stimulation de la respiration et une bronchodilatation. (Kvetnansky *et al.*, 2009).

### **2.2.5. Le pancréas**

Le pancréas, sous forme d'une masse chez l'Homme, est situé à l'arrière de l'estomac. Le pancréas du rat se présente, quant à lui, de façon diffuse dans l'abdomen. Le pancréas est à la fois une glande endocrine et une glande exocrine. Le corps de cet organe est constitué d'un tissu exocrine qui libère les sucs gastriques dans le duodénum. Répartis au sein du pancréas, les îlots de Langerhans contiennent deux grandes populations de cellules aptes à fabriquer des hormones : les cellules  $\alpha$  qui synthétisent le glucagon, et les cellules  $\beta$  plus nombreuses, qui élaborent l'insuline. L'insuline et le glucagon interviennent différemment, mais de manière toute aussi essentielle dans diverses phases du métabolisme et de la régulation de la glycémie (Engelking, 1997). Leurs effets sont opposés : l'insuline est une hormone hypoglycémisante qui agit sur les métabolismes glucidique, protidique et lipidique, augmentant le niveau d'utilisation du glucose et diminuant son taux sanguin (Andrali, S.S., *et al.*, 2008) ; tandis que le glucagon est une hormone hyperglycémisante qui provoque la libération du glucose du foie (Quesada, I., *et al.*, 2008). Les îlots pancréatiques synthétisent également de petites quantités d'autres peptides, dont la somatostatine et l'amyline (Engelking, 1997).

La somatostatine exerce un contrôle inhibiteur sur la sécrétion de nombreuses hormones : pancréatiques, intestinales et hypophysaires. Le rôle exact de l'amyline est encore sujet à caution.

### **2.2.6. Les ovaires**

Les ovaires sont des glandes génitales paires logées dans la cavité pelvienne de la femme. L'ovaire produit cycliquement des hormones œstrogéniques et progestatives sous l'influence de la FSH et de la LH sécrétées par l'hypophyse, qui assurent la régulation du système reproducteur (Richards, J.S. et S.A. Pangas, 2010). En particulier, la LH est responsable du déclenchement de l'ovulation. Les œstrogènes produits par les follicules ovariens, stimulent la prolifération de l'endomètre et sont responsables du développement et du maintien des caractères sexuels secondaires, notamment au niveau de la glande mammaire. Les hormones progestatives sont produites par le corps jaune ovarien. Elles stimulent l'activité sécrétoire de l'endomètre. Elles ont aussi une action sur le développement de la glande mammaire. Les ovaires produisent également l'inhibine, une hormone protéique qui s'oppose à la sécrétion de la FSH (Richards, J.S. et S.A. Pangas, 2010).

Enfin, au cours des semaines précédant l'accouchement, les ovaires et le placenta synthétisent une hormone peptidique appelée relaxine. Celle-ci provoque l'assouplissement et la relaxation de l'utérus, des ligaments pelviens et de la symphyse pubienne, ce qui facilitera l'expulsion du nouveau-né.

### **2.2.7. Les testicules**

Les testicules sont constitués de deux compartiments : un compartiment tubulaire composé de tubes séminifères contenant les cellules de Sertoli et les cellules germinales assurant la fonction exocrine (spermatogenèse), et un compartiment interstitiel comportant plusieurs types cellulaires dont les cellules de Leydig qui assurent la fonction endocrine du testicule (stéroïdogenèse) en produisant les androgènes (Wagner *et al.*, 2009). La plus importante de ces hormones est la testostérone, qui régit la production des spermatozoïdes, stimule le développement des caractères sexuels secondaires, influence la croissance des glandes annexes (prostate, vésicules séminales, ...), et favorise l'activité sécrétoire de ces structures.

## **3. Les perturbateurs endocriniens**

### **3.1. Historique et définition**

Depuis la fin du XX<sup>ème</sup> siècle, la problématique des composés chimiques actifs sur le système hormonal suscite de fortes préoccupations au sein de la communauté scientifique en raison des effets délétères de ces composés sur la santé des organismes. La prise de conscience de l'impact de ces composés chimiques dits « perturbateurs endocriniens » a conduit à un développement accru des recherches dans ce domaine (Hotchkiss *et al.*, 2008). Les progrès de l'industrialisation qui ont certes contribué à l'amélioration de nos conditions et modes de vie, nous exposent cependant à plus de 100 000 nouvelles molécules exogènes dont l'innocuité pour certaines est de plus en plus mise en cause (Hotchkiss *et al.*, 2008). Certains contaminants environnementaux interagissent avec les hormones et peuvent exercer des conséquences néfastes en raison de leurs actions en tant que perturbateurs endocriniens (PE). En population générale, l'eau et l'alimentation (migration de substances depuis l'emballage, contamination des sols, des cultures, résidus hormonaux dans la viande) mais également l'air et les cosmétiques, sont les principales sources d'exposition aux PE (Yang *et al.*, 2011).

En milieu professionnel, les expositions sont le plus souvent multiples, mais à des doses plus importantes que dans la population générale (Frye *et al.*, 2012). Plusieurs secteurs professionnels sont concernés, tant au niveau de la production que de l'utilisation : agriculture (manipulation de pesticides), industries pharmaceutiques (production d'hormones) et chimique (fabrication des pesticides, matières plastiques) (Zhou *et al.*, 2010; Kortenkamp, 2007).

Bien qu'il n'existe pas de définitions universellement acceptées du terme PE, certaines sont largement admises. L'une des premières à avoir été établie est la suivante : (Kavlock *et al.*, 1996): «Un perturbateur endocrinien est une substance exogène qui entraîne des effets néfastes sur la santé dans un organisme intact, ou sa descendance, suite à des changements dans la fonction endocrine». En 2002, l'Organisation Mondiale de la Santé (WHO, 2002) a précisé les modes d'action au regard de la littérature, avec la définition suivante : «Un agent exogène qui interfère avec la synthèse, la sécrétion, le transport, la fixation, l'action, ou l'élimination des hormones naturelles du corps humain responsables de l'entretien ou de l'homéostasie, de la reproduction, du développement et/ou du comportement ».

Les PE ne sont donc pas définis par un mécanisme d'action spécifique et ils ne s'apparentent pas à une classe chimique particulière. Ces substances n'ont de commun que leurs propriétés à induire des modifications de l'homéostasie endocrinienne susceptible de produire des conséquences délétères pour les organismes (Vosges, 2010).

### **3.1.1. Mode d'action des perturbateurs endocriniens**

Les mécanismes d'action des hormones sont multiples et il existe de nombreuses réactions avec lesquelles les agents chimiques peuvent interférer. La perturbation du système endocrinien peut prendre plusieurs formes (Figure 5) :

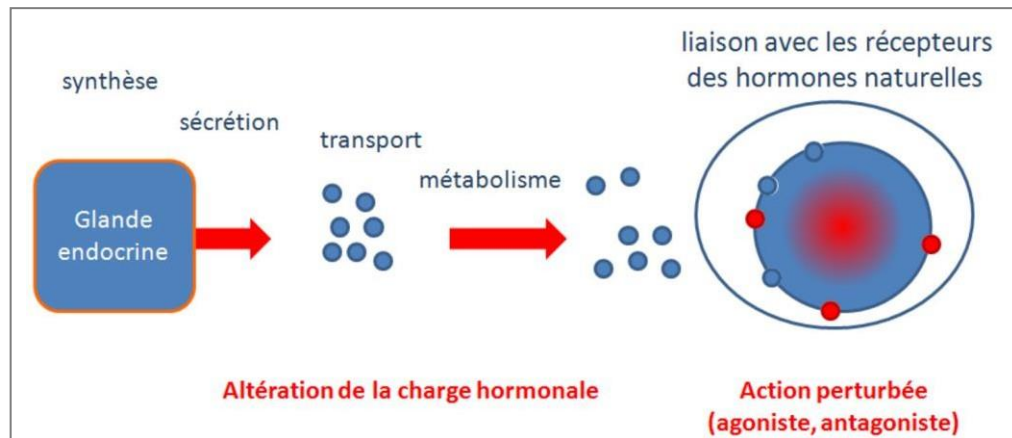
Imiter l'action des hormones endogènes (effet agoniste) : la substance de structure similaire peut interagir directement avec le récepteur de l'hormone et l'activer, mimant l'action d'une hormone endogène et induisant des effets similaires, notamment par l'activation ou l'inhibition de transcription des gènes (Waring et Harris, 2005).

Inhiber des interactions entre les hormones et leurs récepteurs (effet antagoniste) : la substance vient se fixer sur le récepteur sans l'activer, empêchant la liaison de l'hormone endogène à son récepteur. Elle bloque ainsi le récepteur et son fonctionnement. Ceci affecte les fonctions cellulaires normales liées à l'hormone (Waring et Harris, 2005).

Par action sur la synthèse, le transport, le métabolisme et l'excrétion des hormones, en modifiant leurs concentrations (Waring et Harris, 2005). La substance peut avoir une action sur le métabolisme intracellulaire des glandes sécrétrices en perturbant les cascades de biosynthèse des hormones elles-mêmes. Ces composés affectent potentiellement des enzymes spécifiques du métabolisme en stimulant ou inhibant leur activité (Tabb et Blumberg, 2006).

En altérant le développement des récepteurs hormonaux et leurs fonctions : La substance peut activer ou supprimer le développement d'un récepteur cellulaire, et donc altérer les activités hormonales (Zama et Uzumcu, 2009).

En altérant les fonctions par des interactions avec les hormones: La substance peut interagir avec une hormone et modifier le message issu de celle-ci et ainsi altérer les fonctions cellulaires (Tabb et Blumberg, 2006).



**Figure 6.** Mécanisme d’action des perturbateurs endocriniens (Chevrier *et al.*, 2011).

### 3.1.2. Classification des perturbateurs endocriniens

Les PE englobent un grand nombre de molécules chimiques de deux origines distinctes : naturelle ou anthropique, incluant notamment des constituants de plantes, des pesticides, des composés utilisés dans l’industrie des plastiques et des produits de consommation, des sous- produits industriels et des polluants (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

#### 3.1.2.1. Les hormones naturelles

Elles comprennent l’insuline, les œstrogènes, la progestérone et la testostérone, naturellement présents dans l’organisme des hommes et des animaux de même que les phyto-œstrogènes présents dans certaines plantes, comme les germes de luzerne et le soja, et qui ont une activité semblable à celles des œstrogènes une fois ingérés par l’organisme. L’organisme humain est capable de métaboliser et d’excréter rapidement ces substances. Elles restent très peu de temps dans l’organisme et ne s’accumulent pas dans les tissus comme c’est le cas de certaines substances anthropiques. Néanmoins, la question des risques liés à une très forte consommation de soja (notamment par les nouveau-nés) se pose (Barbier, 2011).

#### 3.1.2.2. Les hormones de synthèse

Les hormones de synthèse ont été créées par l’homme dans le but d’agir et de contrôler le système endocrinien soit pour l’inhiber et c’est le but des contraceptifs oraux, soit pour le pallier et c’est le rôle

des traitements hormonaux de substitution de la ménopause, de la fonction thyroïdienne ou des hormones de croissance dans le domaine vétérinaire (Gore et Crews, 2009 ; Barbier, 2011).

### **3.1.2.3. Les polluants chimiques anthropiques**

Ce sont des substances chimiques conçues pour être utilisées dans l'industrie pharmaceutique, cosmétique, agro-alimentaire, phytosanitaire, pétrolière, automobile, du plastique... à des fins propres en soi pour leurs propriétés physico-chimiques recherchées et dont la fonction endocrine n'est à proprement parler non suspectée à priori (Anway et Skinner, 2008).

## **CHAPITRE II : LES PESTICIDES**

### **1. Généralités sur les pesticides**

Les pesticides constituent un enjeu important pour la qualité de notre alimentation et de notre environnement. Leur utilisation dans les secteurs de la production agricole a pour but de prévenir ou de réduire les pertes causées par les ravageurs et peut donc améliorer le rendement ainsi que la qualité du produit (Oerke et *al.*, 2004 ; Cooper et Dobson, 2007) et la valeur nutritionnelle des aliments (Narayanasamy, 2006; Damalas, 2009). Malgré leur popularité et leur utilisation intensive, les pesticides présentent un risque de santé lié à l'exposition des agriculteurs à ces produits pendant leur mixtion, leur application dans les champs ou bien la présence de ces résidus sur les aliments et l'eau potable pour la population générale (Soares et Porto, 2009). La plupart de ces pesticides présentent un degré élevé de toxicité, car ils sont conçus pour tuer certains organismes et de ce fait créer ainsi un risque de dommage (Power, 2010). Dans ce contexte, l'utilisation des pesticides a soulevé de sérieuses préoccupations non seulement pour leurs effets potentiels sur la santé humaine, mais aussi sur la faune et l'écosystème (Asogwa et Dongo, 2009). Malgré de nombreuses études sur la toxicité et le devenir des pesticides, il y a encore des lacunes dans la recherche, ce qui provoque des incertitudes dans la prédiction de leurs effets à long terme sur la santé et l'environnement (Damals et Eleftherohorinos, 2011).

#### **1.1. Histoire des pesticides**

L'utilisation des pesticides en agriculture remonte à l'antiquité. L'usage du soufre paraît remonter à la Grèce antique (1000 ans avant J-C.). L'arsenic était recommandé par Pline, naturaliste romain, en tant qu'insecticide et les produits arsenicaux ou à base de plomb (Arséniate de plomb) sont connus en Chine dès le XVI<sup>e</sup> siècle ; c'est également vers cette époque que sont signalées les propriétés insecticides du tabac et des racines de Derris et de Lonchocarpus (Gatignol et Étienne, 2010).

La recherche et l'expérimentation de moyens aptes à lutter contre les maladies des céréales, de la pomme de terre et de la vigne ; ou à limiter le développement d'insectes ravageurs, ont été publiés dans des périodiques de l'agriculture du XVIII<sup>e</sup> siècle (Duval, 2009). L'utilisation plus généralisée des pesticides a suivi les progrès de la chimie minérale. Au XIX<sup>e</sup> siècle, les traitements fongicides sont à base de sulfate de cuivre (dont la célèbre bouillie bordelaise) ou à base de mercure ; les insecticides tels l'arsénite de cuivre, l'acéto arsénite de cuivre, l'arséniate de plomb font aussi leur apparition. Le pyrèthre, une poudre provenant de fleurs du genre *chrysanthemum* est introduit comme insecticide à cette même époque (Duval, 2009). Autour de 1920, les insecticides arsenicaux ont vu une utilisation

intense et on s'aperçut alors que les fruits et légumes traités recélaient des poisons à des doses qui pouvaient être mortelles pour les consommateurs. Ces données ont poussé les scientifiques à chercher d'autres produits moins dangereux (Duval, 2009). L'ère des pesticides de synthèse débute vraiment dans les années 1930 avec le pouvoir insecticide des thiocyanates d'alkyle et d'autres produits comme l'anilide salicylique en 1931 et les dithiocarbamates en 1934 (Duval, 2009). En 1874, Zeidler synthétise le DDT dont Muller en 1939 établit les propriétés insecticides. Le DDT est commercialisé dès 1943 et ouvre la voie à la famille des organochlorés. Ce produit domine alors le marché des insecticides jusqu'au début des années 1970. La seconde guerre mondiale a généré, à travers les recherches engagées pour la mise au point de gaz de combat, la famille des organophosphorés qui, depuis 1945, a connu un développement considérable, notamment pour certains produits comme le malathion. Aux États-Unis, durant la période 1950-1955, les herbicides de la famille des urées substituées (linuron, diuron) sont développés, suivis peu après par les herbicides du groupe ammonium quaternaire et triazines. Les fongicides du type benzimidazoles et pyrimides datent de 1966, suivis par les fongicides imidazoliques et triazoliques dits fongicides IBS qui représentent actuellement le plus gros marché des fongicides. Dans les années 1970-80, une nouvelle classe d'insecticides, les pyréthrinoïdes apparaît, dominant le marché des insecticides (Duval, 2009).

À partir des années 90, le grand nombre de produits commercialisés et les exigences réglementaires (homologation, normalisation, etc.) rendent la compétition entre les industries phytosanitaires de plus en plus sévères. Les industriels préfèrent axer leurs efforts sur la vente d'un seul produit optimisé pour un usage bien ciblé plutôt que de se lancer dans la fabrication simultanée d'autres produits. Pour cette raison, les recherches sont actuellement de plus en plus orientées vers le perfectionnement des méthodes d'analyse de résidus pour la surveillance et le contrôle de la qualité des eaux et des aliments, à la protection et à la réhabilitation de l'environnement et des ressources naturelles (Gatignol et Étienne, 2010).

## **1.2. Définition d'un pesticide**

Le mot « pesticide » provient de l'association du mot latin « pestis » qui signifie animal, insecte, plante ou nuisible (virus, bactérie, champignon..etc) susceptible d'être nuisible à l'homme et à son environnement et du suffixe « cide » (du verbe latin caedo, caedere) qui signifie tuer (Couteux et Salaün, 2009). Le vocable pesticide regroupe à la fois les produits phytopharmaceutiques destinés à un usage agricole et les biocides anciennement dénommés pesticides à usage non agricole (Even *et al.*, 2002) qui désignent également une substance active ou une préparation commerciale constituée d'une ou plusieurs substances actives (Vigourou-Villard, 2006).

La substance active (anciennement appelée matière active) est la substance ou le microorganisme qui détruit ou empêche l'agent nuisible pour la culture de s'installer ou de se développer (Camard, 2010).

### **1.3. Classification des pesticides**

Les pesticides disponibles aujourd'hui sur le marché sont caractérisés par une telle variété de structure chimique, de groupes fonctionnels et d'activité que leur classification est complexe (tableau 01).

La classification des pesticides est principalement basée sur :

- La nature de leurs cibles (nature de l'espèce à combattre) : ainsi en distinguent les insecticides, les herbicides, et les fongicides, etc.
- Leurs natures chimiques : organochlorés, organophosphorés, etc.
- Leurs utilisations : agriculture, santé publique, domestique (Jayaraj *et al.*,2016).

#### **1.3.1. Selon leurs cibles**

##### **1.3.1.1. Les insecticides**

Un insecticide est une substance active ou une préparation toxique utilisée pour lutter contre les parasites qui infectent les plantes cultivées ou pour éliminer les insectes vecteurs de maladies (Lushchak *et al.*,2018).

##### **1.3.1.2. Les fongicides**

Ils permettent de combattre la prolifération des maladies des plantes provoquées par des champignons parasites (mildiou, oïdium, ...) et ils servent à protéger les tubercules, les fruits et les légumes pendant le stockage et la croissance des plantes (Lushchak *et al.*,2018).

##### **1.3.1.3. Les herbicides**

Ils représentent les pesticides les plus utilisés dans le monde toutes cultures confondues. Ils sont destinés à éliminer les végétaux entrant en concurrence avec les plantes à protéger en ralentissant leur croissance. Les herbicides sont connus comme régulateurs de croissance, inhibiteurs de la photosynthèse, les inhibiteurs de la biosynthèse des acides aminés et des lipides, les perturbateurs de la membrane cellulaire et les inhibiteurs de la biosynthèse des pigments (Lushchak *et al.*,2018).

Les herbicides les plus connus sont l'acide sulfurique, utilisé pour désherber les céréales dès 1911, et les phytohormones (2,4-D) ainsi que des dérivés de l'acide 2-phénoxy-éthanoïque (comme le MCPP) et les sulfonilurées.

Le classement par cible distingue également les molluscicides contre les escargots et les limaces, les rodenticides contre les rongeurs, les acaricides contre les acariens, etc....

### **1.3.2. Selon leur nature chimique**

Il s'agit d'un classement technique qui tient compte la nature chimique de la substance active. Ainsi ; en fonction de leur structure chimique, les pesticides les plus répandus peuvent être répartis dans les groupes suivants :

#### **1.3.2.1. Les organochlorés**

Les pesticides organochlorés sont des pesticides synthétiques appartiennent au groupe des dérivés des hydrocarbures chlorés. Les caractéristiques de base des pesticides organochlorés sont une persistance élevée, une faible polarité, une faible solubilité dans l'eau et une liposolubilité, Très résistants à la dégradation biologique, ces composés sont connus par leur toxicité, leur persistance dans l'environnement et leur bioaccumulation élevée (Jayaraj *et al.*, 2016).

#### **1.3.2.2. Les organophosphorés**

Il s'agit des composés organiques qui contiennent un ou plusieurs atomes de phosphore dans leur molécule. Les organophosphorés (OP) sont des esters de l'acide phosphorique, leur dégradation et plus rapide dans les systèmes biologiques (Tadeo *et al.*, 2008), Ils agissent par inhibition de l'acétylcholinestérase de façon irréversible au niveau des terminaisons nerveuses (Lushchak *et al.*, 2018). Parmi les herbicides organophosphorés le glyphosate et le glufosinate sont les plus commercialisés.

#### **1.3.2.3. Les carbamates**

Ce sont des produits constitués d'esters de l'acide carbamique ( $R_1 - O - CO - NR_2R_3$ ). Leur mécanisme d'action est l'inactivation réversible de l'enzyme acétylcholinestérase. Les carbamates se décomposent dans l'environnement en quelques semaines ou quelques mois, exemples : Chlorpropham, Desmedipham, Molinate, Phenmedipham, Propham (Bouseba, 2011).

#### **1.3.2.4. Les phénoxyacides**

C'est un groupe de composés portant un radical phénoxy lié à un acide alcanoïque à faible nombre de carbone, tel que l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique ou le mécoprop (acide propionique). Certains herbicides de ce groupe sont formés par des stéréo-isomères, qui sont commercialisés sous forme d'énantiomères simples ou de mélanges racémiques (Tadeo *et al.*, 2008).

#### **1.3.2.5. Autres**

Il y a d'autres pesticides qui sont utilisés dans les pratiques agricoles comme le fer, le plomb, le soufre, l'arsenic, le mercure, le zinc, ils ont été utilisés sous forme de métal inorganique ou organique. Le chlorure de méthyle mercurique, l'arséniate de sodium, l'arséniate de calcium, le phosphore de zinc sont des composés qui entrent dans cette catégorie (Jayaraj *et al.*, 2016).

### 1.3.3. Selon leurs utilisations

Selon le domaine de leur utilisation on distingue deux grandes catégories de pesticides

- Les pesticides à usage agricole (produits phytopharmaceutiques) destinés à la protection des végétaux contre les maladies et contre les organismes nuisibles aux cultures.
- Les biocides destinés à la protection des éléments de construction, hygiène publique, ou des animaux domestiques (Bencheikh, 2010).

**Tableau 1.** Croisements entre la classification chimique et la classification biologiques des pesticides (Calvet, 2005).

Groupe	Classe chimique	Exemples de molécules
<b>Antiparasitaires (insecticides et anticoccidiens)</b>	Insecticides minéraux	Arséniate de plomb, fluorure d'aluminium, composés soufrés, mercuriques, séléniés
	Organochlorés	DDT HCH dont le lindane
	Organophosphorés	Dichlorvos, chlorfenvinphos, phorate
	Carbamates	Aldicarbe, carbofuran, carbaryl, benfuracarbe,
	Pyréthroïdes	Perméthrine, cyperméthrine, deltaméthrine
	Macrolides endectocides	Ivermectine, doramectine, abamectine, moxidectine, sélénamectine, éprinomectine
<b>Herbicides</b>	Herbicides minéraux	Sulfates, nitrates, chlorures, chlorates, cyanamide
	Phytohormones	Pichloranne, trichlopyr, fluroxypyr, glyphosate,
	Carbamates	Asulame, diallate, sulfallate
	Dérivés de l'urée	Monuron, diuron, linuron
	Divers	Triazines, dinitrophénols, aminotriazole,
<b>Fongicides</b>	Dithiocarbamates	Mancozèbe, manèbe, zinèbe, propinèbe
	Carbamates benzimidazolés	Bénomyl, carbendazime
	Dérivés de l'imidazole	Kétoconazole, niconazole, imazalil, prochloraz

#### 1.4. Devenir des pesticides dans l'environnement

En plus de leurs effets toxiques sur la santé humaine, Les pesticides ont également des effets néfastes sur l'environnement (Burger *et al.*, 2008 ; Mariyono, 2008).

Leur utilisation inappropriée est source de contamination de l'eau et de l'air ainsi que de dommages aux cultures (par suite de pénétration des résidus d'herbicides dans le sol) (Eleftherohorinos, 2008). Environ 90% des pesticides utilisés en agriculture n'atteignent pas les organismes cibles. De même que de nombreux pesticides utilisés en agriculture s'introduisent dans l'environnement par l'accumulation de leurs résidus et métabolites dans le sol, les surfaces d'eaux et l'air (Gamón *et al.*, 2003; Shalaby et Abdou, 2010). Leurs effets néfastes sur l'environnement résultent des interactions entre les propriétés physico-chimiques (pression de vapeur, la stabilité, la solubilité, pKa) du pesticide, l'adsorption et la persistance au sol, les facteurs de sol (pH, les composants organiques, l'humidité du sol, la microflore du sol) et la variation climatique. (Eleftherohorinos, 2008). Les facteurs de sol et les conditions climatiques sont reconnus depuis longtemps comme des facteurs importants qui influent sur le devenir du pesticide dans l'environnement (Matthews, 2006).

Trois grands processus de dispersion des pesticides dans l'environnement (Figure 7) sont communément admis : la volatilisation, le ruissellement et le lessivage des sols ou infiltration.

Les pesticides peuvent rejoindre le compartiment atmosphérique soit directement lors de l'épandage (application par pulvérisation qui facilite la volatilisation), soit après application sous forme adsorbée (adsorption des pesticides sur les particules puis érosion éolienne du sol) ou bien sous forme dissoute (vaporisation directe ou via l'évaporation de l'eau depuis le sol vers l'atmosphère) (Fauvelle, 2012). Une fois arrivés dans l'atmosphère, les polluants peuvent être entraînés par les précipitations (Rouvalis *et al.*, 2009) et redéposés au sol ou dans les eaux de surface.

La dispersion des contaminants peut également se faire par infiltration à travers le sol. Les composés se dissolvent alors dans l'eau issue des précipitations puis percolent et/ou se diffusent verticalement dans le sol.

Le processus global de dégradation des pesticides peut être attribué à des mécanismes biologiques ou bien abiotiques. Ces derniers regroupent principalement l'hydrolyse, les réactions d'oxydoréduction et la photodégradation (Bending *et al.*, 2006). Les processus biologiques interviennent principalement dans la couche arable du sol où résident une grande diversité et une grande abondance de microorganismes (Al Housari *et al.*, 2011).

La persistance des contaminants dans l'environnement est donc corrélée à la sensibilité des substances à ces processus de dégradation.

Il est à noter que les produits de dégradation ou métabolites font toutefois l'objet d'un intérêt croissant tant on les retrouve à la fois dans les eaux souterraines et dans les eaux de surface à des concentrations excédant parfois celles des molécules mères (Postle *et al.*, 2004; Hladik *et al.*, 2005).



**Figure 7.** Devenir des pesticides dans l'environnement (Lissalde, 2010).

## 1.5. Modes d'exposition de l'homme aux pesticides

Les crises sanitaires récentes obligent à mieux comprendre et articuler les liens entre agriculture, environnement et santé publique. Le risque des pesticides pour l'homme se situe à l'interface de ces trois domaines. Il s'agit d'un risque global intégratif, qui naît du cumul des expositions auxquelles est soumis un être vivant. La figure 8 résume les modes d'exposition possibles de l'environnement et de l'homme aux pesticides (CPP, 2002).

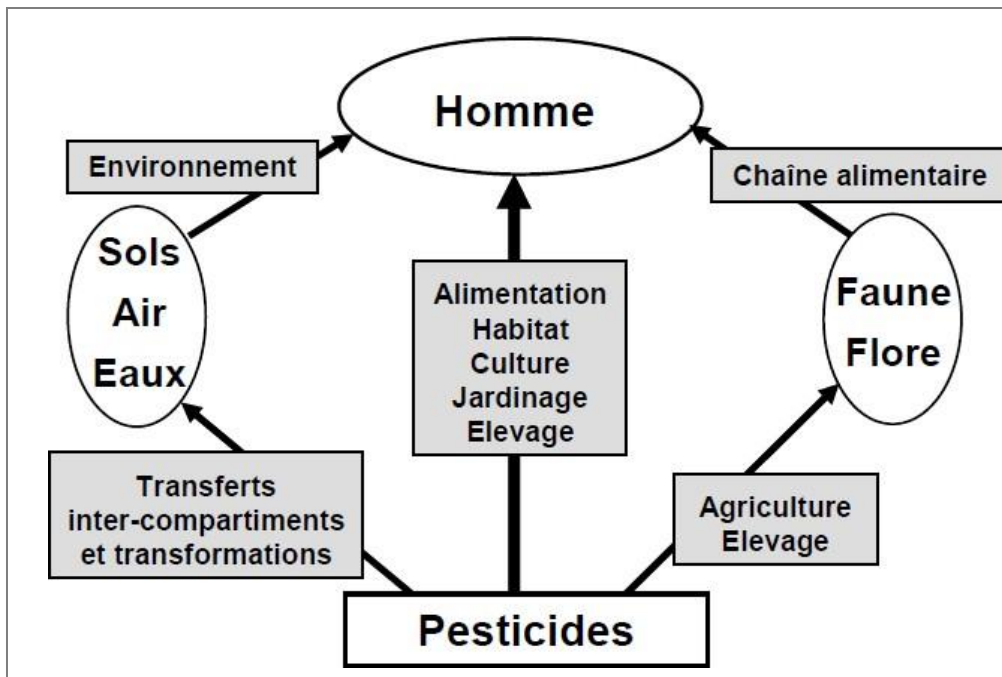
### 1.5.1. Exposition professionnelle

L'exposition professionnelle concerne les personnes manipulant les produits, au moment de la préparation, de l'application et du nettoyage des appareils de traitement.

Les agriculteurs constituent une population particulièrement exposée qui forme un groupe sentinelle pour l'observation d'éventuels effets des pesticides (Zeljezic *et al.*, 2006). L'absorption des pesticides par la peau est révélée comme la voie d'exposition la plus significative en milieu agricole (Jakubowski et Trzcinka-Ochocka, 2005). Par ailleurs, bien que les équipements de protection individuelle (gants, masques, combinaisons) constituent les principales mesures de prévention mises en œuvre afin de réduire l'exposition des professionnels, une étude menée en France (Baldi *et al.*, 2006), a mis en évidence une insuffisance de l'efficacité de ces équipements.

### **1.5.2. Exposition non professionnelle**

L'ensemble de la population peut être exposé aux pesticides lors des usages domestiques ou d'entretien des jardins mais surtout à des résidus de ces pesticides au travers de son environnement (eau, air, particules en suspension, poussières) et de son alimentation (Baril *et al.*, 2005). Les évaluations de risque attribuent 90% de l'exposition à l'alimentation contre 10% à l'eau. Les enfants semblent être plus vulnérables aux pesticides que les adultes (Van Zelm *et al.*, 2009). Leur comportement et leur système en développement font en sorte qu'ils sont plus exposés et plus sensibles aux effets potentiels des pesticides (Chen *et al.*, 2003). L'exposition de l'enfant aux pesticides peut avoir lieu très tôt, in utero via le placenta suite à l'exposition de la mère (Saunders *et al.*, 2004), mais également après la naissance, soit directement par exposition aux contaminations domestiques (pesticides utilisés dans la maison ou le jardin ou habitat dans une zone agricole) ou via le lait maternel et l'alimentation (Jurewicz *et al.*, 2006), soit indirectement pour les enfants de parents professionnellement exposés (agriculteurs). Il est à noter que l'alimentation a été montrée comme une source d'exposition majeure des enfants aux pesticides organophosphorés (Lu *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2008). En effet, selon une étude réalisée en Allemagne, les concentrations de composés organochlorés sont très significativement supérieures dans les sérums de nouveau-nés allaités par rapport à ceux recevant du lait commercial (Lackmann *et al.*, 2004).



**Figure 8.** Modes d'exposition de l'homme aux pesticides (CPP, 2002).

## 1.6. Impact des pesticides sur l'environnement et la santé

### 1.6.1. Impact sur les écosystèmes

De nombreux pesticides sont toxiques pour les insectes bénéfiques, les oiseaux, les mammifères, les amphibiens ou les poissons. L'empoisonnement de la faune sauvage résulte de la toxicité d'un pesticide et de ses autres propriétés (Picó *et al.*, 2004). Les pesticides utilisés en agriculture peuvent réduire l'abondance des mauvaises herbes et insectes qui sont une source importante de nourriture pour de nombreuses espèces animales. Les herbicides peuvent aussi changer les habitats en altérant la structure de la végétation, et finalement conduire au déclin de la population (Boatman *et al.*, 2007). Les insecticides organophosphorés, comprenant le disulfoton, le fenthion et le parathion, sont hautement toxiques pour les oiseaux ; ils ont fréquemment empoisonné les rapaces en recherche de nourriture dans les champs (Nicolai *et al.*, 2009). Les oiseaux en quête de nourriture sont le plus souvent exposés directement via l'ingurgitation des semences traitées avec un fongicide toxique (Prosser et Hart, 2005). Il est aujourd'hui démontré que les pesticides et autres produits chimiques sont la cause directe du déclin des populations de mammifères sauvages (Sarigiannis et Hansen, 2012). Ce sont principalement les chauves-souris et les rongeurs qui sont les plus affectés par l'emploi excessif de ces pesticides (Brakes et Smith, 2005).

De même que certains pesticides peuvent s'accumuler graduellement le long de la chaîne alimentaire et affectent particulièrement les espèces des rangs supérieurs et les super-prédateurs,

comme les mammifères ou les rapaces (Dormann *et al.*, 2008). Des études récentes ont démontré que les pratiques agricoles intensives sont considérées comme étant parmi les principales menaces environnementales pesant sur les abeilles mellifères et sauvages (Boncristiani *et al.*, 2012; Cresswell *et al.*, 2012; Henry *et al.*, 2012). Le déclin massif des populations d'abeilles, connu sous le nom de syndrome d'effondrement, reste pour l'heure inexpliqué (Dainat *et al.*, 2012). Une étude majeure sur les communautés d'amphibiens a mis en évidence que, entre autres facteurs, les champs agricoles à proximité des eaux de surfaces et les pesticides, nuiraient à la richesse des espèces d'amphibiens (Beasley *et al.*, 2002). Dans des tests sur le terrain, l'insecticide carbaryl est apparu comme affectant la composition d'une communauté aquatique d'amphibiens et d'insectes en modifiant la colonisation des bassins et le nombre d'œufs pondus (Vonesh et Kraus, 2009). Également, dans des études de terrain, il ressort que l'atrazine affecterait le système immunitaire des têtards de grenouilles léopards, une espèce en déclin (Blasco *et al.*, 2002). L'atrazine et les engrais phosphatés étaient les principaux facteurs en lien avec le nombre de larves trématodes présentes dans les grenouilles (Rohr *et al.*, 2008). Aussi, en tests de laboratoire, la survie des crapauds des grandes plaines et des crapauds à couteaux juvéniles du nouveau Mexique a été réduite après l'exposition à certaines préparations des herbicides glufosinate et glyphosate (Dinehart *et al.*, 2009). Également, il a été établi que les insecticides ont la capacité de causer de sérieux préjudices aux amphibiens, à des concentrations même inférieures aux conditions normales de leur utilisation (Sparling et Feller, 2009).

Les cas d'emploi des pesticides qui présentent un risque élevé pour les communautés d'espèces aquatiques résultent de la dérive au vent des pulvérisations d'insecticides et du ruissellement des herbicides depuis les champs (Verro *et al.*, 2009). Une évaluation a établi que les effets néfastes de l'endosulfan sur les poissons et les invertébrés sont préoccupants quand cet insecticide est utilisé à proximité des écosystèmes aquatiques (Carriger et Rand, 2008).

### **1.6.2. Impact sur l'homme**

Les pesticides ont amélioré la longévité et la qualité de vie, principalement dans le domaine de la santé publique. Les programmes de lutte antiparasitaire ont sauvé des millions de vies en combattant des maladies comme le malaria, la fièvre jaune et le typhus (Cluzeau *et al.*, 2000). De plus, l'utilisation de pesticides constitue un aspect important de l'agriculture moderne, comme ils sont absolument nécessaires pour le développement économique (Gouma, 2009). Cependant, il y a plus d'un demi-million de tonnes de pesticides périmés ou interdits dans plusieurs pays en voie de développement qui mettent en danger l'environnement et la santé de millions de personnes (Henry *et al.*, 2012).

En absence d'une stratégie claire de gestion, au fil des années, des quantités importantes de pesticides périmés ont été stockées dans les pays en voie de développement (Dasgupta *et al.*, 2010). De nombreux travaux ont signalé des problèmes de santé liés à l'exposition aux pesticides, en particulier les pesticides à toxicité élevée pour les mammifères ou ceux qui persistent dans l'environnement (Cooper et Dobson, 2007). Aussi, la probabilité de subir des effets néfastes sur la santé dépend du type de pesticide et des autres produits chimiques qu'il contient, de la quantité administrée, de la durée et de la fréquence de l'exposition (Jakubowski et Trzcinka-Ochocka, 2005). L'OMS et la FAO estiment que le nombre annuel d'intoxication par les pesticides varie entre 1 et 5 millions de personnes (Chubilleau *et al.*, 2011). De nombreuses études scientifiques indiquent que l'exposition chronique aux pesticides est susceptible d'augmenter l'indice de dérèglement du système endocrinien (Gatignol et Etienne, 2010). Certains pesticides peuvent également induire des effets tératogènes ou cancérogènes (Bassil *et al.*, 2007).

#### **1.6.2.1. Effet cancérigène**

Des études épidémiologiques ont montré que les agriculteurs exposés aux pesticides présentent un risque deux à trois fois plus élevée de développer des cancers et autres affections du système lymphohématopoïétique (Strom *et al.*, 2005). Le mélanome cutané, les sarcomes des tissus mous et le cancer du poumon sont aussi fréquents (Freeman *et al.*, 2005). Des études ont été menées auprès de personnes qui appliquent des pesticides en zone agricole et les résultats obtenus montrent que ces personnes pourraient s'exposer à un risque légèrement plus élevé que la moyenne de développer un lymphome non hodgkinien, une leucémie, un myélome multiple, un cancer de la prostate ou un cancer du cerveau (Lee *et al.*, 2008b). Selon une étude conduite dans le sud-ouest viticole français, les agriculteurs exposés à de forts niveaux de pesticides ont un plus grand risque de développer une tumeur cérébrale. Les chercheurs ont alors constaté que chez les agriculteurs exposés aux niveaux les plus élevés, le risque est plus que doublé, toutes tumeurs cérébrales confondues (Provost *et al.*, 2007). L'utilisation domestique des pesticides a également été associée à certains cancers de l'enfant comme par exemple des tumeurs cérébrales et des cancers hématopoïétiques tels que des leucémies (Ma *et al.*, 2002). D'autre part, il a été montré que le fait d'habiter dans une zone agricole pourrait augmenter l'incidence des leucémies de l'enfant (Reynolds *et al.*, 2002). D'autres relations positives, moins significatives statistiquement, mettent en cause les pesticides sur l'apparition des cancers de l'enfant comme par exemple des rétinoblastomes et des cancers des tissus mous (Flower *et al.*, 2004) ou des os (le sarcome d'Ewing) (Valery *et al.*, 2002), des cancers rénaux (Pearce et Parker, 2000), testiculaires (Rodvall *et al.*, 2003) et des cancers de cellules germinales (Chen *et al.*, 2005).

Également, certaines études identifient une association positive entre l'exposition aux pesticides et la leucémie, le cancer du cerveau, le cancer de la prostate, le cancer du foie, le cancer pancréatique (Beard, 2006). Une autre étude plus récente celle-là a montré que les petites filles ayant été exposées in utero au DDT dans les années 60 ont aujourd'hui, à 50 ans, plus de risque d'avoir un cancer du sein (Cohn *et al.*, 2015). L'association entre exposition aux pesticides et augmentation du risque de cancer du sein est statistiquement significative (Mukherjee, 2006). Certaines molécules agissent par inhibition de l'apoptose des lignées cellulaires sensibles aux œstrogènes ; d'autres induisent un stress oxydatif, et d'autres encore jouent le rôle de perturbateurs endocriniens, ces mécanismes favorisant le développement du cancer du sein (Fan *et al.*, 2007). D'autres cancers pourraient aussi découler de l'exposition aux différents insecticides, herbicides et fongicides : cancers du foie, du pancréas et de divers organes (Jaga, 2005; Van Maele-Fabry, 2006; Provost, 2007; Bassil, 2007). Les résultats d'une étude concernant les employés travaillant dans des usines de production de pesticides, a montré un excès de risque significatif de cancer de la prostate estimé à 28 % (Van Maele-Fabry *et al.*, 2006).

#### **1.6.2.2. Effet reprotoxique**

Plusieurs études se sont intéressées aux effets des pesticides sur la reproduction, en particulier sur la fertilité masculine. Les pesticides peuvent agir comme des perturbateurs endocriniens au niveau de la spermatogénèse via des altérations des hormones, les facteurs de croissance ou les neurotransmetteurs (Rogan, 2007; Hotchkiss, 2008; Medjdoub, 2013). D'autres études associent les perturbations endocriniennes et les actions anti-androgénique chez l'enfant à des pesticides spécifiques, tels que Manèbe ou Zinèbe, ou Vinchlozoline (Damstra, 2002; Landrigan *et al.*, 2003). Des études menées sur des animaux de laboratoire indiquent que certains pesticides pourraient être responsables d'effets sur la reproduction et sur le développement du fœtus. Certains effets liés à la reproduction dont l'avortement spontané, la prématurité, une diminution de la fertilité, une diminution de la production et de la mobilité des spermatozoïdes, sont parfois soupçonnés (Weselak, 2007 ; Wigle, 2008). Chez les femmes également, l'exposition aux pesticides est un facteur de risque d'infertilité important. Ainsi une étude publiée en 2003 a mis en évidence dans une population de femmes ayant des problèmes d'infertilité que le facteur de risque le plus important était la préparation et l'utilisation de pesticides et particulièrement de fongicides; le risque d'infertilité étant multiplié dans ce cas par 27 (Greenlee *et al.*, 2003). Le risque de malformations congénitales est élevé dans la descendance des professionnels maniant quotidiennement ces poisons ou lors d'exposition accidentelles massives. La génotoxicité des pesticides a été démontrée « in vitro ».

Ces substances étant capables d'endommager l'ADN (Rojas *et al.*, 2009). Une étude indique que des modifications géniques et épigénétiques, telles que des mutations entraînant une instabilité génétique ou une suppression de l'apoptose des cellules germinales, peuvent être transmises à partir du père dans le fluide séminal et justifie ainsi l'impact de l'exposition paternelle dans l'apparition des pathologies sur le développement in utero de l'enfant mais également de son système endocrinien et reproductif (Cordier, 2008).

Également, une étude réalisée par Santé Canada a montré que le risque de fausse couche et de prématurité était plus grand dans les familles dans lesquelles le père avait manipulé certains pesticides. Le risque de fausse couche était 1,9 fois supérieur si le père avait manipulé des thiocarbamates, du carbaryl et d'autres pesticides. Le risque d'accouchement prématuré était de 1,7 à 2,4 fois plus élevé si le père avait manipulé des pesticides comme l'atrazine, le glyphosate ou des pesticides organophosphorés (Perry, 2008).

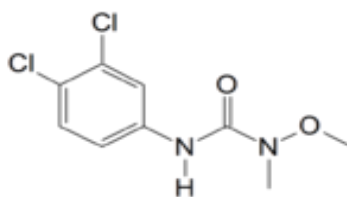
## CHAPITRE III. LE LINURON

### 1. Le Linuron (3-(3,4-chlorophényl)-1-méthoxy-1-méthylurée)

Le linuron (LIN) (3-(3,4-chlorophényl)-1-méthoxy-1-méthylurée) est un herbicide à base de phénylurée couramment utilisé pour lutter contre une variété de mauvaises herbes à feuilles larges et de graminées dans un large éventail de cultures, notamment le soja, le coton, le maïs, le blé, la canne à sucre, la pomme de terre et de nombreux autres fruits et légumes. Selon certains rapports, la mélatonine pourrait avoir la capacité d'inverser les déficits fonctionnels liés à une variété de maladies du système reproducteur masculin (Rocha *et al.*, 2015)

Le linuron est un herbicide faiblement toxique couramment appliqué pour éliminer les mauvaises herbes dans le soja, le coton, le maïs, le blé, la canne à sucre, la pomme de terre et de nombreux autres légumes. Les rapports de la littérature montrent que le linuron se dégrade rapidement après avoir pénétré dans le corps de l'animal, et l'ingestion de 125 mg/kg de linuron pendant deux ans ne produit pas de distorsion détectable, d'effets cancérigènes et/ou mutagènes, bien que des résidus mineurs puissent être trouvés dans le sang, la graisse, le foie, les reins et la rate (Lambright *et al.*, 2000 ; Santos *et al.*, 2014 ; Wilson *et al.*, 2009). Cependant, Andrews et Gray (1990) rapportent que les rats exposés par voie orale au linuron à 100 mg/kg/jour n'entraînent aucune modification des taux de testostérone et d'hormone lutéinisante (LH). Lorsque la dose est augmentée à 200 mg/kg/jour, dose à laquelle une neurotoxicité sévère peut être observée, l'exposition au linuron augmente le taux sérique de LH de 25 %. En outre, McIntyre *et al.* (2002a,b) montrent que par gavage oral de rats mères avec 50 mg/kg/jour pendant la grossesse, le linuron ne provoque pas de changements pathologiques significatifs dans les tissus testiculaires des rats mâles descendants au 7<sup>e</sup> jour postnatal (PND7) et au 14<sup>e</sup> jour postnatal, ni de changements dans les niveaux testiculaires ou sériques de testostérone.

Une étude récente de ce groupe a établi que l'exposition maternelle au linuron peut provoquer une toxicité reproductive significative chez les rats mâles descendants (Ding *et al.*, 2017). Après l'exposition maternelle pendant la grossesse, les rats mâles descendants présentent une distance anogénitale réduite, un manque de fusion dans les plis urogénitaux, les tubules séminifères endommagés et l'ultrastructure des cellules de Leydig blessée. L'étude menée par Bai *et al.* (2017) indique une diminution de la concentration sérique de testostérone au PND2. Ces observations nous ont incités à étudier les mécanismes qui sous-tendent les toxicités tissulaires et cellulaires induites par le linuron.



**Figure 9.** Structure chimique du linuron.

**Tableau 2.** Propriétés physico-chimiques et données de toxicité du linuron .

Formule brute	<b>C9H10Cl2N2O2</b>
Masse moléculaire (g mol <sup>-1</sup> )	<b>249,09</b>
Solubilité dans l'eau (mg L <sup>-1</sup> )	<b>75 à 25 °C</b>
pKa	<b>12</b>
Pression de vapeur (Pa) à 24°C	<b>0,002</b>
DL50 (mg kg <sup>-1</sup> ) ingestion rat peau rat	<b>1 146 &gt; 2 500</b>
CL50 (mg/m <sup>3</sup> /4 heures) inhalation rat	<b>48</b>
Demi-vie dans le sol (jours)	<b>60</b>
LogP (oct-eau)	<b>3,2</b>

## 2. Les formes du Linuron disponibles en Algérie

Les formes du Linuron les plus utilisées et qui sont disponibles en Algérie selon l'Index des produits phytosanitaires (2017) :

LINUCHEM 50 est un herbicide à base de LINURON 50% actif contre les dicotylédones annuelles et les graminées, efficace à travers son absorption par les feuilles et les racines.

Cette formulation est utilisée pour lutter contre les adventices dicotylédones qui peuvent se développer dans les cultures maraichères : pomme de terre, tomate, poivron, carotte.

### 2.1. La toxicité du Linuron

Le linuron pénètre et s'attarde dans les cours d'eau de surface par les décharges agricoles (Patterson 2004), son principal mode d'action est la destruction de la photosynthèse dans les mauvaises herbes ciblées (Hayyat *et al.*, 2016), En bloquant les enzymes de la chaîne de transport des électrons photosynthétiques.

Il est également largement répandu dans les résidus trouvés sur les aliments et dans l'eau potable (Pest Management Regulatory Agency 2014 ; Environmental Protection Agency, 2015). Récemment, le LIN a été classé comme cancérigène de catégorie 2 et nocif pour la reproduction de catégorie 1B. (EFSA, 2016). Il a une réputation anti-androgène (Lambright *et al.*, 2000).

En effet, plusieurs études ont montré que le LIN est associé à divers effets néfastes sur la santé des organes reproducteurs mâles chez le rat, tels qu'un développement fœtal anormal, le développement de tumeurs dans les cellules de Leydig et une réduction de la production de testostérone à la fois *in vitro* et *in vivo* (Hotchkiss *et al.*, 2004 ; Wilson *et al.*, 2009 ; Ding *et al.*, 2017). Cet herbicide provoque des malformations, la stérilité ou des cancers cellulaires en attaquant le foie et les globules rouges (MarxStoelting *et al.*, 2014 ; Bai *et al.*, 2017 ; Ding *et al.*, 2017). Des recherches antérieures ont montré que l'exposition à l'herbicide endommage les cellules et génère un stress oxydatif qui, à son tour, provoque un excès d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et une peroxydation des lipides (Leong *et al.*, 2013 ; Tichati *et al.*, 2021). Ces organismes se développent continuellement en tant que sous-produits des processus métaboliques typiques. L'exposition à des substances telles que les pesticides, que la cellule est incapable de contrer, accélère leur production. Une ou plusieurs biomolécules, telles que les protéines, les acides nucléiques, les lipides et les glucides, sont alors endommagées (D'Souza, 2017 ; Voronkova *et al.*, 2018). Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) pourraient être à l'origine d'un certain nombre de maladies, notamment des problèmes hépatiques et une atrophie testiculaire (Bai *et al.*, 2017).

### **2.1.1. Toxicocinétique**

Le linuron est rapidement absorbé par voie orale. Le linuron est efficacement métabolisé dans le foie du rat et ne s'accumule pas dans les systèmes mammifères.

En cas d'administration par voie intraveineuse, le linuron se distribue rapidement et largement dans les tissus périphériques et est rapidement éliminé.

Les métabolites primaires ont été identifiés comme N<sup>1</sup>-(3,4-dichlorophényl)-N-méthoxyurée, N<sup>1</sup>-(3,4-dichlorophényl) urée et N<sup>1</sup>-(6-hydroxy-3,4-dichlorophényl) urée. Le linuron est un inducteur d'enzymes hépatiques chez les rats (Pest Management Regulatory Agency 2014).

### **2.1.2. Mécanisme de toxicité**

En tant que toxique pour la reproduction et le développement, le linuron agit par l'intermédiaire d'une activité antagoniste du récepteur des androgènes, c'est-à-dire qu'il entre en compétition avec la testostérone pour se lier au récepteur des androgènes avec la testostérone pour se lier au récepteur des androgènes. Dans les tissus de souris, le linuron a bloqué de manière compétitive la transcription par

le récepteur des androgènes induite par la dihydrotestostérone en fonction de la concentration et ceci de manière dépendante de la concentration (EFSA, 2016).

### **2.1.3. Toxicité aiguë et à court terme**

#### **-Chez l'animal**

Le linuron est légèrement toxique par voie cutanée, orale ou par inhalation (catégorie de toxicité III de l'US EPA).

-La DL50 orale aiguë du linuron pour les rats est de 4000 mg kg<sup>-1</sup>

-La DL50 par voie cutanée chez le lapin est supérieure à 5000 mg kg<sup>-1</sup>

-La CL50 rapportée pour le linuron chez la truite et le crapet arlequin est de 16 mg l<sup>-1</sup>

#### **-L'homme**

Le linuron a un faible potentiel de toxicité aiguë, à l'exception des irritations de la peau, des yeux et des voies respiratoires.

### **2.1.4. Toxicité chronique**

#### **-Chez l'animal**

Dans des études de toxicité chronique menées sur des chiens beagle, le linuron a provoqué une destruction des globules rouges et une modification du poids du foie ainsi que des tumeurs testiculaires, des lésions des globules rouges et des retards de croissance ont été observés dans des études à long terme sur des rats. Des augmentations statistiquement significatives des tumeurs du foie, des réductions du poids corporel et du foie ont été observées chez des souris lors d'essais biologiques chroniques (EFSA, 2016).

#### **-L'homme**

On sait relativement peu de choses sur les effets à long terme du linuron chez l'homme.

### **Traitement clinique**

Il n'existe pas d'antidote spécifique pour l'empoisonnement au linuron. Le traitement comprend l'élimination de l'exposition (décontamination) et une thérapie de soutien.

### **2.1.5. Elimination**

Après administration orale à des rats, le linuron a été rapidement absorbé, distribué et excrété rapidement, la plus grande partie de la dose est éliminée dans l'urine 48 heures après le traitement sous forme inchangée (B. L. Worobey et J. B. Shields, 1991).

Compte tenu des métabolites courants signalés chez le rat et le lapin et du fait que le linuron est un inducteur d'enzymes hépatiques chez le rat, il est possible que le linuron induise également le système P450 chez le

lapin. Ainsi, malgré la faible toxicité aiguë du linuron chez le lapin, la consommation de foin et d'aliments contaminés par l'herbicide pourrait constituer un risque pour la santé de ces animaux reproducteurs puisqu'elle pourrait modifier l'efficacité de nombreux médicaments couramment utilisés en pratique vétérinaire et métabolisés par ces derniers. des enzymes hépatiques (Anfossi *et al.*, 1993).

## **2.2. Le linuron, potentiel antagoniste des récepteurs androgéniques**

La modulation endocrinienne provoquée par le linuron a été mise en évidence *in vitro* et *in vivo*. *In vivo*, une réduction du poids des organes sexuels accessoires a été observée chez des mâles sevrés intacts et chez des rats castrés, jeunes ou adultes, exposés au linuron alors qu'ils recevaient des suppléments de testostérone. Ces résultats ont été corroborés par les effets observés au cours d'une étude de la sensibilité aux androgènes, d'un essai de dépistage de 15 jours sur des rats mâles intacts et d'une expérience visant à déterminer l'incidence de l'âge sur la réponse. Les résultats d'études tentant de dégager un profil d'effets hormonaux chez le mâle ne sont pas uniformes (Bai *et al.*, 2017). Certaines études font état d'une piètre réponse hormonale après le traitement, tandis que d'autres mettent en évidence des changements hormonaux affectant la testostérone, l'hormone lutéinisante, l'hormone folliculostimulante, la prolactine, la thyroxine et/ou l'oestrogène. Dans une étude, il est indiqué que les changements affectant la testostérone, l'oestrogène et l'hormone lutéinisante ont été beaucoup plus importants chez les rats matures que chez les rats immatures (Voronkova *et al.*, 2018), alors que, dans une autre, on fait état d'une réponse hormonale plus marquée à des doses plus faibles chez les rats immatures (Lambright *et al.*, 2000).

De plus, certaines données indiquent une augmentation du taux de testostérone après le traitement, tandis que d'autres données indiquent une diminution des taux par rapport à ceux des animaux témoins. Un écart similaire a aussi été noté en ce qui concerne l'hormone lutéinisante.

Dans l'ensemble, la valeur probante des données indique que l'exposition au linuron peut entraîner une modulation hormonale. Le linuron augmente les lésions aux testicules et diminue la fertilité (Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire, 2012).

Le linuron inhibe de manière compétitive la liaison des androgènes aux récepteurs androgéniques et agit comme un antagoniste faible dans les essais d'activation transcriptionnelle *in vitro*. L'exposition *in utero* au linuron affecte radicalement la différenciation et le développement sexuels en provoquant une réduction de la distance anogénitale et une rétention des mamelons, ainsi qu'un

degré élevé de malformation de l'épididyme et d'atrophie des testicules chez les descendants mâles (Ding *et al.*, 2017).

Lorsqu'elles sont administrées à la mère pendant la période critique de la différenciation sexuelle, les doses élevées de linuron administrées *in utero* réduisent également la synthèse de testostérone fœtale *ex vivo* chez les descendants mâles ( Bai *et al.*, 2017). Chez les rats mâles adultes traités au propionate de testostérone immature par castration, un traitement de 7 jours au linuron a réduit le poids des tissus dépendant de la testostérone et de la DHT. Contrairement à d'autres pesticides tels que la vinclozoline ou la procymidone, les mâles exposés au linuron présentent rarement des malformations des organes génitaux externes ou des testicules non descendus (Gray *et al.*, 2006). Aucune étude n'est disponible sur les associations entre l'exposition au linuron et les phénotypes liés au Syndrome de dysgénésie testiculaire chez les garçons ou les hommes.

### **2.3. Le Linuron et le stress oxydant**

Des études récentes indiquent que l'exposition au Linuron produit le stress oxydatif par la génération des radicaux libres qui est suggéré comme l'un des mécanismes moléculaires de la toxicité de ce pesticide (Tayeb *et al.*, 2013; Nakbi *et al.*, 2012 ). En effet, les ROS sont capables de réagir avec les protéines, les acides nucléiques, les lipides et d'autres molécules, ceci entraîne des modifications de leur structure qui se manifeste par des effets tel que l'inactivation des enzymes, la peroxydation des lipides et les lésions de l'ADN, pouvant finalement conduire à la mort cellulaire par nécrose ou apoptose (Bukowska, 2006 ; Maire *et al.*, 2007 ; Lushchak *et al.*, 2018).

La production accrue des (ROS) et l'augmentation de la peroxydation lipidique, peuvent affecter les activités protectrices des antioxydants enzymatiques, et épuiser le réservoir des molécules antioxydantes non enzymatiques (Bongiovanni, *et al.*, 2011 ; Tayeb *et al.*, 2013). Les produits de peroxydation lipidique peuvent modifier les propriétés physiologiques de la membrane cellulaire.

Les changements oxydatifs dans les membranes sont le résultat de la polymérisation de protéines, ce qui aboutit à une augmentation de la rigidité de la membrane érythrocytaire ; en raison de ce fait, les pesticides provoquent un déclin de la capacité de la membrane à se déformer.

## CHAPITRE IV. STRESS OXYDANT

### 1. Le stress oxydant

#### 1.1. Définition

Le stress oxydant se définit classiquement comme un déséquilibre de la balance entre les systèmes de défenses antioxydants et la production des ROS, en faveur de ces dernières. Ce déséquilibre provient soit d'une surproduction d'agents oxydants soit d'une altération des mécanismes de défense dans les cellules, un compartiment ou un organisme. Il peut avoir, une origine endogène, telle que la surproduction d'agents pro-oxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants, ou une origine exogène ; une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants comme le tabac, les médicaments, les rayons gamma, les rayons UV, les métaux lourds, les pesticides et les solvants industriels etc... (Pham-Huy., 2008 ; Phaniendra *et al.*, 2015).

#### 1.2. Les radicaux libres biologiques

Un radical libre se définit comme tout atome, groupes d'atomes, ou molécules possédant un ou plusieurs électrons non appariés (célibataires) sur l'orbital externe. Cette caractéristique lui confère une réactivité importante vis à vis d'autres molécules plus stables, pour capter ou céder leurs électrons, créant ainsi de nouveaux radicaux en initiant des réactions en cascade (Carange, 2010).

Dans certaines conditions métaboliques, la réduction de l'oxygène est incomplète et aboutit à la formation de radicaux libres, actuellement on utilise le terme d'espèces actives de l'oxygène (ERO) ou *Reactive Oxygen Species* (ROS) pour désigner un ensemble plus large de molécules. D'autres espèces dérivées de l'oxygène : dites espèces actives de l'oxygène comme l'oxygène singlet  $^1\text{O}_2$ , le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ou le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux.

L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (ROS) (tableau 3)

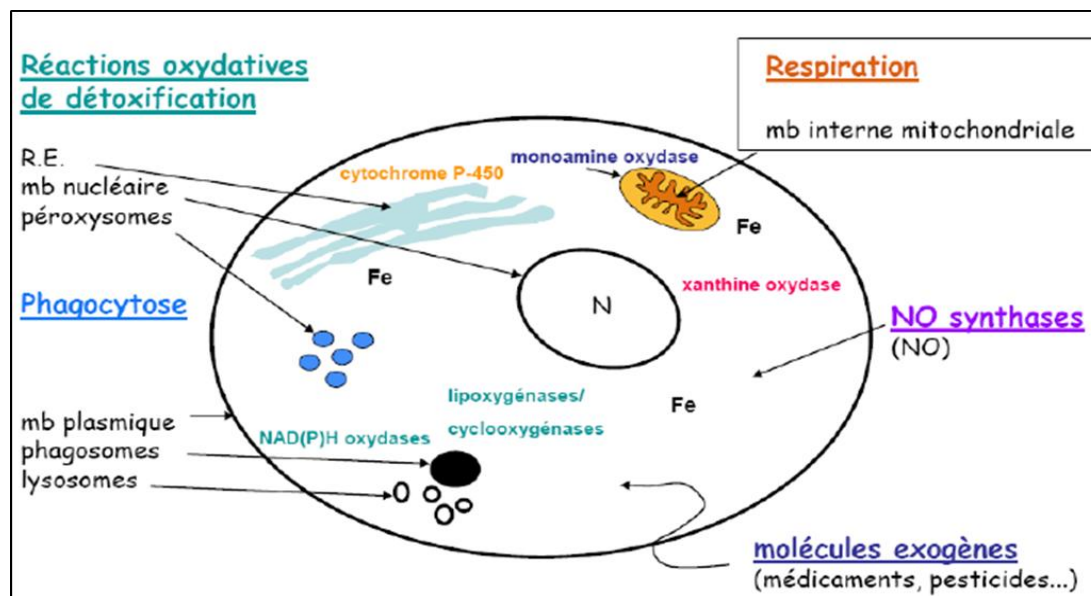
**Tableau 3.** Principales ERO radicalaires et non-radicalaires (Dwassy, 2014).

<b>Espèces réactives de l'oxygène (ERO)</b>	
<b>Radicalaire</b>	<b>Non radicalaire</b>
<b>Radical superoxyde: <math>O_2^{\cdot-}</math></b>	Peroxyde d'hydrogène : $H_2O_2$
<b>Radical hydroxyle: <math>OH^{\cdot}</math></b>	Ion hypochlorite : $ClO^-$
<b>Peroxyde: <math>RO_2^{\cdot}</math></b>	Ozone : $O_3$
<b>Alkoxyde: <math>RO^{\cdot}</math></b>	Oxygène singulet : $^1O_2$
<b>Hydropéroxyde: <math>HO_2^{\cdot}</math></b>	Péroxinitrite : $ONOO^-$

### 1.3. Les sources cellulaires des radicaux libres

Les ROS peuvent être produites à partir de sources endogènes ou exogènes. Les sources de ROS endogènes incluent différents organes cellulaires tels que les mitochondries, les peroxysomes et le réticulum endoplasmique, où la consommation d'oxygène est élevée, les autres sources endogènes de ROS comprennent la synthèse de prostaglandine, l'auto-oxydation de l'adrénaline, les cellules phagocytaires, la riboflavine réduite, le cytochrome P 450, l'activation des cellules immunitaires, les inflammations, les infections, le cancer, le vieillissement, ischémie etc... (Phaniendra *et al.*, 2015 ; Engwa, 2018).

D'autre part, les ROS sont également produites dans les systèmes biologiques par diverses sources exogènes par exemple : la pollution de l'air et de l'eau, les pesticides, les solvants industriels, les métaux de transition - Cd, Hg, Pb, As, les métaux lourds - Fe, Cu, Co, Cr, les médicaments etc... (Pham-Huy, 2008).



**Figure 10.** Les principaux sites cellulaires de productions des ERO.

#### 1.4. Les effets du stress oxydant sur les macromolécules biologiques

La surproduction de radicaux libres peut entraîner un stress oxydatif et un stress nitrosatif, comme ces radicaux libres sont très réactifs, ils peuvent endommager les trois classes importantes de molécules biologiques, notamment les lipides, les protéines et les acides nucléiques.

##### 1.4.1. Peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique (ou lipoperoxydation) est l'oxydation des lipides contenant une ou plusieurs double liaison carbone-carbone, en particulier des acides gras polyinsaturés (AGPI) tels que les acides linoléiques, linoléique et arachidonique. Elle est caractérisée par trois phases comprenant l'initiation la propagation et la terminaison.

- Dans l'étape d'initiation, les pro-oxydants tels que les radicaux : hydroxyles, alcoxyles, peroxyles, l'oxygène singulet ou le péroxinitrite, ces espèces sont capables d'arracher un atome d'hydrogène au niveau du groupement méthylène bis-allylique pour former un radical pentadienyl qui se combine ensuite avec l'oxygène pour former un radical peroxy.
- La phase de propagation débute lorsqu'une molécule d'O<sub>2</sub> attaque le radical acide gras (L<sup>•</sup>) pour former un radical peroxy (LOO<sup>•</sup>) qui peut arracher un H<sup>•</sup> d'une autre molécule lipidique générant un nouveau L<sup>•</sup> (qui poursuit la réaction en chaîne) et créer un nouveau radical, qui s'oxydera et ainsi de suite (Therond, 2006).

La phase de terminaison correspond à la phase de formation de molécules plus stables non-radicalaires obtenues le plus souvent par réaction entre deux radicaux libres ou grâce à l'action d'un antioxydant.

Ces hydroperoxydes appartiennent à la famille des peroxydes lipidiques qui peuvent soit être réduits et neutralisés par la glutathion peroxydase et la vitamine E intercalée dans la bicouche lipidique des membranes soit se décomposer et libèrent de nombreux produits, tels que le malondialdéhyde (MDA), les isoprostanes et le 4-hydroxynonéal, qui sont considérés comme l'un des plus importants biomarqueurs du stress oxydatif dans les tissus (Haleng *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2015).

#### 1.4.2. L'oxydation des protéines

Les ROS sont en effet capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes de protéines, altérant également leurs fonctions, leur oxydation aboutit à la formation de produits carbonylés et hydroxylés. En effet les ERO les plus réactifs avec les protéines sont le radical hydroxyle  $\text{HO}^\circ$  et le peroxydinitrite  $\text{ONOO}^\cdot$ . L'ion superoxyde  $\text{O}_2^{\circ-}$  est le moins réactif des ROS mais est suffisamment fort pour oxyder les groupements thiols (-SH) de la cystéine. En outre Les acides aminés soufrés dont la cystéine et la méthionine, les acides aminés basiques (arginine, leucine) et les acides aminés aromatiques tels que le tryptophane, la phénylalanine et la tyrosine semblent être les plus vulnérables (Halliwell et Guterridge, 2015).

Les ROS peuvent modifier les protéines soit par :

- **Voie directe** : c'est la fragmentation des protéines et la formation de produits carbonylés : En effet les protéines peuvent être modifiées directement par les espèces réactives de l'oxygène conduisant ainsi à l'oxydation des acides aminés. Cette modification oxydative est réversible, traduite par la formation de disulfures, d'acide sulfénique et de méthionine sulfoxyde résultant de l'oxydation des chaînes latérales des résidus cystéine et méthionine, les plus sensibles à l'oxydation.
- **Voie indirecte** : par la glyco-oxydation (qui résulte de la formation d'une liaison covalente entre la fonction aldéhyde du glucose et les groupements amines des protéines) et de la peroxydation lipidique. Ces composés peuvent réagir avec les résidus lysine et arginine des protéines pour former deux classes de produits les AGE (produits de glycation avancée) et les ALE (produits de lipoxydation avancée) (Weiss *et al.*, 2000 ; Stadtman *et al.*, 2003).

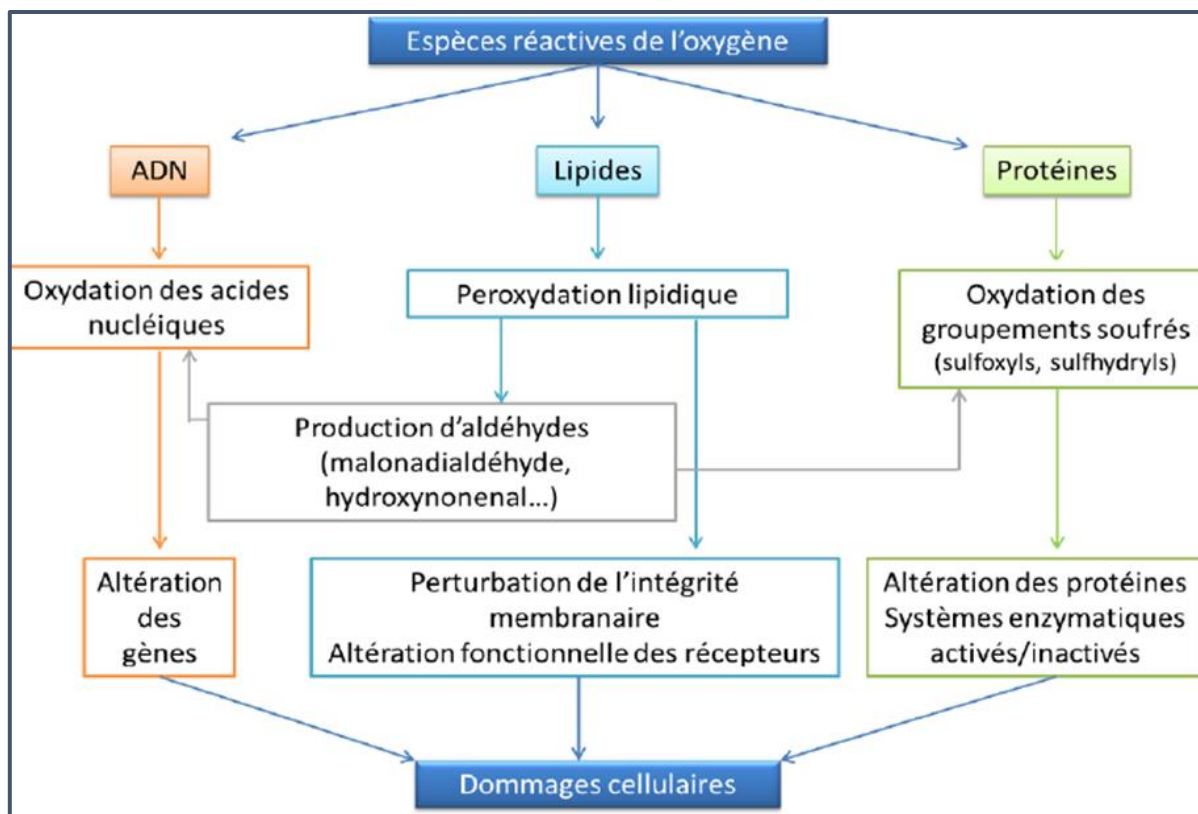
Les résultats les plus fréquents de modifications oxydatives des protéines sont les changements dans la structure des protéines et un dépliement partiel de la protéine se traduisant par une diminution de l'activité enzymatique, une susceptibilité plus forte à la

dégradation protéolytique, de la stabilité à la chaleur ce qui aboutit à la mort cellulaire par apoptose (Reeg et Grune ,2015).

### **1.4.3. Les dommages oxydatifs de l'ADN**

Les ROS de sources endogènes ou environnementales ont le potentiel d'oxyder différentes macromolécules de la cellule notamment la molécule d'ADN nucléaire et mitochondrial qui est la plus exposé aux attaques oxydantes à cause de sa proximité des sites de production d'ERO et son manque de ressources de réparation (Wallace, 2008). En effet, les ROS peuvent réagir avec les acides nucléiques attaquant les bases azotées et le squelette sucre-phosphate, provoquant ainsi différents types de dommage de l'ADN comme : les cassures simple- et double-brin , des lésions, l'instabilité de l'ADN qui comprend le blocage de la réplication et la transcription ainsi que des réarrangements chromosomiques (Evans *et al.*,2004 ; Gredilla,2011), en outre, la présence de 8-OHdG ( 8-hydroxy-2-désoxyguanosine (8-OHdG : un marqueur des dommages oxydatifs causés à l'ADN) dans les cellules peut entraîner une mutagenèse et jouer ainsi un rôle important dans la carcinogenèse (Cooke *et al.*,2003).

Les dommages oxydatifs de l'ADN jouent un rôle majeur dans la pathogenèse de nombreuses maladies, y compris : le cancer, les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires, les maladies inflammatoires chroniques (Thanan *et al.*,2015 ; Lima *et al.*,2019).



**Figure 11.** Les différentes cibles des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Monteil, 2004).

### 1.5. Pathologies chroniques liées à un excès d'EROs

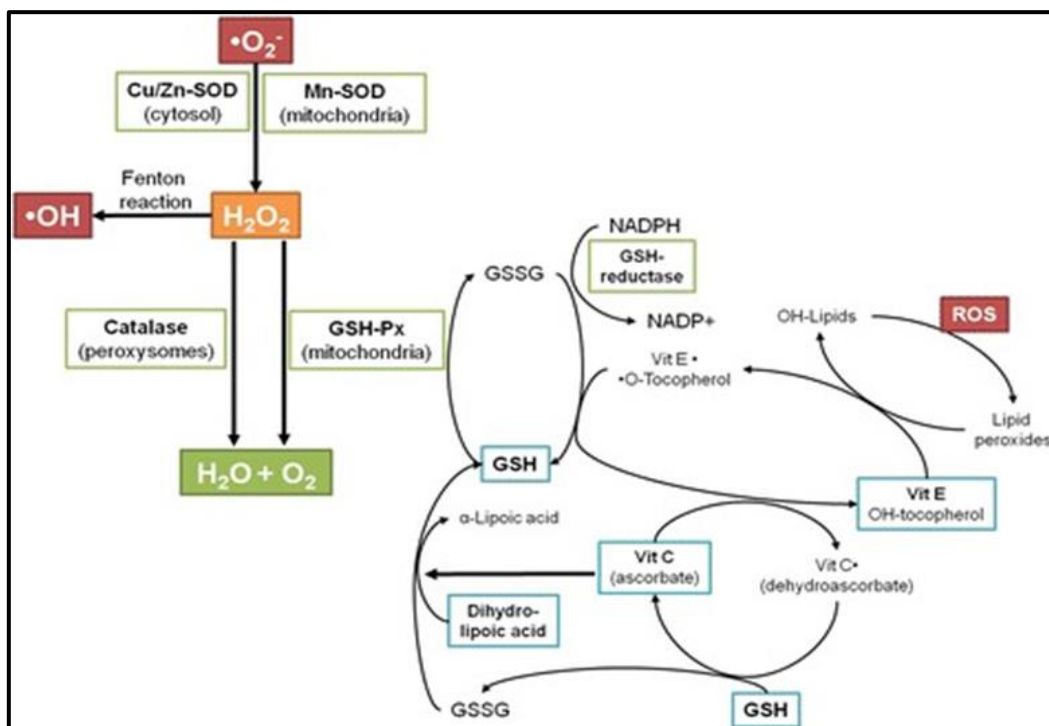
Les phénomènes radicalaires de base sont utiles au bon fonctionnement de l'organisme. L'altération des composants cellulaires et des structures tissulaires intervient lorsque l'intensité de ces phénomènes augmente anormalement et dépasse la quantité d'antioxydants disponibles (Rahman, 2007). La surproduction de radicaux libres peut causer des dommages oxydatifs aux biomolécules telles, les lipides et les protéines, les lipoprotéines et l'acide désoxyribonucléique (ADN) altérant ainsi le statut redox normal, et conduisant à un stress oxydatif accru.

En effet le stress oxydatif induit par les radicaux libres serait impliqué dans plusieurs pathologies qui possèdent un caractère radicalaire comme facteur déclenchant ou associé à des complications de l'évolution de plusieurs maladies, tant chroniques que dégénératives, ainsi que de l'accélération du processus de vieillissement du corps et de l'apparition de pathologies, telles que : le diabète sucré (Bashan *et al.*,2009;Vanessa *et al.*,2013), les troubles neurodégénératifs (maladie de Parkinson-PD, maladie d'Alzheimer-AD et sclérose en plaques-MS) (Uttara *et al.*, 2009), les maladies cardiovasculaires (athérosclérose et hypertension) (Ceriello,2008 ; Cervantes *et al.*,2017), les maladies respiratoires (asthme, la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC)) (Caramori et Papi, 2004), le développement de la cataracte, la polyarthrite rhumatoïde et dans divers cancers (cancers colorectaux, de la prostate,

du sein, du poumon et de la vessie) (Phaniendra *et al.*, 2015 ; Pizzino *et al.* ,2017). En outre, Le stress oxydatif est impliqué dans les maladies qui affectent l'appareil rénal, telles que la néphrite interstitielle glomérulaire et tubulaire, l'insuffisance rénale, la protéinurie et l'urémie (Droge, 2002 ; Karam *et al.*, 2013).

## 2. Les systèmes de défenses antioxydants

Les antioxydants au sens large représentent l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire les ROS. Ces antioxydants peuvent agir en réduisant ou en dismutant ces espèces, on les piègeant pour former un composé stable (Valko *et al.*, 2007).



**Figure 12.** Les défenses antioxydantes dans l'organisme (Kurutas, 2015).

### 2.1. Les mécanismes d'actions des antioxydants

Afin de maintenir des niveaux optimaux d'EROs, le système de défense des cellules fait intervenir différents acteurs : les enzymes antioxydantes, les antioxydants non-enzymatiques et les facteurs de transcription. Leurs mécanismes sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulet, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition.

En outre, certains facteurs de transcription permettent l'expression de gènes de défense antioxydante, par exemple, l'augmentation modérée des EROs intracellulaires active de la voie de signalisation de Keap1(*Kelch-like ECH-associated protein 1*)-Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), lors de laquelle Nrf2 transloque au noyau et lie les éléments de la réponse antioxydante (*Antioxidant Response Elements*) sur l'ADN, ce qui permet la transcription de gènes comme la SOD et la CAT (Luczaj *et al.*, 2017).

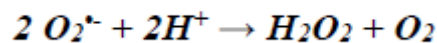
## **2.2. Les systèmes antioxydants enzymatiques**

### **2.2.1. Les superoxydes dismutases (SOD EC 1.15.1.11)**

Les SODs ce sont des métallo-enzymes qui existent sous trois formes dans les tissus des mammifères et qui diffèrent par leurs cofacteurs, leurs emplacements sous-cellulaire et leurs distributions tissulaires.

1. La superoxyde dismutase de cuivre-zinc (CuZnSOD) est présente dans le cytoplasme et les organites de presque toutes les cellules de mammifère. (Laukkanen *et al.*,2016)
2. La superoxyde dismutase de manganèse (Mn-SOD) ou de fer se trouve dans les mitochondries de presque toutes les cellules (Weisiger et Fridovich,1973 ; Laukkanen *et al.*,2016).
3. La superoxyde dismutase extracellulaire (ECSOD) est une SOD contenant du cuivre et du zinc. Elle a une grande affinité pour l'héparine et les sulfates d'héparine (Marklund ,1982 ; Laukkanen *et al.*,2016).

Ces enzymes sont la première ligne de défense contre le stress oxydant en raison de sa capacité de convertir les radicaux superoxydes hautement réactifs en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire (Weisiger,1973 ; Valko *et al.*,2006 ; Laukkanen, 2016), elles catalysent la dismutation de  $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$  selon la réaction suivante :

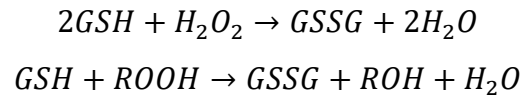


### **2.2.2. La glutathion peroxydases (GPx : EC 1.11.1.9)**

La glutathion peroxydase (GPx) est une sélénoprotéine, formée de quatre sous-unités identiques contenant chacune un atome de sélénium incorporé dans une molécule de sélénocystéine, elle est présente dans les liquides extracellulaires et dans les cellules au niveau du cytosol et des mitochondries (Rahman., 2007).

Des glutathion peroxydases à sélénium sont retrouvées dans le plasma (pGPx), dans le cytosol (cGPx), au niveau de la membrane cellulaire (HPGPx), et on retrouve une isoenzyme qui est spécifique aux cellules digestives (GIGPx) (Ganther,2014 ; Boubali,2017).

La GPx catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène ou du peroxyde organique (ROOH) en eau ou en alcool, ce processus se produit en présence de GSH, qui est converti en GSSG (glutathion oxydé). Elle assure plus largement la transformation des hydroperoxydes organiques, lipidiques notamment de type ROOH, en alcools (ROH) (Valko *et al.*, 2006).

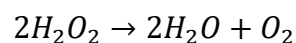


### 2.2.3. Les Glutathion-S-Transférases (GST, EC 2.5.1.18)

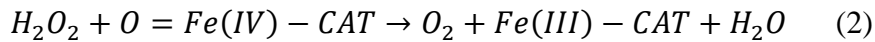
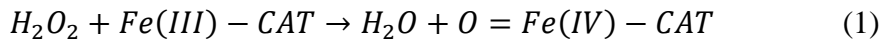
Les GST sont des enzymes sont une famille d'enzymes de détoxification de phase II, qui catalysent la conjugaison du glutathion (GSH) à une grande variété de composés électrophiles endogènes et exogène telles que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou les xénobiotiques et les cancérigènes environnementaux (Nissar *et al.*, 2017). Ils sont divisés en deux groupes : microsomal liés à la membrane et cytosolique, les GST humaines sont répartis en 8 classes selon leurs propriétés structurales (similarité des séquences nucléotidiques). On distinguera ainsi les classes : Alpha ( $\alpha$ ), Kappa ( $\kappa$ ), Mu ( $\mu$ ), Omega ( $\Omega$ ), Pi ( $\pi$ ), Sigma ( $\sigma$ ), Thêta ( $\theta$ ) et Zeta ( $\zeta$ ) (Board *et al.*, 2000 ; Umasuthan *et al.*, 2012 ; Revathy *et al.*, 2012).

### 2.2.4. La catalase (CAT : EC 1.11.1.6)

Les Catalases sont des enzymes qui catalysent la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène, Ils se composent de quatre sous-unités protéiques, chacune contenant un groupe hème et une molécule de NADPH. La catalase est particulièrement concentrée dans le foie et les érythrocytes, mais se trouve aussi dans d'autres tissus. Dans la cellule, elle est majoritairement concentrée dans les peroxysomes où elle régule la production de  $H_2O_2$  issue des enzymes oxydases et empêche ainsi sa diffusion hors de l'organite (Valko *et al.*, 2006), Elle possède une activité peroxydase et capable d'utiliser une molécule d' $H_2O_2$  comme substance donneur d'électrons et une autre molécule d' $H_2O_2$  comme oxydant ou accepteur d'électrons (Murray *et al.* ; 2013). Leur fonction principale est de catalyser la décomposition par dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène (Powers et Jackson, 2008). Elle catalyse ainsi la réaction suivante :

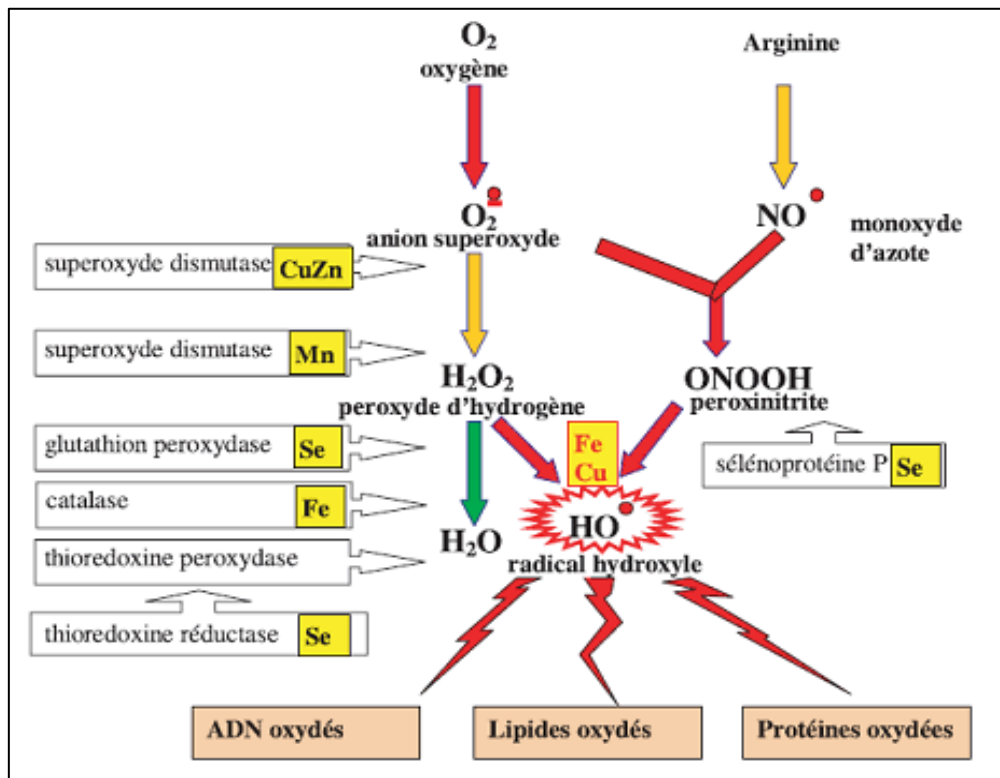


Le mécanisme réactionnel met en jeu le fer (III) de chaque groupement héminique. Celui-ci permet la rupture hétérolytique de la liaison entre les deux atomes d'oxygène de l' $H_2O_2$ . Au cours de cette réaction le Fer III est oxydé en Fer (IV)=O (1), puissant oxydant qui va dans une seconde étape oxyder une deuxième molécule d' $H_2O_2$  pour donner une molécule d'eau et une molécule de dioxygène (2) :



### 2.2.5. Les thiorédoxines (TRx) et la thiorédoxine réductase (TRxR)

Le système thiorédoxine comprend la thiorédoxine (Trx), la thiorédoxine réductase (TrxR) et le NADPH. Les thiorédoxines sont des enzymes à activité antioxydante intrinsèque comme toutes les protéines à groupement thiol (-SH), une fois oxydée, la thiorédoxine sera régénérée par le NADPH sous l'action de la thiorédoxine réductase (TrxR), cette dernière possède un groupement sélénocystéine dans son site actif et elle intervient dans la dégradation des peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène (Bouguerne, 2012).



**Figure 13.** Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (Favier, 2003).

## 2. 3. Les systèmes antioxydants non enzymatiques

### 2.3.1. Le glutathion

Il s'agit d'un tri-peptide qui joue un rôle à de divers niveaux dans la lutte contre le stress oxydant. Le glutathion (GSH) peut interagir directement avec les espèces oxygénées activées mais il est

principalement utilisé comme substrat de la glutathion peroxydase qui assure l'élimination des lipides peroxydés, il participe au transport des acides aminés à travers la membrane plasmique, piègeur direct du radical hydroxyle et de l'oxygène singulet, et participe dans la régénération des vitamines C et E (Birk *et al.*, 2013 ; Kurutas, 2015).

### **2.3.2. L'acide alpha-lipoïque**

L'acide alpha-lipoïque est un acide soufré présent dans toutes les cellules du corps. C'est un puissant antioxydant capable de neutraliser plusieurs types de radicaux libres car l'acide alpha lipoïque est soluble dans l'eau (hydrosoluble) et dans les graisses (liposolubles). En tant qu'antioxydant, c'est un piègeur direct des radicaux libres, il chélate les ions de métaux de transition (par exemple, le fer et le cuivre), augmente les niveaux de glutathion cytosolique et de vitamine C et prévient des toxicités associées à leur perte (Senoglu *et al.*, 2009).

### **2.3.3. La mélatonine**

La mélatonine (N-acétyl-5-méthoxytryptamine) est un des principaux produits de sécrétion de la glande pinéale dans le cerveau, reconnue pour sa polyvalence fonctionnelle. Dans des centaines d'études, la mélatonine a été documentée en tant que piègeur direct des radicaux libres et antioxydant indirect, ainsi qu'en tant qu'agent immun-modulateur important (Kurutas, 2015).

### **2.3.4. L'acide urique**

L'acide urique est formé suite à l'oxydation de l'hypo-xanthine et de la xanthine par la xanthine oxydase. Dans les conditions physiologiques, l'acide urique est majoritairement ionisé sous sa forme d'urate ( $\text{UrH}_2^-$ ). Dans le plasma il possède une forte activité de piégeage des radicaux. C'est un puissant piègeur de radicaux  $\bullet\text{OH}$ ,  $\text{ROO}\bullet$  et  $\text{NOO}\bullet$  (Haleng *et al.*, 2007).

### **2.3.5. Le Coenzyme Q 10**

Le coenzyme Q, également connu sous le nom Ubiquinone (UQ), synthétisé dans les cellules du corps ou peut également être obtenu à partir de l'alimentation est un puissant antioxydant qui neutralise les ROS et protège la muqueuse interne de la lymphe, des vaisseaux sanguins et de l'endothélium (Quinzii *et al.*, 2007 ; Motohashi *et al.*, 2017).

### **2.3.6. L'acide ascorbique**

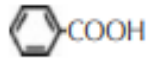
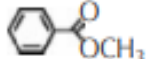
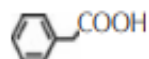
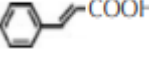
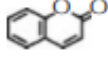
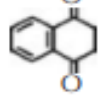
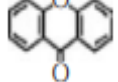
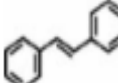
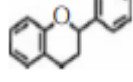
L'acide ascorbique, également appelé vitamine C, est l'un des principaux antioxydants hydrosolubles, présent dans les fluides intra et extracellulaires. Ces activités biologiques viennent de son puissant potentiel réducteur, agit principalement en piégeant directement et très efficacement les radicaux superoxydes et hydroxyles, il peut aussi recycler la vitamine E pour



### 2.3.9. Les polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires de plantes, se divisent en plusieurs classes (les acides phénoliques, les flavonoïdes, les anthocyanes, etc...). Ils peuvent être classifiés selon le nombre et l'arrangement de leurs atomes de carbones (Tableau 4.). Ces molécules sont généralement trouvés conjuguées aux sucres et les acides organiques.

**Tableau 4.** Structure des squelettes des polyphénols (Crozier *et al.*, 2008).

Nombre de carbones	Squelette	Classification	Exemple	Structure de base
7	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Acides phénols	Acide gallique	
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Acétophénones	Gallacétophénone	
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Acides hydroxycinamiques	Acide p- hydroxy- phénylacétique	
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Acide phénylacétique	Acide p- coumarique	
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Coumarines	Esculetine	
10	C <sub>6</sub> -C	Naphthoquinones	Juglone	
13	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Xanthones	Mangiférine	
14	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Stilbènes	Resvératrol	
15	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoïdes	Naringénine	

### 2.3.10. Les polyphénols et la santé

Les polyphénols sont des micro-constituants végétaux abondants dans nos aliments. Ces composés sont reconnus pour leur forte bioactivité qui se traduit au niveau de l'organisme par une large gamme de propriétés biologiques y compris la protection contre les dommages oxydatifs moléculaires et cellulaires induisant par diverses pathologies (cancers, diabète de type

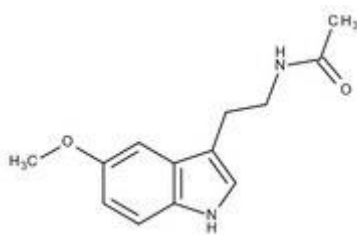
2, maladies cardiovasculaires et neurodégénératives) (Ozcan *et al.*,2014 ; Shahidi et Yeo., 2018).leurs effets protecteurs ont été mis en évidence tant d'un point de vue épidémiologique qu'expérimental (Gaston, 2016). Ils ont la capacité de réguler une diversité de processus cellulaires et moléculaires par interaction avec des cibles protéiques (enzymes, récepteurs, facteurs de transcription), ce qui leur conférant des propriétés anti-athérogéniques, anti-inflammatoires, anti-thrombotiques, anti-carcinogéniques et neuroprotectrices. Les polyphénols sont aussi capables de diminuer d'autres facteurs de risque des maladies cardiovasculaires impliqués dans le syndrome métabolique (hyperglycémie, taux de lipides élevé, insulino-résistance, obésité abdominale et hypertension artérielle) (Amiot *et al.*,2009). Ils peuvent agir comme des antioxydants de différentes manières via plusieurs mécanismes à savoir ; le piégeage direct des ERO, l'inhibition des enzymes génératrices d'EOR, la chélation des ions de métaux de transitions, responsables de la production des ERO et l'induction de la biosynthèse d'enzymes antioxydantes (Halliwell,1994 ;1997).

## CHAPITRE V : LA MELATONINE

### 1. La Mélatonine

Récemment, l'attention s'est portée sur les plantes comme une source de molécules naturelles bioactives aux propriétés antioxydantes puissantes et qui peuvent être employés pour se protéger contre les effets du stress oxydant induit par divers toxiques (Puttanna *et al.*,2016 ; Al-Attar *et al.*,2017 ; Hegazy *et al.*,2018).

Découverte dans les années 50, la mélatonine est une hormone naturelle produite par notre organisme, sa sécrétion est influencée par l'alternance du jour et de la nuit, et par les facteurs de l'environnement. Cette hormone dérivée de la sérotonine est produite principalement par la glande pinéale et est sécrétée la nuit, avec un pic vers 3 heures du matin (Gard, 2001), il existe d'autres sources extra pinéales de sécrétion de la mélatonine, notamment dans la rétine, l'intestin, le foie, les reins, la cochlée, la thyroïde, et certaines cellules sanguines (Touitou , 2008).



**Figure 16.**Structure chimique de la mélatonine.

La mélatonine surnommée l'hormone du sommeil est une hormone produite naturellement par l'organisme principalement par la glande pinéale ou épiphyse elle est aussi fabriquée en laboratoire sous forme de médicaments ou de compléments alimentaire.

Son effet majeur reste la synchronisation du cycle veille / sommeil, elle règle le rythme de sommeil de 24h et est couramment utilisé pour prévenir le décalage horaire et pour guérir les troubles du sommeil (Touitou , 2003).

### 2. Synthèse de la Mélatonine

Elle est synthétisée chez les animaux à partir de l'acide aminé L-tryptophane. Plusieurs enzymes interviennent pour former, dans un premier temps, de la sérotonine (un neurotransmetteur) puis, dans un second temps, de la mélatonine (voir schéma ci-contre) (Singh et Jadhav, 2014).

Sa production se fait principalement la nuit, avec une production maximale en moyenne autour de 3-4h du matin. En effet, la synthèse de mélatonine est inhibée lorsque la rétine est exposée à de lumière, en particulier de la lumière bleue. C'est d'ailleurs ce qui lui confère sa principale fonction : indiquer à l'organisme l'alternance jour/nuit. Cela permet de synchroniser le cycle veille/sommeil (circadien) (Malhotra *et al.*, 2004; Srinivasan *et al.*, 2009).

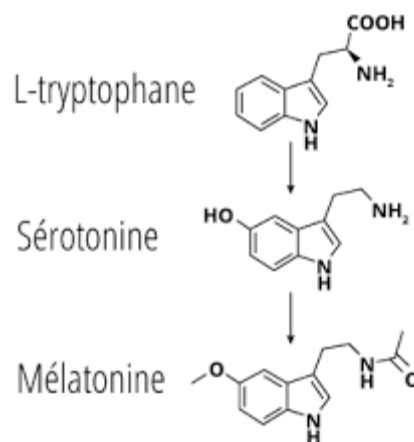
La mélatonine est obtenue à partir d'un acide aminé le tryptophane, celui-ci est tout d'abord transformé en sérotonine. Cette transformation comporte deux étapes :

-Le 1-tryptophane après avoir été capté par les cellules parenchymateuses épyphysaires selon un mécanisme de transport actif, subit dans un premier temps l'action de tryptophane hydroxylase entraînant ainsi la production du 1-5hydroxytryptophane (5-HTP) par hydroxylation, puis ce dernier est transformé en sérotonine (5-hydroxytryptamine ou 5-HT par action de la 5-HTP décarboxylase .

-Au sein des pinéaloctes, la sérotonine subit alors l'action de la sérotonine N-acetyl-transférase (NAT) aboutissant ainsi à la N-acetyl-sérotonine. Enfin, l'hydroxyindole-O-méthyltransférase (HIOMT) permet d'obtenir la mélatonine (Menard, 2011).

Ces enzymes sont en quantité élevée au moment où le sujet se trouve dans l'obscurité, ce qui explique la très grande sécrétion nocturne de mélatonine (Sophie Ambroise-Thomas, 1998).

La demi-vie de la mélatonine est courte, évalué de 30 à 50 min. la molécule est dégradée par le foie (85%) et par le cerveau (15%).les métabolites sont ensuite éliminés par les reins (90%) et dans les fèces (10%) (Carpentieri *et al.*, 2016).



**Figure17.** Schéma représentatif de la synthèse de la mélatonine.

Il n'existe pas de stockage intra-épiphyse de la mélatonine. Aussitôt après sa synthèse, la hormone gagne la circulation sanguine ainsi que d'autres liquides biologiques (la salive, liquide séminale, liquide céphalo-rachidien, bile, liquide amniotique, lait maternel, sang placentaire, fluide folliculaire ovarien, chambre antérieure de l'œil) par diffusion passive.

La mélatonine, douée par une forte lipophilie, traverse facilement les membranes cellulaires. Chaque organe est alors capable d'interpréter le message hormonal et d'ajuster son activité physiologique grâce à l'existence de nombreux récepteurs (ou de site de liaison), en particulier dans les noyaux supra chiasmatiques (Sophie Ambroise-Thomas, 1998).

Il existe trois types de récepteurs membranaires à la mélatonine : MT1, MT2 et MT3. Les deux premiers sont couplés à la protéine G. le récepteur MT3 quant à lui est caractérisé comme une quinone réductase et participe à la protection contre le stress oxydatif. Il existe aussi des récepteurs intracellulaires à la mélatonine mais il y a peu d'information sur le sujet (Dubocovich *et al.*, 2010).

### **3. Métabolisme de la mélatonine**

La demi-vie de la mélatonine est très courte puisqu'elle n'est que de 30 min en moyenne. Sa biodisponibilité est faible et hétérogène suite à une administration orale de mélatonine à cause d'un fort premier passage hépatique (S. Royant-Parola, 2015).

La mélatonine circulante est essentiellement catabolisée au niveau du foie mais aussi dans le cerveau.

Au niveau du foie, la mélatonine va subir une hydroxylation majoritaire (80%) dans les hépatocytes en 6-hydroxymélatonine (enzyme à CYP450) dépourvue d'activité biologique par une 6-hydroxylase microsomale, suivie d'une élimination par le rein via une sulfoconjugaison (70 à 80% du catabolisme total) via l'acide sulfurique ou une glucuroconjugaison (5% du catabolisme total) via l'acide glucuronique (S. Royant-Parola, 2015).

Le catabolisme hépatique est assuré de façon préférentielle par le Cyp1A2 qui métabolise aussi de nombreux médicaments ou substances naturelles (tel que le café par exemple), ce qui peut donc modifier la biodisponibilité. Toujours au niveau hépatique, il existe également des voies de désacétylation et de déméthylation. Après désacétylation, la mélatonine est transformée en 5-méthoxytryptamine, puis en acide 5-méthoxyindole acétique après oxydation. La mélatonine peut être déméthylée en N-acétylsérotinine qui peut se conjuguer avec l'acide glucuronique ou sulfurique dans le foie (S. Royant-Parola, 2015).

Les 20% restants du catabolisme total se font au niveau cérébral par oxydation. Il y a ouverture du noyau pyrrole de la mélatonine aboutissant à la formation de N-acétyl-5-méthoxykinurénamine passant par un intermédiaire N-formylé (Menard, 2011).

L'élimination de la mélatonine se fait pour 70 % dans les urines et pour 20 % dans les fèces en 24 heures. La voie principale d'élimination est donc urinaire et va aboutir à la formation de divers métabolites présents dans les urines, parmi eux on retrouve la 6-hydroxymélatonine sous forme de sulfate (70-80 %) et de glucuronide (5 %) et les kynurénamines (15 %). D'autres formes d'élimination urinaires sont représentées par la mélatonine elle-même (1 %) et l'acide 5-méthoxyindole acétique (0,5 %). Le 6-sulfatoxymélatonine est le métabolite urinaire principal et il peut être dosé sur la première urine du matin. Il se révélera être un bon index de la sécrétion nocturne de la mélatonine (Menard, 2011 ; S.Royant-Parola S., 2015).

#### **4. Mélatonine et reproduction**

La plus forte concentration de récepteurs à la mélatonine se trouve dans la pars tuberalis de l'adénohypophyse. Cette localisation permet d'expliquer le rôle de la mélatonine dans la reproduction. En effet, elle va freiner la synthèse de la LH qui, par rétrocontrôle, va inactiver la synthèse de la neuro-hormone hypothalamique GnRH (Favero *et al.*, 2018). Cette dernière va alors exercer un frein sur la fabrication des hormones sexuelles et donc sur l'activité sexuelle (d'où la saisonnalité de l'activité sexuelle chez certaines espèces).

De plus, la mélatonine entraîne la production de prolactine. Cette dernière permet le contrôle de nombreuses fonctions saisonnières dont la reproduction, le changement de couleur du pelage chez les animaux ou encore la mue (Regrigny, 2000).

## 5. Mélatonine et stress oxydatif

L'effet le plus connu de la mélatonine concerne la régulation des rythmes biologiques aussi bien à l'échelle de la saison qu'à l'échelle de la journée avec le rythme circadien. Néanmoins d'autres rôles sont attribués à la mélatonine : des rôles antimitotique et antioxydant, des rôles sur le système immunitaire, sur la dépression, sur le sommeil et sur le système cardio-vasculaire (Devavry, 2001).

La mélatonine possède une action protectrice contre les radicaux libres, supérieure aux autres antioxydants connus (mannitol, glutathion, vitamine E, vitamine C). grâce à sa capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique, la mélatonine exercerait son action au niveau des cellules neuronales et gliales, en diminuant l'oxydation de lipides ou en s'opposant à la cassure des chaînes des macromolécules (Menard, 2011).

En plus de ces propriétés protectrices, la mélatonine pourrait participer à la réparation de l'ADN endommagé, mais aussi à l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales et des métastases et à l'augmentation de l'apoptose des cellules cancéreuses.

Ces actions antiprolifératives, proapoptotiques et anti-métastase, permettent d'attribuer à la mélatonine des effets limitant l'initiation des tumeurs cellulaires et par conséquent la fréquence survenue apparition des cancers (Devavry, 2001).

La mélatonine est également un antioxydant puissant et peut être utilisée pour prévenir le stress oxydatif et elle a un effet protecteur contre les dommages cellulaires et les radicaux libres (Web 1).

La mélatonine est présente à la fois dans le monde végétal et chez les animaux (Acosta *et al.*, 2022). C'est une molécule produite par de très nombreuses plantes, bien que cette phyto-mélatonine ne possède, pour la plante, aucun rôle chronobiologique. C'est ainsi que des traces de mélatonine sont retrouvées dans de nombreux aliments, comme les graines (riz, luzerne), les fruits (banane), etc.

Cependant, les doses ingérées de mélatonine sont insuffisantes pour produire un effet significatif chez l'Homme. Ses activités anti-inflammatoires, antioxydantes et anticancéreuses ont été identifiées dans de nombreuses recherches (Eghbal *et al.*, 2016 ; Favero *et al.*, 2018). La MLT protège contre la toxicité de nombreux agents environnementaux et variables chimiques car elle possède des propriétés antioxydantes et préventives (Asghari *et al.* 2017 ; Król *et al.*, 2018 ; Upadhyaya *et al.*, 2018). La mélatonine augmente les enzymes, antioxydantes comme la catalase, la glutathion peroxydase et la superoxyde dismutase chez les rats (Magierowski *et al.*, 2013 ; Manchester *et al.*, 2015 ; Reiter *et al.*, 2016). Selon certains rapports, la mélatonine pourrait avoir la capacité d'inverser les déficits fonctionnels liés à une variété de maladies du

système reproducteur masculin (Rocha *et al.*, 2015). En outre, parce qu'elle contrôle la libération des hormones stéroïdes, la MLT est essentielle à la reproduction masculine. Les caractéristiques lipophiles et hydrophiles de la MLT, qui sont dispersées dans les organites subcellulaires, lui permettent de traverser la barrière sang-testicule et la membrane des cellules testiculaires.

## CHAPITRE VI. MATERIEL ET METHODES

### 1. Les produits chimiques

- Linuron (50%) ;
- Mélatonine ;
- glutathion (GSH), 5,5-dithiobis-2 nitro acide ;
- benzoïque (DTNB), nitro-bleu tétrazolium (NBT) et tous les autres produits chimiques utilisés dans l'expérimentation ont été achetés auprès de Sigma (St. Louis, France).

### 2. Matériel Biologique

#### 2.1 Présentation

L'ensemble des traitements et des protocoles expérimentaux ont été réalisés en conformité avec les principes et recommandations de santé animale (NIH publication No.85-23 révisée 1985). Au cours de notre protocole, nous avons utilisé 28 rats blancs mâles de la souche Wistar (*Rattus norvegicus*) qui proviennent de l'Institut Pasteur d'Algérie. Ces rongeurs, âgés de 6 à 8 semaines et d'un poids corporel compris entre  $250 \pm 0.10$  g, ont été élevés dans une animalerie, et ont été soumis à une période d'adaptation d'un mois environ, sous une température de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$  et une photopériode naturelle.

#### 2.2. Animaux et conditions d'élevage

Dans cette étude, nous avons utilisé 36 rats blancs mâle (*Albinos wistar*), provenant de l'institut pasteur d'Alger, âgés de huit semaines avec un poids de  $220 \pm 20$  g, les animaux sont élevés au sein de l'animalerie du département de Biologie, Université Badji Mokhtar – Annaba. Ils ont été soumis à une période d'adaptation d'un mois environ, aux conditions de l'animalerie ; à une température de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  et une photopériode de 12 h/12 h. Les rats étaient logés dans des cages en polyéthylène qui sont tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois. Les cages ont été nettoyées et la litière changée une fois tous les deux jours jusqu'à la fin de l'expérimentation. Ils ont été nourris avec un concentré énergiquement équilibré (ONAB, Bejaia) dans la composition et détaillée dans l'annexe (Annexe1). L'eau de boisson est servie dans des biberons ad libitum, et renouvelée quotidiennement.

### 3. Protocole expérimental

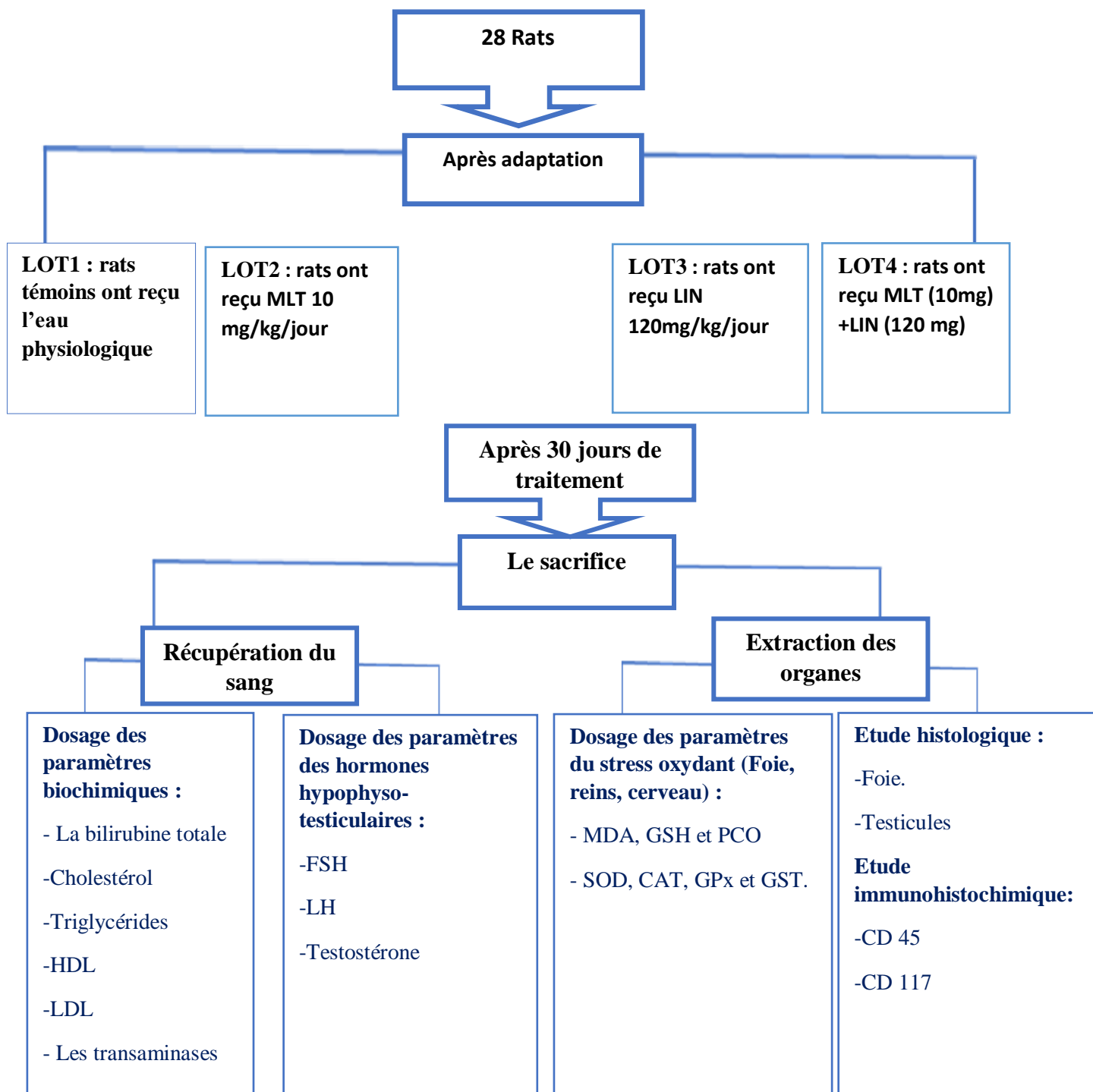
#### 3.1. Répartition et traitement des rats

Les rats ont été répartis en six groupes de six rats chacun, il s'agit de :

- **Lot 1** : constitué de rats témoins (T) qui sont soumis aux mêmes conditions que les autres lots mais ont reçu uniquement l'eau physiologique pendant 30 jours.

- **Lot 2** : constitué de rats traités par voie orale (gavage) avec 10 mg/ml/jour de Mélatonine pendant 30 jours. Selon l'étude précédente d'Olukole et al. (2018).
- **Lot 3** : constitué de rats traités par voie orale (gavage) avec 120 mg/kg/jour de Linuron pendant 30 jours (Bai et al. 2017).
- **Lot 4** : constitué de rats traités par voie orale (gavage) avec 10 mg/ml /jour Mélatonine et 120mg/kg/jour de linuron.

La dose de Mélatonine (10 mg/kg du poids corporel) utilisée dans la présente étude a été choisie en tant que dose effectrice pour fournir une protection élevée contre les conditions de stress dans plusieurs tissus (Olukole et al. 2018), et la dose de l'herbicide était basé sur l'étude précédente de Bai et al.(2017), dans lequel (120mg/kg/jour) du Linuron provoque des dommages oxydatifs.



**Figure18.** Schéma récapitulatif de l'expérimentation.

### 3.2. Sacrifices des animaux

A la fin de période de traitement (un mois), les animaux sont mis à jeun pendant une nuit, le poids des rats après le dernier jour du gavage est noté avant le sacrifice.

### **3.2.1. Prélèvement sanguin**

Le sang est immédiatement recueilli dans deux types de tubes. Le premier, sec, destiné à une centrifugation à 3000 tours/min pendant 15 minutes ; le sérum recueilli a été stocké au congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'analyse, le second tube, contenant un anticoagulant (EDTA), est utilisé pour la détermination de la formule de numération sanguine (FNS).

### **3.2.2. Prélèvement des organes**

Après la dissection, le foie et les testicules sont soigneusement prélevés, rincés avec du NaCl à 0.9% puis pesés. Ils ont été stockés selon deux méthodes : la moitié est stockée au congélateur pour la préparation ultérieure de l'homogénat qui a servi au dosage des paramètres du stress oxydant, l'autre moitié fixée dans la solution de formol à 10% afin de réaliser des coupes histologiques.

### **3.2.3. Dosage des paramètres biochimiques : hépatique**

Les différents paramètres biochimiques sont mesurés par la méthode spectrophotométrique en utilisant des kits prêts à l'emploi (coffrets Spinreact utilisés pour le dosage des paramètres : triglycérides, cholestérol, de la bilirubine totale (BT), Les activités enzymatiques sériques de l'aspartate amino-transaminase (ASAT), de l'alanine amino-transaminase (ALAT), Lactate Déshydrogénase (LDH).selon les principes et les protocoles des kits de dosage (Spinreact, SA, Espagne) (Annexe).

### **3.2.4. Analyse ELISA des hormones hypophyso-testiculaires**

Des kits ELISA ont été utilisés pour mesurer les niveaux de testostérone, LH et FSH conformément aux instructions du fabricant (SKFDIA Beckman Coulter, Inc., 33 560 testostérone, réf. 33 560 ; FSH, réf. 33,520 ; LH, réf. 33,510).

## **3.3. Dosage des paramètres du stress oxydant**

### **3.3.1. Préparation de l'homogénat de tissus**

Un gramme de foie et de testicules de rats récupérés à partir des quatre lots étudiés, ont été broyés. Après homogénéisation des tissus dans 2 ml de solution tampon phosphate (TBS : Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) à 1 :2 (P/V), on a procédé à une centrifugation de la suspension cellulaire (9000 tours/min,  $4^{\circ}\text{C}$ , 15 min), puis le surnageant obtenu est aliquoté dans des tubes

ependorfs est conservé -20°C en attendant d'effectuer les dosages des paramètres du stress oxydant.

### **3.3.2. Dosage des protéines**

Le réactif de Bradford développe en présence de protéines une coloration bleue quantifiable à 595 nm, et dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans l'échantillon.

#### **Principe :**

Les groupements amines (-NH<sub>2</sub>) des protéines réagissent avec un réactif à base de l'acide ortho phosphorique, de l'éthanol et de bleu de Coomassie pour former un complexe de couleur bleue. L'apparition de cette couleur reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité établit la concentration des protéines dans l'échantillon est mesurée à 595nm (à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible Jenway 6305).

#### **Mode opératoire:**

- Prélever 0,1 ml de l'homogénat.
- Ajouter 5 ml du réactif de Bradford.
- Agiter et laisser reposer 5 min pour la stabilisation de la couleur.
- Lire la densité optique à 595 nm, contre le blanc (H<sub>2</sub>O à la place de l'homogénat).
- La densité optique obtenue est rapportée sur une courbe d'étalonnage préalablement tracée.

#### **Calcul de la concentration des protéines :**

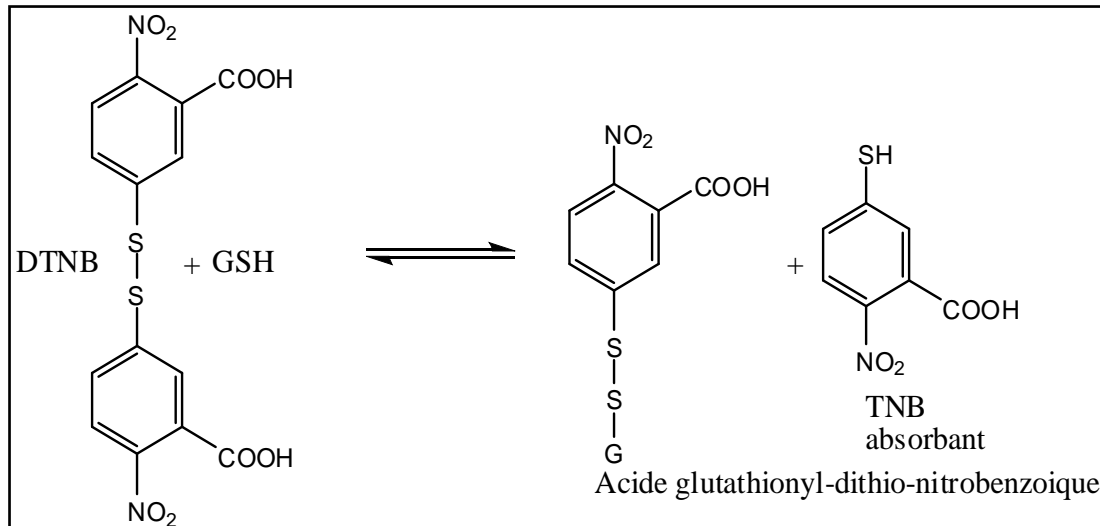
La densité optique obtenue est rapportée sur une courbe d'étalonnage préalablement tracée. La concentration des protéines est déterminée par comparaison à une gamme étalon d'albumine sérique bovine (1 mg/ml) réalisée dans les mêmes conditions (annexe).

### **3.3.3. Dosage de quelques paramètres du stress oxydant tissulaire**

#### **3.3.3.1. Dosage du glutathion**

##### **Principe :**

Le dosage du glutathion (GSH) est réalisé selon la méthode de Weekbeker et Cory (1988). Ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5-marcapturique qui résulte de la réduction de l'acide 5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoïque par les groupements (-SH) du glutathion.



**Figure19.** Principe de dosage du glutathion.

### Mode opératoire :

La procédure expérimentale du dosage du glutathion est la suivante :

- Prélever 0.8 ml de l'homogénat 0.2ml de la solution d'acide salicylique (0.25%)
- Agiter et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace
- Centrifuger à 1000 tours /min pendant 5min
- Prélever 0.5ml du surnageant
- Ajouter 1 ml du tampon Tris-NaCl, pH 7.4
- Mélanger et ajouter 0.025 ml de l'acide 5,5dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à 0.01M.

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

### Calcul de la concentration :

La concentration du GSH est obtenue par la formule suivante :

$$\text{GSH } (\mu\text{mol/mgproteines}) = \frac{\text{DO} \times 1 \times 1.525}{13.100 \times 0.8 \times 0.5 \times \text{mg proteines}}$$

- **DO** : La densité optique
- **1** : Volume total des solutions utilisées de la déprotéinisation (0.8ml homogénat, 0.2ml SSA).

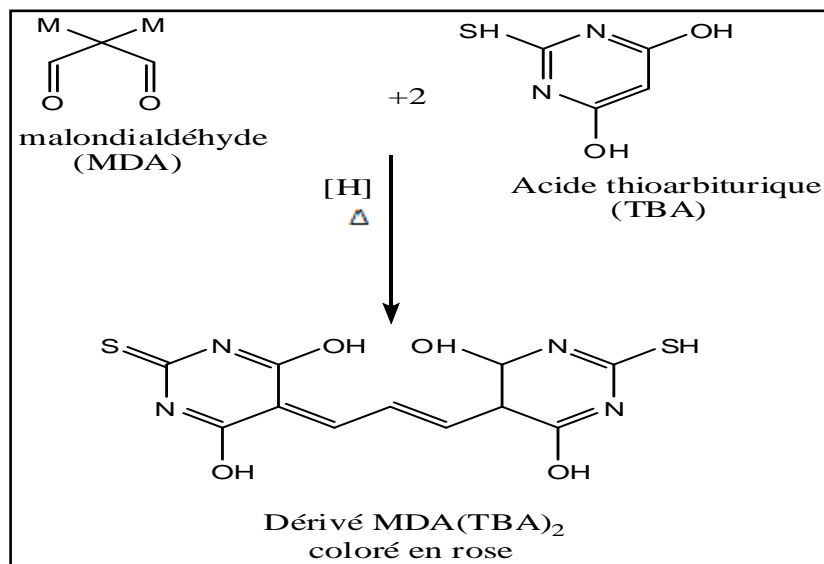
- **1.525** : volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0.5 ml surnageant + 1ml tris + 0.025 ml DNTB).
- **13.100** : Coefficient d'absorbance (concernant le groupement –SH à 412 nm).
- **0.8** : Volume de l'homogénat après déprotéinisation.
- **0.5** : Volume de surnageant trouvé dans 1.525 ml.

### 3.3.3.2. Détermination de la peroxydation lipidique par la mesure du taux du malondialdéhyde (MDA) au niveau tissulaire

Le MDA est l'un des produits des réactions de peroxydation lipidique qui se forme lors de l'attaque des lipides polyinsaturés par des espèces réactives de l'oxygène, générées par certains contaminants. Dans notre étude, le niveau de la peroxydation lipidique a été évalué par le dosage des TBARS d'après la méthode de Buege et Aust (1984), dans le rein, le foie et le cerveau.

#### Principe :

Le principe de ce dosage est basé sur la condensation de MDA en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique. La réaction entraîne la formation d'un complexe, de couleur rose entre deux molécules d'acide thiobarbiturique, qui peut être donc mesuré par spectrophotométrie d'absorption à 530 nm.



**Figure 20.** Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique.

#### Mode opératoire :

- Prélever 375 µl de l'homogénat.
- Ajouter 150 µl de la solution tampon TBS (Tris 50mM, NaCl 150mM pH 7.4)
- Ajouter 375 µl de la solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%).
- Agiter et centrifuger à 1000 tours/min pendant 10 min à 4°C.

- Prélever 400µl du surnageant
- Ajouter 80 µl du HCl (0.6 M)
- Ajouter 320 µl de la solution Tris-TBA (Tris 26 mM, TBA 120mM).
- Mélanger et incubé au bainmarie à une température de 80°C pendant 10 min.

Les densités optiques sont mesurées à 530 nm contre le blanc réactif.

#### Calcul de la concentration du MDA :

La quantité du MDA dans l'échantillon est exprimée en nmol/gramme de protéine. Selon l'équation :

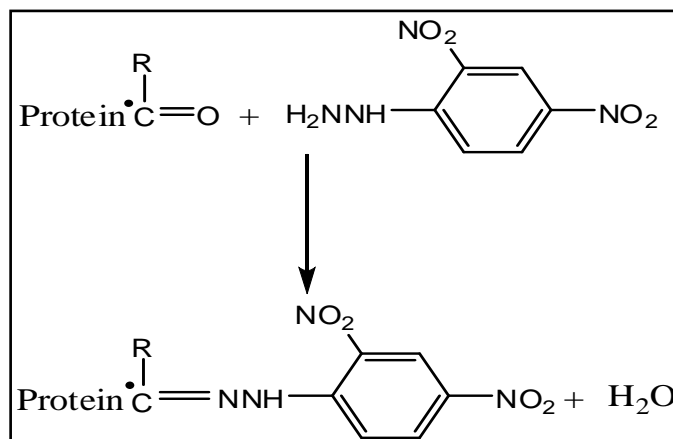
$$\text{MDA (nmol/mg protéines)} = \frac{\text{DO} \times 10^6}{\text{E} * \text{X} * \text{L} * \text{Fd}}$$

- **C** : Concentration en nmol/mg de protéines.
- **DO** : Densité optique lue à 530 nm.
- **E** : Coefficient d'extinction molaire du MDA =  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .
- **L** : Longueur du trajet optique = 0.779 cm.
- **X** : Concentration de l'extrait en protéines (mg/ml).
- **Fd** : Facteur de dilution : Fd = 0.2083.

#### 3.3.3.3. Dosage des protéines carbonylées

##### Principe :

Les protéines carbonylées (marqueurs de l'oxydation protéique) sont donc mesurées selon la méthode de Levine *et al.* (1990), qui se base sur la dérivation du groupe carbonyle avec la 2,4-Dinitrophénylhydrazine (DNPH), ce qui conduit à la formation d'un produit 2,4-dinitrophényl(DNP) hydrazone stable (**figure 21**).



**Figure 11.** Réaction entre les protéines carbonylées et le DNPH.

### **Mode opératoire :**

- Mélanger : 100 µl de l'échantillon + 500 µl (DNPH (10 mM) incubé dans HCl (2N)
- Agitation
- Incubation des tubes pendant 1 heure (T° ambiante) à l'abri de la lumière : avec vortex chaque 15 mn
- Laisser les tubes sur la glace durant 5 mn
- Ajouter 500 µl TCA (20%)
- Centrifugation pendant 10 min (4°C) à 3500 rpm
- Collecte le précipité protéine (en enlevant le surnageant)
- Lavage du culot 2 fois avec éthanol- acétate d'éthyle (v/v)
- Sécher le culot
- Le précipité final sera dissout dans 600 µl guanidine – HCl (6M)
- Incubation 15 mn à 37 °C
- Vortex et centrifugation pendant 10 mn à 4000 rpm
- Lecture de la DO (370 nm)

### **- Calcul de la concentration :**

La concentration des groupements carbonyles exprimée en micromoles par milligramme de protéines (µmol/mg prot.) selon la formule suivante :

$$\text{Protéines carbonylées (}\mu\text{mol/mg prot)} = \frac{\text{DO}}{\epsilon \times L \times X} \times 106 \times F_d$$

- **DO** : Densité optique lue à 370 nm.
- **ε**: Coefficient d'extinction molaire de DNPH =  $2.2 \cdot 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .
- **L** : Longueur du trajet optique = 0.779 cm.
- **X** : Concentration de l'extrait en protéines (mg/mL).
- **F<sub>d</sub>** : Facteur de dilution.

### **3.3.3.4. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPX :**

#### **E.C.1.11.1.9)**

#### **Principe :**

L'activité de la GSH-Px est mesurée par la technique de [Flock et Gunzler \(1984\)](#). Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) 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 (surnageant) ;
- Ajouter 0,4 ml de GSH (0,1 mM) ;
- Ajouter 0,2 ml de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4 ;
- Incuber au bain marie à 25°C, pendant 5 min ;
- Ajouter 0,2ml de  $H_2O_2$  (1,3 mM) pour initier la réaction, laisser agir pendant 1 minutes ;
- Ajouter 1 ml de TCA (1%) pour arrêter la réaction ;
- Mettre le mélange dans la glace pendant 30 minutes ;
- Centrifuger durant 10 minutes à 3000 tours /minutes ;
- Prélever 0,48 ml du surnageant ;
- Ajouter 2,2 ml de la solution tampon TBS ;
- Ajouter 0,32 ml de DTNB (1,0 mM) ;
- Mélanger et après 5 minutes lire les densités optiques à 412 nm

### Calcul de l'activité enzymatique :

L'activité enzymatique du GPx est exprimée en nano moles de GSH oxydé par milligramme de protéines (nmol GSH/mg prot) selon l'équation :

$$\text{GPx } (\mu\text{mol/mg prot.}) = \frac{(\text{DO échantillon} - \text{DO étalon}) \times 0,04}{\text{DO étalon}} + \frac{5}{\text{mg prot.}}$$

- **DO** : Densité optique lue à 412 nm.
- **0.04** : Concentration de substrat (GSH).

### 3.3.3.5. Dosage de l'activité enzymatique de la catalase (E.C.1.11.1.6)

#### Principe :

Les catalases sont présentes dans un grand nombre de tissus. Ce sont des enzymes tétramériques, chaque unité portant une molécule d'hème et une molécule de NADPH. Ces enzymes interviennent dans la défense de la cellule contre le stress oxydant en éliminant les espèces réactives et en accélérant la réaction spontanée de l'hydrolyse du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) toxique pour la cellule en eau et en oxygène (Aebi, 1984).

La réaction se fait en deux étapes. La réaction bilan est :



L'activité de la CAT est mesurée à 240nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Mode opératoire :

Le mode opératoire a été réalisé comme suite :

Réactifs	Zéro (µl)	Blanc (µl)	Essai (µl)
Tampon phosphate (PBS) (100mM, pH 7.4)	1000	800	780
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0.500 mM)	-----	200	200
Homogénat	-----	-----	20

La quantité de surnageant est déterminée en fonction de la quantité de protéine qui doit être comprise entre 1 et 1,5 mg/ml, soit une quantité de 10 à 20 µl de surnageant dilué. Ensuite, la lecture de l'absorption à 240 nm se fait après 15 secondes de délais et du durant 60 secondes de mesure.

#### Calcul de l'activité enzymatique :

L'activité enzymatique de la catalase est exprimée en micromoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par minute par milligramme de protéines (µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg prot) selon la formule suivante :

$$\text{Catalase } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg proteins}) = \frac{\Delta\text{DO}/\text{min}}{\epsilon \times L \times X \times \text{Fd}}$$

- **ΔDO** : Variation de la densité optique par minutes.
- **ε** : Coefficient d'extinction moléculaire de l'eau oxygénée, ε H<sub>2</sub>O = 0.043 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> = 0,043 µmol cm<sup>-1</sup>ml<sup>-1</sup>.
- **L** : Largeur de la cuve= 1 cm
- **X** : Quantité de protéines en mg/ml
- **Fd** : Facteur de dilution pour le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans la solution tampon

#### 3.3.3.6. Dosage de l'activité de la superoxyde dismutase (E.C.1.15.1.1)

La méthode de dosage de l'activité SOD par le test NBT est une méthode de photoréduction du complexe méthionine-riboflavine. L'oxydation du NBT par l'anion superoxyde O<sup>2-</sup> est utilisée comme base de détection de la présence de SOD.

Dans un milieu aérobie, le mélange riboflavine/méthionine/NBT donne une coloration bleue, la présence de SOD inhibe l'oxydation de NBT (Beyer et Fridovich,1987).

Une unité de SOD correspond à la quantité de protéines nécessaire pour inhiber la photo-réduction de 50 %.

Mode opératoire :

Le mode opératoire a été réalisé comme suite :

Réactifs	Blanc (µl)	Essai (µl)
EDTA-Met (0,1 mM, 13 mM)	1000	1000
Tampon phosphate (50 mM) pH 7,8	1000	1000
Echantillon	-----	50
Tampon phosphate	1000	950
NBT (75 µM)	85.2	82.5
Riboflavine (2 µM)	22.6	22.6

#### Calcul de l'activité enzymatique :

L'activité enzymatique de la SOD est exprimée en unité enzymatique par milligramme de protéines (U/mg de prot) selon la formule :

L'activité SOD = % d'inhibition /mg de protéine.

$$Y = \frac{DO\ B - DO\ E}{DO\ B} \times 100 \times \frac{20}{\text{mg de prot.}} \times \text{facteur de dilution}$$

Activité spécifique SOD = Y/50 unité de SOD/mg de protéine.

#### 3.3.3.7. Dosage de l'activité de glutathion-s-transférase (GSTs)

La mesure de l'activité des GST, consiste à fournir à l'enzyme un substrat en général le 1-chloro, 2,4-dinitrobenzène (CDNB), qui réagit facilement aux nombreuses formes de GST et du glutathion. La réaction de conjugaison de ces deux produits entraîne la formation d'une nouvelle molécule qui absorbe la lumière à 340 nm. La méthode utilisée dans cette étude pour doser les GSTs est celle de (Habig et al.,1974) ; celle-ci 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.

**Tableau 5.** Les réactifs utilisés lors du dosage de l'activité de la GST.

Réactifs	Blanc (µl)	Essai (µl)
Tampon phosphate (0.1M) pH 6.5	850	830
CDNB (0.02M)	50	50
GSH(0.1M)	100	100
Homogénat	-	20

La valeur de la densité optique du blanc (conjugaison spontanée du substrat) a été ensuite retranchée à la valeur de chaque essai afin de mesurer la variation due uniquement à l'activité de l'enzyme.

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

$$\text{GST (nmol GST/min/mg protéine)} = \frac{(\text{DO échant/min} - \text{DO blanc/min})}{9,6 \times \text{mg de protéine}}$$

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

### 3.4. Étude histopathologique

Les organes prélevés (foies, reins, cerveau) sont conservés dans le formol (10 %). Les coupes histologiques ont été réalisées au laboratoire d'anatomie pathologique (NIHA) Annaba.

La technique utilisée est celle décrite par Hould (1984).

- Fixation : la fixation a pour but la conservation des structures, elle s'effectue par immersion, en baignant les échantillons dans formol (tranché en pièces).
- Déshydratation : la première étape de déshydratation consiste à remplacer l'eau présente dans les organes par de l'éthanol 100%, lequel sera ensuite substitué par du toluène qui lui-même sera remplacé par de la paraffine. Elle s'effectue par immersion dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes (de 70°, 95°, jusqu'à l'éthanol absolu 100°).

- Inclusion en paraffine des tissus : Elle a pour but de permettre la réalisation de coupes fines et régulières. En effet les tissus sont inclus dans des blocs de paraffine. Des tranches de section de 2 à 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur seront ensuite réalisées grâce à un microtome qui permet de trancher le bloc à l'épaisseur désirée.
- Déparaffinage : il consiste à éliminer la paraffine, les lames sont placées sur une plaque chauffante (à 45-60°C) pendant 15 min, afin d'obtenir la liquéfaction et donc l'élimination de la paraffine.
- Réhydratation : en immergeant les lames dans des bains d'alcool de degrés décroissant (de l'alcool à 100° jusqu'à l'alcool 50°), puis dans l'eau distillée.
- Coloration avec la combinaison entre deux colorants hématoxyline et éosine (HE)  
Pour la coloration, on a utilisé la technique à l'Hématoxyline-Eosine (ou Hématoéine-Eosine) qui nécessite la présence de l'alcool acide (100 ml d'alcool éthylique à 70% + 50 ml d'acide HCl), eau ammoniacale (100ml d'eau distillée + 2 ml d'ammoniaque) et solution d'Eosine
- La coloration suit les étapes suivantes : déparaffiner et hydrater les lames à l'eau du robinet puis rincer à l'eau distillée. Immerger dans un bain d'Hématoxyline de Harris (15 minutes) qui colore en bleu violacée les structures basophiles (noyaux).
- Différencier les coupes dans l'alcool acide (1 à 2 plongées) ; déposer ensuite les lames dans un bain d'eau du robinet et vérifier la différenciation au microscope.
- Bleuir dans un bain d'eau ammoniacale.
- Immerger dans un bain d'Eosine (15 secondes à 2 minutes) qui colore en rose les structures acidophiles (cytoplasme). Tous ces bains sont séparés par des lavages à l'eau du robinet.
- Observation au microscope optique doté d'un appareil photographique.

### **3.5. Détection par immunohistochimie de la glycoprotéine CD 117**

L'échantillon hépatique inclus en paraffine a été découpé en sections de 5 micromètres qui ont ensuite été déparaffinées et réhydratées à l'aide de xylène et d'un alcool éthylique gradué. La première section a été colorée à l'hématoxyline-éosine pour l'étude morphologique. Pour inhiber l'activité de la peroxydase endogène, les sections ont été incubées pendant 30 minutes avec 3% de peroxyde d'hydrogène dans de l'eau désionisée. Ensuite, elles ont été lavées dans 50 tampons, pH 7,6 et prétraitées dans du citrate de sodium 10 mM, pH 6,0 pendant 45 minutes,

puis les sections ont été colorées pendant 4 minutes dans de l'eau désionisée avec une solution de récupération d'antigène (abcam Lab, UK).

Les sections ont ensuite été incubées avec l'anticorps primaire (anticorps anti-117 ab231780), pendant une nuit à 4°C. Après plusieurs lavages dans 50 mM Tris/HCl, pH 7,6, les lames ont été incubées avec l'anticorps de chèvre anti-lapin CD45 biotinylé dilué à 1:200 pendant 1 h à température ambiante (tous deux de Novus biological, Laboratories). La méthode de la peroxydase a été appliquée pendant 1 h à température ambiante en utilisant un chromogène stable 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (DAB ; Sigma, St Louis, MO, USA). Les coupes ont été contre-colorées à l'hématoxyline de Mayer et observées au microscope optique (Leica DM710) à un grossissement de  $\times 400$  et photographiées par un appareil photo microsysteme Leica (logiciel de traitement d'images, LAZ EZ version 3).

### **3.6. Etude statistique**

Pour l'étude *in vitro* les données représentent la moyenne de trois répétitions (Triplicata) indépendantes  $\pm$  l'erreur type ( $M \pm SEM$ ).

Les résultats ont été représentés sous forme de moyenne  $\pm$  l'erreur type ( $M \pm SEM$ ).

Avec  $M = \Sigma x / n$  ; x signifiant la valeur du paramètre étudié et n c'est le nombre de valeurs.

Le SEM = écart type/  $\sqrt{n}$ .

La comparaison entre les différents lots sont effectuées après une analyse de la variance (ANOVA) suivie par le test post-hoc de Tukey pour la comparaison multiple (logiciel GraphPad Prisme 7 (Prism7, version 7.00, GraphPad Software, California USA).

La différence est significative pour  $P < 0.05$  (\*).

La différence est hautement significative pour  $P < 0.01$  (\*\*)

La différence est très hautement significative pour  $P < 0.001$  (\*\*\*)

## **CHAPITRE VII. RÉSULTATS & DISCUSSION**

### **1. Effets du traitement sur la santé générale des rats**

Au cours de la période expérimentale, aucun signe anormal de comportement, tel que coups de tête, griffures, morsures, cercles, léchage et mouvements léthargiques, n'a été observé chez les rats mâles exposés au linuron. Aucune mortalité n'a été constatée dans aucun groupe. Les rats des groupes témoin et MLT n'ont montré aucun signe de toxicité systémique. Cependant, les rats du groupe LIN ont montré des signes cliniques tels que l'anorexie, la perte de poids corporel. Tous ces signes cliniques étaient liés à la toxicité aiguë du LIN. En outre, les rats du groupe MLT+LIN ont présenté certains symptômes d'anorexie et de perte de poids.

### **2. Evaluation du poids corporel et du poids des organes**

#### **2.1. Poids corporel**

Tout au long du protocole expérimental, les rats ont été pesés un jour sur deux. Ceci nous a permis de calculer l'évolution du poids corporel dans les différents lots (tableau 5).

Les résultats relatifs aux mesures du poids corporel sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type, sont présentés au niveau du tableau 5.

Nos résultats montrent que l'administration du LIN à raison de 120mg/kg de poids corporel conduit à une modification du poids des animaux après 30 jours de traitement (tableau 5). Le poids corporel final a diminué progressivement de manière significative ( $P < 0,001$ ) tout au long de l'étude dans tous les lots associés à un retard de croissance chez les rats traités par le LIN, de moins de 9,13 % par rapport au groupe témoin.

#### **2.2. Poids absolus et relatif des organes : Foie, testicules.**

Les résultats obtenus montrent que l'administration du LIN à raison de 120mg/kg de poids corporel a augmenté de manière significative ( $P < 0,05$ ) le poids absolu et relatif du foie des rats de plus de 28 %, 40 % respectivement et une diminution du poids absolu ( $P < 0,05$ ) et relatif ( $P < 0,001$ ) des testicules dans le lot LIN de moins de -9 %, -21 % respectivement par rapport au lot témoin.

Cependant, On note aussi une diminution statistiquement significative du poids absolu et relatif ( $P < 0,05$ ) du foie chez les rats recevant la combinaison MLT +LIN tandis qu'on enregistre une

augmentation du poids absolu et relatif des testicules dans le même lot (-15 %, -14 % et 8 %, 19 %, respectivement) par rapport aux rats du lot LIN (Tableau 5).

**Tableau 5.** Variation de poids corporel, poids absolu (g) et relatif (g/100g de PC) du foie et des testicules chez les rats témoins et traités après 30 jours du traitement.

Paramètres	Témoin	MLT	LIN	MLT+LIN
<b>Poids initial (g)</b>	251.9±3.30	252.71± 2.79	250.87± 3.04	250.02± 5.58
<b>Poids final (g)</b>	275.28±4.41	259± 4.42	237.3± 3.32*** P<0.001	235± 5.91*** P<0.001
<b>Poids absolue du foie (g)</b>	6.19 ±0.20	5.55±0.12	7.14±0.18* P=0.0419	6.01±0.36 # P=0.0123
<b>Poids relatif du foie (g)</b>	2.08±0.07	2.14±0.05	3.02±0.08*** P<0.001	2.59±0.15 # P=0.0268
<b>Poids absolue testicules(g)</b>	3.25±0.13	2.91±0.15	2.64±0.16* P=0.0424	2.86±0.15
<b>Poids relatif testicules (g)</b>	1.27±0.06	1.20±0.06	0.95±0.04*** P=0.110	1.13±0.08

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne ± SEM (n= 7 animaux)

\*\*\*P <0,001 ; \*P<0,05 : Différence significative des lots MLT, LIN vs témoin

#P < 0,05 : Différence significative MLT+LIN vs traité par le LIN

## Discussion

Au cours de notre travail, on rappelle que nous nous sommes attelés à déclencher une réaction inflammatoire chez le rat wistar afin d'évaluer dans un premier temps les effets du linuron, mais également, nous avons tenté une thérapie basée sur l'administration par gavage de la mélatonine.

La toxicité du Linuron a fait l'objet de plusieurs études expérimentales. Il a été démontré que le linuron a des effets toxiques sur les organismes aquatiques comme les poissons et les mollusques ainsi qu'un cancérogène possible pour l'être humain (Ding *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2014).

Par ailleurs, le linuron (3-[3, 4-dichlorophényl]-1-méthoxy-1-méthylurée) est classé comme un xénobiotique persistant qui est à peine dégradé par la micro-flore du sol (Guzzella *et al.*, 2000; Sniegowski *et al.*, 2011).

L'Union européenne a donc inclus le linuron(LIN) dans la liste II du Directive sur les substances les plus dangereuses (76/464/CEE) et a encouragé les pays membres à réduire et/ou limiter l'utilisation de cet herbicide (EPA, 1995).

La présente étude a pu mettre l'accent pour la première fois sur l'effet protecteur d'une supplémentation en mélatonine à une dose de 10 mg /kg de poids corporel d'une part et vis-à-vis la toxicité et l'état de stress oxydative induite par me Linuron à une dose de 120 mg/ kg chez les rats Wistar.

Ainsi, comme dans toute expérimentation animale, nous avons mesuré, tout au long de notre protocole, le poids de l'animal, ainsi que le poids relatif des organes clés. D'ailleurs, la réduction de poids corporel est généralement utilisée comme indicateur de la détérioration de l'état de santé générale du rat (Djeffal *et al.*, 2012).

Il a été rapporté dans un ensemble de travaux que la réduction du poids corporel serait un indicateur de la détérioration de l'état de santé général des rats. Notre étude a montré que l'administration de LIN induit une diminution du poids corporel. La diminution du poids corporel est considérée comme un indicateur des effets toxiques du LIN sur l'état de santé des rats. En fait, la diminution du poids corporel après l'administration de pesticides a été signalée dans plusieurs

études (Bhatti *et al.*, 2011 ; Chiali *et al.*, 2013). Dans notre expérimentation, la réduction du poids corporel était liée à la réduction de la consommation de nourriture.

Nos données ont montré une augmentation du poids absolu et relatif du foie dans le groupe traité par LIN par rapport au groupe témoin. Cette augmentation pourrait être attribuée à une augmentation du métabolisme hépatique et à une amélioration des mécanismes de détoxification suite à l'administration de pesticides (Sharma *et al.*, 2014 ; Tichati *et al.*, 2020).

L'augmentation du poids du foie après le traitement LIN est conforme à certaines études antérieures sur l'exposition aux pesticides (Dakhkhni *et al.*, 2016). En fait, la diminution significative du poids des testicules dans les groupes traités au LIN pourrait être due aux effets néfastes du LIN (Bai *et al.*, 2017 ; Prathima *et al.*, 2020).

Cependant, la coadministration de MLT aux rats traités au LIN a permis de restaurer la prise de poids et le poids relatif des organes (foie, testicules). Cela pourrait être dû à la restauration de la prise alimentaire suite à la réduction de l'accumulation de radicaux libres et à l'atténuation de l'effet toxique des pesticides (Asghari *et al.*, 2016 ; Li *et al.*, 2021).

## 2.3. Etude des paramètres biochimiques

Les résultats observés après le dosage sérique des paramètres biochimiques sont illustrés dans les tableaux 7 et 8.

Les résultats affirment l'existence d'une grande perturbation métabolique

### 2.3.1. Effet du traitement sur les réponses des marqueurs biochimiques de la fonction hépatique

#### Bilirubine totale et transaminases

Les paramètres enzymatiques associés au métabolisme hépatique qui ont été mesurés chez les rats témoins et traités sont illustrés dans le tableau 6. Nos résultats montrent que l'administration du LIN chez les rats a provoqué une toxicité hépatique chez les rats. En outre, l'activité enzymatique de la bilirubine totale, de l'ASAT et de l'ALAT était significativement plus élevée ( $P < 0,05$ ), ( $P < 0,001$ ) chez les rats exposés au LIN comparativement aux témoins (35 %, 34 % et 89 %, respectivement), ce qui indique une hépatotoxicité.

#### 2.3.2. Effet du traitement sur le métabolisme lipidique

En outre, les taux de triglycérides et de LDL ont augmenté de manière significative ( $P < 0,01$ ), ( $P < 0,05$ ) dans le lot LIN par rapport au lot témoin (31 % et 57 %, respectivement). Le profil lipidique sérique dans le lot LIN a connu une diminution significative ( $P < 0,001$ ), ( $P < 0,01$ ) du cholestérol et du HDL par rapport à celui du témoin (-37% et -15%, respectivement). Cependant, la co-administration de MLT a atténué l'effet de LIN sur les variables biochimiques sanguines.

**Tableau 7.** Effets des traitements sur les paramètres biochimiques sériques chez les rats témoins et traités après 30 jours du traitement.

Paramètres	Témoin	MLT	LIN	MLT+LIN
<b>Bilirubine totale</b>	3.38±0.24	3.47±0.15	4.71±0.42 *	3.24±0.27 ##
<b>ASAT</b>	96.50± 3.43	109.43±4.62	146.65±9.60 ***	122.69±3.55 #
<b>ALAT</b>	33.11±3.03	40.94±2.39	77.73±2.71 ***	52.22±4.03 ###
<b>Cholesterol</b>	0.88±0.04	0.84±0.03	0.53 ±0.08***	0.78±0.04 #
<b>Triglycérides</b>	1.07±0.03	0.97±0.06	1.28±0.02**	0.74±0.02###
<b>HDL</b>	0.29±0.01	0.24±0.01	0.20±0.01**	0.26±0.01#
<b>LDL</b>	0.33±0.01	0.28±0.01	0.44±0.03*	0.37±0.02

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM (n= 7 animaux) ;  
 \*\*\*p < 0,001, \*\*p < 0,01, \*P<0.05 : Lots MLT, LIN Comparativement aux rats témoins ;  
 ### p < 0,001, ##p, #P<0.05 : MLT+LIN Comparativement aux rats traités par le LIN.

### 2.3.3. Effets du traitement sur les hormones de l'axe hypophyse-testiculaire

Les taux sériques de FSH, LH et testostérone des différents lots de rats sont représentés dans le tableau 8. Nos résultats révèlent que le traitement au LIN provoque une diminution significative plus élevée (P < 0,01), (P<0,001), (P < 0,01) dans le plasma de FSH, LH et testostérone chez les rats traités au LIN (-44%, -65% et -62% respectivement) que dans le lot témoin, ce qui indique une altération de la réponse de l'axe hypophysaire gonadotrope. Cependant, le traitement par MLT a provoqué une augmentation remarquable de ces niveaux par rapport au lot traité au LIN.

**Tableau 8.** Effets des traitements sur la réponse de l'axe gonadotrope sérique chez les rats témoins et traités après 30 jours du traitement.

Paramètres	Témoin	MLT	LIN	MLT+LIN
<b>Testostérone</b>	2.16 $\pm$ 0.22	1.98 $\pm$ 0.20	0.74 $\pm$ 0.33 ** P= 0.0028	1.73 $\pm$ 0.21 # P= 0.0461
<b>FSH</b>	0.55 $\pm$ 0.07	0.42 $\pm$ 0.06	0.23 $\pm$ 0.04** P=0.0057	0.33 $\pm$ 0.05
<b>LH</b>	0.52 $\pm$ 0.02	0.37 $\pm$ 0.01** P= 0.0051	0.13 $\pm$ 0.03 *** P <0.0001	0.27 $\pm$ 0.02## P= 0.0067

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM (n= 7 animaux) ;  
 \*\*\*p < 0,001, \*\*p < 0,01 : Lots MLT, LIN Comparativement aux rats témoins ;  
 ##p, #P<0.05 : MLT+LIN Comparativement aux rats traités par le LIN.

## Discussion

Le foie, principal organe de métabolisme, d'excrétion intervenant dans la détoxification des xénobiotiques (Rjeibi *et al.*, 2016), doté d'un accès immédiat aux substances toxiques provenant du tube digestif à travers la veine porte, il exerce une action chimique et enzymatique sur ces agents (LeCluyse *et al.*, 2012). Lors d'insuffisance hépatique, ces substances indésirables ont tendance à s'accumuler dans le corps et entraînent potentiellement des toxicités.

Le foie est une cible privilégiée des xénobiotiques et le premier organe qui protège l'organisme des xénobiotiques. La fuite des enzymes hépatiques telles que l'ALAT, l'ASAT et la bilirubine totale dans le sérum sanguin est un signe de dommages hépatocellulaires et de dysfonctionnement hépatique (Bischoff *et al.*, 2018). Dans nos résultats, une augmentation significative de l'activité de l'ALAT, de l'ASAT et de la bilirubine totale s'est produite dans le sérum des rats traités par LIN par rapport aux rats témoins.

Cette élévation est probablement due à une perturbation du métabolisme enzymatique en raison de l'augmentation de la perméabilité membranaire et de la fuite de ces enzymes des hépatocytes dans le sang (Dar *et al.*, 2019). Les présents résultats étaient conformes aux rapports précédents, qui ont démontré qu'une élévation des taux sériques de transaminases, d'albumine et de protéines totales (Dominguez *et al.*, 2011), pourrait être le résultat de lésions de la membrane des cellules hépatiques chez les rats exposés au diuron (da Silva Simoes *et al.*, 2017), une conséquence attendue de l'action des inhibiteurs respiratoires qui induisent généralement une fuite de protéines (Marek *et al.*, 2016). Une augmentation significative des niveaux de bilirubine dans le sang a également été observée chez les rats traités au LIN par rapport au groupe témoin, confirmant les dommages au foie et ses changements histopathologiques. Nos données sont en accord avec l'observation selon laquelle l'exposition aux pesticides présente des anomalies claires et nettes dans les biomarqueurs de dommages tissulaires (Kanbur *et al.*, 2015 ; Khan *et al.*, 2013).

Nos résultats montrent clairement que le LIN a réduit le taux de cholestérol et de HDL. Tamysn M. Uren Webster *et al.* (2015) ont identifié une diminution frappante de l'expression des transcrits codant pour la majorité des enzymes formant la voie de biosynthèse du cholestérol. Ils ont également observé une diminution hautement significative du cholestérol hépatique total chez des poissons (truite brune) exposés à 225,9 µg/L de LIN et une corrélation négative entre le cholestérol total et la concentration de traitement au LIN.

Il est bien connu que le foie est l'organe clé dans la synthèse et l'excrétion du cholestérol. Par conséquent, tout type de dommage dans la fonction des cellules intra ou extra-hépatiques induira une diminution du taux de cholestérol total dans le plasma. Nos résultats montrent une diminution significative du cholestérol et une diminution très significative du HDL. A partir de ces résultats, on peut conclure que le traitement LIN pourrait perturber le métabolisme des lipides et conduire à une hypocholestérolémie.

Selon Ornostay *et al.* 2013, ces effets sont conjointement dus à la modulation de l'expression ainsi qu'à la diminution de l'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme du cholestérol, ce qui a conduit à une diminution de la concentration plasmatique de cholestérol.

Dans notre travail, le prétraitement à la mélatonine à raison de 10 mg/kg semble avoir un effet réparateur voire protecteur vis-à-vis la toxicité du LIN au niveau hépatique et hormonal, ceci est révélé par un rétablissement des concentrations sériques dans les niveaux de cholestérol total, de triglycérides et de HDL dans le plasma chez les rats traités au LIN. Ce qui peut être expliqué par ses propriétés antioxydantes qui lui confèrent un rôle majeur dans la détoxification des xénobiotiques.

Cet effet antihyperlipidémique de la MLT est principalement attribué à son activité antioxydante et à la protection de l'intégrité de la membrane cellulaire contre les dommages oxydatifs induits par le LIN (Abdel-Wahab, 2012). Un autre mécanisme possible des effets de la mélatonine sur les lipides sanguins pourrait être ses effets sur le tractus gastro-intestinal, inhibant l'absorption du cholestérol et des triglycérides, renforçant les mécanismes endogènes de clairance du cholestérol en augmentant l'activité des enzymes dégradant le cholestérol, et/ou son effet sur les hormones thyroïdiennes, qui à son tour affecte le métabolisme des graisses (Chan et Tang, 1995).

Nos données montrent clairement qu'une exposition chronique de 30 jours au LIN chez le rat entraîne une baisse significative de la testostérone associée à une hypoplasie testiculaire. Il semble donc que la toxicité reproductive du LIN soit directement liée à la production de cette hormone (Wilson *et al.*, 2009).

La biosynthèse de la testostérone fait intervenir des enzymes du cytochrome P450 et des hydroxystéroïdes déshydrogénases qui transportent le cholestérol à travers la membrane mitochondriale et convertissent le cholestérol en prégnénolone ; cette dernière réaction est catalysée par les enzymes P450 mitochondriales (Zirkin et Papadopoulos, 2018). La prégnénolone est ensuite catalysée par la 3 $\beta$ -HSD pour former la progestérone. Ces réactions sont les étapes limitant la vitesse de la synthèse de la testostérone. Il est possible que le LIN affecte l'activité de ces enzymes clés ou le transport du cholestérol et sa conversion en prégnénolone (Brokken *et al.*, 2009 ; Svechnikov *et al.*, 2010).

Cependant, la co-administration de MLT dans le groupe traité par LIN a provoqué une augmentation des niveaux de FSH, LH et testostérone avec un rétablissement important des cellules testiculaires. Les effets protecteurs de la MLT peuvent être dus à sa capacité à inhiber le stress oxydatif dans les testicules par de nombreux mécanismes, notamment l'inhibition de la peroxydation des lipides et de l'apoptose dans les cellules de Leydig (Li *et al.*, 2020 ; Koohsari *et al.*, 2020).

Dans cette étude, la MLT a été testée pour sa capacité à contrecarrer les effets délétères du LIN sur deux compartiments importants qui assurent la vitalité de l'organisme, à savoir le foie et les testicules.

Les résultats biochimiques sont concomitants avec les résultats histologiques qui ont montré que la MLT a le potentiel d'améliorer l'architecture histologique et l'intégrité du foie et des testicules des rats traités par le LIN.

## **2.4. Stress oxydant induit par le Linuron : Effets protecteurs de la supplémentation en Mélatonine**

### **2.4.1. Effet du traitement sur les paramètres non-enzymatiques**

#### **2.4.1.1. Taux du glutathion réduit (GSH)**

Le traitement des rats par le LIN à une dose de 120 mg/kg de poids corporel pendant 30 jours, a provoqué une diminution très hautement significative ( $P < 0,001$ ) des niveaux d'activité du GSH hépatique (-72%) et une diminution significative ( $P < 0,05$ ) au niveau des testicules (-67%) comparativement au lot témoin.

Cependant, la co-administration de la MLT a montré une amélioration significative du glutathion réduit hépatique et un rétablissement non significative au niveau des testicules par rapport au groupe LIN (figures 23 et 25).

#### **2.4.1.2. Peroxydation lipidique (MDA)**

La déplétion de la défense antioxydante hépatique et gonadique a été associée par une peroxydation lipidique importante, révélée par une augmentation hautement significative ( $P < 0.01$ ) du taux du MDA dans le foie (+ 86%), accompagnée d'une augmentation significative ( $P < 0.05$ ) du MDA au niveau des testicules (+52%).

En revanche, l'administration de la MLT a amélioré de manière significative le taux de la MDA au niveau des organes étudiés (foie et testicules) (figures 23 et 25).

#### **2.4.1.3. Taux de protéines carbonylées**

Concernant l'effet oxydant du LIN sur la fraction protéique hépatique et gonadique, nos résultats montrent une augmentation hautement significative ( $P < 0.01$ ), de protéines carbonylées (69%), dans le foie, et une augmentation significative ( $P < 0,05$ ) dans les testicules (86%) par rapport au lot témoin. En revanche, on note un rétablissement par une diminution hépatique très hautement significative ( $P < 0.001$ ) et une diminution significative ( $P < 0.05$ ) au niveau des testicules de la teneur en protéines carbonylées chez les rats traités par la combinaison MLT+LIN par rapport aux rats traités par le LIN (figures 23 et 25).

## **2.4.2. Effet du traitement sur les paramètres enzymatiques**

### **2.4.2.1. La superoxyde dismutase (SOD)**

Nos résultats montrent que le traitement par le LIN à raison de 120 mg/kg de poids corporel pendant 30 jours a provoqué une diminution significative ( $p < 0.05$ ) de l'activité enzymatique de la SOD hépatique (- 18 %) et au niveau des testicules (-25%), comparativement au lot témoin. Tandis qu'on enregistre un rétablissement par une augmentation non significative de la SOD hépatique et gonadique chez le lot traité par la combinaison MLT+LIN (figures 22 et 24).

### **2.4.2.2. La catalase (CAT)**

D'après les résultats obtenus (Figures 22 et 24) on observe une diminution hautement significative ( $P < 0,01$ ) de l'activité enzymatique de la catalase dans le foie (-59 %) et significative ( $p < 0.05$ ) dans les testicules (-78 %) chez les rats traités par le LIN par rapport aux rats témoins. Par ailleurs la co-administration de la MLT avec le LIN a rétabli l'activité enzymatique de la catalase dans le foie par une augmentation significative ( $p < 0.05$ ) de cette activité comparativement au lot traité uniquement par le LIN. Tandis que les rats traités par la combinaison MLT+LIN montrent une variation hautement significative ( $P < 0,01$ ) de l'activité enzymatique de la catalase au niveau des testicules.

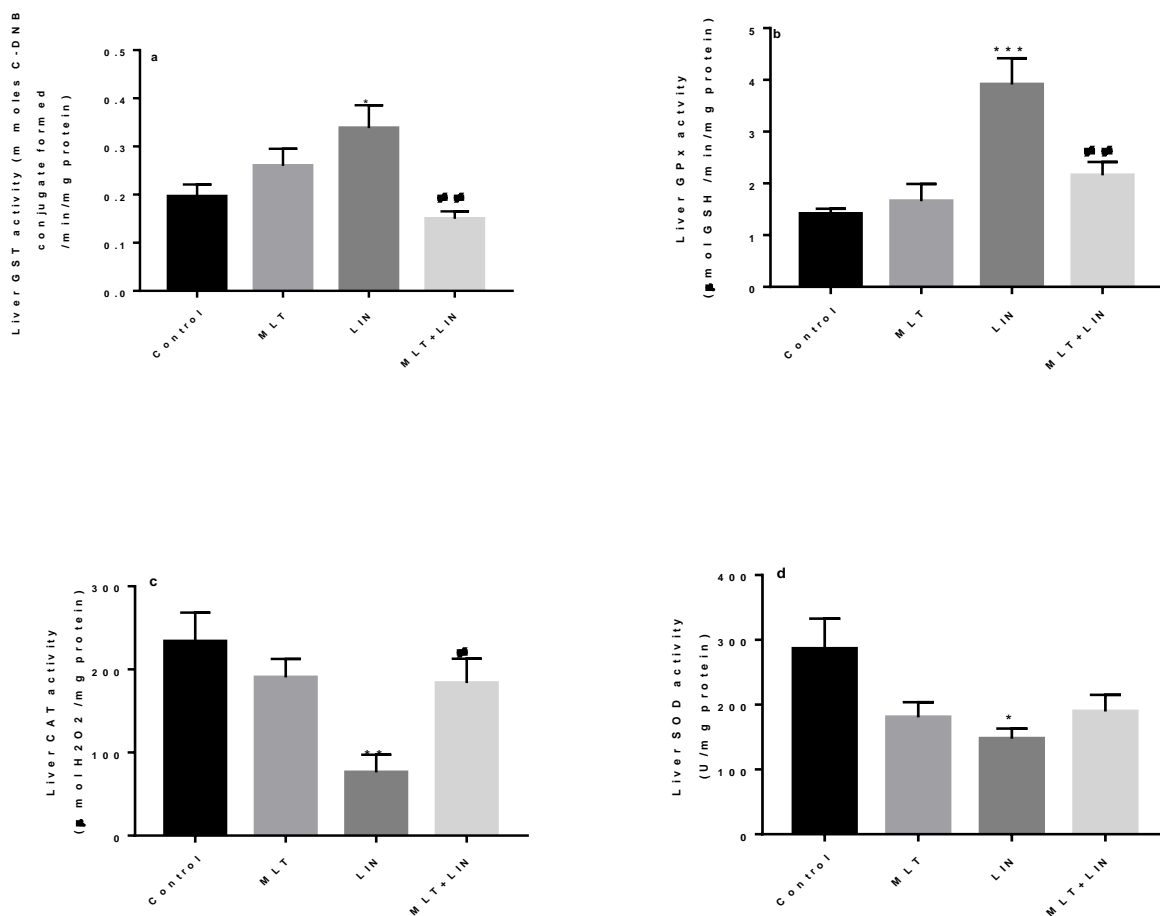
### **2.4.2.3. La glutathion peroxydase (GPx)**

D'après les figures 22 et 24 on constate que le traitement des rats avec le LIN a provoqué une augmentation très hautement significative ( $p < 0.001$ ) de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) hépatique (135%) et testiculaire (82%).

En revanche, la co-administration de la MLT avec le LIN a diminué de manière hautement significative l'activité enzymatique de la GPx dans le foie et les testicules comparativement au lot traité par le LIN.

### **2.4.2.4. Glutathion - S- transférase (GST)**

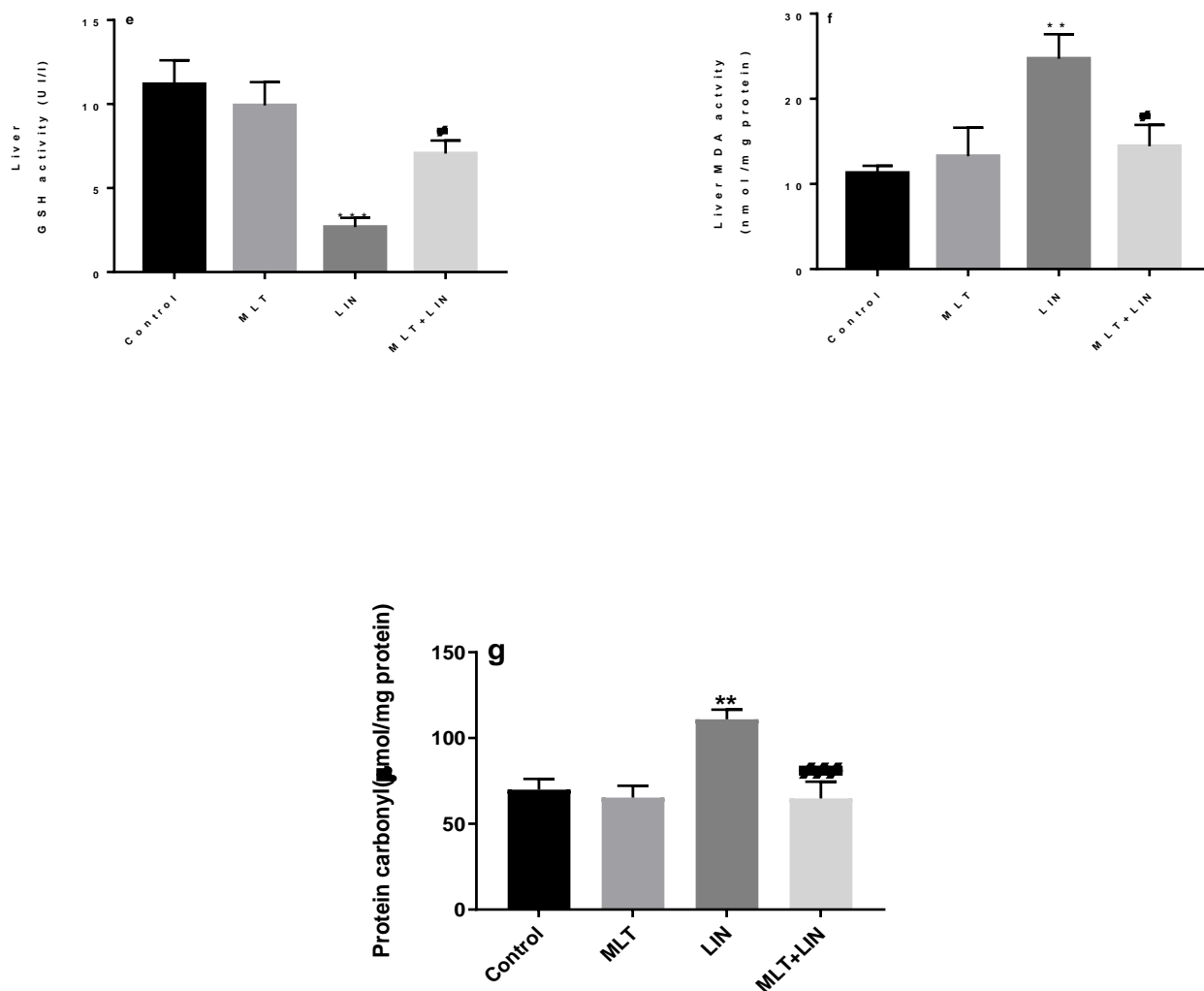
L'administration du 2,4-D chez les rats induit une augmentation significative ( $p < 0.05$ ) de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (GST) dans le foie (+30 %) et dans les testicules (+ 60 %) par rapport aux rats témoins. Tandis qu'on enregistre un rétablissement par une diminution hautement significative ( $p < 0.01$ ) de l'activité de la GST dans le foie, les testicules chez les rats recevant la combinaison de MLT+LIN comparativement au rats traités au LIN (Figures 22 et 24).



**Figure 22.** Variation de l'activité enzymatique de la GST (nmoles de conjugué C-DNB formé/min/mg de protéine) (a) ; GPx ( $\mu\text{mol GSH/mg}$  de protéine) (b) ; CAT (nmol  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min/mg}$  de protéine) (c) et SOD (U/mg de protéine) (d) dans le foie chez les rats témoins et traités pendant 30 jours.

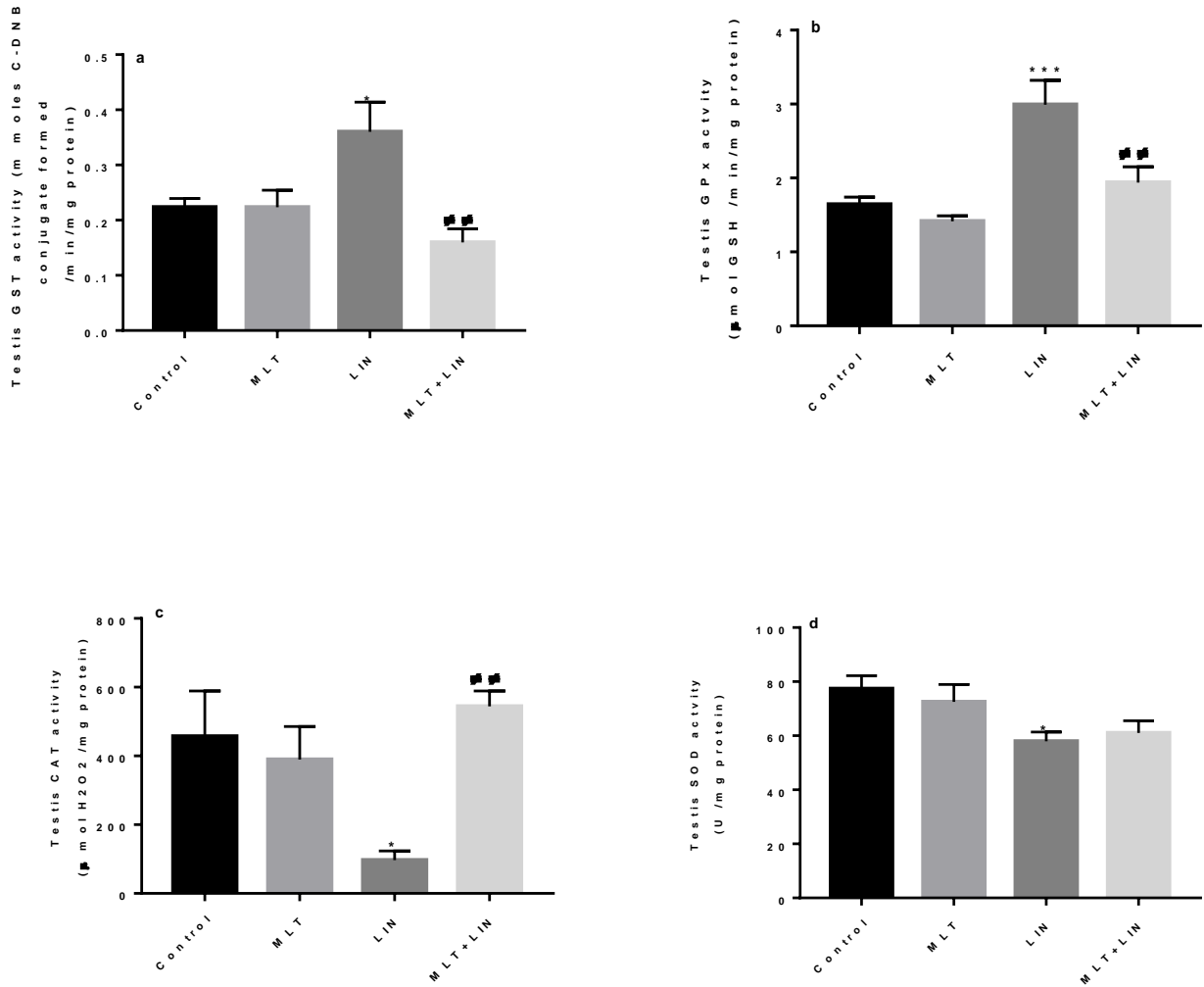
Différence significative : lots MLT, LIN comparativement au témoin (\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ ) ;

Différence significative : MLT+LIN par rapport aux rats traités au LIN (## $p < 0.01$ , #  $p < 0.05$ ) ;



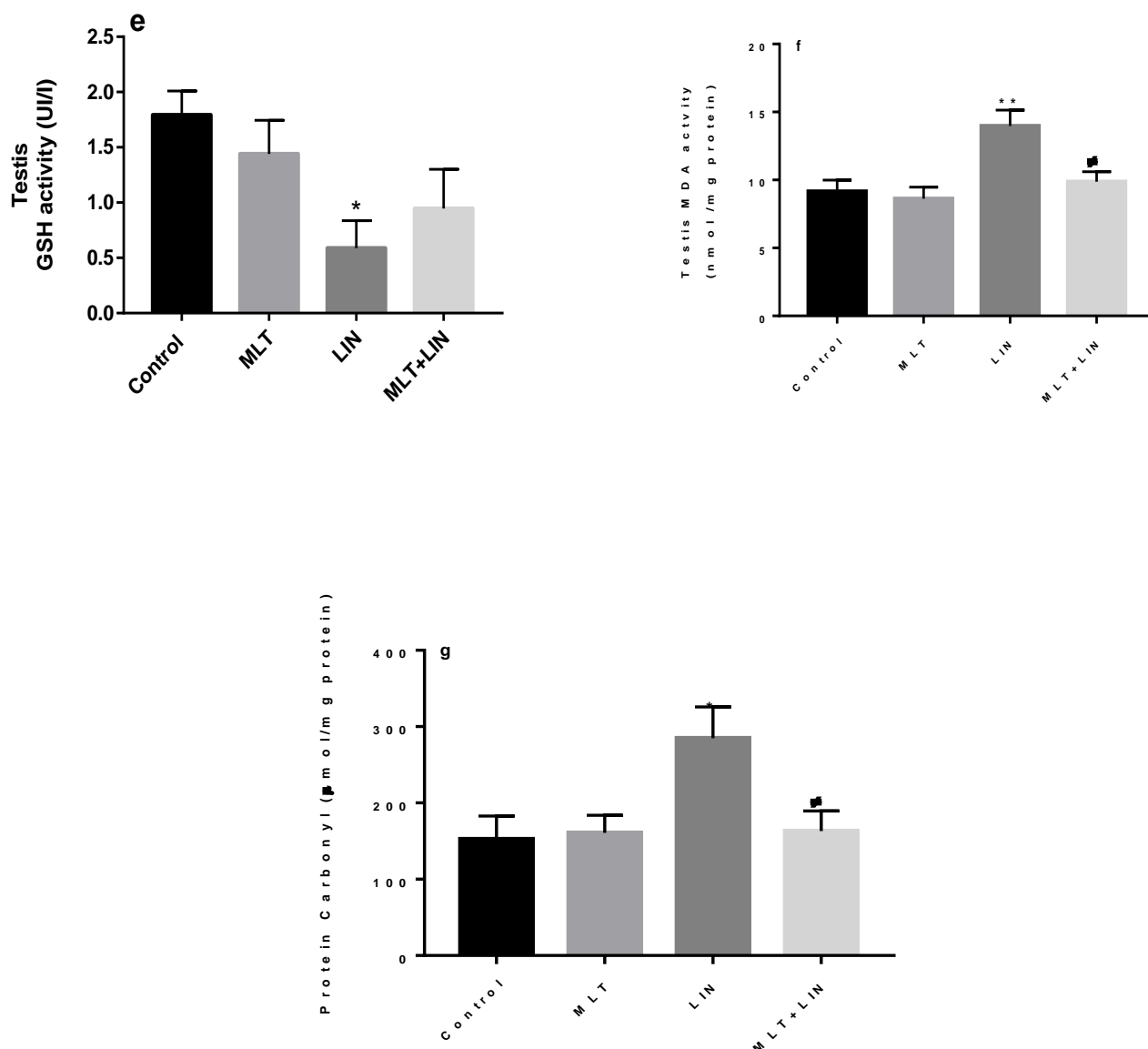
**Figure 23.** Variation de l'activité de la GSH ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de protéine) (e) ; MDA ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de protéine) (f) et PCO ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de protéine) (g) dans le foie chez les rats témoins et traités pendant 30 jours.

Différence significative : lots MLT, LIN comparativement au témoin ( $***p < 0.001$ ,  $**p < 0.01$ ) ;  
 Différence significative : MLT+LIN par rapport aux rats traités au LIN ( $### p < 0.001$ ,  $\# p < 0.05$ ) ;



**Figure 24.** Activité enzymatique de la GST (nmoles de conjugué C-DNB formé/min/mg de protéine) (a) ; GPx ( $\mu\text{mol GSH/mg}$  de protéine) (b) ; CAT (nmol  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min/mg}$  de protéine) (c) et SOD (U/mg de protéine) (d) dans le foie chez les rats témoins et traités pendant 30 jours.

Différence significative : lots MLT, LIN comparativement au témoin (\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$ ) ;  
 ;  
 Différence significative : MLT+LIN par rapport aux rats traités au LIN (##  $p < 0.01$ ) ;



**Figure 25.** GSH ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de protéine) (e) ; MDA ( $\mu\text{mol}$  GSH/mg de protéine) (f) et PCO ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de protéine) (g) dans le foie chez les rats témoins et traités pendant 30 jours.

Différence significative : lots MLT, LIN par rapport au témoin (\* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ) ;  
 Différence significative : MLT+LIN par rapport au rats traités au LIN (#  $p < 0.05$ ) ;

## **2.5. Etude histologique**

Les modifications histopathologiques du foie et des testicules des rats traités au LIN sont illustrées aux figures 26 et 27, respectivement.

### **2.5.1. Etude histologique du foie**

Des altérations morphologiques pouvant être attribuées au traitement par LIN ont été observées dans le foie et les testicules. Cependant, une discrète hypertrophie centrolobulaire hépatocellulaire a été observée.

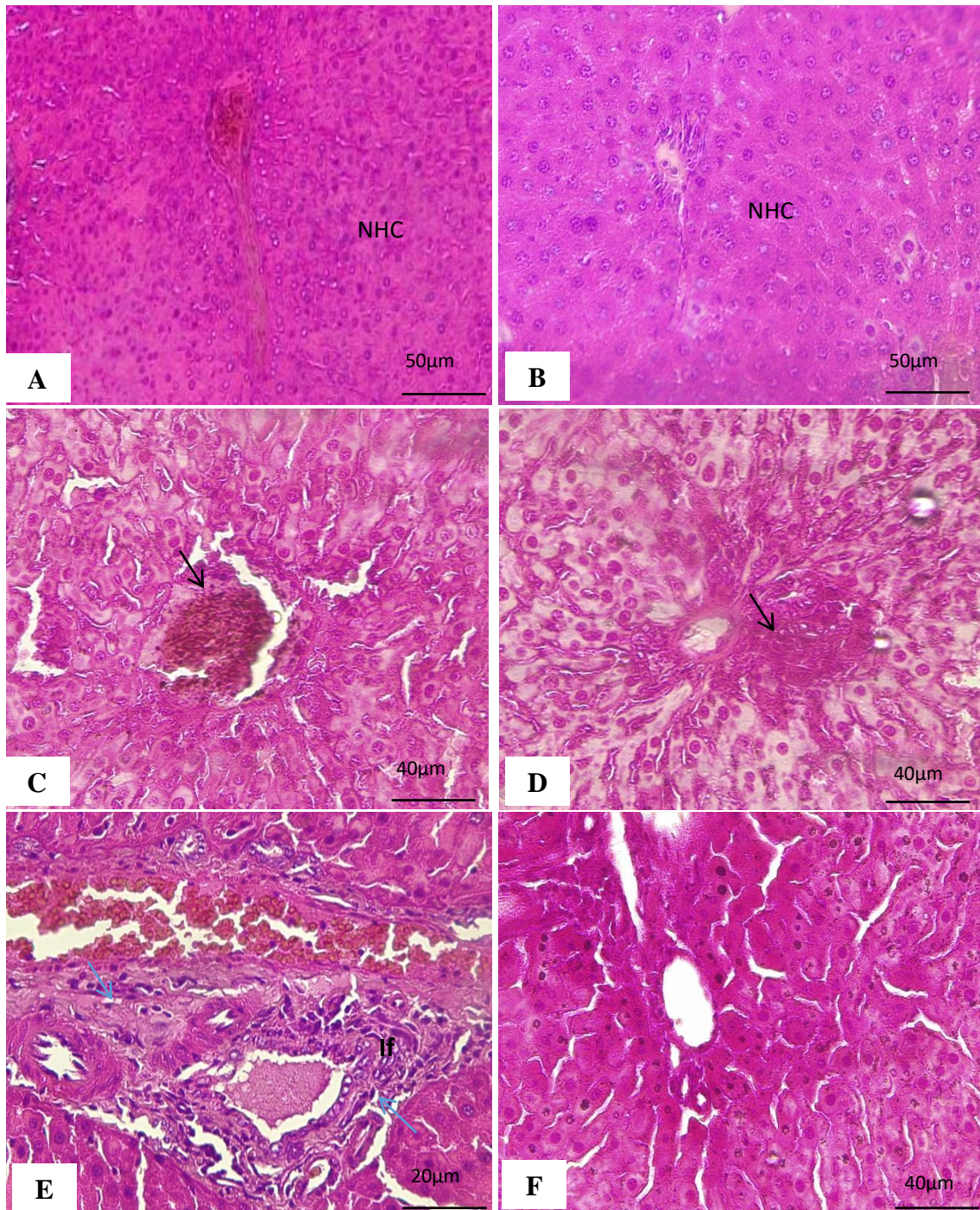
Les rats traités dans le cadre du contrôle présentaient une morphologie hépatique normale avec des hépatocytes distincts aux noyaux proéminents et aucune lésion tissulaire (Figure.26.A). En revanche, les coupes de foie des rats traités par LIN présentaient de graves lésions structurelles caractérisées par une infiltration de cellules mononucléaires, une expansion périportale, un ballonnement et une dégénérescence des hépatocytes, une nécrose, une congestion vasculaire et une dilatation sinusoidale (Figure.26.C à E). Cependant, les foies des rats du groupe traité par MLT et LIN présentaient une histologie plus saine que les foies des rats du groupe traité par LIN seul (Figure.26.F). Aucune altération histologique du foie n'a été observée entre le groupe traité par MLT et le groupe témoin (Figure.26.B).

### **2.5.2. Etude histologique des testicules**

L'observation microscopique de l'histologie des testicules des rats témoins et des rats traités à la mélatonine montre un tissu testiculaire normal composé d'une structure normale du tube séminifère (Ts) avec des spermatozoïdes Spz concentrés dans la lumière (Lu) et des cellules de Leydig normales (Cl) dans le tissu interstitiel (TI) et aucune modification de l'épithélium séminifère stratifié (Es) (Figure 27.A et B). Cependant, les groupes de traitement LIN ont révélé de graves altérations de l'épithélium séminifère stratifié avec une réduction de sa densité ainsi que de rares cellules germinales avec des noyaux pycnotiques (Np), l'absence de cellules de Leydig, et une diminution significative du nombre de spermatozoïdes et une vacuolisation (V) (Figure 27.C, D). L'observation microscopique des sections de testicules des rats recevant le traitement combiné (MLT+ LIN) a montré moins d'altérations histologiques dans l'épithélium séminifère stratifié par rapport aux rats traités uniquement par LIN, et donc l'intensité des dommages aux tissus des testicules a été nettement réduite (Figure 27. E, F).

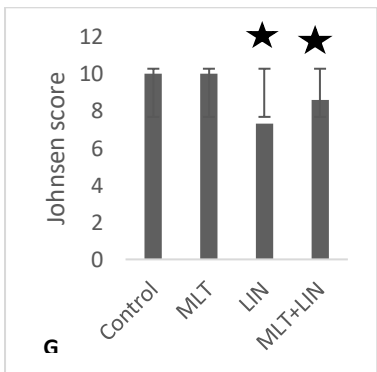
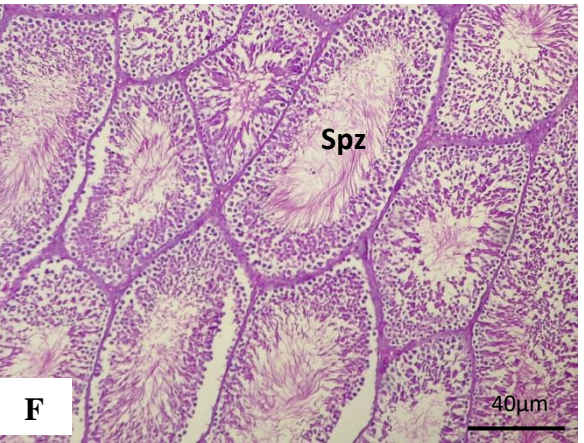
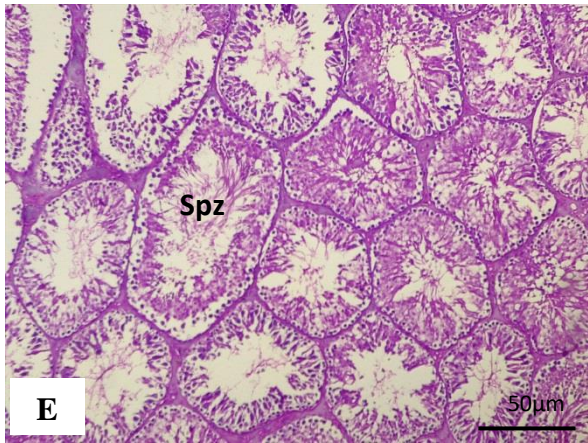
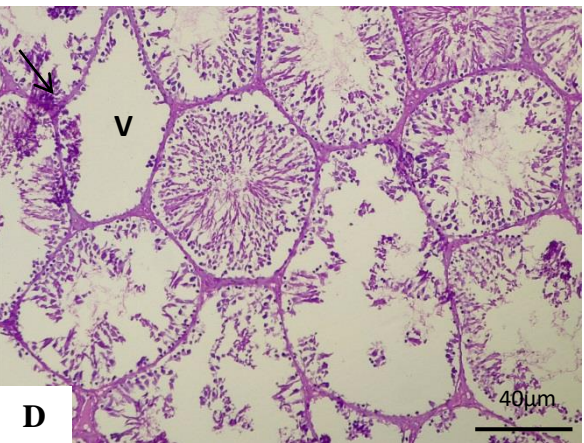
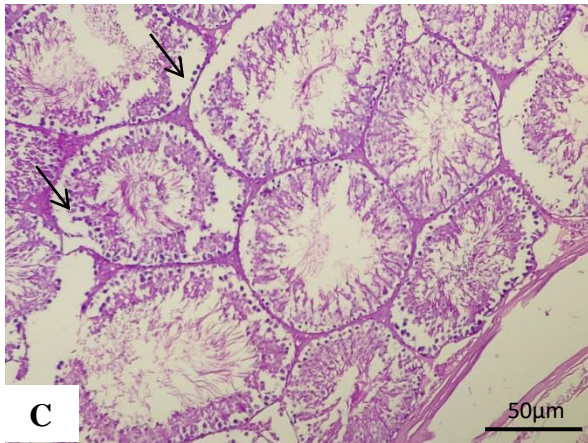
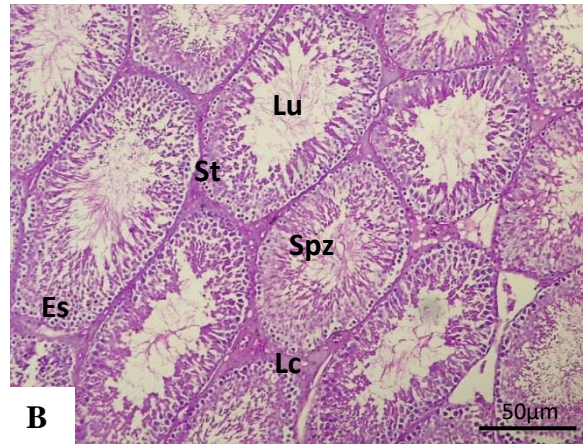
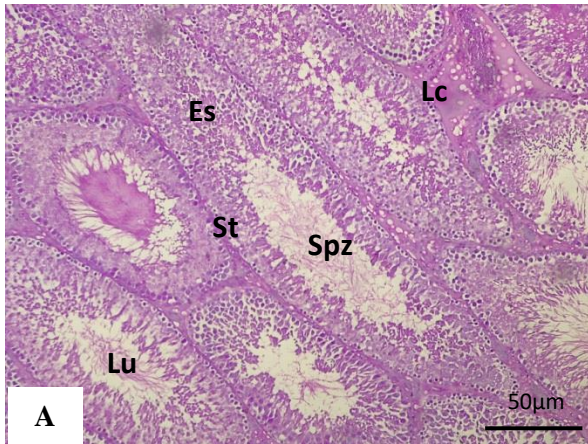
### **2.5.3. Immunohistochimie**

Le marquage immunohistochimique de l'expression de CD45 dans le foie des rats témoins et des rats traités à la mélatonine montre un nombre inférieur de cellules CD 45+ par rapport aux rats traités au linuron (Figure 28. B). On peut supposer que l'augmentation des niveaux de CD 45 est associée à des changements dans le nombre et l'activité fonctionnelle de l'homéostasie ionique cellulaire, qui vise à éliminer la réponse inflammatoire et à restaurer le tissu hépatique après des dommages toxiques. Nos résultats confirment que la co-administration de MLT affecte le profil des hormones stéroïdiennes, puisqu'il y a une diminution de la production de CD 45.

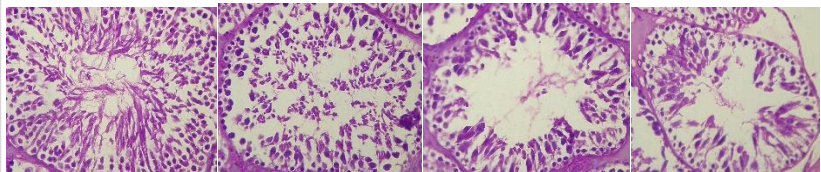


**Figure 26.** Coupes de foie colorées à l'hématoxyline et à l'éosine de rats témoins (A), de rats traités à la mélatonine (B) ou au linuron (C, D, E) et à la mélatonine/luniron (F) pendant 30 jours.

La coloration a été effectuée pour détecter les zones fibrotiques (indiquées par des flèches) ; flèches bleues : celinfiltrats mononucléaires dans le système porte, If : inflammation des cellules hépatiques, NHC : cellule hépatique normale. Les coupes ont été observées à un grossissement de 400 fois (barre d'échelle 50µm- 20 µm).

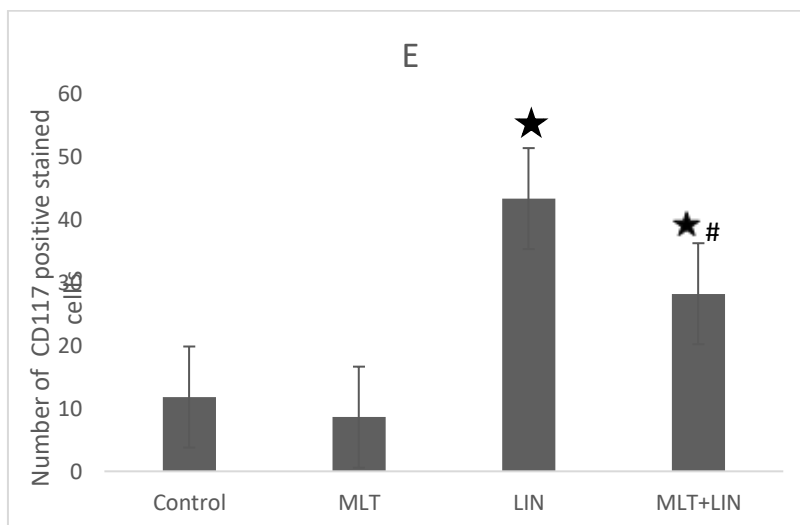
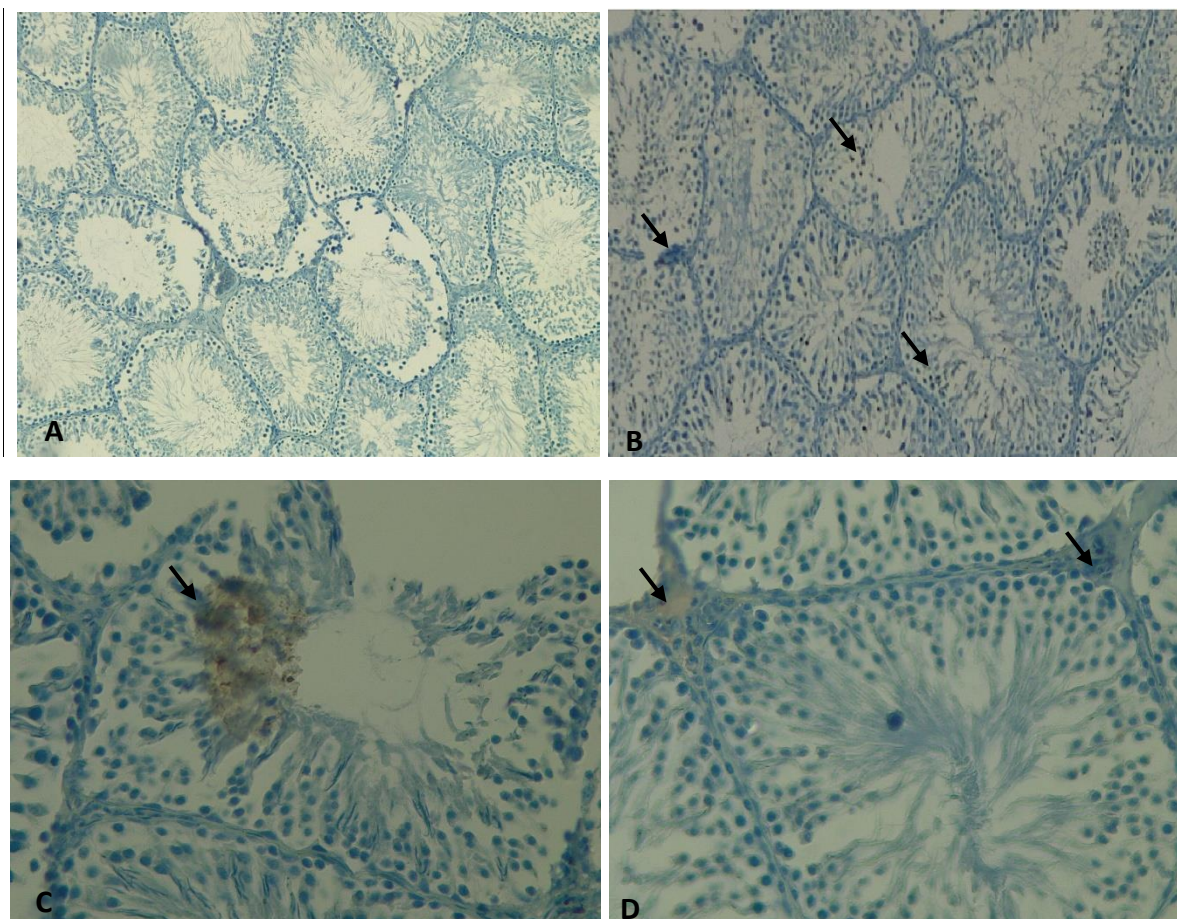


*Différents degrés de lésions des testicules*



**Figure 27.** Coupes histologiques des testicules de rats avec coloration H& E. Contrôle et rats traités à la mélatonine (A et B) pendant 30 jours.

Rats témoins et traités à la mélatonine (A et B), au Luniron (C et D), et traités à la mélatonine et au Luniron (E et F) et scores de Johnsen (G). A et B montrent une structure normale du tube séminifère (St), des spermatozoïdes Spz concentrés dans la lumière (Lu), des cellules de Leydig (LC) dans le tissu interstitiel et de l'épithélium séminifère stratifié (Es). Chez les rats luniron (C, D), la couche est moins dense et présente de rares cellules germinales avec des noyaux pycnotiques (flèche) ; les cellules de Leydig sont pratiquement absentes et présentent une vacuolisation du tubule séminifère (V). Restauration de Es chez les rats traités à la mélatonine (E, F). Les coupes ont été observées à un grossissement de 150 et 600 fois (barres d'échelle : 40 à 50  $\mu\text{m}$ ).



**Figure 28.** Marquage immunohistochimique de l'expression du CD117 dans le foie de rats témoins (A), de rats traités à la mélatonine (B), au luniron (C) et au luniron/mélatonine (D) pendant 30 jours à un grossissement de x 300.

Les sections des rats témoins et des rats traités à la mélatonine présentent un nombre inférieur de cellules CD 117+ par rapport aux rats traités au luniron. L'expression du CD117 a été estimée par le nombre de cellules positivement colorées en utilisant QuPath (E) ; les données sont représentées comme moyennes  $\pm$  SEM (n = 5). \*P < 0,05 par rapport au lot témoin et à celui traité à la MLT, # P < 0,05 comparativement au lot LIN.

## **Discussion :**

L'étude des données sur la toxicité pour le développement constitue une partie importante de l'évaluation des dangers et de la relation dose-réponse pour les contaminants de l'environnement (Makris *et al.*, 2011). Les composés toxiques présents dans l'environnement, tels que les pesticides, peuvent contribuer à l'apparition d'un stress oxydatif dans les systèmes biologiques et d'un déséquilibre métabolique, ce qui peut entraîner divers troubles chez l'homme (Djeffal *et al.*, 2015). La toxicité induite par le LIN semble être médiée par son effet pro oxydant favorisant une hyper production de radicaux libres. Ces derniers pourraient interagir avec les molécules biologiques tel que les protéines membranaires, mitochondriales, les lipides, l'ADN et causer de ce fait un dysfonctionnement du métabolisme cellulaire (Kim *et al.*, 2017).

Les composés toxiques présents dans l'environnement, tels que les pesticides, peuvent contribuer à l'établissement d'un stress oxydatif en générant des radicaux libres, ce qui peut entraîner des effets néfastes, tels que des altérations métaboliques, des troubles neurologiques et des problèmes de fertilité (D'Souza *et al.*, 2017 ; Kim *et al.*, 2017 ; Kadar *et al.*, 2017), Pour prévenir le stress oxydatif, des rapports récents ont démontré les effets protecteurs des antioxydants dans les cellules et les tissus exposés à ces composés (Król *et al.*, 2018 ; Prathima *et al.*, 2020 ; Li *et al.*, 2021).

De nombreuses études ont été menées pour établir le lien entre l'utilisation de pesticides antiandrogènes, de fongicides et les dommages testiculaires, principalement les altérations épидидymaires chez les animaux (Prathima *et al.*, 2020 ; Kadar *et al.*, 2017).

En effet, nos résultats relatifs aux paramètres indicateurs d'un état de stress oxydant à savoir la concentration de l'MDA, des protéines carbonylées, la teneur en GSH d'une part et de la qualité des réponses de certaines enzymes antioxydantes, la catalase, la SOD, la GPx et la GST d'autre part assoit clairement cette hypothèse.

Nos résultats montrent distinctement chez les rats traités par le LIN à raison de 120 mg/kg pendant 30 jours une augmentation significative de la GPx, la GST, des lipoperoxide et des protéines carbonylées associée à une diminution de la concentration du GSH de l'activité de la catalase, de la SOD au niveau du foie et des testicules. En effet l'épuisement significatif des niveaux de GSH confirme l'effet potentiel du LIN à induire un état de stress oxydatif au niveau

hépatique et gonadique. Ce profil de réponse au LIN est en faveur d'un déséquilibre entre les oxydants (radicaux libres) et les antioxydants ce qui est à l'origine de l'installation d'OSS. Plusieurs travaux récents confirment nos résultats ont trouvé de niveaux diminués de la SOD, CAT et le glutathion réduit chez les rats traités par le LIN (Prathima *et al.*, 2020 ).

L'augmentation des taux cellulaires de la peroxydation lipidique via hyper expression du MDA, GPx et du taux des protéines carbonylées, la déplétion du GSH, et diminution de l'activité enzymatique de la CAT, SOD sont des manifestations physiologiques incriminés dans l'apparition des lésions tissulaires. Ce qui confirme les observations histologiques du foie et testicules. L'analyse des paramètres biochimiques a été confirmée par les études histopathologiques. En particulier, les rats exposés au LIN présentaient une infiltration de cellules inflammatoires et une hyperplasie du tissu hépatique.

En effet, on a noté, dans histologie du foie, de graves lésions structurelles caractérisées par une infiltration de cellules mononucléaires, une expansion périportale, un ballonnement et une dégénérescence des hépatocytes, une nécrose, une congestion vasculaire et une dilatation sinusoïdale chez les rats recevant le LIN.

Cette observation a été confirmée par l'expression croissante de marqueurs inflammatoires tels que le CD 117 dans le foie des rats traités au LIN, qui est un marqueur des cellules hématopoïétiques exprimé au cours du processus inflammatoire (Saint-Paul *et al.*, 2016) ; en outre, les rats témoins et les rats exposés à la mélatonine ont montré un nombre plus faible de cellules positives au CD 117 par rapport aux rats traités au LIN. Il a également été montré précédemment que le CD 117 joue un rôle important dans la formation des cellules hématopoïétiques (Dupéré-Minier *et al.*, 2004).

De plus, les résultats de l'étude histologique ont montré une diminution de la densité des cellules germinales et que les cellules de Leydig des rats semblaient être significativement endommagées et parfois absentes après le traitement au LIN. Les cellules de Leydig étant les cellules précurseurs connues où la testostérone est synthétisée, il est probable que les lésions de ces cellules et/ou leur dégradation soient responsables de la réduction de la production de testostérone (Sharpe *et al.*, 2002). Il a également été rapporté que le LIN perturbe le développement des tissus androgéno-dépendants en agissant comme un antagoniste de l'AR et en inhibant la synthèse de la testostérone par le testicule fœtal (K.Svechnikov *et al.*, 2010).

Nos données montrent une augmentation de l'expression de la glycoprotéine CD117 dans les cellules des testicules des rats traités par LIN par rapport au lot témoin et celui traité à la MLT. Nos résultats montrent que la CD117 joue un rôle important dans l'hématopoïèse, la spermatogenèse et la carcinogenèse (Escribano *et al.*, 1998 ;Aucagne ,2010 ;). Potti *et al.* (2004) ont démontré la présence d'une relation entre la surexpression de CD117 et l'exposition aux pesticides chez l'homme. Dans notre étude, nous avons observé une diminution significative du nombre de cellules CD 117-positives dans les testicules de rats traités à la MLT. Ce résultat révèle le rôle important de la MLT dans la régulation de la voie inflammatoire pendant la toxicité testiculaire induite par le linuron et la capacité de la MLT à protéger et à minimiser les dommages à la spermatogenèse.

Selon plusieurs études, le mécanisme le plus fréquent de la toxicité des pesticides est le dommage oxydatif (Trea *et al.*, 2020 ; Tichati *et al.*, 2021 ; Li *et al.*, 2021). La surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) entraîne un état oxydatif dans les testicules et une diminution concomitante des niveaux d'antioxydants, ce qui compromet l'intégrité de la membrane cellulaire et aboutit à une altération de la spermatogenèse, comme cela a été observé chez le rat (Lee *et al.*, 2007 ; Voronkova *et al.*, 2018).

Dans cette étude, la mélatonine (MLT) a été testée pour sa capacité à contrecarrer les effets délétères du Linuron (LIN) sur deux compartiments importants qui assurent la vitalité de l'organisme, à savoir le foie et les testicules. Les résultats de nos expériences démontrent que l'exposition orale au linuron chez le rat peut gravement modifier la structure des organes reproducteurs et la fonction hépatique via l'installation d'un état de stress oxydatif. Ces altérations peuvent être observées au niveau morphologique, biochimique et moléculaire.

Cet effet antioxydant de la MLT est probablement dû à la modulation des capacités antioxydantes de l'organisme relative à la sollicitation de certaines enzymes. De plus, la mélatonine favorise la synthèse du glutathion (GSH) en stimulant l'activité de l'enzyme  $\gamma$ -glutamyl-cystéine synthetase (Urata *et al.*, 1999). Par l'activation des récepteurs de mélatonine (MT) 1 et MT2 elle augmente directement l'expression génique de la glutathione peroxidase (Gpx), de la GSH réductase, de la catalase (CAT) et dismutase, aidant à maintenir le rapport GSH / disulfure de glutathion (GSSG) et un recyclage élevé de GSH (Galano, 2011 ; Reiter *et al.*, 2001; Sharafati-Chaleshtori *et al.*,2017; Tarocco *et al.*, 2019).

Cependant, on a découvert que la mélatonine neutralisait les substances toxiques à base de nitrogènes et supprimait l'enzyme pro-oxydante, l'oxyde nitrique synthase (Bettahi *et al.*, 1996; Storr *et al.*, 2002).

Plusieurs rapports ont mis en cause les dommages oxydatifs comme le mécanisme le plus courant de la toxicité des pesticides (D'Souza, 2017 ; Tichati *et al.*, 2021 ; Li *et al.*, 2021).

L'état oxydatif est produit par la surproduction et l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ce qui entraîne des dommages à l'intégrité de la membrane cellulaire (Voronkova *et al.*, 2018).

Nos résultats ont montré une diminution significative de la teneur en GSH associée à une augmentation de l'activité de la GST, et de la GPx dans le foie et le testicule dans le groupe traité par LIN par rapport au témoin.

Les acides aminés aromatiques avec un groupe thiol sont les plus sensibles à l'oxydation et sont une cible particulière des ROS dans les protéines ; l'oxydation du GSH en GSSG constitue un processus de protection des cellules contre les dommages oxydatifs (Aydin *et al.*, 2010 ; Prathima *et al.*, 2020). De plus, nos résultats ont montré une augmentation des niveaux de PCO et de MDA, cette élévation peut être due à la formation d'adduits entre certains résidus d'acides aminés et des produits de peroxydation lipidique tels que le MDA (Stadt-man et Levine, 2006). Cependant, la supplémentation en MLT a réduit de manière significative les dommages oxydatifs contre une protéine et les niveaux de peroxydation lipidique chez les rats LIN+MLT. Par conséquent, dans notre étude, les effets protecteurs de la MLT sur la toxicité induite par le LIN peuvent être dus à la capacité de la MLT à piéger les composés pro-oxydants ou à renforcer la défense antioxydante enzymatique (Manchester *et al.*, 2015 ; Reiter *et al.*, 2016).

CAT et SOD constituent la première ligne de défense contre les effets néfastes des radicaux libres. Ils convertissent également les radicaux superoxydes en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, un radical beaucoup plus stable. Cette fonction n'est efficace que si elle est suivie par la réduction du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par la CAT (Bhatti *et al.*, 2014). Cela explique pourquoi, dans notre étude, nous avons constaté une diminution de l'activité enzymatique de la CAT et de la SOD chez les rats traités à la LIN par rapport au lot témoin dans tous les tissus cibles. Cette diminution significative des systèmes de défense antioxydants a confirmé l'effet destructeur du LIN sur le stress oxydatif dans les tissus des testicules et du foie. En revanche, l'administration de MLT à des rats recevant du LIN a amélioré le niveau de GSH et restauré les activités enzymatiques de la SOD et de la CAT. Cet effet peut être en partie dû aux propriétés antioxydantes de la MLT (Murawska-Ciałowicz *et al.*, 2011 ; Goc *et al.*, 2017 ; Król *et al.*, 2018).

Les effets protecteurs de la MLT ont également été rapportés par do Nascimento et al. 2019 contre les lésions oxydatives induites par la cyperméthrine dans le foie, le sérum et le cerveau du rat.

Dans ce contexte, on peut conclure que la MLT peut protéger les testicules et le foie des effets néfastes des espèces réactives de l'oxygène produites de manière intense suite à l'exposition au Luniron. Le mécanisme de cet effet protecteur de la MLT implique très probablement l'activation d'enzymes antioxydantes. La MLT pourrait être considérée comme une alternative thérapeutique fiable et sans risque pour la santé. Cela donne une bonne perspective pour étudier les propriétés de cette molécule en tant que piègeur de radicaux libres dans la prévention de l'hypofertilité dépendante du stress oxydatif et causée par l'exposition indirecte aux pesticides.

### **Conclusion et Perspectives**

En ce qui concerne l'étude *in vivo*, nos résultats montrent dans un premier temps que l'administration du LIN à raison de 120 mg/kg de poids corporel chez les rats pendant 30 jours a provoqué des perturbations au niveau de la fonction hépatique au niveau des testicules se traduisant par une augmentation des marqueurs biochimiques de la fonction hépatique et hormonale.

Dans un second temps, nos résultats montrent que le traitement préventif utilisé à savoir la MLT à raison de 10 mg /kg de poids corporel a amélioré la plus part des paramètres étudiés.

Les résultats obtenus nous ont permis de conclure que :

L'administration du LIN chez les rats a engendré des perturbations au niveau de la croissance générale des rats :

- Diminution significative du poids corporel durant la période de traitement
- Augmentation du poids absolu et relatif du foie
- Diminution du poids absolu et relatif des testicules

Des perturbations au niveau de certains paramètres biochimiques biomarqueurs de la fonction hépatique :

- Une augmentation significative de la concentration sérique (la bilirubine totale et des des transaminases)
- Des perturbations au niveau de certains paramètres biochimique biomarqueurs de la fonction lipidique :

- Une augmentation significative de la concentration sérique en triglycérides et LDL chez les rats traités par le LIN par rapport aux rats témoins, ce qui confirme l'effet cytotoxique du LIN
- Une diminution significative de la concentration sérique en testostérone, FSH et LH.
- Une diminution de la teneur en glutathion réduit (GSH), de l'activité enzymatique du superoxyde dismutase (SOD), de la catalase (CAT), associée à une augmentation du taux de la GST, GPx, MDA et de protéines carbonylées dans les organes étudiés.

L'administration de la MLT chez les rats traités par le LIN a provoqué :

- Une amélioration au niveau de la croissance générale des rats
- Une baisse de la peroxydation lipidique et des protéines carbonylées, GST, GPx, de MDA hépatique et testiculaire révélée par une diminution significative de ces paramètres relatifs.
- Une restauration des niveaux des biomarqueurs biochimiques de la fonction hépatique, lipidique et hormonale.
- Un rétablissement du taux du GSH et de l'activité des enzymes antioxydantes.

En perspective, Il s'avère intéressant d'approfondir ces travaux de recherche par :

- L'étude des capacités de détoxification à travers les dosages de tous les éléments de la cascade enzymatique ; les protéines de stress :Heat Shock Protein(HSP).
- L'identification par CPG-SM du contenu de l'extrait aqueux du linuron commercialisé en Algérie pour cerner d'une manière plus fine les différentes actions possibles de ces composés et sa synergie.
- Le prolongement de 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 au niveau du foie et du rein.
- L'élucidation des mécanismes de signalisation impliqués dans le processus inflammatoire, ainsi que les enzymes impliquées dans la production des espèces réactives de l'oxygène avec l'étude de l'expression de certains gènes importants.



## References bibliographies

### A

---

Acosta GM, Martínez-Andújar C, Martínez-Melgarejo PA et al (2022) Protective effect (Safener) of Melatonin on *Vigna Radiata* L. Seedlings in the Presence of the Fungicide Copper Oxochloride. *J Plant Growth Regul.* <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10>

Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105 ,121-126

Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire, 2012. PRVD2012-01: Projet de décision de réévaluation: Linuron. Santé Canada, 27 juillet 2012, 243 pages.

Al-Attar, A. M., Elnaggar, M. H., Almalki, E. A. (2017). Protective effect of some plant oils on diazinon induced hepatorenal toxicity in male rats. *Saudi journal of biological sciences.*24(6), 1162-1171.

Al Housari F, Höhener P, Chiron S. Factors responsible for rapid dissipation of acidic herbicides in the coastal lagoons of the Camargue (Rhône River Delta, France). *Science of The Total Environment.* 2011; 409: 582-587.

Ali Tor, Removal of fluoride from an aqueous solution by using montmorillonite, *Desalination*, Volume 201, Issues 1–3, 2006, Pages 267-276, ISSN 0011-9164, <https://doi.org/10.1016/j.desal.2006.06.003>.

Amiot, M. J., Riollot, C., & Landrier, J. F. (2009). Polyphénols et syndrome métabolique : Polyphenols and metabolic syndrome. *Médecine des Maladies Métaboliques*, 3(5), 476-482.

Andrali, S.S., et al., Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic betacells. *Biochem J*, 2008. 415(1): p. 1-10.

Anfossi, P., Roncada, P., Stracciari, GL, Montana, M., Pasqualucci, C. et Montesissa, C. (1993). Toxicocinétique et métabolisme du linuron chez le lapin : études in vivo et in vitro . *Xénobiotique* , 23 (10), 1113-1123. <https://doi.org/10.3109/00498259309059426>.

Anna Ornostay, Andrew M. Cowie, Matthew Hindle, Christopher J.O. Baker, Christopher J. Martyniuk, Classifying chemical mode of action using gene networks and machine learning: A case study with the herbicide linuron, *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, Volume 8, Issue 4, 2013, Pages 263-274, ISSN 1744-117X, <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2013.08.001>.

Anway MD, Skinner MK. Transgenerational effects of the endocrine disruptor vinclozolin on the prostate transcriptome and adult onset disease. *Prostate*. 2008; 68: 517–529.

Asghari MH, Moloudizargari M, Bahadar H, Abdollahi M (2017) A review of the protective effect of melatonin in pesticide-induced toxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 13(5):545–554.

Asogwa EU, Dongo LN. Problems associated with pesticide usage and application in Nigerian cocoa production: A review. *Afr J Agr Res*. 2009; 4: 675-683.

Aucagne, R. (2010). TIF1 $\gamma$  est un régulateur essentiel de l'hématopoïèse et agit en tant que suppresseur de tumeur dans la leucémie myélomonocytaire chronique (Thèse de doctorat, UNIVERSITE DE BOURGOGNE).

Aurélié Turquetil, Yves Reznik, Les glandes surrénales, rôle et dysfonctionnement, *Actualités Pharmaceutiques*, Volume 58, Issue 585, 2019, Pages 18-22, ISSN 0515-3700, <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2019.02.004>. Alessio, H.M. (1993). Exercise-induced oxidative stress. *Med. Sci. Sports Exerc.* 25, 218-224.

Aydın S, Atukeren P, Cakatay U, Uzun H, Altuğ T (2010) Genderdependent oxidative variations in the liver of aged rats. *Biogerontology* 11(3):335–346.

## B

---

- Bai J, Han H, Wang F, Su L, Ding H, Hu X, Hu B, Li H, Zheng W, Li Y (2017) Maternal linuron exposure alters testicular development in male offspring rats at the whole genome level. *Toxicology* 389:13–20.
- Baldi I, Lebailly P, Jean S, Rougetet L, Dulaurent S, Marquet P. Pesticide contamination of workers in vineyards in France. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*. 2006; 16(2): 115-124.
- Barbier MG. Rapport sur les perturbateurs endocriniens, le temps de la précaution pour l'Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques. 2011. Rapport n°765.
- Baril A, Whiteside M, Boutin C. Analysis of a database of pesticide residues on plants for wildlife risk assessment. *Environmental toxicology and chemistry*. 2005; 24: 360-371.
- Barry R Zirkin, Vassilios Papadopoulos, Cellules de Leydig : formation, fonction et régulation, *Biologie de la reproduction* , volume 99, numéro 1, juillet 2018, pages 101-111, <https://doi.org/10.1093/biolre/ioy059>.
- Bhatti JS, Sidhu IPS, Bhatti GK (2011) Ameliorative action of melatonin on oxidative damage induced by atrazine toxicity in rat erythrocytes. *Mol Cell Biochem* 353(1):139–149.
- Bashan, N., Kovsan, J., Kachko, I., Ovadia, H., Rudich, A. (2009). Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiological reviews*.89(1), 27-71.
- Bassil KL, Vakil C, Sanborn M, Cole DC, Kaur JS, Kerr KJ. Cancer health effects of pesticides: systematic review. *Can Fam Physician*. 2007; 53(10): 1704-1711.
- Beard J. DDT and human health. *Science of the total environment*. 2006; 355: 78-89.
- Beasley V, Brannian R, Cochran J, Cole R. Environmental factors that affect amphibian community structure and health as indicators of ecosystems. US. EPA; 2002.
- Bencheikh, S. (2010). Les pesticides : définition, classification et données de toxicovigilance. *Toxicologie*. 4, 1-16.
- Bending GD, Lincoln SD, Edmondson RN. Spatial variation in the degradation rate of the pesticides isoproturon, azoxystrobin and diflufenican in soil and its relationship with chemical and microbial properties. *Environmental Pollution*. 2006; 139: 279-287.
- Bettahi, I., Pozo, D., Osuna, C., Reiter, R.J., Acuña-Castroviejo, D., Guerrero, J.M., 1996. Melatonin reduces nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. *Journal of pineal research* 20 (4), 205– 210. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.1996.tb00260.x>.

- Beyer, WF., Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity. *Anal Biochem.* 161, 559-66.
- Bhatti GK, Sidhu IPS, Saini NK, Puar SK, Singh G, Bhatti JS (2014) Ameliorative role of melatonin against cypermethrin induced hepatotoxicity and impaired antioxidant defense system in Wistar rats. *IOSR J Environ Sci Toxicol Food Technol* 8(1):39–48.
- Birk, J., Meyer, M., Aller, I., Hansen, H. G., Odermatt, A., Dick, T. P., and Appenzeller-Herzog, C. (2013). Endoplasmic reticulum: reduced and oxidized glutathione revisited. *J Cell Sci.* 126(7), 1604-1617.
- Bischoff K, Mukai M, Ramaiah SK (2018) Liver Toxicity. 239–257. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811410-0.00015-5>.
- Blasco C, Fernandez M, Pico Y, Font G, Manes J. Simultaneous determination of imidacloprid, carbendazim, methiocarb and hexythiazox in peaches and nectarines by liquid chromatography-mass spectrometry. *Anl Chim Acta.* 2002; 461(1): 109-116.
- Board, P. G., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Easteal, S., Jermin, L. S., Schulte, G. K., Rosner, M. H. (2000). Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 275(32), 24798-24806.
- Boatman ND. Impacts of agricultural change on farmland biodiversity in the UK, In: Hester RE, Harrison RM (editors). *Biodiversity under threat*. Cambridge, UK: RSC Publishing ; 2007.p. 1-32.
- Boncrisiani H, Underwood R, Schwarz R, Evans JD, Pettis J, Van Engelsdorp D. Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology.* 2012; 58: 613-620.
- Bongiovanni, B., Ferri, A., Brusco, A., Rassetto, M., Lopez, L. M., de Duffard, A. E., Duffard, R. (2011). Adverse effects of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on rat cerebellar granule cell cultures were attenuated by amphetamine. *Neurotoxicity research.* 19(4), 544-555.
- Boubali, Z (2017). *Biomarqueurs du stress oxydatif*. Université Mohammed v rabat (Doctorat dissertation).
- Bouguerne B. (2012). *Conception et synthèse de dérivés phénoliques hautement fonctionnalisés et étude de leurs propriétés biologiques vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (athérosclérose)*. Thèse de doctorat. Université Toulouse, Toulouse, 198p.

- Bouseba, B. (2011). Etude de la biodégradation de l'herbicide acide 2, 4-dichlorophenoxyacétique (2, 4-d) dans des sols agricoles de la région de Constantine ((Doctoral dissertation).
- Brakes CR, Smith RH. Exposure of non-target small mammals to rodenticides: short-term effects, recovery and implications for secondary poisoning. *Journal of Applied Ecology*. 2005; 42(1): 118-128.
- Buckingham, J.C., Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *Br J Pharmacol*, 2006. 147 Suppl 1: p. S258-68.
- Buege, JA, Aust, SD (1984) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 105:302–310.
- Bukowska B (2006) Toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid - Molecular mechanisms. *Polish Journal of Environmental Studies*. 15:365–374.
- Burger J, Mol F, Gerowitt B. The necessary extent of pesticide use Thoughts about a key term in German pesticide policy. *Crop Prot*. 2008; 27: 343-351.

## C

---

- Calvet R, Barriuso E, Bedos C, Benoit P, Charnay MP, Coquet Y. Les pesticides dans le sol : Conséquences agronomiques et environnementales. France; France Agricole; 2005.Caramori.
- Camard JP. Produits phytosanitaires risques pour l'environnement et la santé; 2010.
- Camarena, V., Wang, G. (2016). The epigenetic role of vitamin C in health and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(8), 1645-1658.
- Caramori, G., Papi, A. (2004). Oxidants and asthma. *Thorax*.59(2), 170-173.
- Carange, J. (2010). Rôle antioxydant et anti-apoptotique des brassinostéroïdes, une nouvelle stratégie de neuroprotection ? (Doctoral dissertation, Université du Québec à Trois-Rivières).
- Carpentieri A, Díaz de Barboza G, Areco V, Peralta López M, Tolosa de Talamoni N. New perspectives in melatonin uses. *Pharmacol Res*. 2012 Apr;65(4):437–44.
- Carriger JF, Rand GM. Aquatic risk assessment of pesticides in surface waters in and adjacent to the everglades and Biscayne National Parks: Hazard assessment and problem formulation. *Ecotoxicology*. 2008; 17(7): 660-679.

- Ceriello, A. (2008). Possible role of oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. *Diabetes care*, 31(Supplement 2), S181-S184.
- Cervantes Gracia, K., Llanas-Cornejo, D., Husi, H. (2017). CVD and oxidative stress. *Journal of clinical medicine*. 6(2), 22.
- Chan, TY et Tang, PL (1995). Effet de la mélatonine sur le maintien de l'homéostasie du cholestérol chez le rat. *Recherche endocrinienne* , 21 (3), 681-696. <https://doi.org/10.1080/07435809509030483>.
- Chen J, Kumar M, Chan W, Berkowitz G, Wetmur JG. Increased influence of genetic variation on PON1 activity in neonates. *Environ Health Perspect*. 2003; 111(11): 1403-1409.
- Chen Z, Stewart PA, Davies S, Giller R, Krailo M, Davis M, Robinson L, Shu Xo. Parental occupational exposure to pesticides and childhood germ-cell tumors. *Am J Epidemiol*. 2005; 162(9): 858-67.
- Chevrier C, Limon G, Monfort C, Rouget F, Garlantézec R, Petit C, Durand G, Cordier S. Urinary biomarkers of prenatal atrazine exposure and adverse birth outcomes in the PELAGIE birth cohort. *Environ Health Perspect*. 2011; 119(7): 1034-41.
- Chiali FZ, Merzouk H, Merzouk SA, Medjdoub A, Narce M (2013) Chronic low level metribuzin exposure induces metabolic alterations in rats. *Pestic Biochem Physiol* 106(1–2):38–44.
- Chubilleau C, Pubert M, Comte J, Giraud J. Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007. *Pesticides et santé*; 2011. Rapport n° 136.
- Cluzeau S, Patunelle MC, Lhoutellier C. *Index phytosanitaire*. Paris: ACTA; 2000.p.644.
- Cohn BA, La Merrill M, Krigbaum NY, Yeh G, Park JS, Zimmermann L, Cirillo PM. DDT Exposure in Utero and Breast Cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015; 16: 18-41.
- Connell, J.M. and E. Davies, The new biology of aldosterone. *J Endocrinol*, 2005. 186(1): p. 1-20.
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., et Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*. 17(10), 1195-1214.
- Cooper J, Dobson H. The benefits of pesticides to mankind and the environment. *Crop Protection*. 2007; 26(9): 1337-1348.
- Cordier S. Evidence for a role of paternal exposures in developmental toxicity. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2008; 102(2): 176-181.

- Counis, R., et al., Gonadotropin-releasing hormone and the control of gonadotrope function. *Reprod Nutr Dev*, 2005. 45(3): p. 243-54.
- Counis R, Laverriere JN, Garrel G, Bleux C, Cohen-Tannoudji J. Gonadotropin-releasing hormone and the control of gonadotrope function. *Reprod Nutr Dev*. 2005; 45(3): 243-54.
- Couteux A, Salaün C. *Index phytosanitaire de l'Association de Coordination Technique Agricole*. 45ème éd. France. Mame ; 2009.
- CPP (Comité de la Prévention et de la Protection). *Risques sanitaires liés à l'utilisation des produits phytosanitaires* ; 2002.
- Cresswell JE, Desneux N, Van Engelsdorp D. Dietary traces of neonicotinoid pesticides as a cause of population declines in honey bees: An evaluation by Hill's epidemiological criteria. *Pest Management Science*. 2012; 68: 819-827.
- Crozier, A., Clifford, M. N., Ashihara, H. (Eds.). (2008). *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. John Wiley & Sons.

## D

---

- Dainat B, Van Engelsdorp D, Neumann P. Colony collapse disorder in Europe. *Environmental Microbiology Reports*. 2012; 4: 123-125.
- Dakhakhni, TH., Raouf, GA., Qusti, SY. (2016). Evaluation of the toxic effect of the herbicide 2, 4-D on rat hepatocytes: an FT-IR spectroscopic study. *European Biophysics Journal*. 45,311–320.
- Damalas CA. Understanding benefits and risks of pesticide use. *Sci Res Essays*. 2009; 4: 945-949.
- Damalas DA, Eleftherohorinos IG. Pesticide Exposure, Safety Issues and Risk Assessment Indicators. *Int J Environ Res Public Health*. 2011; 8: 1402-1419.
- Damstra T. Potential effects of certain persistent organic pollutants and endocrine disrupting chemicals on the health of children. *J Toxicol Clin Toxicol*. 2002; 40(4): 457-465.
- Dar MA, Sultana M, Mir AH, Raina R, Prawez S (2019) Effect of repeated oral administration of Roundup® and ammonium nitrate on liver of wistar rats. *Proc Natl Acad Sci, India Section B: Biol Sci* 89: 505–510. <https://doi.org/10.1007/s40011-017-0961-x>

- Dasgupta S, Meisner C, Wheeler D. Stockpiles of obsolete pesticides and cleanup priorities: A methodology and application for Tunisia. *Journal of Environmental Management*. 2010; 91(4): 824-830.
- De Paula, F.J. and C.J. Rosen, Back to the future: revisiting parathyroid hormone and calcitonin control of bone remodeling. *Horm Metab Res*, 2010. 42(5): p. 299-306.
- Devavry S., (2001). Récepteurs de la mélatonine : pharmacologie du récepteur ovin MT2, identification de leur activité constitutive et développement d'une approche par ARN interférent. Thèse de doctorat : Sciences de la Vie. TOURS : université François - Rabelais, 259P.
- Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev*. 2009; 30(4): 293-342.
- Dinehart SK, Smith LM, McMurry ST, Anderson TA, Smith PN, Haukos DA. Toxicity of a glufosinate- and several glyphosate-based herbicides to juvenile amphibians from the Southern High Plains, USA. *Science of the Total Environment*. 2009; 407(3): 1065-1071.
- Ding H, Zheng W, Han H, Hu X, Hu B, Wang F, Su L, Li H, Li Y (2017) Reproductive toxicity of linuron following gestational exposure in rats and underlying mechanisms. *Toxicol Lett* 266:49–55
- Djeffal, A., Messarah, M., Boumendjel, A., et al. (2015). Protective effects of vitamin C and selenium supplementation on methomyl-induced tissue oxidative stress in adult rats. *Toxicology and industrial health*. 31(1),31-43.
- 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 IndustrialHealth*. 31(1): 31-43.
- Dominguez, M. del C., Lorenzo, N., Barbera, A., Darrasse-Jeze, G., Hernández, MV, Torres, A., ... Padrón, G. (2011). Un ligand peptidique modifié correspondant à un nouvel épitope de la protéine de choc thermique 60 induit des cellules T régulatrices et supprime la réponse pathogène dans un modèle animal d'arthrite induite par un adjuvant. *Auto-immunité* , 44 (6), 471-482. <https://doi.org/10.3109/08916934.2010.550590>.

- Do Nascimento Marinho KS, Neto CJCL, de Sousa Coelho IDD, da Silva MA, Melo MEG, Dos Santos KRP, Aparecido Chagas C, Teixeira AAC, Teixeira VW (2019) Evaluation of the protective effect on exogenous melatonin in adult rats and their offspring exposed to insecticides methomyl and cypermethrin during pregnancy. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 848:503107.
- Don, J. and G. Stelzer, The expanding family of CREB/CREM transcription factors that are involved with spermatogenesis. *Mol Cell Endocrinol*, 2002. 187(1-2): p. 115- 24.
- Dormann CF, Schweiger O, Augenstein I, Zobel M. Effects of landscape structure and land-use intensity on similarity of plant and animal communities. *Global Ecology and Biogeography*. 2008; 16(6): 774-787.
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*. 82(1), 47-95.
- D'Souza UJA (2017) Pesticide toxicity and oxidative stress: a review. *Borneo Journal of Medical Sciences* 11(1):9–19.
- Dubocovich ML, Delagrange P, Krause DN, Sugden D, Cardinali DP, Olcese J. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, Classification, and Pharmacology of G Protein-Coupled Melatonin Receptors. *Pharmacol Rev*. 2010 Sep;62(3):343–80.
- Dupéré-Minier, G., Hamelin, C., Desharnais, P. et al. La diminution du volume apoptotique, l'acidification du pH et l'activation des canaux chlorure pendant l'apoptose nécessitent l'expression de CD45 dans les cellules T HPB-ALL. *Apoptose* 9 , 543-551 (2004). <https://doi.org/10.1023/B:APPT.0000038031.84705.84>.
- Duval M. L'histoire des phytosanitaires de l'origine à 2030. *Santé sécurité au travail*; 2009.
- Dwassy, A. (2014). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques (Doctoral dissertation).

## **E**

---

- Eghbal M, Eftekhari A, Ahmadian E, Azarmi Y, Parvizpur A (2016) A review of biological and pharmacological actions of melatonin: oxidant and prooxidant properties. *J Pharmacol Reports* 1(106):2.
- Eleftherohorinos IG. *Weed Science: Weeds, Herbicides, Environment, and Methods for Weed Management*. Greece : AgroTypos: Athens ; 2008.

Engelking, L.R., Physiology of the endocrine pancreas. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)*, 1997. 12(4): p. 224-9.

Engwa, G. A. (2018). Free Radicals and the Role of Plant Phytochemicals as Antioxidants Against Oxidative Stress-Related Diseases. *Phytochemicals: Source of Antioxidants and Role in Disease Prevention*, 49.

Environmental Protection Agency (2015) EDSP: weight of evidence analysis of potential interaction with the estrogen, androgen or thyroid pathways. In: *Chemical: Linuron*. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC  
EPA,U.S,1955.R.E.D.FactsLinuron.U.S, Environmental Protection Agency ,pp.1-11.

Escribano, L., Ocqueteaub, M., Almeida, J., Orfao, A. et Migue, JFS (1998). Expression de la molécule c-kit (CD117) dans l'hématopoïèse normale et maligne. *Leucémie et lymphome* , 30 (5-6), 459-466.

European Food Safety Authority (2016) Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance linuron. *EFSA J* 14:e04518

Evans, M. D., Dizdaroglu, M., Cooke, M. S. (2004). Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 567(1), 1-61.

Even I, Berta JL, Volatier JL. Evaluation de l'exposition théorique des nourrissons et des enfants en bas âge aux résidus de pesticides apportés par les aliments courants et infantiles. Agence française de sécurité sanitaire des aliments; 2002.

## **F**

---

Fan WQ, Yanase T, Morinaga H, Yanase T, Mori-naga H, Gondo S, Okabe T, Nomura M, Komatsu T, Morohashi KI, Hayes T, Takayanagi R, Nawata H. Atrazine-Induced Aromatase Expression in SF-1 De-pendent: Implications for Endocrine Disruption in Wild-life and Reproductive Cancers in Humans. *Environmental Health Perspectives*. 2007; 115 : 720-727.

- Fauvelle V. Evaluation de la Contamination en Pesticides des Tributaires du Bassin D'arcachon et Développement d'un Echantillonneur Passif Spécifique des Herbicides Anioniques. [Thèse De Doctorat, Chimie Environnementale]. Bordeaux: Université de Bordeaux 1; 2012.
- Favero G, Moretti E, Bonomini F, Reiter RJ, Rodella LF, Rezzani R (2018) Promising Antineoplastic Actions of Melatonin. *Front Pharmacol* 9:1086. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01086>. PMID: 30386235; PMCID: PMC6198052
- Favier, A. (2003). Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. 5,108-115.
- Flock, L., Gunzler, WA. (1984) Analysis of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*.
- Flower KB, Hoppin JA, Lynch CF, Blair A, Knott C, Shore DL, Sandler D. Cancer risk and parental pesticide application in children of Agricultural Health Study participants. *Environ Health Perspect*. 2004; 112(5): 631-635.
- Freeman LEB, Bonner MR, Blair A. Cancer incidence among male pesticide applicators in the agricultural health study cohort exposed to diazinon. *Am J Epidemiol*. 2005; 162(11): 1070-1079.
- Frye C, Bo E, Calamandrei G, Calzà L, Dessì-Fulgheri F, Fernández M, Fusani L, Kah O, Kajta M, Le Page Y, Patisaul HB, Venerosi A, Wojtowicz AK and G Panzica. Endocrine Disrupters: A Review Of Some Sources, Effects And Mechanisms Of Actions On Behavior And Neuroendocrine Systems. *J Neuroendocrinol*. 2012; 24(1): 144–159.

## G

---

- Galano, A., 2011. On the direct scavenging activity of melatonin towards hydroxyl and a series of peroxy radicals. *Physicalchemistrychemicalphysics* : PCCP 13 (15), 7178–7188. <https://doi.org/10.1039/c0cp02801k>.

- Gamón ME, Sáez E, Gil J, Boluda R. Direct and indirect exogenous contamination by pesticides of rice-farming soils in a Mediterranean wetland. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2003; 244: 141–151.
- Ganther, HE. Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis*. 2014 ; 20(19) :1657- 66.
- Gaston, E. (2016). Les polyphénols du vin rouge : des propriétés pour prévenir les cancers. Thèse Pour L'obtention du diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Bordeaux. HAL Id : dumas-01267044.
- Gatignol MC, Étienne M JC. Pesticides et santé. Assemblée nationale sénat, constitution du 4 octobre 1958 .2010. Rapport n° 2463.
- Goc Z, Szaroma W, Kapusta E, Dziubek K (2017) Protective effects of melatonin on the activity of SOD, CAT, GSH-Px and GSH content in organs of mice after administration of SNP. *Chin J Physiol* 60(1):1–10
- Gore AC, Crews D. Environmental endocrine disruption of brain and behavior. In: Pfaff DW, Arnold AP, Etgen A, Fahrbach S, Rubin R, editors. *Hormones, Brain and Behavior*. San Diego: Academic Press; 2009. 1789–1816.
- Gouma S. Biodegradation of mixtures of pesticides by bacteria and white rot fungi. [Phd. Thesis]. UK: School of Health Cranfield University; 2009.
- Gray, L. E., Wilson, V. S., Stoker, T., Lambright, C., et al. (2006). Adverse effects of environmental antiandrogens and androgens on reproductive development in mammals. *International Journal of Andrology*, 29(1), 96–104. discussion105–8.
- Gredilla, R. (2011). DNA damage and base excision repair in mitochondria and their role in aging. *Journal of aging research*.2011.
- Greenlee AR, Arbuckle TE, Chyou PH. Risk Factors for Female Infertility in an Agricultural Region. *Epidemiology*.2003; 14: 429-436.
- Guillemin, R., Hypothalamic hormones a.k.a. hypothalamic releasing factors. *J Endocrinol*, 2005. 184(1): p. 11-28.Goetz, P., and Ghedira, K. (2012). Mécanisme d'action antibactérienne des huiles essentielles. *Phytothérapie anti-infectieuse*.193-208.
- Gülcin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of toxicology*. 86(3), 345-391.

Guzella, L., Pozzoni, F., Giuliano, G., 2000. Field study on mobility and persistence of linuron and monolinuron in agricultural soil. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 78, 87-106.

## H

---

Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. (1974). Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Biol Chem.* 249(22), 7130-7139.

Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., Chapelle, J. P. (2007). Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège.* 62(10), 628-38.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine.* Oxford University Press, USA.

Halliwell, B. (1997). Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutrition Reviews.* 55 : 44–52.

Halliwell B. (1994). Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews.* 52 : 253-265.

Hayyat MS, Safdar ME, Akram M, Iqbal Z (2016) Screening of herbicides for efficient control of broadleaf weeds in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pakistan J Weed Sci Res* 22(3)

Hegazy, A. M., Abdel-Azeem, A. S., Zeidan, H. M., Ibrahim, K., Sayed, E. E. (2018). Hypolipidemic and hepatoprotective activities of rosemary and thyme in gentamicin-treated rats. *Human & experimental toxicology.* 37(4), 420-430.

Henry M, Béguin M, Requier F, Rollin O, Odoux JF, Aupinel P, Aptel J, Tchamitchian S, Decourtye A. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science.* 2012; 336: 348-350.

Hladik ML, Hsiao JJ, Roberts AL. Are neutral chloroacetamide herbicide degradates of potential environmental concern Analysis and occurrence in the Upper Chesapeake Bay. *Environmental Science and Technology.* 2005; 39: 6561-6574.

Hotchkiss AK, Rider CV, Blystone CR, Wilson V S, Hartig PC, Ankley GT. Fifteen years after ‘Wingspread’—Environmental endocrine disruptors and human and wildlife health: Where we are today and where we need to go. *Toxicological Sciences.* 2008;105: 235-259.

Hotchkiss AK, Parks-Saldutti LG, Ostby JS, Lambright C, Furr J, Vandenberg JG, Gray LE Jr (2004) A mixture of the “antiandrogens” linuron and butyl benzyl phthalate alters sexual differentiation of the male rat in a cumulative fashion. *Biol Reprod* 71(6):1852–1861

Hould, R. (1984). *Techniques d’histopathologie et de cytopathologie*. Ed Maloine .19(21) ,225-227.

## I

---

Inzerillo, A.M., M. Zaidi, and C.L. Huang, Calcitonin: the other thyroid hormone. *Thyroid*, 2002. 12(9): p. 791-8.

## J

---

Jaga K, Dharmani C. The epidemiology of pesticide exposure and cancer : a review. *Rev Environ Health*. 2005; 20(1): 15-38

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

Jayaraj, R., Megha, P., Sreedev, P. (2016). Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *Interdisciplinary toxicology*. 9(3-4), 90-100.

J. Fenoll, P. Sabater, G. Navarro, G. Pérez-Lucas, and S. Navarro, “Photocatalytic transformation of sixteen substituted phenylurea herbicides in aqueous semiconductor suspensions: Intermediates and degradation pathways,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 244–245, pp. 370–379, Jan. 2013.

Joshi, Y. B., Praticò, D. (2012). Vitamin E in aging, dementia, and Alzheimer's disease. *Biofactors*.38(2), 90-97.

## K

---

Kadar A, De Sousa G, Peyre L, Wortham H, Doumenq P, Rahmani R (2017) Evidence of in vitro metabolic interaction effects of a chlorfenvinphos, ethion and linuron mixture on human hepatic detoxification rates. *Chemosphere* 181:666–674.

- Kanbur M, Eraslan G, Ince S, Altintas L, Liman BC, Bayram L (2015) The effects of propetamphos, cypermethrin and propetamphos-cypermethrin combination on some biochemical and histopathological parameters in mice. *J KafKas Univ Vet Fakultesi Dergisi* 21: 187–194. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2014.12004>
- Karam, Z., Tuazon, J. (2013). Anatomic and physiologic changes of the aging kidney. *Clinics in geriatric medicine*. 29(3), 555-564.
- Kavlock RJ , Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, Luster M, Mac MJ, Maczka C, Miller R, Moore J, Rolland R, Scott G, Sheehan DM, Sinks T, Tilson HA. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect*. 1996; 104 (Suppl 4): S715-40.
- Kemppainen, R.J. and E.N. Behrend, Adrenal physiology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 1997. 27(2): p. 173-86.
- Khan HAA, Akram W, Shad SA, Lee JJ (2013). Insecticide mixtures could enhance the toxicity of insecticides in a resistant dairy population of *Musca domestica* L. *PloS One* 8: e60929. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060929>
- Kim, K. H., Kabir, E., Jahan, S. A. (2017). Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of the Total Environment*.575, 525-535.
- Koohsari M, Ahangar N, Mohammadi E, Shaki F (2020) Ameliorative effect of melatonin against reproductive toxicity of tramadol in rats via the regulation of oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and apoptosis-related gene expression signaling pathway. *Addict Health* 12(2):118
- Kortenkamp A. Ten years of mixing cocktails: A review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environ Health Perspect*. 2007; 115 (Suppl 1): S98-105.
- Król T, Trybus W, Trybus E, Kopacz-Bednarska A, Kowalczyk M, Brytan M, Paluch M, Antkowiak B, Saracyn M, Król G, Ciechanowska M (2018) Assessment of exogenous melatonin action on mouse liver cells after exposure to soman. *Environ Toxicol Pharmacol* 64:147–154
- K. Svechnikov, G. Izzo , L. Landreh , J. Weisser , et O. Söder.(2010). Perturbateurs endocriniens et fonction des cellules de Leydig. *BioMed Recherche Internationale*. Tome 2010 | Numéro d'article 684504 | <https://doi.org/10.1155/2010/684504>.

Kurutas, E. B. (2015). The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutrition journal*.15(1), 71.

Kvetnansky, R., E.L. Sabban, and M. Palkovits, Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol Rev*, 2009. 89(2): p. 535-606.

## L

---

Lackmann GM, Schaller KH, Angerer J. Organochlorine compounds in breast-fed vs. bottle-fed infants: preliminary results at six weeks of age. *Sci Total Environ*. 2004; 329(1-3):289- 293.

Lambright C, Ostby J, Bobseine K, Wilson V, Hotchkiss AK, Mann PC, Gray LE Jr (2000) Cellular and molecular mechanisms of action of linuron: an antiandrogenic herbicide that produces reproductive malformations in male rats. *Toxicol Sci* 56(2):389–399.

Landrigan P, Garg A, Droller DB. Assessing the effects of endocrine disruptors in the National Children's Study. *Environ Health Perspect*. 2003; 111(13): 1678-1682.

Laukkanen, M. O. (2016). Extracellular superoxide dismutase: growth promoter or tumor suppressor? *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.

LeCluyse, EL, Witek, RP, Andersen, ME et Powers, MJ (2012). Modèles de culture organotypiques du foie : relever les défis actuels des tests de toxicité. *Examens critiques en toxicologie* , 42 (6), 501-548.  
<https://doi.org/10.3109/10408444.2012.682115>.

Lee E, Ahn MY, Kim HJ, Kim IY, Han SY, Kang TS et al (2007) Effect of di (n-butyl) phthalate on testicular oxidative damage and antioxidant enzymes in hyperthyroid rats. *Environ Toxicol* 22:245–255.

Lee WJ, Son M, Chun BC, Park ES, Lee HK, Coble J, Dosemeci M. Cancer mortality and farming in South Korea: an ecologic study. *Cancer Causes Control*. 2008b; 19(5): 505-513.

Leong CT, D'Souza UJ, Iqbal M, Mustapha ZA (2013) Lipid peroxidation and decline in antioxidant status as one of the toxicity measures of diazinon in the testis. *Redox Rep* 18(4):155–164.

- Leon JS Brokken, Annika Adamsson, Jorma Paranko, Jorma Toppari, L'exposition aux antiandrogènes *in utero* perturbe l'expression du hérisson du désert et du facteur de type insuline 3 dans le testicule de rat fœtal en développement, *Endocrinologie*, Volume 150, numéro 1, 1er janvier 2009, pages 445–451, <https://doi.org/10.1210/en.2008-0230>.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186,464-78.
- Li J, Sun BX, Wang DL, Liu Y, Qi JJ, Nie XW, Bai CY, Zhang JB, Liang S (2021) Melatonin ameliorates cypermethrin-induced impairments by regulating oxidative stress, DNA damage and apoptosis in porcine Sertoli cells. *Theriogenology* 167:67–76.
- Lima, J. E., Xavier, D. J., Sakamoto-Hojo, E. T. (2019). Oxidative Stress, DNA Damage and Repair Pathways in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. In *Type 2 Diabetes*. Intech Open.
- Lissalde S. Application et validation des échantillonneurs passifs de type POCIS pour l'échantillonnage passif des pesticides dans les eaux du bassin versant charentais. [Thèse de Doctorat]: Université de Poitiers; 2010.
- Li J, Sun BX, Wang DL, Liu Y, Qi JJ, Nie XW, Bai CY, Zhang JB, Liang S (2021) Melatonin ameliorates cypermethrin-induced impairments by regulating oxidative stress, DNA damage and apoptosis in porcine Sertoli cells. *Theriogenology* 167:67–76.
- Li Z, Zhao J, Liu H, Wang J, Lu W (2020) Melatonin inhibits apoptosis in mouse Leydig cells via the retinoic acid-related orphan nuclear receptor  $\alpha/p53$  pathway. *Life Sci* 246:117431
- Lohmeier, T.E., Neurohypophysial hormones. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003. 285(4): p. R715-7. Liu, H., Xu, H., Huang K. (2017). Selenium in the prevention of atherosclerosis and its underlying mechanisms. *Metallomics*. 9,21-37.
- Lu C, Barr DB, Pearson MA, Waller LA. Dietary intake and its contribution to longitudinal organophosphorus pesticide exposure in urban/suburban children. *Environ Health Perspect.* 2008; 116(4): 537-542.

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

Ludwig S. Comportement d'un "Perturbateur Endocrinien" et d'un "non Perturbateur Endocrinien" vis à vis de la toxicité testiculaire chez le rat. [Thèse de Doctorat, Agricultural sciences]. Paris: Université Paris Sud; 2011. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186,464-78.

Łuczaj, W., Gęgotek, A., Skrzydlewska, E. (2017). Antioxidants and HNE in redox homeostasis. *Free Radical Biology and Medicine.*111, 87-101.

Lushchak, V. I., Matviishyn, T. M., Husak, V. V., Storey, J. M., Storey, K. B. (2018). Pesticide toxicity: a mechanistic approach. *EXCLI journal.*17, 1101.

## M

---

Magierowski M, Jasnos K, Pawlik M, Krzysiek-Maczka G, PtakBelowska A, Olszanecki R, Kwiecien S, Korbut R, Brzozowski T (2013) Role of angiotensin-(1–7) in gastroprotection against stress-induced ulcerogenesis. The involvement of mas receptor, nitric oxide, prostaglandins, and sensory neuropeptides. *J Pharmacol Exp Ther* 347:717–726.

Maire, M. A., Rast, C., Landkocz, Y., Vasseur, P. (2007). 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid: effects on Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation, c-Myc expression, DNA damage and apoptosis. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.*631(2), 124-136.

Manchester LC, Coto-Montes A, Boga JA, Andersen LPH, Zhou Z, Galano A, Vriend J, Tan DX, Reiter RJ (2015) Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. *J Pineal Res* 59(4):403–419.

Maran, R.R., Thyroid hormones: their role in testicular steroidogenesis. *Arch Androl*, 2003. 49(5): p. 375-88.

- Marek, M., Shaik, T. B., Jung, M., Sippl, W., Pierce, R. J., & Romier, C. (2016). Combattre les maladies négligées en ciblant sélectivement leurs enzymes épigénétiques: le cas de la désacétylase 8 (HDAC8) de *Schistosoma mansoni*. *Biologie Aujourd'hui*, 210(4), 311-320.
- Marklund, S. L. (1982). Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 79(24), 7634-7638.
- Malhotra S, Sawhney G and Pandhi P (2004) The therapeutic potential of melatonin: a review of the science. *Medscape General Medicine* 6(2): 46–52.
- Marieb, E., *Anatomie et Physiologie humaines*. Vol. 2e édition. 1993, Saint-Laurent (Canada): De Boeck Université. 547-551.
- Mariyono J. Direct and indirect impacts of integrated pest management on pesticide use: A case of rice agriculture in Java, Indonesia. *Pest Manag Sci*. 2008; 64:1069-1073.
- Marreiro, D., Cruz, K., Morais, J., Beserra, J., Severo, J., de Oliveira, A. (2017). Zinc and oxidative stress: current mechanisms. *Antioxidants*. 6(2), 24.
- Matthews GA. *Pesticides: Health, Safety and the Environment*. Oxford, UK: Blackwell Publishing; 2006.
- Marx-Stoelting P, Niemann L, Ritz V, Ulbrich B, Gall A, Hirsch-Ernst KI, Solecki PR (2014) Assessment of three approaches for regulatory decision making on pesticides with endocrine disrupting properties. *Regul Toxicol Pharmacol* 70(3):590–604.
- Mediavilla, M.D., et al., Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin. *Curr Med Chem*, 2010. 17(36): p. 4462-81.
- Mansour, SA., Mohamed RI., Ali, AR. (2017). Ameliorating effect of selenium against deltamethrin induced hepato-renal dysfunction and oxidative stress to pregnant rats and their offspring. *Journal of Toxicology and Pharmacology*.1(002).
- Medjdoub A. Evaluation des effets métaboliques d'un gavage par les pesticides (Mancozèbe, Métribuzine) chez le rat Wistar. [Thèse de Doctorat, Physiologie et Biochimie de la Nutrition]. Tlemcen: Université Abou Bekr Belkaid; 2013.

- Mellina da Silva Simões, Livia Bracht, Angela Valderrama Parizotto, Jurandir Fernando Comar, Rosane Marina Peralta, Adelar Bracht, The metabolic effects of diuron in the rat liver, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, Volume 54, 2017, Pages 53-61, ISSN 1382-6689, <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.06.024>.
- Menard C. Thèse Mélatonine, agonistes mélatoninergiques et luminothérapie dans les troubles du sommeil et du décalage horaire. UFR Nantes; 2011.
- M. Makris , G. Calizzanib, K. Fischerc, E.A. Gilmana, C.R.M. Hayd, R. Lassilae, T. Lambertf , C.A. Ludlamg, P.M. Mannuccih. EUHASS: The European Haemophilia Safety Surveillance system. *Thrombosis Research* 127 Suppl. 2 (2011) S22–S25. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(10\)70150-X](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(10)70150-X).
- Motohashi, N., Gallagher, R., Anuradha, V., Gollapudi, R. (2017). Co-enzyme Q10 (Ubiquinone): It's Implication in Improving the Life Style of the Elderly. *Med Clin Rev.* 3(S1), 10.
- Mukherjee S, Koner BC, Ray S, Ray A. Environmental contaminants in pathogenesis of breast cancer. *Indian J Exp Biol.* 2006; 44(8): 597-617.
- Murawska-CiaŁowicz E, Jethon Z, Magdalan J, Januszewska L, Podhorska-OkoŁów M, Zawadzki M, Zawadzki M, Sozański T, Dzięgiel P (2011) Effects of melatonin on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in the liver, kidneys and brain of rats administered with benzo (a) pyrene. *Exp Toxicol Pathol* 63(1–2):97–103
- Murray., Bender. ,Bothan., Kennlly., Rodwell., wiel. (2013). *Biochimie de Harper* 5 édition. De Boech supérieure s.a Paris ; p, 561.

## N

---

- Nakbi, A., Tayeb, W., Dabbou, S., Chargui, I., Issaoui, M., Zakhama, A., Miled, A., Hammami, M. (2012). Hypolipidemic and antioxidant activities of virgin olive oil and its fractions in 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-treated rats. *Nutrition*. 28,81-91.
- Narayananasamy P. *Postharvest Pathogens and Disease Management*. New York: John Wiley & Sons; 2006.
- Nicolai B, *et al*. Species protection: Red Kite – The current situation in Germany (Sachsen-Anhalt). *Naturschutz und Landschaftsplanung*.2009; 41(3): 69-77.
- Nissar, S., Sameer, A. S., Rasool, R., Chowdri, N. A., Rashid, F. (2017). Glutathione S transferases: Biochemistry, polymorphism and role in colorectal carcinogenesis. *J. Carcinog. Mutagen*. 8(2), 287.
- Nussey S, Whitehead S. *Endocrinology: An Integrated Approach*. London: Boshier; 2006.
- Neumeister, L. (2014). *The risks of the herbicide 2, 4-D*. Munich: Technobiosafety.

## O

---

- Oerke EC, Dehne HW. Safe guarding production-losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Prot*. 2004; 23: 275-285.
- Olukole SG, Ajani SO, Ola-Davies EO, Lanipekun DO, Aina OO, Oyeyemi MO, Oke BO (2018) Melatonin ameliorates bisphenol A-induced perturbations of the prostate gland of adult Wistar rats. *Biomed Pharmacother* 105:73–82
- Omar Abdel-Wahab, Mazhar Adli, Lindsay M. LaFave, Jie Gao, Todd Hricik, Alan H. Shih, Suveg Pandey, Jay P. Patel, Young Rock Chung, Richard Koche, Fabiana Perna, Xinyang Zhao, Jordan E. Taylor, Christopher Y. Park, Martin Carroll, Ari Melnick, Stephen D. Nimer, Jacob D. Jaffe, Iannis Aifantis, Bradley E. Bernstein, Ross L. Levine, ASXL1 Mutations Promote Myeloid Transformation through Loss of PRC2-Mediated Gene Repression, *Cancer Cell*, Volume 22, Issue 2, 2012, Pages 180-193, ISSN 1535-6108, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.06.032>.

O'Shea, P.J. and G.R. Williams, Insight into the physiological actions of thyroid hormone receptors from genetically modified mice. *J Endocrinol*, 2002. 175(3): p. 553-70.

Ozcan, T., Akpinar-Bayazit, A., Yilmaz-Ersan, L., Delikanli, B. (2014). Phenolics in human health. *International Journal of chemical engineering and applications*. 5(5), 393.

## **P**

---

Patterson, M. Linuron: Analysis of risks to endangered and threatened salmon and steelhead. Technical report prepared for Environmental Field Branch, Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency: Washington, DC, 2004.

Pearce MS, Parker L. Paternal employment in agriculture and childhood kidney cancer. *Pediatr Hematol Oncol*. 2000; 17(3): 223-230.

Perry MJ. Effects of environmental and occupational pesticide exposure on human sperm: a systematic review. *Hum Reprod Update*. 2008; 14(3): 233-242.

Pest Management Regulatory Agency (2014) Annual Report 2012– 2013. Pest Management Regulatory Agency, Ottawa, ON, Canada.

Pham-Huy, L. A., He, H., Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science: IJBS*. 4(2), 89.

Phaniendra, A., Jestadi, D. B., Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry* 30(1), 11-26.

Picó Y, Font G, Mañes J. *Handbook of food analysis*. 2<sup>nd</sup> Ed. New York : Nollet, Marcel Dekker; 2004.p.1072.

Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., ... and Bitto, A. (2017). Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.2017.

Postle JK, Rheineck BD, Allen PE, Baldock JO, Cook CJ, Zogbaum R, Vandebrook JP. Chloroacetanilide herbicide metabolites in Wisconsin groundwater: 2101 Survey results. *Environmental Science and Technology*. 2004; 38: 5339-5343.

- Potti, A., Moazzam, N., Langness, E. *et al.* Détermination immunohistochimique de la surexpression de HER-2/neu, c-Kit (CD117) et du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) dans le mélanome malin. *J Cancer Res Clin Oncol* **130**, 80-86 (2004). <https://doi.org/10.1007/s00432-003-0509-8>.
- Power AG. Ecosystem services and agriculture: Trade offs and synergies. *Phil Trans R Soc.* 2010; 365: 2959-2971.
- Powers, S. K., Jackson, M. J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological reviews.* 88(4), 1243-1276.
- Prathima P, Venkaiah K, Daveedu T, Pavani R, Sukeerthi S, Gopinath M, Sainath SB (2020)  $\alpha$ -Lipoic acid protects testis and epididymis against linuron-induced oxidative toxicity in adult rats. *Toxicological Research* 36(4):343–357
- Prosser P, Hart ADM. Assessing potential exposure of birds to pesticide-treated seeds. *Ecotoxicology.* 2005; 14: 679-691.
- Provost D, Cantagrel A, Lebailly P, Jaffré A, Loyant V, Loiseau H, Vital A, Brochard P, Baldi I. Brain tumours and exposure to pesticides: a case-control study in southwestern France. *Occup Environ Med.* 2007; 64(8): 509-14.
- Puttanna, G. S., Nayak, S., Ravi, M., Ravishankar, B. (2016). Nephroprotective activity of *Amomum subulatum* seeds against cypermethrin induced nephrotoxicity in rats. *The Journal of Phytopharmacology.* 5(4): 145-149.

## Q

---

- Quesada, I., et al., Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *J Endocrinol*, 2008. 199(1): p. 5-19.
- Quinzii, C. M., DiMauro, S., Hirano, M. (2007). Human coenzyme Q 10 deficiency. *Neurochemical research.* 32(4-5), 723-727.

## R

---

- Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical interventions in aging.* 2(2), 219.
- Reeg, S., Grune, T. (2015). Protein oxidation in aging: does it play a role in aging progression? *Antioxidants & redox signaling.* 23(3), 239-255.

Regrigny O. Mélatonine et autorégulation du débit sanguin cérébral, 2000.

Reiter RJ, Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Alatorre-Jimenez M, Qin L (2016) Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J Pineal Res* 61(3):253–278

Reiter RJ, Tan DX, Fuentes-Broto L (2010) Melatonin: a multitasking molecule. *Prog Brain Res* 181:127–151.

Reiter, R.J., et al., Melatonin and reproduction revisited. *Biol Reprod*, 2009. 81(3): p. 445-56.

Reiter, R.J., Acuña-Castroviejo, D., Tan, D.X., Burkhardt, S., 2001. Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Annals of the New York Academy of Sciences* 939, 200–215.

Revathy, K. S., Umasuthan, N., Lee, Y., Choi, C. Y., Whang, I., Lee, J. (2012). First molluscan theta-class Glutathione S-Transferase: Identification, cloning, characterization and transcriptional analysis post immune challenges. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 162(1-3), 10-23.

Reynolds P, Von Behren J, Gunier RB, Goldberg DE, Hertz A, Harnly M. Childhood cancer and agricultural pesticide use: an ecologic study in California. *Environ Health Perspect*. 2002; 110 (3): 319-324.

Richard M. Sharpe, Bronwen Martin, Keith Morris, Irene Greig, Chris McKinnell, Alan S. McNeilly, Marion Walker, Alimentation du nourrisson avec du lait maternisé au soja : effets sur les testicules et sur les taux de testostérone dans le sang chez les ouistitis pendant la période de testicule néonatal activité, *Human Reproduction* , Volume 17, Numéro 7, juillet 2002, Pages 1692-1703, <https://doi.org/10.1093/humrep/17.7.1692>

Richards, J.S. and S.A. Pangas, The ovary: basic biology and clinical implications. *J Clin Invest*, 2010. 120(4): p. 963-72.

Rjeibi, I., Ben Saad, A., and Hfaiedh, N. (2016). Oxidative damage and hepatotoxicity associated with deltamethrin in rats: the protective effects of *Amaranthus spinosus* seed extract. *Biomedicine and pharmacotherapy*.84, 853–860.

- Rocha CS, Rato L, Martins AD, Alves MG, Oliveira PF (2015) Melatonin and male reproductive health: relevance of darkness and antioxidant properties. *Curr Mol Med* 15(4):299–311
- Rodvall Y, Dich J, Wiklund K. Cancer risk in offspring of male pesticide applicators in agriculture in Sweden. *Occup Environ Med*. 2003; 60(10): 798-801.
- Rogan WJ, Ragan NB. Some evidence of effects of environmental chemicals on the endocrine system in children. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2007; 210(5): 659-667.
- Rojas AR, Ojeda ME, Barraza YXO. Congenital malformations and pesticides exposures. *Rev Med Chil*. 2009; 128 (4): 399-404.
- Rosol, T.J., et al., Adrenal gland: structure, function, and mechanisms of toxicity. *Toxicol Pathol*, 2001. 29(1): p. 41-8.
- Rouvalis A, Karadima C, Zioris IV, Sakkas VA, Albanis T, Iliopoulou-Georgudaki J. Determination of pesticides and toxic potency of rainwater samples in western Greece. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2009; 72: 828-833.

## **S**

---

- Saint-Paul, L., Nguyen, C. H., Bastie, J. N., Delva, L., & Quéré, R. (2016). CD45, une protéine phosphatase cible importante dans le traitement des leucémies aiguës myéloblastiques. *médecine/sciences*, 32(12), 1051-1053.
- Santos,S.M.,Videira,R.A.,Fernandes,M.A.,Santos,M.S.,Moreno,A.J.,Vicente.J.A.,Jurado,A.S.,2014.Toxicity of the herbicide linuron as assessed by bacterial and mitochondrial model systems. *Toxicol.Vitro* 28,932-939.
- Sarigiannis DA, Hansen U. Considering the cumulative risk of mixtures of chemicals - A challenge for policy makers. *Sarigiannis and Hansen Environmental Health*. 2012; 11(Suppl 1): S18, 1-12.
- Saunders M, Fox D, Salisbury C, Strokes V, Palmer A, Preece A. Placental transfer and foetal uptake of pesticides. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2004; 197: 341.

- Schuster, C., [Sites and mechanisms of action of melatonin in mammals: the MT1 and MT2 receptors]. *J Soc Biol*, 2007. 201(1): p. 85-96.
- Senoglu, M., Nacitarhan, V., Kurutas, E. B., Senoglu, N., Altun, I., Atli, Y., Ozbag, D. (2009). Intraperitoneal Alpha-Lipoic Acid to prevent neural damage after crush injury to the rat sciatic nerve. *Journal of brachial plexus and peripheral nerve injury*.4(1), 22.
- Senoglu, M., Nacitarhan, V., Kurutas, E. B., Senoglu, N., Altun, I., Atli, Y., Ozbag, D. (2009). Intraperitoneal Alpha-Lipoic Acid to prevent neural damage after crush injury to the rat sciatic nerve. *Journal of brachial plexus and peripheral nerve injury*.4(1), 22.
- Shahidi, F., Yeo, J. (2018). Bioactivities of phenolics by focusing on suppression of chronic diseases: A review. *International journal of molecular sciences*. 19(6), 1573.
- Shalaby SEM, Abdou GY. The influence of soil microorganisms and bio- or - organic fertilizers on dissipation of some pesticides in soil and potato tube. *Journal of Plant Protection Research*. 2010; 50(1): 86-92.
- Sharafati-Chaleshtori, R., Shirzad, H., Rafieian-Kopaei, M., Soltani, A., 2017. Melatonin and human mitochondrial diseases. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences* 22, 2. <https://doi.org/10.4103/1735-1995.199092>.
- Sharma A, Kumar V, Shahzad B, Tanveer M, Sidhu GPS, Handa N, Kohli SK, Yadav P, Bali AS, Parihar RD, Dar OI, Singh K, Jasrotia S, Bakchi P, Ramakrishnan M, Kumar S, Bhardwaj R, Spirhanzlova Thukral AK (2019) Worldwide pesticide usage and its impacts on the ecosystem. *SN Applied Sciences* 1(11):1–16
- Singh, M., Kapoor, A., Bhatnagar, A. (2015). Oxidative and reductive metabolism of lipid-peroxidation derived carbonyls. *Chemico-biological interactions*. 234, 261-273.
- Singh M and Jadhav HR (2014) Melatonin: functions and ligands. *Drug Discovery Today* 19(9): 1410–1418.
- Sniegowski, K., Bers, K., Ryckeboer, J., Jaeken, P., Spanoghe, P., Springael, D., 2001. Robust linuron degradation in on-farm biopurification systems exposed to sequential environmental changes. *Appl. Environ. Microbiol.* 77.6614-6621.

- Soares WL, Porto MFD. Estimating the social cost of pesticide use: An assessment from acute poisoning in Brazil. *Ecol Econ.* 2009; 68: 2721-2728.
- Sophie Ambroise-Thomas. La mélatonine : rôle biologique, intérêt et limites de l'usage thérapeutique. *Sciences pharmaceutiques.* 1998. ffdumas-01613566f.
- Sparling DW, Feller GM. Toxicity of two insecticides to California, USA, anurans and its relevance to declining amphibian populations. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 2009; 28(8): 1696–1703.
- Srinivasan V, Spence WD, Pandi-Perumal SR, et al. (2009) Melatonin and human reproduction: shedding light on the darkness hormone. *Gynaecology and Endocrinology* 25: 779–785.
- S. Royant-Parola, La mélatonine : un hypnotique miracle ?, *European Psychiatry*, Volume 30, Issue 8, Supplement, 2015, Page S82, ISSN 0924-9338, <https://doi.org/10.1016/j.eurpsy.2015.09.364>.
- Stadtman ER, Levine RL (2006) Oxidatively modified proteins and proteomic technologies. In: Dalle-Donne I, Scaloni A, Butterfeld DA (Eds.), *Redox Proteomics*. Wiley, Hoboken, pp. 1–23.
- Stadtman, E. R., Levine, R. L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino acids.* 25(3-4), 207-218.
- Stelmach, I., Grzelewski, T., Bobrowska-Korzeniowska, M., Kopka, M., Majak, P., Jerzynska, J., ... and Wąsowicz, W. (2014, May). The role of zinc, copper, plasma glutathione peroxidase enzyme, and vitamins in the development of allergic diseases in early childhood: The Polish mother and child cohort study. In *Allergy & Asthma Proceedings*.35(3).
- Storr, M., Koppitz, P., SibaeV, A., Saur, D., Kurjak, M., Franck, H., Schusdziarra, V., Allescher, H.-D., 2002. Melatonin reduces non-adrenergic, non-cholinergic relaxant neurotransmission by inhibition of nitric oxide synthase activity in the gastrointestinal tract of rodents in vitro. *Journal of pineal research* 33 (2), 101–108. <https://doi.org/10.1034/j.1600-079x.2002.02909.x>.
- Strom SS, Gu Y, Gruschkus SK. Risk factors of myelodysplastic syndromes: a case-control study. *Leukemia.* 2005; 19(11): 8-12.

# T

---

- Tabb MM, Blumberg B. New modes of action for endocrine-disrupting chemicals. *Mol Endocrinol.* 2006; 20(3): 475-82.
- Tadeo, J. L. (2008). *Analysis of pesticides in food and environmental samples.* CRC Press.
- Talmage, R.V. and H.T. Mobley, Calcium homeostasis: reassessment of the actions of parathyroid hormone. *Gen Comp Endocrinol*, 2008. 156(1): p. 1-8.
- Tamsyn M. Uren Webster, Mandy H. Perry et Eduarda M. Santos. L'herbicide Linuron inhibe la biosynthèse du cholestérol et induit Réponses au stress cellulaire chez la truite. *Sciences et technologies environnementales* **2015** 49 (5), 3110-3118
- Tan, B. L., Norhaizan, M. E., Winnie-Pui-Pui Liew, H. S. (2018). Antioxidant and oxidative stress: A mutual interplay in age-related diseases. *Frontiers in pharmacology.*9.
- Tarocco, A., Caroccia, N., Morciano, G., Wieckowski, M.R., Ancora, G., Garani, G., Pinton, P., 2019. Melatonin as a master regulator of cell death and inflammation: molecular mechanisms and clinical implications for newborn care. *Cell death & disease* 10 (4), 317. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1556-7>.
- Tayeb, W., Nakbi A., Cheraief, I., Miled, A., Hammami, M. (2013). Alteration of lipid status and lipid metabolism, induction of oxidative stress and lipid peroxidation by 2, 4-dichlorophenoxyacetic herbicide in rat liver. *Toxicology mechanisms and methods.* 23(6), 449-458.
- Thanan, R., Oikawa, S., Hiraku, Y., Ohnishi, S., Ma, N., Pinlaor, S., ... and Murata, M. (2015). Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. *International journal of molecular sciences.* 16(1), 193-217.
- Therond, P. (2006). Oxidative stress and damages to biomolecules (lipids, proteins, DNA). In *Annales pharmaceutiques françaises.* 64(6), 383-389.
- Tichati L, Trea F, Ouali K (2021) The antioxidant study proprieties of *Thymus munbyanus* aqueous extract and its beneficial effect on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-induced hepatic oxidative stress in albino Wistar rats. *Toxicol Mech Methods* 31(3):212–223
- Touitou Y. *Mélatonine : de la physiologie à la pathologie.* EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Endocrinologie-Nutrition, 10-025-A-10, 2008.

Touitou Y. The effect of ageing on melatonin secretion: clinical aspects. In: Redfern P, editor. Chronotherapeutics. London: Pharmaceutical Press; 2003. p. 369-91.

Trea F, Tichati L, Ouali K (2020) Protective effect of *Thymus munbyanus* aqueous extract against 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-induced nephrotoxicity in Wistar rats. *Drug Chem Toxicol.* <https://doi.org/10.1080/01480545.2020.1809669>.

## U

---

Umasuthan, N., Revathy, K. S., Lee, Y., Whang, I., Choi, C. Y., Lee, J. (2012). A novel molluscan sigma-like glutathione S-transferase from Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: Cloning, characterization and transcriptional profiling. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 155(4), 539-550.

Upadhyaya, A. M., Rao, M. V., D Jhala, D. (2018). Ameliorative effects of melatonin against 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid toxicity in kidney of mice: a histological study. *Asian J Pharm Clin Res.* 11(1), 78-82.

Urata, Y., Honma, S., Goto, S., Todoroki, S., Iida, T., Cho, S., ... & Kondo, T. (1999). Melatonin induces  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(7-8), 838-847.

Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., Mahajan, R. T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current neuropharmacology*. 7(1), 65-74.

## V

---

Valery PC, McWhirter W, Sleight A, Williams G, Bain C. Farm exposures, parental occupation, and risk of Ewing's sarcoma in Australia: a national case-control study. *Cancer*. 2002; 13(3): 263-270.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 39(1), 44-84.

- Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*. 160(1), 1-40.
- Vanessa Fiorentino, T., Prioletta, A., Zuo, P., Folli, F. (2013). Hyperglycemia-induced oxidative stress and its role in diabetes mellitus related cardiovascular diseases. *Current pharmaceutical design*.19(32), 5695-5703.
- Van Maele-Fabry G, Libotte V, Willems J, Lison D. Review and meta-analysis of risk estimates for prostate cancer in pesticide manufacturing workers. *Cancer Causes Control*. 2006; 17: 353-73.
- Van Zelm R, Huijbregts MAJ, Posthuma L, Wintersen A, Van de Meent D. Pesticide ecotoxicological effect factors and their uncertainties for freshwater ecosystems. *International Journal Life of Cycle Assessment*. 2009; 14: 43-51.
- Verro R, Finizio A, Otto S, Vighi M. Predicting pesticide environmental risk in intensive agricultural areas. II: Screening level risk assessment of individual chemicals in surface waters. *Environmental Science and Technology*. 2009 43(2): 522- 529.
- Vigourou VA. Niveau d'imprégnation de la population générale aux pesticides : sélection des substances a mesuré en priorité. Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et de travail; 2006.
- Vonesh JR, Kraus JM. Pesticide alters habitat selection and aquatic community composition. *Oecologia*. 2009; 160(2): 379-385.
- Voronkova YS, Voronkova OS, Gorban VA, Holoborodko KK (2018) Oxidative stress, reactive oxygen species, antioxidants: a review. *Ecology and Noospherology* 29(1):52–55.
- Vosges M. Effets neuroendocrines des perturbateurs endocriniens chez le poisson zèbre (*Danio rerio*): Etude du système à GnRH. Evaluation des risques écotoxicologiques. [Thèse de Doctorat]. Tours : Université Verneuil-en-Halatte; 2010.

## W

---

- Wagner, M.S., S.M. Wajner, and A.L. Maia, Is there a role for thyroid hormone on spermatogenesis? *Microsc Res Tech*, 2009. 72(11): p. 796-808.
- Wallace, D. C. (2008). Mitochondria as chi. *Genetics*.179(2), 727-735.

- Waring RH, Harris RM. Endocrine disrupters: a human risk. *Mol Cell Endocrinol*. 2005; 244(1-2): 2-9.
- Web 1. Dorothée B : Tout savoir sur la mélatonine. [PDF]. (298 juin 218) ,disponible sur : [https://www.doctissimo.fr/html/sante/mag\\_2001/mag0406/dossier/sa\\_3769\\_melatonine.htm](https://www.doctissimo.fr/html/sante/mag_2001/mag0406/dossier/sa_3769_melatonine.htm).
- Weckbecker G, Cory JG. Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-dependent mouse leukaemia L 1210 cells in vitro. *Cancer Lett*. 1988 ; 40 : 257-264.
- Weisiger, R. A., Fridovich, I. (1973). Superoxide dismutase organelle specificity. *Journal of Biological Chemistry*.248(10), 3582-3592.
- Weiss, M. F., Erhard, P., Kader-Attia, F. A., Wu, Y. C., Deoreo, P. B., Araki, A., ... and Monnier, V. M. (2000). Mechanisms for the formation of glycoxidation products in end-stage renal disease. *Kidney international*. 57(6), 2571-2585.
- Weselak M, Arbuckle TE, Wigle DT, Krewski D. In utero pesticide exposure and childhood morbidity. *Environmental Research*. 2007; 103: 79-86.
- WHO. Global assessment of the state-of-science of endocrine disruptors. IPCS (International Programme on Chemical Safety); 2002.
- Wigle DT, Arbuckle TE, Turner MC, Brub A, Yang O, Liu S, Krewski D. Epidemiologic Evidence of Relationships Between Reproductive and Child Health Outcomes and Environmental Chemical Contaminants. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 2008; 11: 373-517.
- Wilson VS, Lambright CR, Furr JR, Howdeshell KL, Gray LE Jr (2009) The herbicide linuron reduces testosterone production from the fetal rat testis during both in utero and in vitro exposures. *Toxicol Lett* 186(2):73–77.
- Worobey, B. L., & Shields, J. B. (1991). Preliminary studies on the bioavailability and disposition of bioincurred carrot residues of [14C] linuron and [14C]3,4-dichloroaniline in rats. *Food Additives and Contaminants*, 8(2), 193–200. doi:10.1080/02652039109373969.

**X**

---

## **Y**

---

Yang CZ, Yaniger SI, Jordan VC, Klein DJ, Bittner GD. Most plastic products release estrogenic chemicals: a potential health problem that can be solved. *Environ Health Perspect.* 2011; 119: 989– 96.

Yin, H., Xu, L., Porter, N. A. (2011). Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical reviews.* 111(10), 5944-5972.

## **Z**

---

Zama AM, Uzumcu M. Fetal and neonatal exposure to the endocrine disruptor methoxychlor causes epigenetic alterations in adult ovarian genes. *Endocrinology*, 2009; 150(10): 4681-91.

Zeljezic D, Garaj-Vrhovac V, Perkovic P. 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.* 2006; 20(6): 923-935.

Zhou J, Cai ZH, Zhu XS. Are endocrine disruptors among the causes of the deterioration of aquatic biodiversity?. *Integr Environ Assess Manag.* 2010; 6(3): 492-498.

## Annexe

### Annexe 1. Composition de l'aliment pour 1 kilogramme de nourriture (ONAB, Bejaïa)

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

### Annexe2. Liste des réactifs chimiques spécifiques utilisés.

Réactifs	Nom complet (code)	Firme
<b>Acide ortho-phosphorique 85%</b>	-----	Sigma Aldrich
<b>BHT</b>	Hydroxy toluénebutylé	Sigma Aldrich
<b>Bleu de Coomassie</b>	-----	MERCK
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumine lyophilized	Fluka
<b>DTNB</b>	Acide 5-5'-dithiobis-2-nitro benzoïque	Sigma Aldrich
<b>GSH</b>	Glutathion	Sigma Aldrich
<b>Méthionine</b>	L-Méthionine	Biochem. Chemopharma
<b>NBT</b>	Nitro Blue Tetrazolium	Sigma Aldrich
<b>Riboflavine</b>	-----	Biochem. Chemopharma
<b>TBA</b>	Acide thiobarbiturique	Sigma Aldrich
<b>TCA</b>	Acide trichloracétique	Sigma Aldrich
<b>DPPH</b>	2.2-diphényle-1-picrylhydrazyl	ALDER
<b>Riboflavine</b>	-----	Biochem. Chemopharma
<b>NBT</b>	Nitro Blue Tetrazolium	Sigma Aldrich

## Préparation des solutions

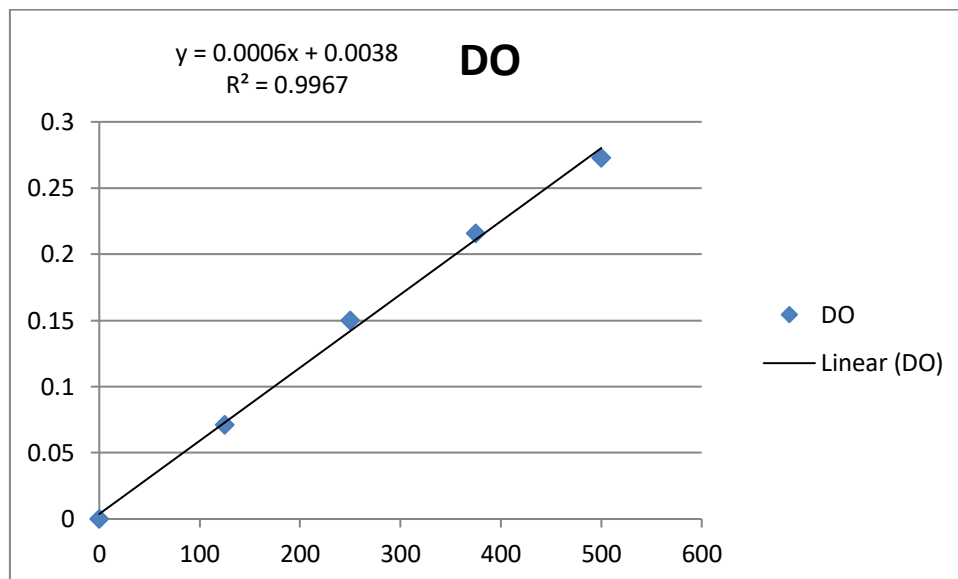
### 1. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

#### BSA (1 mg/ml) :

Dissoudre 5 mg BSA dans 5 ml d'eau distillée.

#### Réactif de Bradford :

Dissoudre 100 mg de bleu de Coomassie (G 250) dans 50 ml d'éthanol (95%). Agiter par l'agitateur pendant 2 heures, puis ajouter 100 ml d'acide orthophosphorique (85%) et 850 ml d'eau distillée (pour obtenir 1 L de solution). Ce réactif doit être filtré puis conserver pendant 1 mois au maximum à une température de 4°C et à l'abri de la lumière.



**Figure:** La gamme d'étalonnage réalisée à partir d'une solution mère de BSA

### 2. Dosage de MDA

#### La solution du tampon TBS :

Tris (50mM), NaCl (150mM) : pH 7,4

0,6057g de Tris (50 mM) dans 100 ml de Na Cl (150 mM).

#### La solution d'H Cl (0,6 M) :

51,569 ml de H Cl 36% dans 1L d'eau.

#### La solution de Tris - TBA :

0,173g de TBA (120 mM) dans 10ml de Tris (26 mM).

La solution de TCA – BHT :

1g de BHT (Butyl hydroxytoluene) dans 100 ml de TCA (acide trichloracétique) à 20%

### **3. Dosage du glutathion**

Tris (0,4 M), EDTA (0,02 M) : pH 9,6 :

Dissoudre 12,114 g Tris et 1,871 g EDTA dans 250 ml d'eau distillée et ajuster le pH à 9,6.

EDTA (0,02 M) :

Dissoudre 5,613 g EDTA dans 750 ml d'eau distillée.

DTNB (0,01 M) :

Dissoudre 200 mg DTNB dans 50 ml de méthanol absolu.

L'acide salicylique (0,25%) :

Dissoudre 250 mg d'acide salicylique dans 100 ml d'eau distillée.

### **4. Dosage des taux des protéines carbonylées**

La solution de DNPH :

4.5 mg de DNPH dans 1 ml de HCl (2N).

La solution du HCl (2N):

Pour préparer une solution de 2N, il faut ajouter 24 ml d'eau distillée à 4 ml de HCl (12N).

La solution de TCA (20 %) :

20 mg de TCA dans 100 ml d'eau distillée

Ethanol : éthyl acétate :

(1v :1v)

La solution de Guanidine-HCl (6M) :

573,216 g/litre

### **5. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx)**

Le tampon KNaHPO<sub>4</sub> 6,7mM ; PH = 7,8 :

Solution A ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,2M) : 3,483g dans 100ml d'eau distillée.

Solution B ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,2M) : 2,721g dans 100ml d'eau distillée.

58,5 ml de B + 91,5 ml d'A + 450 ml d'eau distillée donnent 600 ml du tampon KPO<sub>4</sub> (50 mM), PH 7.

EDTA disodique (5 mM), PH 7,8 :

1,116g dans 600 ml de KPO<sub>4</sub> (50 mM).

La solution de GSH (0,1mM) :

3,073 mg dans 100 ml d'eau distillée.

La solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,3mM) :

13 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10M) dans 100 ml d'eau distillée.

La solution de TCA 1% :

1g dans 100 ml d'eau distillée.

La solution de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,32mM) :

28,65 g dans 250 ml d'eau distillée.

La solution de DTNB (1mM) : 3,963 mg dans 100 ml d'eau distillée.

## **6. Dosage de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)**

Tampon phosphate (0.1 M, pH 7.4) :

Solution A, dissoudre 6,24 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2 H<sub>2</sub>O) dans 200 ml d'eau distillée.

Solution B, dissoudre 14,32 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (12 H<sub>2</sub>O) dans 200 ml d'eau distillée.

Mélanger 16 ml de la solution A avec 84 ml de la solution B

## **7. Dosage de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD)**

Le tampon phosphate (50mM), PH = 7, 8 :

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 4,476g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 1,95g :dans 250ml d'eau distillée

La solution de Na<sub>2</sub> – EDTA :

50mg dans 50 ml de tampon phosphate.

La solution EDTA – Méthionine (0,1 mM, 13 mM) :

11,16 ml (Na<sub>2</sub> – EDTA) + 580 mg Méthionine et compléter à 100 ml par le tampon phosphate.

La solution de NBT (75 µM) :

10,79 mg dans 5ml de tampon phosphate.

La solution de Riboflavine (2 µM) :

10 mg dans 100 ml de tampon phosphate.

## **8. Dosage de l'activité enzymatique de la Glutathion-S-Transférase (GST)**

CDNB (0,02 M) :

Dissoudre 202,55 mg CDNB dans 50 ml d'éthanol absolu.

Solution GSH (0,1 M) :

Dissoudre 153,65 mg GSH dans 50 ml d'eau distillée.

