

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE BLIDA 1**



**FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE**

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLOME MASTER EN SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE**

Filière : Biologie

**SPECIALITE :
BIOSIGNALISATION CELLULAIRE ET MOLECULAIRE, IMMUNOLOGIE**

THEME :

**CONTRIBUTION A LA RECHERCHE DES EFFETS TOXIQUES
D'UNE EAU EXEMPTEE DE PLOMB ET DE CADMIUM PAR
PROCEDE BIOLOGIQUE ENZYMATIQUE CHEZ DES RATS DE
SOUCHE WISTAR**

**Présenté par :
M^{elle} HADJIMI Meriem**

Soutenu le 30/10/2014

Devant le jury composé de :

- M^{elle} ZATRA Y.	MAA	UB1	Présidente
- M^{me} CHAKHMA A.	MAA	UB1	Examinatrice
- Dr. SAADI L.	MCA	UB1	Promotrice

Année Universitaire 2013/2014

Remerciements

Au terme de mon travail je remercie tout d'abord ALLAH qui m'a donné la force, la volonté, le courage et la santé pour mener à bien ce modeste travail.

Je tiens à exprimer ma gratitude à ma promotrice Mme SAADI Leïla, Maître de Conférences à l'Université de Blida 1, pour ses conseils, ses orientations et sa gentillesse.

Je remercie Mme ZATRA Y. Maître assistante à l'Université de Blida 1, d'avoir accepté de présider le jury examinant ce travail.

Mes vifs remerciements s'adressent à Mme CHAKHMA A. Maître assistante à l'Université de Blida 1, d'avoir accepté l'examen de ce modeste travail.

Ma grande considération au Professeur AMIR ZINE C. et à l'ensemble du personnel du service d'anatomo-pathologie Mustapha BACHA (Alger) pour l'aide et la sympathie qu'ils ont témoignés durant mon stage.

Mes remerciements au Professeur ABDELALI M. et à l'ensemble du personnel du service laboratoire de Cytologie CHU NAJISSA HAMOUD (Alger-EX PARNET) pour leur aide.

Mes remerciements aux responsables et ingénieurs des laboratoires de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Blida 1.

Enfin, mes remerciements vont à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin pour mener à bien ce travail.

Dédicaces

A mes parents

A mes sœurs

A mes enseignants

A mes proches et amies

Je dédie ce travail

RESUME

Le système immunitaire est un organe complexe et dynamique. Il peut être perturbé par les métaux lourds (Cadmium, Plomb ...etc.) ; retrouvés dans l'environnement ; par induction d'apoptose ou de nécrose dans les cellules du système immunitaire. Leurs effets toxiques touchent également le système nerveux, le sang et la moelle osseuse. Ils sont généralement cancérigènes. Donc la nécessité d'éliminer les métaux lourds polluants de l'eau est impérative.

La présente étude se propose de démontrer dans son premier volet la possibilité d'utiliser un extrait de la peroxydase de raifort (HRP) partiellement purifié (6.5 UI/ml) pour l'élimination définitive des traces de métaux lourds présents dans l'eau à des concentrations de 0,5 et 1 mg/l pour le Cadmium et 2,5 et 5 mg/l pour le Plomb. En second volet, une recherche des effets toxiques sur les rats femelles de souche wistar alimentés d'une eau préalablement exemptée de Cadmium et de Plomb , via des analyses hématologiques , hormonales (FT3 , FT4 ,TSH) et sériques (CRP, NOs) ,suivies d'une étude histologiques des organes vitaux ; thyroïde, foie, reins et rate.

D'après les résultats de contrôle des différents paramètres de ces eaux traitées (pH, Conductivité , nitrates et nitrites ...etc.), nous avons constaté que le traitement à base de peroxydase pour l'élimination des deux métaux lourds Cd et Pb de l'eau est efficace . Nous n'avons constaté aucun cas de mortalité, aucun changement de comportement ni signes de toxicité chez les rats pendant l'expérimentation.

D'autre part, l'eau traitée, par laquelle les rats ont été alimentés ne semble pas perturber les poids corporel, ni aucun cas d'anémie n'a été enregistré. Cependant une augmentation de la fluidité du sang avec diminution des agrégations plaquettaires a été notée, mais uniquement chez les rats des lots (1 Pb 2.5 ppm et 2 Pb 5 ppm). Ceci est dû à l'augmentation du taux des nitrites dans le sang de l'animal. Aucune perturbation n'a été notée pour les équilibres leucocytaires, hormonaux thyroïdiens et hépatiques. Aucune réaction inflammatoire chez aucun rat n'a été remarquée.

Les résultats histologiques des divers organes vitaux ; thyroïde, foie, reins et rate ne présentent pas d'altérations structurales.

Mots clés : Peroxydase de raifort (HRP) , Cadmium , Plomb , Eau , Organes vitaux , Rats femelles adultes 'Wistar'.

ABSTRACT

The immune system is a complex and dynamic organ. It can be disrupted by heavy metals (Cadmium, Lead ... etc.); found in the environment; by induction of apoptosis or necrosis in cells of the immune system. Toxic effects also affect the nervous system, blood and bone marrow. They are usually carcinogenic. So the need to eliminate water pollutants heavy metals is imperative.

The present study aims to demonstrate in the first time the possibility of using an extract of horseradish peroxidase (HRP) partly purified (6.5 IU / ml) , in order to eliminate traces of heavy metals found in water with either concentration of (0.5 and 1 mg / l) for Cd and (2.5 and 5 mg / l) for Pb. In the second time , we studied harmful effects on adult female rats of Wistar strain fed a water previously treated; via hematological , hormonal (FT3 , FT4 , TSH) and serum (CRP , NOs) assays , followed by a histological study of vital organs such as thyroid gland , liver, kidneys and spleen.

According to the results of various parameters of treated water (pH , conductivity, nitrite and nitrate.....), it was noticed that the treatment with peroxidase for the removal of two heavy metals Cd and Pb is effective. We have seen no deaths , no change in behavior or signs of toxicity in rats during the experiment .

On the other hand, the treated water does not disturb the rats body weight, no rat was presented as anemia. However an increase in the fluidity of blood with reduced platelet aggregation was observed, with both 1 Pb 2.5 ppm and 2 Pb 5 ppm group: This is due to the increased rate of nitrite in the blood of the animal. No disturbance was observed for leukocyte , hormonal thyroid and liver equilibriums. Inflammatory responses in rats were not noticed.

Histological findings of the various vital organs; thyroid, liver, kidney and spleen did not exhibit structural alterations.

Keywords: Horseradish Peroxidase (HRP), Cadmium, Lead, Water, Vital organs, Adult female rats Wistar.

ملخص

جهاز المناعة عضو معقد ونشط - يمكن أن يضطرب بالمعادن الثقيلة (كدميوم، رصاص.... إلخ)؛ التي توجد في البيئة وتتسبب في موت مبرمج أو غير مبرمج في خلايا الجهاز المناعي - تأثيرات هذه المعادن سامة تمس كذلك الجهاز العصبي، الدم والنخاع العظمي - تكون عموماً مسببة للسرطان - إذن ضرورة التخلص من المعادن الثقيلة الملوثة للماء أمر إلزامي.

دراستنا هذه تحاول، في شطرها الأول أن تبين إمكانية استعمال مستخلص من بروكسيداز الفيجل الحار (HRP) مصفى جزئياً (6.5 و.ع/مل) من أجل التخلص التام لآثار المعادن الثقيلة Cd (0.5 و 1 مغ/ل) و Pb (2.5 و 5 مغ/ل) في الماء.

في شطرها الثاني، يركز البحث عن العوامل السامة على فئران أنثى من فصيلة "ويستار"، مغذات بمياه خالية من المعادن الثقيلة، وذلك عن طريق تحاليل دموية، هرمونية (TSH, FT4, FT3) ومصلية (CRP, Nos)، متبوعة بدراسة نسيجية للأعضاء الحيوية، الغدة البرقية، الكبد، الكليتان والطحال.

حسب نتائج مراقبة مختلف معايير تلك المياه المعالجة (pH، توصيلة و نتريث ... إلخ) لاحظنا فعالية اتخاذ المعالجة على أساس "بروكسيداز" لإزالة المعدنين الثقيلين Cd و Pb من الماء - لم نلاحظ أي حالة وفاة، أو تغير في السلوك أو علامة تسميم لدى الفئران خلال التجربة.

من ناحية أخرى؛ الماء المعالج، التي غذيت به الفئران لم تغير الوزن الجسدي، ولم تظهر أعراض الأنيميا على أي فأر. بينما سجل ارتفاع ميوعة الدم مع انخفاض تراكمات الصفائح الدموية، لكن فقط عند فئران الفوجين (1 pb 2.5 مغ/ل و Pb 2 5مغ/ل) هذا ناتج عن ارتفاع نسبة النيترات في دم الحيوان.

لم يظهر أي اضطراب على توازنات الهرمونات، الغدة الدرقية، الكبد، والكريات البيضاء.

كما لم نلاحظ ظهور أي التهاب لدى أي فأر-

نتائج الدراسات النسيجية لمختلف الأعضاء الحيوية: الغدة الدرقية، الكبد، الكليتان والطحال، لم تظهر أي فساد بنيوي

كلمات مفتاحية: بروكسيداز ريفور (HRP)؛ كدميوم؛ رصاص؛ ماء؛ أعضاء حيوية؛ فئران إناث بالغة "ويستار".

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : Plante du Raifort (<i>Armoracia rusticana</i>)	10
Figure 02 : Racines du raifort.....	10
Figure 03 : Structure de la peroxydase de raifort.....	12
Figure04 : Structure du groupement prosthétique de la peroxydase de raifort.....	12
Figure 05: Diagramme résumant les étapes de préparation de l'eau d'alimentation des rats d'expérimentation (lot traités).....	15
Figure 06 : Schéma d'un système CI avec les principaux éléments.	18
Figure 07 : Lecture des résultats sur les bandelettes Quantofix [®] Nitrate Nitrite.....	19
Figure 08: Les instruments de base pour la spectrométrie d'absorption atomique (SAA).....	20
Figure 09 : Photographies illustrant les étapes du sacrifice des rats.....	23
Figure 10: Frottis sanguin d'un rat femelle wistar coloré par coloration May-Grünwald-Giemsa.....	26
Figure11: Principe de dosage de la protéine C- Réactive (CRP) par méthode d'agglutination Latex-Turbidimétrie.....	28
Figure 12 : Voie de réduction des Nitrates.....	29
Figure 13: La détection des nitrites par le réactif de Griess.....	29
Figure 14 : Valeurs moyennes du pH et leurs significations avant et après traitement de l'eau d'alimentation des rats	35
Figure 15: Valeurs moyennes de la conductivité leurs signification avant et après traitement de l'eau d'alimentation des rats.....	36
Figure 16: Valeurs moyennes des taux des nitrates et leurs significations avant et après traitement de l'eau d'alimentation des rats.....	37
Figure 17 : Valeurs moyennes des taux des nitrites et leurs significations avant et après traitement de l'eau d'alimentation des rats.....	37
Figure 18: Chromatogrammes des divers composés ioniques d'échantillon d'eau du lot témoin.....	39
Figure 19: Valeurs des traces de Cadmium présentes dans les échantillons des lots 01 Cd et 02 Cd analysés, avant et après l'application du procédé biologique	40
Figure 20 : Valeurs moyennes des traces de plomb présentes dans les échantillons des lots 01 Pb et 02 Pb avant et après l'application du procédé biologique.....	41
Figure 21 : Valeurs moyennes des poids corporels (g) chez les rats témoins et traités avec les significations statistiques avant et après l'expérimentation	41
Figure 22 : Valeurs moyennes des poids absolus (g) et relatifs (g/100g d'animal) du foie et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités	43
Figure 23 : Valeurs moyennes des poids absolus (g) et relatifs (g/100g d'animal) de la rate et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités	43
Figure 24 : Valeurs moyennes des poids absolus (g) et relatifs (g/100g d'animal) des reins et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités	43
Figure 25 : Valeurs moyennes des taux des globules blancs et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités.....	44
Figure 26 : Valeurs moyennes des taux des globules rouges et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités.....	44
Figure 27 : Valeurs moyennes des taux de plaquettes et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités.....	45
Figure 28 : Valeurs moyennes des pourcentages des différents éléments de l'équilibre leucocytaire du sang des rats témoins.....	45
Figure 29 : Valeurs moyennes des pourcentages des différents éléments de l'équilibre leucocytaire du sang des rats du lot 01 Cd.....	45
Figure 30 : Valeurs moyennes des pourcentages des différents éléments de l'équilibre leucocytaire du sang des rats du lot 02 Cd.....	46
Figure 31: Valeurs moyennes des pourcentages des différents éléments de l'équilibre leucocytaire du sang des rats du lot 01 Pb.....	46

Figure 32 : Valeurs moyennes des pourcentages des différents éléments de l'équilibre leucocytaire du sang des rats du lot 02 Pb.....	46
Figure 33 : Frottis sanguin d'un rat du lot témoin montrant les principaux éléments de l'équilibre leucocytaire (A) et (B).....	48
Figure 34 : Frottis sanguin des rats du lot 01 Cd (A), lot 02 Cd (B) comparé au lot témoins (C).....	49
Figure 35 : Frottis sanguin des rats des lots 01 Pb (A, A'), 02 Pb (B, B') comparés au lot témoin (C).....	50
Figure 36 : Valeurs moyennes des concentrations sériques de la triiodothyronine libre (FT3) en pmol/l et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités.....	51
Figure 37 : Valeurs moyennes de la concentration de la thyroxine libre (FT4) en pmol/l et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités.....	52
Figure 38 : Valeurs moyennes des concentrations de la thyroïdostimuline (TSH) en μ UI/ml et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités.....	52
Figure 39 : Valeurs moyennes des taux de la protéine C- réactive (CRP) en mg/l et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités.....	53
Figure 40 : Teneurs moyennes en nitrites totaux (Métabolites des NOs) en μ M plasmatiques et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités.....	53
Figure 41 : Structure du parenchyme thyroïdien chez les rats témoins ((a), (b), (c), (d), (e) et (f)).....	55
Figure 42 : Structure du parenchyme thyroïdien chez les rats du lot 01 Cd ((a), (b), (c), (d)).....	56
Figure 43 : Structure du parenchyme thyroïdien chez les rats du lot 02 Cd ((a) et (b)).....	57
Figure 44 : Structure du parenchyme thyroïdien chez les rats du lot 01 Pb ((a) et (b)).....	57
Figure 45 : Structure du parenchyme thyroïdien chez les rats du lot 02 Pb (a) et (b).....	58
Figure 46 : Structure du parenchyme hépatique chez les rats témoins ((a), (b), (c) et (d)).....	60
Figure 47 : Structure du parenchyme hépatique chez les rats du lot 01 Cd ((a), (b) et (c)).....	61
Figure 48 : Structure du parenchyme hépatique chez les rats du lot 02 Cd ((a) et (b)).....	62
Figure 49 : Structure du parenchyme hépatique chez les rats du lot 01 Pb ((a) et (b)).....	62
Figure 50 : Structure du parenchyme hépatique chez les rats du lot 02 Pb ((a), (b) et (c)).....	63
Figure 51 : Structure du parenchyme rénal chez les rats témoins ((a), (b), (c) et (d)).....	65
Figure 52 : Structure du parenchyme rénal chez les rats du lot 1 Cd ((a),(b) et (c)).....	66
Figure 53 : Structure du parenchyme rénal chez les rats du lot 2 Cd ((a), (b) et (c)).....	67
Figure 54 : Structure du parenchyme rénal chez les rats du lot 1 Pb ((a), (b) et (c)).....	69
Figure 55 : Structure du parenchyme rénal chez les rats du lot 2 Pb ((a), (b) et (c)).....	69
Figure 56 : Structure du parenchyme splénique chez les rats témoins ((a), (b), (c), (d),(e) et (f)).....	71
Figure 57 : Structure du parenchyme splénique chez les rats du lot 1 Cd (a), (b) et (c).....	72
Figure 58 : Structure du parenchyme splénique chez les rats du lot 2 Cd ((a),(b) et (c)).....	73
Figure 59 : Structure du parenchyme splénique chez les rats du lot 1 Pb ((a), (b) et (c)).....	74
Figure 60 : Structure du parenchyme splénique chez les rats du lot 2 Pb ((a),(b) et (c)).....	75

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Propriétés physico chimiques avec la classification des dangers (SGH) du Plomb.....	4
Tableau 2 : Propriétés physico chimiques avec la classification des dangers (SGH) du Cadmium.....	8
Tableau 3 : Préparation de la série des standards (0,005 ppm, 0,01 ppm, 0,1 ppm, 0,9 ppm, 1 ppm) à partir de la solution mère standard Cadmium (Cd)	21
Tableau 4 : Préparation de la série des standards (0.1 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm) à partir de la solution standard nitrates de plomb(Pb NO ₃)	22
Tableau 5 :Préparation de la série des dilutions (1 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM) à partir de la solution standard sodium nitrite.....	30
Tableau 6 : Les valeurs moyennes du pH , la conductivité et les taux de nitrates et nitrites de l'eau d'alimentation des différents lots de rats de l'expérience (Conformité à la norme algérienne).....	40
Tableau 7 : Concentrations des divers composés ioniques d'eau d'alimentation du lot témoin comparées aux valeurs limites fixées par la législation algérienne	41
Tableau I : Appareillages, réactifs, produits chimiques, verreries et consommables utilisés dans la partie expérimentale	ANNEXE 01
Tableau II : Composition de l'alimentation des animaux.....	ANNEXE 01
Tableau III : Table pour la dilution de l'alcool (Table de Gay-Lussac) appelée aussi Table de mouillage de l'alcool.....	ANNEXE 01
Tableau IV : Valeurs moyennes du pH et leurs significations avant et après traitement de l'eau d'alimentation des rats.	ANNEXE 02
Tableau V : Valeurs moyennes de la conductivité leurs signification avant et après traitement de l'eau d'alimentation des rats.....	ANNEXE 02
Tableau VI : Valeurs moyennes des taux des nitrates et des nitrites et leurs significations avant et après traitement de l'eau d'alimentation des rats.....	ANNEXE 02
Tableau VII : Valeurs des concentrations et d'absorbance des solutions standards utilisées pour le dosage des traces de Cadmium contenues dans l'eau analysée.....	ANNEXE 02
Tableau VIII : Valeurs des traces de Cadmium présentes dans les échantillons des lots 01 Cd et 02 Cd analysés avant et après l'application du procédé biologique.....	ANNEXE 02
Tableau IX : Valeurs des concentrations et d'absorbance des solutions standards utilisées pour le dosage de plomb dans les différents échantillons analysés.....	ANNEXE 02
Tableau X : Valeurs moyennes des traces de plomb présentes dans les échantillons des lots 01 Pb et 02 Pb avant et après l'application du procédé biologique.....	ANNEXE 02
Tableau XI : Valeurs moyennes des poids corporels (g) chez les rats témoins et traités avec les significations statistiques avant et après l'application du procédé biologique.....	ANNEXE 02
Tableau XII : Valeurs moyennes des poids absolus (g) et relatifs (g/100g d'animal) du foie et leur significations statistiques chez les rats témoins et traités	ANNEXE 02

<u>Tableau XIII</u> : Valeurs moyennes des poids absolus (g) et relatifs (g%) de la rate et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités	ANNEXE 02
<u>Tableau XIV</u> : Valeurs moyennes des poids absolus (g) et relatifs (g/100g d'animal) des deux reins et leur significations statistiques chez les rats témoins et traités.....	ANNEXE 02
<u>Tableau XV</u> : Valeurs moyennes des différents paramètres hématologiques et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités.....	ANNEXE 02
<u>Tableau XVI</u> : Valeurs moyennes des taux de l'hormone triiodothyronine libre (FT3) en pmol/l et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités...	ANNEXE 02
<u>Tableau XVII</u> : Valeurs moyennes des taux de l'hormone thyroxine libre (FT4) en pmol/l et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités.....	ANNEXE 02
<u>Tableau XVIII</u> : Valeurs moyennes des taux de l'hormone thyroïdienne (TSH) en μ UI/ml et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités	ANNEXE 02
<u>Tableau XIX</u> : Valeurs moyennes des taux de la protéine C- réactive (CRP) en mg/l et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités.....	ANNEXE 02
<u>Tableau XX</u> : Valeurs des concentrations et d'absorbance des solutions standards utilisées pour le dosage des nitrites sériques des rats.....	ANNEXE 02
<u>Tableau XXI</u> : Teneurs moyennes en nitrites totaux plasmatiques (métabolites des NOs) en μ M et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités.....	ANNEXE 02
<u>Tableau XXII</u> : Table de Student.....	ANNEXE 02

LISTE DES ABREVIATIONS

Sigle	Nom développé
CAS	Chemical Abstracts Service
CL 50	Concentration Létale 50
DL 50	Dose Létale 50
HCT	Hématocrite
HGB	Hémoglobine
LYM	Lymphocytes
MCV	Volume globulaire moyen (VGM) ou volume moyen corpusculaire
MCH	Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine
MCHC	Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH)
MXD	Monocytes
NEUT	Neutrophiles
PLT	Plaquettes
pmol/l	Picomol par litre
ppm	Particule par million correspond à 1 mg/ l
RBC	Red blood cell
μ UI/ml	Micro unité internationale par ml
μs/cm	Micro siemens/cm : 2 μs/cm correspond à 1 ppm
WBC	White blood cell

INTRODUCTION

CHAPITRE I :
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE III:
RESULTATS ET DISCUSSION

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

CHAPITRE II :
MATERIELET METHODES

INTRODUCTION

Les métaux lourds (Cadmium, Plomb, Mercure...etc.), sont des polluants atmosphériques communs, émis principalement du fait d'activités industrielles.

Leur subsistance dans les sols, et dans l'environnement permet leur accumulation dans la chaîne alimentaire tant sur les terres que dans l'eau (Rapport OMS plomb, 2014).

Les métaux lourds sont à mettre en rapport, à différents degrés, avec toute une série d'états pathologiques comme les lésions rénales et osseuses, les problèmes de développement et les troubles neurocomportementaux, une tension artérielle élevée, voire potentiellement, des cancers du poumon (Rapport OMS plomb, 2014).

Selon le rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé de l'année 2014 sur le plomb, on estime que, chaque année, l'exposition au plomb causerait 143 000 décès, par an, principalement dans les régions en développement et, entraîne 600 000 nouveaux cas de déficience intellectuelle chez l'enfant.

Selon le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC), l'intoxication chronique au cadmium provoque une ostéoporose diffuse. Il est classé comme agent cancérigène certain pour l'homme (Demi-vie dans l'organisme est d'environ 20 à 40 ans) (Andujar et *al.*, 2010).

Le système immunitaire est un organe complexe et dynamique, qui peut être perturbé par un certain nombre d'agents chimiques (Bergeaud, 1991). Certains métaux lourds (Mercure, Cadmium, Plomb) possèdent des propriétés immunosuppressives qui proviennent en partie de leurs effets cytotoxiques, par induction d'apoptose ou de nécrose dans les cellules du système immunitaire, entraînant une diminution de la résistance aux infections (Shenker et Coll, 1997). Donc la nécessité d'éliminer ou de récupérer ces métaux lourds polluants pour l'environnement n'est plus à discuter (Monnet-Tschudi et *al.*, 2006).

Différentes méthodes de traitement sont employées pour éliminer de façon générale les micropolluants des eaux résiduaires. Les méthodes les plus courantes comprennent la précipitation, l'échange d'ions et l'adsorption (Lydyard et *al.*, 1978).

Les techniques à membranes telles que l'osmose, l'électrodialyse, l'ultrafiltration, la microfiltration ou la nanofiltration, sont des méthodes de choix pour traiter un effluent chargé en ions métalliques. Cependant, ces techniques présentent aussi l'inconvénient d'être peu sélectives et grandes consommatrices d'énergie (Ait khaldoun, 2011).

De plus, il existe des techniques de biosorption pour le traitement de l'eau. Ces techniques emploient les algues, les champignons et les bactéries (Luckey, 1977).

La biosorption reste un procédé dépendant de la survie des matériaux biologiques utilisés et d'un traitement de désinfection obligatoire à la fin du procédé.

L'utilisation d'un procédé biologique à base d'enzyme pour l'élimination des métaux lourds des eaux, n'a jamais été évoquée par les travaux de recherche de bioremédiation des eaux.

Dans la présente étude, un modèle d'enzyme largement utilisée en biotechnologie ; la peroxydase de raifort (POX) ou horseradish Peroxidase (HRP) partiellement purifiée a été utilisée afin d'éliminer deux métaux lourds (Cd et Pb) de l'eau.

La peroxydase de raifort (POX ou HRP) est considérée comme un réactif économique largement utilisé dans l'industrie (Ye et *al.*, 2010). L'HRP est utilisée dans divers domaines de la recherche fondamentale et clinique (Handley et *al.*, 1998).

Aucun travail significatif n'a été accompli en Algérie pour la production de la Peroxydase à partir de raifort afin d'exploiter les vertus cinétiques de cette enzyme.

Alors que de plus amples champs de recherche sont disponibles pour la formulation des médicaments et de préparations des kits de diagnostic à base de la Peroxydase de raifort (Shazia et *al.*, 2012).

La présente étude se propose de démontrer la possibilité d'utiliser un extrait de l'HRP partiellement purifié (6.5 UI/ml) pour l'élimination définitive des traces de métaux lourds Cd (0.5 et 01 mg/l) et Pb (2.5 et 5 mg/l) dans l'eau.

On a recherché à travers une étude expérimentale sur modèle animal rat femelle de souche 'WISTAR', les effets toxiques après trente (30) jours d'alimentation avec l'eau préalablement exemptée des deux métaux lourds Cd et Pb.

Dans ce contexte, nous nous intéressons à faire des recherches basées sur :

- Le suivi des poids corporels des rats,
- Les résultats des paramètres hématologiques (hémogramme et équilibre leucocytaire),
- Les résultats des paramètres biochimiques (Protéine C-Réactive (CRP), métabolites de monoxyde d'azote (NOs)),
- Les résultats des paramètres hormonaux (FT3, FT4, TSH),
- Les résultats de l'étude histopathologique des organes vitaux ; Glande thyroïde, foie, reins et rate.

I.1. GENERALITES SUR LES METAUX LOURDS

Les métaux lourds sont des éléments métalliques naturels dont la plus part ont une masse volumique supérieure à 5g/cm³, comme le cuivre, le zinc, le cadmium, le plomb, etc.

Ils sont présents le plus souvent à l'état de traces dans les trois compartiments de l'environnement (air, sol et eau) (Lacoue-Labarthe et *al.*, 2007).

La toxicité des métaux lourds n'est plus à démontrer. La plupart du temps, leurs effets toxiques concernent le système nerveux, le sang ou la moelle osseuse. Ils sont généralement cancérigènes (Monnet-Tschudi et *al.*, 2006).

I.1.1. Plomb

Le plomb est un métal gris bleuâtre malléable (IPCS, 1995). Le plomb est l'un des métaux les plus anciennement et les plus largement utilisés par l'homme.

Sa toxicité est connue depuis l'Antiquité; les premières descriptions des coliques et de la goutte saturnines sont attribuées à Hippocrate, près de 400 ans avant Jésus-Christ ; celle des troubles mentaux organiques à Dioscoride, au deuxième siècle avant notre ère (Garnier, 2005).

I.1.1.1. Propriétés du Plomb

Les principales propriétés physico-chimiques du plomb et la classification des dangers d'exposition au plomb sont résumés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Propriétés physico chimiques avec la classification des dangers (SGH) du Plomb.

Dénomination (*)	Plomb (Pb)
Masse atomique (g/mol) (*)	207.19
Point de fusion (°C) (*)	327.5
Point d'ébullition (°C) (*)	1740
Solubilité (*)	Insoluble dans l'eau froide Faiblement soluble dans l'eau chaude Soluble dans l'acide nitrique et dans l'acide sulfurique à chaud. Faiblement soluble dans l'alcool.
N° CAS (**)	7439-92-1
Mutagénicité sur les cellules germinales (**)	Génotoxicité in vivo - rat – Inhalation
Cancérogénicité (**)	Évidence limitée de cancérogénicité dans les études sur les animaux
Mentions de danger (**)	
H302	Nocif en cas d'ingestion.
H351	Susceptible de provoquer le cancer.
H361	Susceptible de nuire à la fertilité ou au fœtus.
H373	Risque présumé d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée.
H410	Très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

(*) : IPCS, 1995 ; (**): *Sigma-Aldrich, 2014.*

I.1.1.2. Sources d'exposition

Le plomb est assez abondant dans la croûte terrestre où sa concentration moyenne est comprise entre 10 et 20 mg/kg (IPCS, 1995). Les principales activités entraînant des expositions professionnelles au plomb, sont la métallurgie du plomb, la fabrication et la récupération de batteries d'accumulateurs, la production de cristal, l'étamage de radiateurs automobiles (IPCS, 1995). Les expositions extraprofessionnelles sont:

- A proximité des zones contaminées par le plomb.
- Lors de leur distribution, les eaux peuvent s'enrichir en plomb si le système d'adduction contient des éléments en plomb (tuyaux, robinetterie, etc.) (IPCS, 1995).
- Les aliments n'apportent, habituellement qu'une faible quantité de plomb, à condition qu'ils ne proviennent pas de végétaux cultivés (ou d'animaux élevés) dans une zone contaminée (Garnier, 2000).
- La poussière est une importante source d'exposition au plomb de la population générale (INSERM, 1999).
- L'utilisation de cosmétiques contenant du plomb (khôl) (Mojdehi et Gurtner, 1996) et la consommation des médicaments traditionnels (Spriewald et *al.*, 1999).

I.1.1.3. Toxicocinétique

La principale voie d'absorption du plomb est digestive. Chez l'adulte, en moyenne, seulement 5 à 10 % de la dose ingérée est absorbée. Le passage systémique est beaucoup plus important chez le jeune enfant (40-50 %) (Alexander, 1974). Le passage transcutané des dérivés inorganiques du plomb est très faible (< 0,5 %), si la peau est intacte (Moore et *al.*, 1980).

La distribution du plomb dans l'organisme n'est pas homogène. On distingue trois compartiments, en fonction de leurs cinétiques d'élimination : le sang, les tissus mous et l'os, dont les demi-vies respectives sont de 36 jours, 40 jours et 27 ans (IPCS, 1995).

Le plomb traverse facilement la barrière placentaire (ATSDR, 1999).

L'excrétion du plomb est principalement urinaire (> 75 %) et fécale (15-20 %).

Le reste est éliminé dans les phanères, la sueur et les sécrétions bronchiques. La demi-vie d'élimination est très augmentée en cas d'insuffisance rénale (IPCS, 1995).

- Toxicité aiguë

L'intoxication aiguë par le plomb. Elle ne peut résulter que d'une ingestion massive ou d'une administration parentérale. (Nortier et *al.*, 1980). Elle évolue en deux phases. De 2 à 48 heures après la prise surviennent des douleurs abdominales, des vomissements et parfois une diarrhée. Ces troubles digestifs sont toujours d'intensité modérée et de brève durée. Ils s'accompagnent d'une hémolyse, d'une cytolysé hépatique et d'une atteinte tubulaire rénale dépendante de la dose. La prise d'un traitement chélateur est nécessaire (Garnier et *al.*, 2000).

- Toxicité chronique

L'exposition répétée au plomb produit des effets nocifs dans de nombreux organes et tissus. Les principaux sont neurologiques, néphrologiques et hématologiques (INSERM, 1999).

- L'atteinte neurologique centrale est l'effet le plus constant de l'intoxication saturnine.

Plusieurs études montrent que des individus intoxiqués pendant leur petite enfance conservent des troubles cognitifs au moment de leur scolarisation et ultérieurement, pendant leur adolescence et à l'âge adulte (Garnier, 2005).

- Chez l'enfant, plusieurs publications indiquent une baisse de l'acuité auditive est corrélée à l'augmentation du taux de la plombémie (Osman et *al.*, 1999).

- Deux types de néphropathie sont induits par l'exposition au plomb ; une néphropathie subaiguë caractérisée par une hyperplasie des cellules tubulaires proximales avec une atteinte mitochondriale et des inclusions intranucléaires (Cramer et *al.*, 1974). Une néphropathie tardive, qui s'observe après 10 à 30 ans d'exposition au plomb. L'atteinte est cette fois tubulo-interstitielle et glomérulaire (ATSDR, 1999).

- La cytolysé hépatique est un signe d'intoxication aiguë par le plomb. Elle ne s'observe qu'après des contaminations massives, correspondant à une Plombémie supérieure à 1500 µg/l et généralement, à 2000 µg/l (Alvares et *al.*, 1976).

- Le plomb diminue la clairance rénale de l'acide urique (Batuman, 1993).

- Plusieurs publications indiquent une association négative entre la Plombémie d'une part et les concentrations circulantes des hormones thyroïdiennes et de la thyreostimuline (TSH) (ATSDR, 1999).

- Le plomb interfère avec la synthèse de l'hème et inhibe la synthèse de l'hème.(ATSDR, 1999). Cette inhibition est le principal mécanisme de l'anémie saturnine, qui résulte aussi d'une hyperhémolyse (due à une déplétion érythrocytaire en glutathion et à une toxicité membranaire directe) (Garnier, 2000).

- Expérimentalement, l'administration répétée d'acétate et de sous-acétate de plomb par voies orales, chez la souris ont induit des tumeurs rénales.

Le Centre international de recherche sur le cancer considère qu'il y a des preuves suffisantes de la cancérogénicité des dérivés inorganiques du plomb, chez l'animal (IARC,1987).

- De nombreuses études épidémiologiques montrent que le plomb perturbe la spermatogénèse . Alors que d'autres études épidémiologiques ont montré un risque élevé d'avortement et d'accouchement prématuré (Apostoli et *al.*, 1998).

I.1.2. Cadmium

Le cadmium est un métal peu répandu à l'état naturel et présent à l'état d'impuretés dans divers minerais. Il est rencontré sous forme métallique ou de sels (oxyde, chlorure, sulfure). Les premiers cas d'intoxication aiguë au cadmium ont été décrits dans la littérature en 1858. En revanche, les premiers cas d'intoxication chronique ont été décrits beaucoup plus tard en 1942 en France dans l'industrie de fabrication de batteries Ni-Cd (Andujar et *al.*, 2010).

I.1.2.1. Propriétés du Cadmium

Les sels de cadmium ont une très grande stabilité thermique et chimique (Andujar et *al.*, 2010).

Les principales propriétés physico-chimiques du cadmium et la classification des dangers d'exposition au cadmium sont résumés dans le tableau 2.

Tableau 2: Propriétés physico chimiques du Cadmium avec la classification des dangers (SGH).

Dénomination ⁽¹⁾	Cadmium (Cd)
Masse atomique (g/mol) ⁽²⁾	112,4
Masse volumique (g/cm ³) ⁽³⁾	8,7
Point de fusion (°C) ⁽³⁾	321
Point d'ébullition (°C) ⁽³⁾	765
Solubilité ⁽³⁾	Insoluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques.
N° CAS ⁽¹⁾	7440-43-9
DL50 Oral(e) - rat - ⁽¹⁾	225 mg/kg
CL50 Inhalation- rat -30.0 h ⁽¹⁾	25.0 mg/m ³
Mutagenicité sur les cellules germinales ⁽¹⁾	In vitro ont montré des effets mutagènes In vitro - souris – embryon : Test du micronucléus Génotoxicité in vitro - Hamster – ovaire : Analyse cytogénétique
Cancérogénicité ⁽⁴⁾	Cancérogène certain pour l'homme
Mentions de danger ⁽¹⁾	
H301	Toxique en cas d'ingestion.
H330	Mortel par inhalation.
H341	Susceptible d'induire des anomalies génétiques.
H350	Peut provoquer le cancer.
H361	Susceptible de nuire à la fertilité ou au fœtus.
H372	Risque avéré d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée.
H410	Très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

(¹) : SIGMA-ALDRICH, 2014 ; (²): Nriagu, 1980 ; (³): Andujar et al., 2010 ; (⁴):IARC, 1993).

I.1.2.2. Sources d'exposition

En milieu professionnel, les situations d'exposition sont constituées surtout par l'exposition à des vapeurs ou des fumées contenant du cadmium, notamment lors des travaux de soudure et de la fabrication de pigments, d'accumulateurs ou lors du découpage d'alliages au cadmium (Andujar et al., 2010).

Les deux principales sources d'exposition au cadmium de la population générale sont l'alimentation et le tabagisme. Le cadmium est présent de façon importante dans certains aliments, comme les fruits de mer, les abats, les champignons et les légumes et, dans une moindre mesure, dans le poisson, les fruits et la viande (ATSDR, 2008).

I.1.2.3.Toxicocinétique

Les fumées et les vapeurs de cadmium sont principalement absorbées par voie respiratoire (Schwartz, 1987). L'absorption par voie digestive est faible (environ 5%), facilitée par la carence martiale et diminuée par des régimes riches en fibres (Andersen et *al.*, 2004). L'absorption par voie cutanée est, quant à elle, négligeable (Wester et *al.*, 1992).

A la suite d'une exposition par voie orale ou cutanée, le cadmium est retrouvé majoritairement dans les reins et le foie (Kimura et Otaki, 1972 ; ATSDR, 2012).

En effet, la demi-vie biologique du cadmium, est particulièrement longue, puisqu'elle est d'environ 20 à 40 ans (Nordberg et *al.* 1985). Environ la moitié du cadmium de l'organisme est localisé dans le foie et les reins. L'excrétion du cadmium, essentiellement urinaire, est faible et très lente. Une très faible partie du cadmium est excrétée par voie biliaire (après conjugaison avec du glutathion), salivaire, fécale et sudorale (Andujar et *al.*, 2010).

-Toxicité aigue

Il existe deux principaux types d'intoxication en fonction de la voie d'exposition :

-Intoxication par voie digestive : A partir de 3mg ingérés, il y'a apparition des vomissements souvent sanglants associés à des douleurs abdominales intenses, des diarrhées et des myalgies (EURAR, 2008). Les troubles hémodynamiques sont responsables d'une insuffisance rénale aiguë, associés à la toxicité rénale directe du cadmium. Lors d'intoxications massives, le patient décède en quelques heures (Hise et *al.*, 1973)

-Intoxication par voie respiratoire : L'inhalation de fumées d'oxyde de cadmium peut être à l'origine d'une fièvre d'inhalation et d'une pneumopathie chimique (Andujar et *al.*, 2010).

-Toxicité chronique

Lors d'intoxication chronique au cadmium, plusieurs formes d'atteintes sont envisageables :

- Atteinte rénale, atteinte osseuse dont l'ostéomalacie et ostéoporose diffuse (ATSDR, 2008), atteinte respiratoire (Rose et *al.*, 1992), l'hypertension artérielle (Satarug et *al.*, 2006).

Par ailleurs, des études expérimentales chez l'animal ont montré que le cadmium produit des atteintes testiculaires et diminue la fertilité chez les mâles. À fortes doses, le cadmium produit des effets foeto-toxiques et tératogènes chez plusieurs espèces de rongeurs (ATSDR, 2008). Les auteurs suggèrent que le cadmium pourrait avoir un rôle dans la réduction de la qualité du sperme chez l'humain (Wu et *al.*, 2008).

Le cadmium est considéré comme élément cancérigène certain pour l'homme (IARC, 1993).

I.2. GENERALITES SUR LA PEROXYDASE DE RAIFORT

I.2.1. Raifort (*Armoracia rusticana*)

Le Raifort (*Armoracia rusticana*) est une plante vivace de la famille des *Brassicacées* (Fournet ,2002).



Figure 1: Plante du Raifort (*Armoracia rusticana*) (Anonyme 1 , 2014)

Figure 2 : Racines du raifort (Salomon, 2009)

Selon Léger (2007), les noms vernaculaires des taxons de raifort apparait sous plusieurs noms : raifort sauvage, cranson, moutarde des allemands, cran de Bretagne, radis de cheval, herbe aux cuillers, herbe au scorbut.

La taxonomie botanique du raifort selon Gaertn.et *al*, (1800), est définie comme suit : (Fournet ,2002).

Règne : Plantae

Embranchement: Magnoliophyta

Classe : Equisetopsida

Ordre : Brassicales

Famille : Brassicaceae

Sous-Famille : *Brassicoideae*.

Genre : *Armoracia*

Especie : *Armoracia rusticana*

Le raifort est caractérisée par sa racine de couleur jaune , pulpeuse , de goût piquant largement utilisée comme condiment (Hames et Hooper, 2001). Ces racines possèdent des vertus bénéfiques pour le corps humain. Son pouvoir antibactérien prévient plusieurs infections (Tognolli et *al.*, 2002; Welinder et *al.*, 2002).

Plusieurs affections sont traitées par l'utilisation du raifort telles que bronchite, sinusites, rhumatisme, anémie, gripes et stomatites. Le raifort est également introduit dans la composition des médicaments anticancéreux (Wardaman, 2002; Tupper et al., 2010).

Des composés du raifort ont été utilisés pour la production des enzymes recombinants (Vitch et Smith, 2001).

I.2.2. Peroxydase de raifort

I.2.2.1. Présentation

La peroxydase de raifort (HRP, en anglais horseradish peroxidase) est une enzyme provenant comme son nom l'indique du raifort (Horseradish en anglais).

La peroxydase de raifort (*Armoracia rusticana*) est une hémoprotéine oxydoréductase qui catalyse l'oxydation de divers substrats organiques et inorganiques (donneur de protons) en présence du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Shazia et al., 2012).

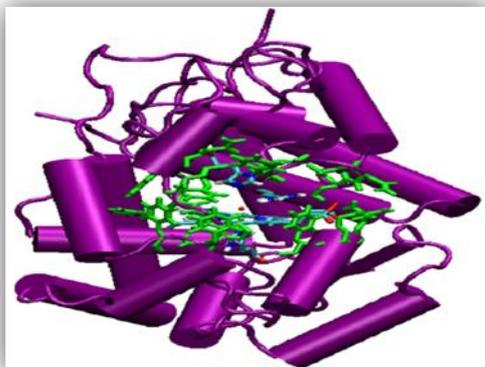


Figure 3: Structure de la peroxydase de raifort. (Le groupement prosthétique est coloré en vert)(Kathryn et al., 2003).

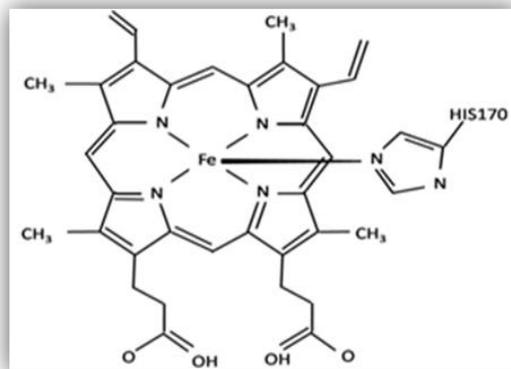


Figure 4: Structure du groupement prosthétique de la peroxydase de raifort (Anonyme 2, 2010)

I.2.2.2. Propriétés et utilisations

La peroxydase de raifort (HRP) est utilisée dans divers domaines de la recherche fondamentale et clinique (Handley et al., 1998) à savoir :

- Le diagnostic rapide des maladies basé sur les tests immunologiques (Test ELISA) (Folkes - Wardaman, 2001; Ramadan et al., 2011).

- La conception des biosenseurs de H_2O_2 vu son activité biocatalytique (Shazia et *al.*, 2012).
- La détection et l'analyse des composés phénoliques présents dans les eaux usées via l'HRP immobilisée sur verre silice (Ye et *al.*, 2010).
- L'HRP est un modèle d'enzyme glutathion qui seul réagit avec plusieurs ions métalliques dont le (Cd^2) et permet la détoxification des cellules (Gregus et Klaassen, 1996).
- L'HRP est utilisée pour la dégradation de certains composés organiques comme les phénols (Shazia et *al.*, 2012).

II. MATERIEL ET METHODES

L'approche méthodologique développée dans notre recherche combine deux objectifs :

- L'essai d'élimination de l'eau de 02 métaux lourds ; le Cadmium et le Plomb , en utilisant un extrait enzymatique (Horseradish peroxidase (HRP)) partiellement purifié (6.5 U/ml) à partir des racine du raifort *Armoracia rusticana* suivis de contrôle des paramètres physicochimiques avant et après l'application du traitement biologique enzymatique.
- Recherche des effets toxiques sur les rats femelles de souche wistar alimentés de l'eau préalablement traitée, via des analyses hématologiques, hormonales (FT3, FT4, TSH) et sériques (CRP, NOs), suivies d'une étude histologiques des organes (thyroïde, foie, reins et rate).

Notre travail est réalisé durant une période s'étalant sur sept mois (du mois de février au mois de septembre 2014), et ceci au niveau de la station expérimentale de la Faculté de Science de la Nature et de la Vie de l'université Blida 1 et aux laboratoires suivants:

- Laboratoire des projets de fin d'études de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie,
- Laboratoire de cytologie et d'anatomie Pathologie CHU Mustapha BACHA -Alger ,
- Laboratoire de cytologie et d'anatomie Pathologie CHU Nafissa HAMOUD (Ex Parnet)- Alger,
- Laboratoire d'analyses médicales à Blida.

II.1.MATERIEL

II.1.1.Matériel biologique

Deux types de matériels biologiques ont été utilisés :

II.1.1.1.Matériel animal

L'expérimentation animale est réalisée sur quarante (40) rats femelles adultes de souche 'WISTAR' de poids corporel moyen de 128.16 g , récupérés depuis l'institut Pasteur de Kouba, Alger. Plusieurs caractéristiques font du rat WISTAR un model intéressant dans les études à long terme ; sa longévité (2 à 3 ans) permet une étude tout au long de la vie de l'animal, l'animal tolère le gavage, sa grande disponibilité favorise la constitution des lots de taille compatible aux évolutions statistiques des données expérimentales (Laroche-Rousselet, 1990).

II.1.1.2. Matériel végétal

Un extrait de l'enzyme HRP partiellement purifié à partir des racines du raifort (*Armoracia rusticana*) utilisé pour l'élimination des 02 métaux lourds toxiques (Cd et Pb) de l'eau. Le choix de cette enzyme a été basé sur le fait que l'HRP est utilisée dans divers domaines de la recherche fondamentale et clinique (Shazia et *al.*, 2012).

II.1.2. Matériel non biologique

Le matériel non biologique utilisé dans notre travail à savoir produits utilisés, verreries et appareillages se résume dans le tableau I de l'annexe 01.

II.2. METHODES

II.2.1. Expérimentation

II.2.1.1. Préparation des animaux

- Période d'acclimatation

Avant de commencer l'expérimentation, les rats ont été soumis à une période d'acclimatation, pendant sept (07) jours, à température ambiante et à une photopériode alternée de 12 heures d'obscurité suivie de 12 heures de lumière artificielle .

- Conditions expérimentales

Les animaux sont élevés individuellement dans des cages adaptés en plastique (Annexe 01) dans les conditions spécifiques à savoir ; la température : $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; l'éclairage naturel maintenu 12 heures sur 24 heures ; l'alimentation (Tableau II - Annexe 01) sous forme de bouchons provenant de l'Office National des Aliments de Bétail (ONAB). L'eau (témoin ou traitée) est donnée aux rats dans des biberons adaptés sur les cages pour une consommation 'ad libitum'.

- Préparation des lots des rats

Les rats utilisés pour notre expérimentation ont été répartis en 05 lots à raison de 08 rats par lot témoins et traités à savoir :

- Le lot témoin : l'eau d'alimentation est l'eau de robinet.
- Lot 01 Cd 0.5 ppm : l'eau d'alimentation est une eau exemptée de Cadmium à 0.5 ppm.
- Lot 02 Cd 1 ppm : l'eau d'alimentation est une eau exemptée de Cadmium à 1 ppm.

- Lot 01 Pb 2.5 ppm: l'eau d'alimentation est une eau exemptée de Plomb à 2.5 ppm.
- Lot 02 Pb 5 ppm: l'eau d'alimentation est une eau exemptée de Plomb à 5 ppm..

II.2.2.Préparation de l'eau d'alimentation des animaux

L'eau d'alimentation des lots traités a été préparée et exemptée de deux métaux lourds Cd et Pb par l'utilisation d'un extrait enzymatique ; peroxydase du raifort partiellement purifiée.

Les étapes de préparation de l'eau exemptée de métaux lourds sont résumées dans la Figure 5.

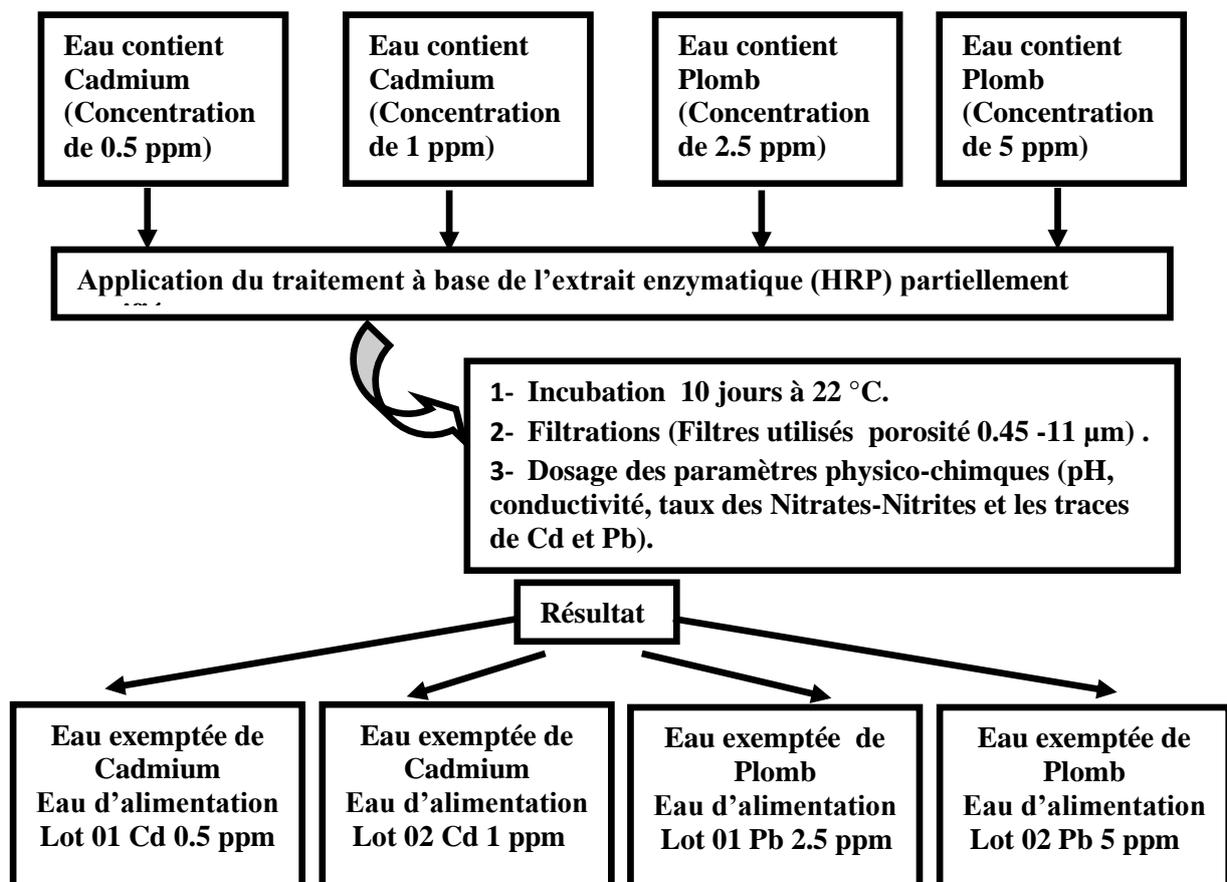


Figure N° 5 : Diagramme résumant les étapes de préparation de l'eau d'alimentation des rats d'expérimentation (lots traités).

Les animaux de chaque lot sont individuellement pesés au début et à la fin de la période d'expérimentation, et le poids corporel est enregistré afin de suivre l'évolution en masse corporelle de l'animal.

II.2.3. Dosage de quelques paramètres de contrôle de l'eau d'alimentation des rats

L'eau d'alimentation des rats est soumise à une analyse avant et après l'application du traitement de procédé biologique. L'essentiel des paramètres mesurés sont : le pH, conductivité, charge ionique, taux des nitrates et nitrites et le taux des traces des métaux lourds Cd et Pb.

II.2.3.1. Détermination du pH à 20 °C (AFNOR NFT 90-008,1986)

Le pH correspond au logarithme de la concentration en ions H^+ ; c'est la différence de potentiel existant entre deux électrodes plongées dans le produit.

a-Principe

La détermination du pH par la méthode potentiométrique, est réalisée à l'aide d'un pH-mètre Crison[®] instrument.

b-Mode opératoire

Le pH est mesuré par la méthode AFNOR NFT 90-008 selon les étapes suivantes :

- Etalonner le pH-mètre, en utilisant des solutions tampon.
- Prélever comme prise d'essai un volume V de l'échantillon suffisamment important pour permettre l'immersion de l'électrode, noter ensuite la valeur du pH affiché sur le pH-mètre (Rodier et *al.*,2009). Les mesures de pH ont été effectuées avant et après l'application du procédé biologique.

c-Lecture

La valeur du pH est directement lue sur le pH mètre Crison[®] instrument utilisé.

II.2.3.2. Détermination de la conductivité

La conductivité d'une eau dépend de la quantité d'ions initialement présents, par exemple les ions chlorures, sodium et ammonium (Dalmas,2000).

L'unité de mesure communément utilisée est exprimée souvent en micro Siemens/cm ($\mu S/cm$).

a-Principe

La détermination de la conductivité est réalisée à l'aide d'un Conductimètre Consort C860[®] instruments.

b-Mode opératoire

La conductivité est mesurée selon les étapes suivantes :

- Etalonner le conductimètre, en utilisant des solutions standards.
- Prélever comme prise de l'échantillon suffisamment important pour permettre l'immersion de l'électrode, noter ensuite la valeur de la conductivité affiché sur le conductimètre (Anonyme 6, 2011).

Les mesures de conductivité ont été effectuées avant et après l'application du procédé biologique.

c-Lecture

La valeur de la conductivité est directement lue sur le conductimètre Consort C860[®].

II.2.3.3. Détermination du taux des anions et des cations par chromatographie ioniques CI (Motrohm IC 881)

Le terme "Chromatographie Ionique" CI désigne la séparation d'ions organiques et inorganiques par une détection conductimétrique (Maximilian et *al.*, 2002)

a-Principe

Le principe de la CI est basé sur un échange d'ions sur une résine chargée soit positivement pour séparer des anions soit négativement pour séparer des cations.

La détermination des taux des anions (Fluoride (F⁻), Chloride (Cl⁻), Nitrate (NO₃⁻), Sulfate (SO₄⁻²)) et des cations (Lithium (Li⁺²), Potassium (K⁺), Calcium (Ca⁺)) est réalisée à l'aide d'une chromatographie ionique Motrhom IC 881 (Maximilian et *al.*, 2002) (Voir Annexe 01) .

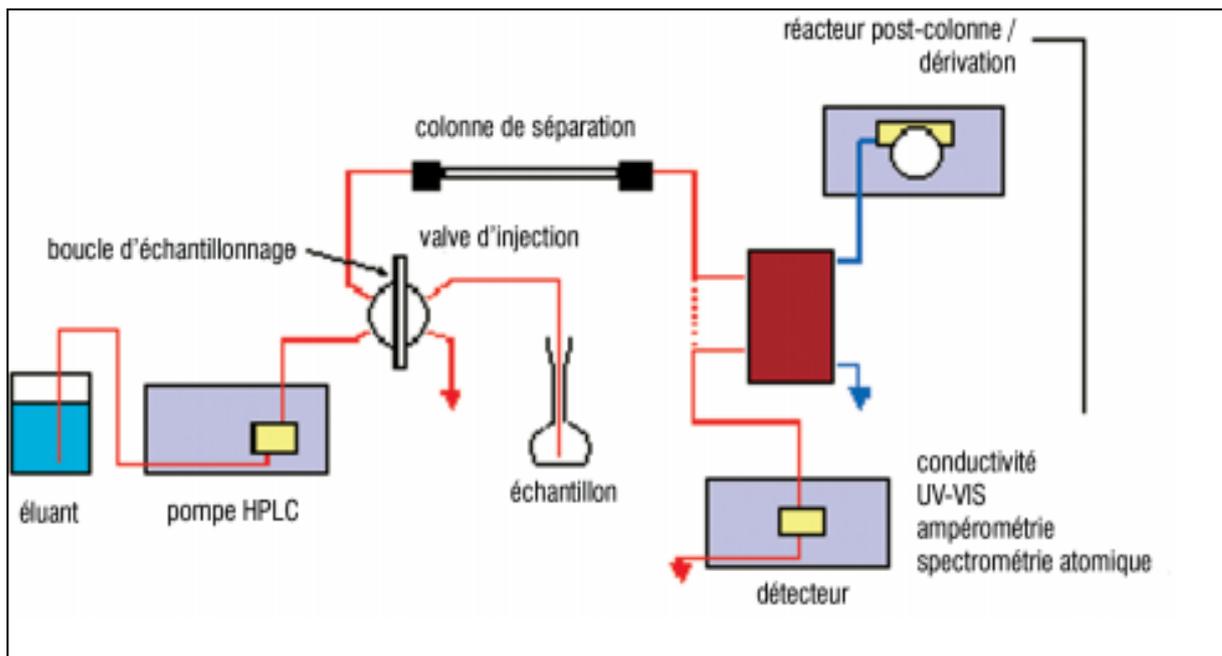


Figure 6 : Schéma d'un système CI avec les principaux éléments (Maximilian et *al.*, 2002).

b-Mode opératoire

- Vérifier des paramètres expérimentaux comme : la colonne, l'éluant, échantillon standard (anions et cations), la méthode, le système cationique ou anionique, le débit (ml/min) , la pression (MPa), la durée d'analyse (min), boucle d'échantillonnage 10 μ l , la polarité(Figure 6).
- Injection automatique de l'échantillon d'eau filtrée dans le système de chromatographie liquide : l'analyse des anions et des cations est réalisée à l'aide d'un détecteur conductimétrique du système.

Une moindre qualité de l'eau risque d'endommager l'appareillage et les colonnes de séparation (Maximilian et *al.*, 2002) ; c'est la raison pour laquelle on a effectué une analyse par CI uniquement pour l'échantillon de l'eau témoin.

c-Lecture

Le résultat est directement fourni par le software Metrohm IC 881[®] sous forme d'un chromatogramme exprimant la conductivité en fonction du temps de rétention des ions.

II.2.3.4. Détermination du taux des nitrates et des nitrites (Quantofix[®] Nitrate Nitrite)

a-Principe

C'est une étude semi quantitative pour la détermination des taux des nitrates et des nitrites contenus dans un volume d'échantillon d'eau (Quantofix[®] MACHEREY- NAGEL, 1998).

b-Mode opératoire

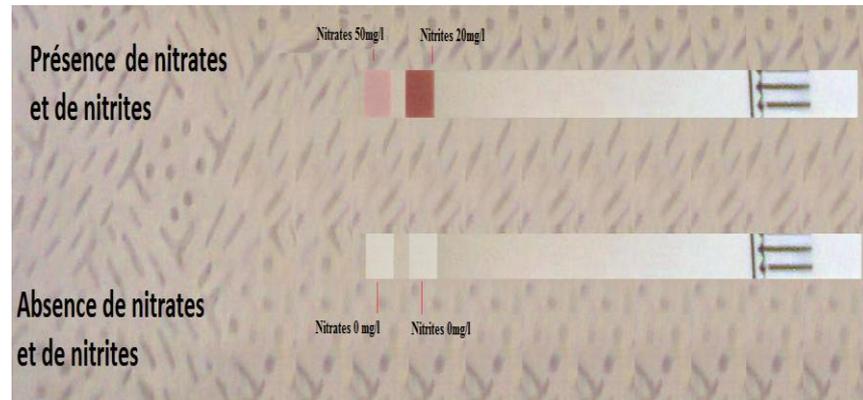
- Plonger la bandelette Quantofix[®] (Voir Annexe 01). dans un volume de 10 ml environ d'eau.
- Laisser incuber pendant 1 minute environ.
- Retirer la bandelette pour la lecture (Quantofix[®] MACHEREY- NAGEL, 1998).

c- Lecture

- Comparer la bandelette avec l'échelle de mesure après 1 minute. (Figure 7 A).
- En présence des nitrates et nitrites ; la zone de mesure se colore en rouge violet et montre ainsi la concentration en nitrates et nitrites contenu dans l'échantillon. (Figure 7 B).



(A)



(B)

Figure 7: Lecture des résultats sur les bandelettes Quantofix[®] Nitrate Nitrite (Photos Originale).

II.2.3.5. Dosage des traces de métaux lourds Cadmium et Plomb par Spectrophotométrie d'Absorption Atomique (SAA) (Buck modèle 210VGP)

Le dosage des métaux dans l'eau est réalisé par la spectrophotométrie d'absorption atomique avec flamme (SAA). Cette méthode est appliquée aussi pour les sédiments et pour le matériel biologique (Pinta *et al.*, 1980).

a-Principe

Une solution contenant l'élément métallique à doser est injectée dans une flamme dans laquelle les éléments tendent à rester à l'état fondamental. Une radiation de longueur d'onde caractéristique de l'élément à doser provenant d'une lampe à cathode creuse est émise à travers la flamme.

En absorbant cette énergie, les atomes passent à l'état excité. La baisse de l'intensité de la radiation due à l'absorption d'énergie est mesurée par un spectrophotomètre, et elle est fonction du nombre d'atomes présents sur le chemin de la radiation à tout moment (Delval, 1984).

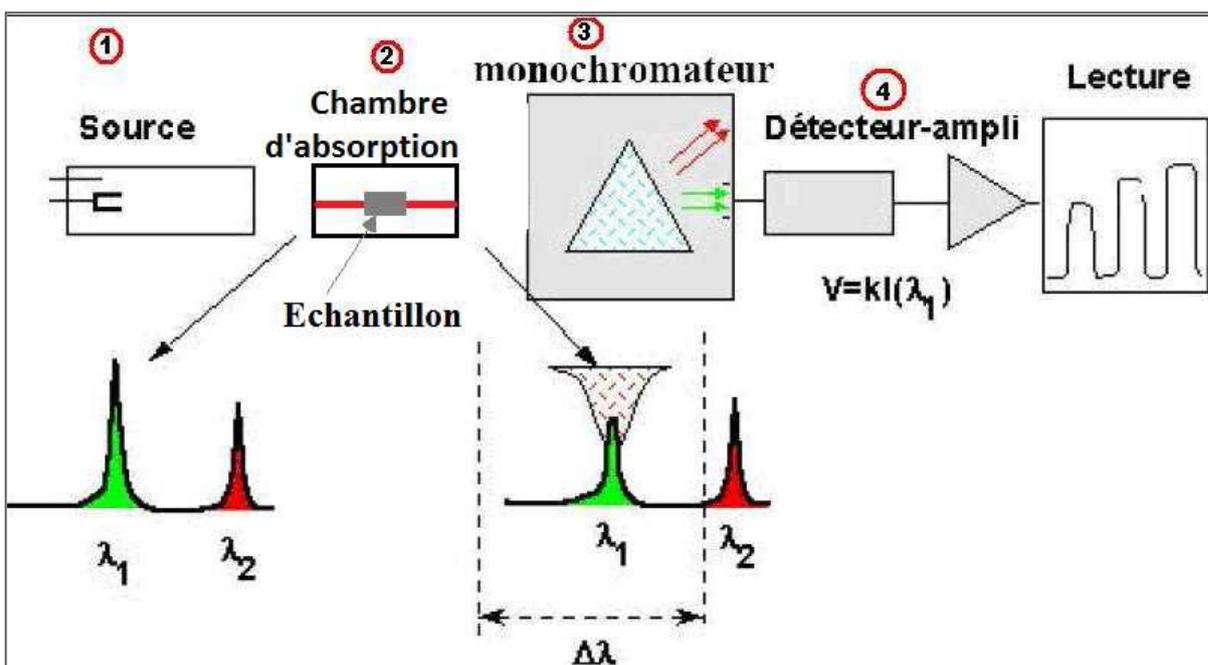


Figure 8: Les instruments de base pour la Spectrométrie d'Absorption Atomique (SAA) (Pradyt, 2004).

b-Mode opératoire

Le protocole de dosage se déroule en deux étapes :

1/ Préparation des dilutions standards et blanc

- Préparer une série de dilution a partir de la solution standard de Cadmium et Plomb comme indiqué dans les tableaux III & IV. (Utiliser des fioles jaugé Pyrex 50 et 100 ml).

- **Cadmium:** Les concentrations obtenues varient entre 0.005-1 ppm :

Tableau III: Préparation de la série des standards (0.005 ppm, 0.01 ppm, 0.1 ppm, 0.9 ppm, 1 ppm) à partir de la solution mère standard Cadmium Cd (1000 ppm).

Standard 1: 0.005 ppm	Standard 2: 0.01 ppm	Standard 3 : 0.1 ppm	Standard 4 : 0.9 ppm	Standard5 : 1 ppm
Ajouter 75 µl d'acide Nitrique(65%) + 250 µl de solution Standard 5	Ajouter 75 µl d'acide Nitrique (65%) + 500 µl de solution Standard 5	Ajouter 75 µl d'acide Nitrique(65%)+ 5 ml de solution Standard 5	Ajouter 75 µl d'acide Nitrique(65%)+ 45 ml de solution Standard 5	Ajouter 150 µl d'acide Nitrique(65%) + 100 µl de solution mère
Compléter jusqu'au volume de 50 ml avec de l'eau distillée				Compléter jusqu'au volume de 100 ml avec de l'eau distillée

- Préparation de la solution blanc : Déposer 150 µl d'acide Nitrique (65%) dans une fiole 100 ml et compléter jusqu'au trait jaugée avec de l'eau distillée.

- **Plomb:** Les concentrations obtenues varient entre 0.1-15 ppm :

Tableau IV: Préparation de la série des standards (0.1 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm) à partir de la solution mère : Standard nitrates de plomb Pb NO₃ (1000 ppm).

Standard 1 : 0.1 ppm	Standard 2 : 1 ppm	Standard 3 : 5 ppm	Standard 4 : 10 ppm	Standard 5 : 15 ppm
Ajouter 75 µl d'acide Nitrique (65%) + 333 µl de solution Standard5	Ajouter 75 µl d'acide Nitrique (65%) + 3.33 ml de solution Standard5	Ajouter 75 µl d'acide Nitrique (65%) + 16.66 ml de solution Standard5	Ajouter 75 µl d'acide Nitrique (65%) + 33.33 ml de solution Standard5	Ajouter 150 µl d'acide Nitrique (65%) + 1.5 ml de solution mère
Compléter jusqu'au volume de 50 ml avec de l'eau distillée				Compléter jusqu'au volume de 100 ml avec de l'eau distillée

- Préparation de la solution blanc : Déposer 150 µl d'acide Nitrique (65%) dans une fiole 100 ml et compléter jusqu'au trait jaugée avec de l'eau distillée.

2/ Dosage des traces de métaux lourds Cadmium et Plomb par SAA

- Placer la lampe à cathode creuse de l'élément à doser.
- Ajuster la lampe et allumer la flamme.
- Laisser le nébuliseur absorber le blanc (environ 2 ml) : Afficher l'absorbance à 0.
- Laisser le nébuliseur absorber les solutions standards par intermittence avec la solution du blanc. Répéter cette étape avec les solutions des échantillons à doser.
- Les valeurs d'absorbance des standards enregistrées sont traduites sous forme de courbe standards : $Abs = f(C \text{ (mg/l)})$.

c-Lecture

A partir de la courbe standard, l'ordinateur donne par lecture, après mesure de l'absorbance de chaque échantillon, la concentration du métal étudié dans la solution préparée (en ppm ou mg/l).

II.2.4.Sacrifice des animaux

Après la période d'expérimentation de trente (30) jours, un sacrifice de tous les animaux a eu lieu, l'animal maintenu à jeun depuis la veille au matin en vue de son sacrifice pour le lendemain. Les sacrifices sont réalisés par décapitation (Figure 9 B et C) après son anesthésie au chloroforme (Figure 9 A) et cela la matinée de 9h à 11 heure afin d'éviter les variations hormonales pendant la journée.



Figure 9 : Photographies illustrant les étapes du sacrifice des rats.

- (A) Anesthésie du rat en utilisant le Chloroforme. (Photos originale)
- (B) Décapitation d'un rat et prélèvement sanguin. (Photos originale)
- (C) Dissection d'un rat. (Photos originale).

II.2.5.Prélèvement des échantillons

II.2.5.1.Prélèvement sanguin

Le sang artério-veineux recueilli dans des tubes portant un numéro d'identification de chaque rat ainsi que la mention traité ou témoin (Figure 9 B).

Deux types de tubes de prélèvement sont utilisés :

- Des tubes secs destinés au dosage hormonale (FT3, FT4 et TSH) et biochimique (CRP) ; le sérum récupéré après centrifugation 3000 tours pendant 20 minutes.
- Des tubes contenant un anti coagulant Acide Ethylique Tétracétique 10 % (EDTA 10 %) ; destinés aux dosages hématologiques (FNS) et biochimiques (Métabolites NOs).

II.2.5.2. Prélèvement des organes

Les organes du rat tels que ; la thyroïde , le foie , la rate et les reins sont rapidement prélevés, débarrassés de leur tissu adipeux, rincés avec de l'eau physiologique, déshumidifiés, pesés puis placés dans des cassettes dans un liquide fixateur 'Formol à 10%' afin de procéder à une étude histologique des divers tissus. Les poids absolu et relatif des organes des différents lots sont enregistrés et comparés entre eux ; afin d'évaluer l'effet de l'eau consommée sur les organes de l'animal.

Le poids relatif de l'organe (g%) (g/100 de l'animal) est déterminé comme suit :

$$\text{Le poids relatif de l'organe (g\%)} = \frac{\text{Poids absolu de l'organe (g)}}{\text{Poids absolu de l'animal (g)}} \times 100$$

II.2.6. Dosage des paramètres hématologiques

II.2.6.1. Hémogramme (Formule de Numération Sanguine -FNS)

Par définition, l'hémogramme est l'étude cytologique quantitative et qualitative du sang circulant (Scipioni et *al.*, 1997).

a-Principe

Le principe de l'hémogramme réalisé par l'analyseur hématologique de type Sysmex KX21N (voir Annexe 01) est basé sur l'analyse des cellules par cytométrie en flux. Les cellules étudiées passent les unes à la suite des autres à travers un faisceau laser afin de réaliser deux mesures pour chacune des cellules ; une mesure de quantification de la teneur en ARN d'une cellule ; la deuxième évalue la taille et de la densité de cette cellule (Evans et *al.*, 1994).

b-Mode opératoire

L'hémogramme est réalisé selon les étapes suivantes :

- Placer l'échantillon sanguin contenu dans le tube EDTA au niveau de l'aiguille d'absorption de façon qu'elle y soit plongée, laisser absorber l'échantillon quelques secondes.
- Retirer le tube de l'aiguille d'absorption après lecture.

c-Lecture

Le résultat est directement fourni par l'automate sous forme d'un diagramme sanguin ; et contient des appréciations quantitatives sur les cellules sanguines.

II.2.6.2. Etude de l'équilibre leucocytaire sur un frottis sanguin (Coloration May-Grünwald Giemsa (MGG))

L'étude du frottis est extrêmement utile au diagnostic cytologique de nombreuses maladies hématologiques et parasitaires.

a-Principe

Le frottis sanguin est un étalement d'une goutte de sang sur une lame de verre, coloré selon la coloration de type Romanowsky (Mitruka, 1977). Parmi les colorations de ce type, on utilise la coloration May-Grünwald-Giemsa et enfin lu au microscope optique. (Voir Annexe 01).

b-Mode opératoire

- On étale à l'aide d'une autre lame une goutte de sang vers l'autre extrémité de la lame support.
- Une monocouche cellulaire est obtenue : c'est le frottis sanguin.
- Le frottis doit être ensuite rapidement séché à l'air pendant une demi-heure (Bailly, 1990).
- Après le séchage, le frottis est coloré avec la coloration May-Grünwald-Giemsa.

Les étapes de la coloration May-Grünwald-Giemsa sont:

- Fixation et coloration par le May-Grünwald pendant 3-5 minutes.
- Riçage à l'eau tomponnée pH = 7 pendant 2-3 minutes.
- Coloration par le Giemsa diluée au 1/10 dans l'eau tomponnée pendant 20 à 30 minutes.
- Riçage à l'eau tomponnée pH = 7 pendant 2-3 minutes.
- Séchage des lames à l'air libre (minimum 05 minutes).

c-Lecture

- Contrôle du frottis au grossissement X40 afin de vérifier la répartition des cellules.
- Lecture du frottis au grossissement X100 : Un comptage des leucocytes est effectué pour 50 champs d'observation :
 - Les neutrophiles ont un cytoplasme presque incolore, le noyau violet foncé est plurilobé.
 - Les éosinophiles ont un cytoplasme bien coloré, le noyau est sous forme d'anneau.
 - Les lymphocytes ont une fine bande de cytoplasme bleu clair, le noyau rond à chromatine très dense.

- Les monocytes sont des cellules de la lignée macrophagique plus grosse ; le cytoplasme est gris bleuté et le noyau de forme variable et irrégulière (arrondie ou en haricot) est très gros (Bailly,1990).

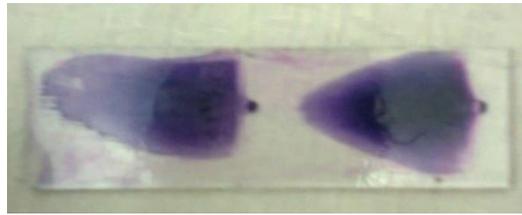


Figure 10 : Frottis sanguin d'un rat femelle wistar coloré par coloration May-Grünwald-Giemsa (photos originale).

II.2.7. Dosage des hormones thyroïdienne et de la thyrostimuline

Les dosages les plus fréquents pour explorer la fonction thyroïdienne sont le dosage de l'hormone Thyroestimuline (TSH), l'hormone Triiodothyronine libre (FT3) et l'hormone Thyroxine libre (FT4).

II.2.7.1. Détermination des hormones thyroïdienne Triiodothyronine libre (FT3) et la Thyroxine libre (FT4)

a-Principe

Le principe de la détermination quantitative de la Triiodothyronine libre (FT3) et la Thyroxine libre (FT4) dans le sérum, est basé sur le dosage immunologique microparticulaire par chimiluminescence (CMIA) adopté par les analyseurs ARCHITECT SYSTEM i 4000 SR® (Anonyme 3, 2010; Anonyme 4, 2009).

b-Mode opératoire

Le dosage immunologique des FT3 ou la FT4 se fait en deux étapes :

- **Première étape :** Mettre en contacte la prise d'essai de 75 µl de sérum préalablement préparé et les microparticules paramagnétiques recouvertes d'anticorps (anti-T3 ou anti-T4 selon la nature du dosage).

Résultat : La FT3 ou la FT4 présentes dans l'échantillon se lient aux microparticules recouvertes d'anticorps (anti-T3 ou anti-T4).

- **Deuxième étape** : Un lavage suivi de l'ajout du conjuguée T3 ou T4 marqué à l'acridinium. Les solutions de préactivation et d'activation sont ensuite ajoutées au mélange réactionnel.

Résultat : Emission chimiluminescence qui détermine la quantité de FT3 ou FT4 dans l'échantillon. (Kits de dosage utilisés sont présentés dans l'Annexe 01).

c-Lecture

La réaction de chimiluminescence qui résulte est mesurée en unités relatives de lumière (URL) via le système optique ARCHITECT *i*. Les résultats sont exprimés en pg/ml ou en pmol/l (Anonyme 3, 2010; Anonyme 4, 2009).

II.2.7.2.Détermination de l'hormone thyroïdienne (TSH)

a-Principe

La détermination quantitative de la thyroïdienne (TSH) dans le sérum est basée sur le dosage qui associe la méthode immunoenzymatique sandwich en une étape à une détection finale en fluorescence (Enzym Linked Fluorescent Assay -ELFA), adopté par les analyseurs VIDAS[®] TSH3 (Anonyme 8, 2010).

b-Mode opératoire

Toutes les étapes du test sont réalisées automatiquement par l'instrument VIDAS[®] TSH3.

Le dosage TSH se fait en deux étapes :

- **Première étape** : Une prise d'essai de 200 µl de sérum préalablement préparé est transférée dans les puits contenant de l'anticorps anti-TSH marqué à la phosphatase alcaline (conjugué). Le mélange échantillon conjugué est aspiré et refouler plusieurs fois par le cône de l'instrument. En fin un lavage automatique afin d'éliminer les composés non fixés.

Résultat : L'antigène va se lier d'une part aux immunoglobulines fixées sur les cônes et d'autres part au conjugué formant ainsi un sandwich.

- **Deuxième étape** : Le substrat (4-Methylumbelliferyl phosphate) est ajouté au cône.

Résultat : L'enzyme du conjugué catalyse la réaction d'hydrolyse de ce substrat en un produit (4-Methylumbelliférol) dont la fluorescence émise est mesurée à 450nm.

La valeur du signal de fluorescence est proportionnelle à la concentration de l'antigène présent dans l'échantillon. (Kit de dosage utilisé voir Annexe 01) (Anonyme 8, 2010).

c-Lecture

Les résultats sont calculés automatiquement par le Software VIDAS[®] TSH3 de l'instrument par rapport à deux courbes de calibration mémorisées (modèle mathématique et model logistique à 4 paramètres). Les résultats sont exprimés en $\mu\text{UI/ml}$ (Anonyme 8, 2010).

II.2.8. Dosage de la Protéine C- Réactive (CRP) par méthode Latex- Turbidimétrie

a-Principe

La Protéine C- Réactive (CRP) sérique provoque l'agglutination des particules de latex couvertes avec les anticorps anti Protéine C- Réactive (Anti-CRP). L'agglutination des particules de latex est proportionnelle à la concentration en CRP et peut être quantifié par turbidimétrie (Anonyme 5, 2013). C'est le principe de dosage adopté par les analyseurs BioSystems[®]. (Voir Annexe 01).

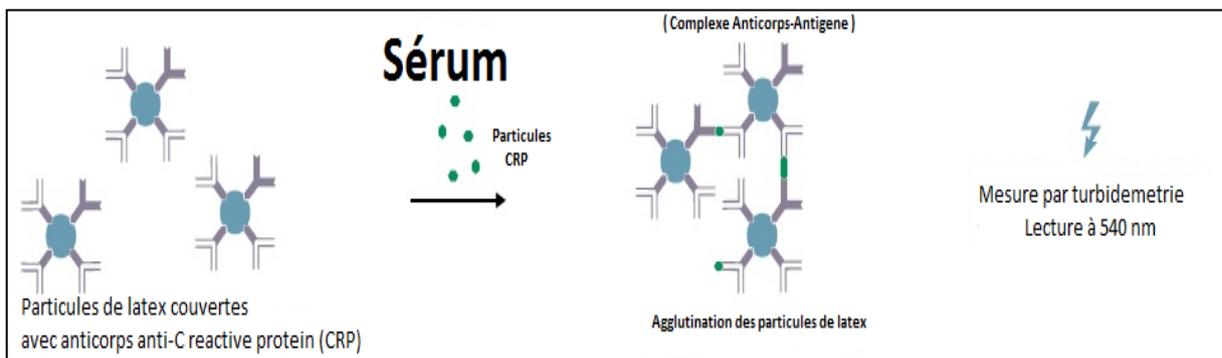


Figure 11: Principe de dosage de la Protéine C- Réactive (CRP) par méthode d'agglutination Latex- Turbidimétrie (Anonyme 3, 2014).

b-Mode opératoire

- Préchauffer le réactif de travail et l'appareil de mesure à 37°C.
- Ajuster le spectrophotomètre à zéro avec de l'eau distillée.
- Pipeter dans la cuve de mesure 1 ml de réactif de travail.
- Ajouter 7 μl d'échantillon. (même procédure pour l'étalon).
- Homogénéiser et insérer la cuve dans l'appareil. mettre le chronomètre en marche.
- Lire les absorbances à 540 nm après 10 secondes (A1) et deuxième lecture après 2 minutes (A2) ; la courbe de calibration est effectuée à l'aide de l'étalon de CRP fourni par le kit de dosage utilisé. (Kit de dosage utilisé voir Annexe 02).

c-Lecture

Les concentrations en CRP dans l'échantillon est calculée à partir de la formule générale suivante :

$$C_{\text{Echantillon}} \text{ (mg/l)} = \frac{(A_2 - A_1)_{\text{Echantillon}}}{(A_2 - A_1)_{\text{Etalon}}}$$

Soit :

- $(A_2 - A_1)_{\text{Echantillon}}$: Différence d'absorbance de l'échantillon, lue à 540nm. (Après 10 secondes et 2 minutes).
- $(A_2 - A_1)_{\text{Etalon}}$: Différence d'absorbance de l'étalon de concentration précisée dans le kit, lue à 540nm . (Après 10 secondes et 2 minutes).
- $C_{\text{Echantillon}}$: Concentration de l'échantillon à doser en mg/l (BioSystem[®], 2013).

II.2.9. Dosage des métabolites de l'oxyde nitrique (nitrites totaux) par la méthode de Griess modifiée

a-Principe

Le principe de dosage des métabolites de l'oxyde nitrique est basé sur une réduction des nitrates (NO₃) en nitrites (NO₂) par voie microbiologique. Ensuite une seconde étape fut un dosage colorimétrique des nitrites totaux utilisant le réactif de Griess (Djerabaa et al.,2010).

Réactif de Griess est composé de deux réactifs : 1.Acide sulfanilique et 2.alpha-naphthylamine.



Figure 12: Voie de réduction des Nitrates.(Knapp et al., 1984)

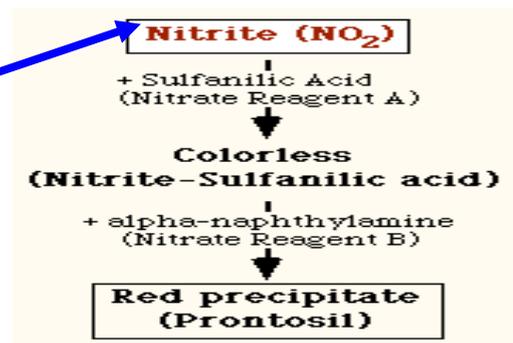


Figure 13 : La détection des nitrites par le reactif de Griess (Skerman,1967)

b-Mode opératoire

Le protocole de dosage se déroule en deux étapes :

1/ Préparation des dilutions standards

Préparer une série de dilution à partir de la solution standard comme indiqué dans le tableau V. La solution de standard utilisée est le sodium nitrite (1.0 mM) diluée dans l'eau distillée. Les concentrations obtenues varient entre 1-100 µM.

Tableau V: Préparation de la série de dilution (1 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM) à partir de la solution standard sodium nitrite (1.0 mM).

Solution1 : 100 µM	Solution2 : 50µM	Solution3 : 25 µM	Solution4 : 10 µM	Solution5 : 1 µM
100 µl de solution standard + 900 µl d'eau distillée	500 µl de solution 01 + 500 µl d'eau distillée	500 µl de solution 02 + 500 µl d'eau distillée	400 µl de solution 03 + 600 µl d'eau distillée	100 µl de solution 04 + 900 µl d'eau distillée

2/ Détermination des taux de nitrites des solutions standards et de l'échantillon par le réactif de Griess

Le plasma a été récupéré après centrifugation de sang à 5000 rpm pendant cinq minutes.

- 50 µl de plasma et des solutions standards ont été mélangés avec 25 µl de PBS et 25 µl de la suspension bactérienne E.coli ATCC 25922 (Voir tableau I- annexe 1), nitrate réductase+.

Le mélange a été incubé à 37 °C pendant 90 minutes (Touil-Boukoffa et *al.*, 1996).

- Un dosage colorimétrique des nitrites totaux ; pour ce faire :
 - Rajouté aux 100 µl du mélange précédent (échantillon ou standard) ,100 µl du réactif de Griess et 800 µl d'eau distillée.
 - Laisser incuber à l'obscurité 05 minutes.
 - Centrifuger le mélange à 10 000 rpm pendant dix minutes.

- Le surnageant est récupéré et l'intensité de la coloration est lue à 543nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Touil-Boukoffa et *al.*, 1998).

c-Lecture

- L'absorbance des solutions standards mesurée permet de tracer une courbe d'étalonnage.
 $Abs = f(\text{Concentration des Nitrites des standards})$.
- Les valeurs lues de l'absorbance des échantillons sont converties en concentration de nitrite par extrapolation sur la courbe des standards.

II.2.10. Etude histologiques

Afin de réaliser l'étude histopathologique sur les différents organes prélevés de l'animal (thyroïde, reins, foie, rate); les étapes suivies étaient conformes à celles décrites par Martoja et Martoja (1967).

II.2.10.1. Fixation et rinçage

Cette étape consiste à fixer les organes prélevés dans une solution de formol 10 % pendant 48 heures puis lavés à l'eau courante pendant 24 heures. La fixation et le rinçage visent à :

- Immobiliser les structures histologiques et de conserver au maximum leurs morphologie.
- Confection des préparations permanentes de pièces prélevées.

II.2.10.2. Déshydratation et éclaircissement

Cette étape est réalisée automatiquement via l'automate Leica. (Voir Annexe 01).

Déshydratation

Les pièces sont imprégnées dans sept bains d'alcool éthylique à concentration croissantes :

- Bain d'alcool 70° : Trois bains de 30 minutes chacun.
- Bain d'alcool 95° : Deux bains de 30 minutes chacun.
- Bain d'alcool 100° : Deux bains de 30 minutes chacun. (Annexe 01).

Eclaircissement

Les pièces sont ensuite imprégnées dans deux bains de xylène pendant 30 minutes chacun.

II.2.10.3.Imprégnation

Dans une étuve réglée à 58 °C, les pièces sont imprégnées dans deux bains successifs d'une heure chacun :

- Premier bain : composé de 50% xylène pure et de 50% de paraffine pure dissoute. (Pendant une heure).
- Deuxième bain : composé de la paraffine pure. (Pendant une heure).

II.2.10.4.Inclusion et mise en bloc

L'inclusion et la mise en bloc sont réalisées via l'automate Leica. (Voir Annexe 01).

L'inclusion comporte les étapes suivantes :

- Ecoulement de la paraffine dans des moules métalliques.
- Inclusion et orientation des pièces dans la paraffine.
- Dépôt des cassettes portant des informations sur l'organe de l'animal.
- Refroidissement des blocs de paraffine sur la plaque réfrigérée de l'automate de l'inclusion.

II.2.10.5.Confection des coupes

Les blocs obtenus sont coupés à l'aide d'un microtome de type Leica (Voir Annexe 01) .Les coupes sont d'une épaisseur de 3 µm.

II.2.10.6.Collage des rubans des coupes et leur séchage

- Les rubans des coupes sont étalés dans un bain d'eau thermostatée (37 °C) puis recupérés et collés sur les lames en verre de microscope.
- Les lames sont ensuite séchées dans l'étuve à 37 °C pendant 24 heures.

II.2.10.7.Déparaffinage et hydratation

Le déparaffinage sert à enlever la paraffine des tissus pour que les colorants puissent les pénétrer ; pour ce faire les coupes déjà étalées sur les lames sont passées dans deux bains de xylène pendant 15 minutes chacun.

L'hydratation a pour objet de retirer le xylène des tissus et le remplacer par l'eau ; pour ce faire les coupes préalablement déparaffinées sont passées pendant quelques secondes dans quatre bains d'éthanol à concentrations décroissantes : 100°, 96°, 75°, 50°.

Les lames sont ensuite lavées à l'eau courante pendant 5 minutes.

II.2.10.8. Coloration

Les colorations réalisées des organes sont la coloration Hématoxyline –Eosine (HE) et la coloration de Trichrome de Masson.

- Coloration Hématoxyline –Eosine (HE)

Cette méthode colore le noyau en bleu-noir (hématoxyline) alors que le cytoplasme et la matrice extracellulaire sont colorés en rose (éosine). Les étapes de la coloration sont les suivantes:

- Passage des lames dans un bain d' Hématoxyline de Groat pendant 3 minutes.
- Rinçage des lames à l'eau courante.
- Passage des lames dans un bain d' eosine pendant 30 secondes.
- Rinçage des lames à l'eau courante.
- Différencier la coloration dans des bains successifs d'alcool à concentration croissante 75°,96°, 100°. (passage pendant quelques secondes).
- Passage des lames dans deux bains de xylène.

- Coloration de Trichrome de Masson (TM)

Cette méthode à pour but la mise en évidence du collagène.

Les étapes de la coloration sont les suivantes:

- Passage des lames dans un bain d' Hemalun de Hansen pendant 3 minutes.
- Rinçage des lames à l'eau courante.
- Passage des lames dans un bain de fuschine-ponceau (1 %) pendant 10 secondes.
- Rinçage des lames à l'eau courante.
- Différencier la coloration dans un bain d'acide phosphotungstique (1%) pendant 10minutes.
- Rinçage des lames à l'eau courante.
- Passage des lames dans un bain de bleu d'aniline pendant 10 secondes.
- Rinçage des lames à l'eau courante.

II.2.10.9.Montage et observation

- Les lames sont collées avec les lamelles en utilisant l'Eukitt. (Voir Annexe 01).
- Laisser sécher le montage (lames et lamelles).
- Observer les coupes histologiques colorées à l'aide de microscope photonique muni de camera (Voir Annexe 01) à différents grossissements : X10, X40, X100.

II.2.11.Analyse statistique

L'étude statistique des différents paramètres étudiés (l'évaluation de la qualité de l'eau d'alimentation, l'évolution pondérale, le poids absolu et relatif des organes ainsi que les paramètres hématologiques hormonaux et biochimiques des rats) a été réalisé par le logiciel *Statistica* version 8. (Test statistique : ANOVA).

Les résultats sont présentés sous forme de Moyenne \pm Ecart type. (Voir Tableaux XXII de l'annexe 02).

L'analyse de la variance ANOVA est suivie par une comparaison intergroupe des différents lots étudiés. Les différences ont été jugées :

- Non significative (NS) quand $p > 0,05$.
- Significative (*) quand $0,02 < p < 0,05$.
- Très significative (**) quand $0,01 < p < 0,02$.
- Hautement significatives (***) quand $p < 0,01$.

III.1. RESULTATS

La recherche des effets toxiques sur les rats femelle 'WISTAR' alimentés d'eau préalablement exemptée de deux métaux lourds, le Cadmium et le Plomb par procédé biologique s'est basée sur les études suivantes:

- Dosage de quelques paramètres de contrôle de l'eau d'alimentation des rats.
- Evolution des poids corporel et les poids des organes.
- Dosage des paramètres hématologiques.
- Dosage des hormones thyroïdiennes et de la thyroïdostimuline.
- Dosage sérique de la Protéine C-Réactive (CRP) et des métabolites d'oxide nitrique (Nos).
- Etudes histologiques des organes à savoir la glande thyroïde, le foie, les reins et la rate.

III.1.1. Dosage de quelques paramètres de contrôle de l'eau d'alimentation des rats

III.1.1.1. Mesure du pH, la conductivité et les taux des nitrates et nitrites

• pH

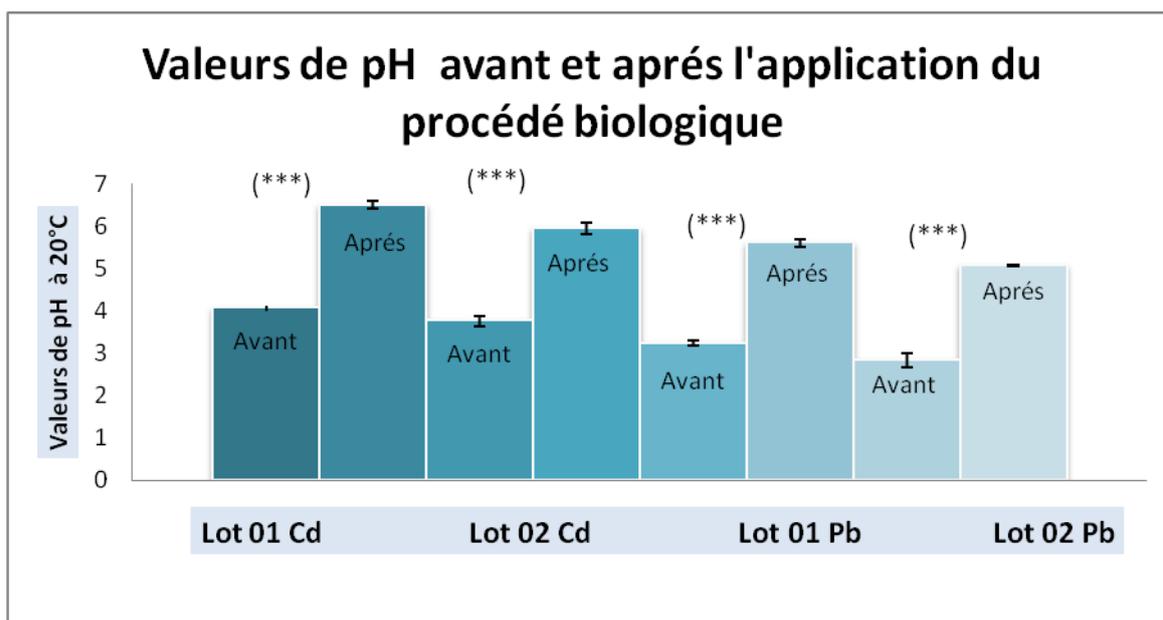


Figure 14: Valeurs moyennes du pH et leurs significations avant et après traitement de l'eau d'alimentation des rats. Nombre d'échantillons analysés pour chaque lot (N=7).

D'après les résultats de la Figure 14 et le tableau IV de l'annexe 02, les échantillons d'eau analysés des différents lots présentent une augmentation des valeurs de pH après le traitement biologique utilisé (Lot 01 Cd : 2,44 ; Lot 02 Cd : 2,18 ; Lot 01 Pb : 2,36 ; Lot 02 Pb: 2,23). Cependant les valeurs moyennes du pH avant et après le traitement présentent une différence hautement significative.

- Conductivité

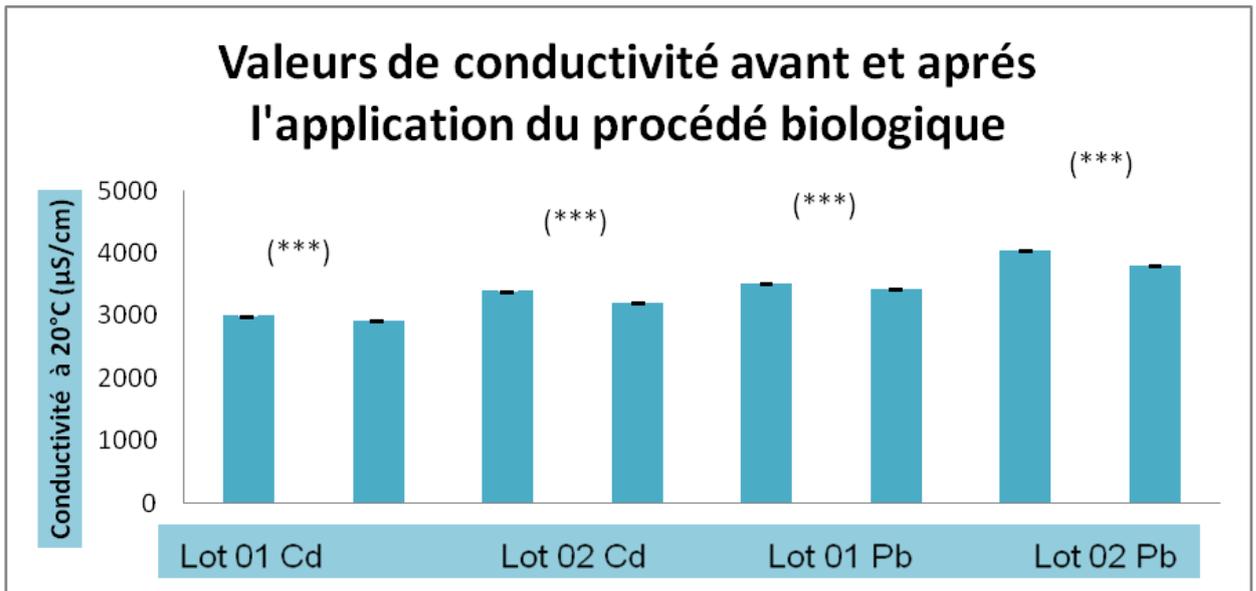


Figure 15 : Valeurs moyennes de la conductivité et leurs significations avant et après traitement de l'eau d'alimentation des rats. Nombre d'échantillons analysés pour chaque lot (N=7).

D'après les résultats de la Figure 15 et le tableau V de l'annexe 02, les échantillons d'eau analysés des différents lots présentent une diminution des valeurs de la conductivité après le traitement biologique utilisé (Lot 01 Cd : 89,3 µS/cm; Lot 02 Cd : 197,6 µS/cm ; Lot 01 Pb: 88,9 µS/cm ; Lot 02 Pb:256,5 µS/cm). Cependant les valeurs moyennes de la conductivité avant et après le traitement présentent une différence hautement significative.

- Taux de nitrates et des nitrites

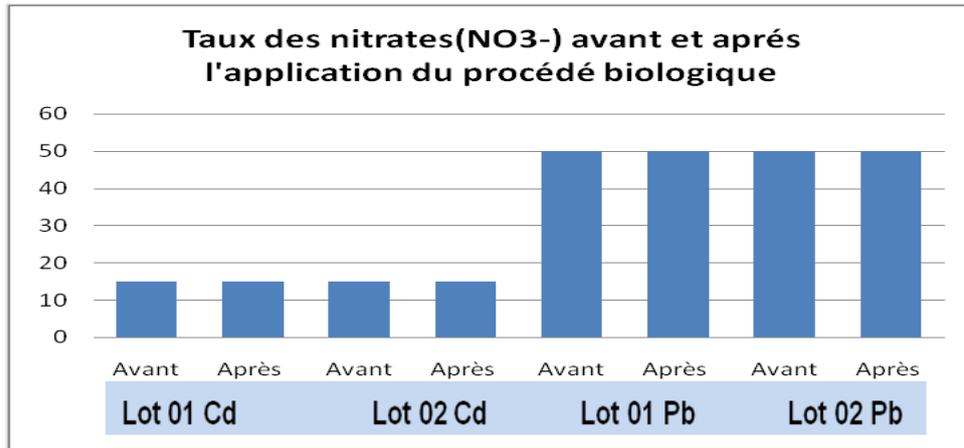


Figure 16: Valeurs moyennes des taux des nitrates et leurs significations avant et après traitement de l'eau d'alimentation des rats. Nombre d'échantillons analysés pour chaque lot (N=7).

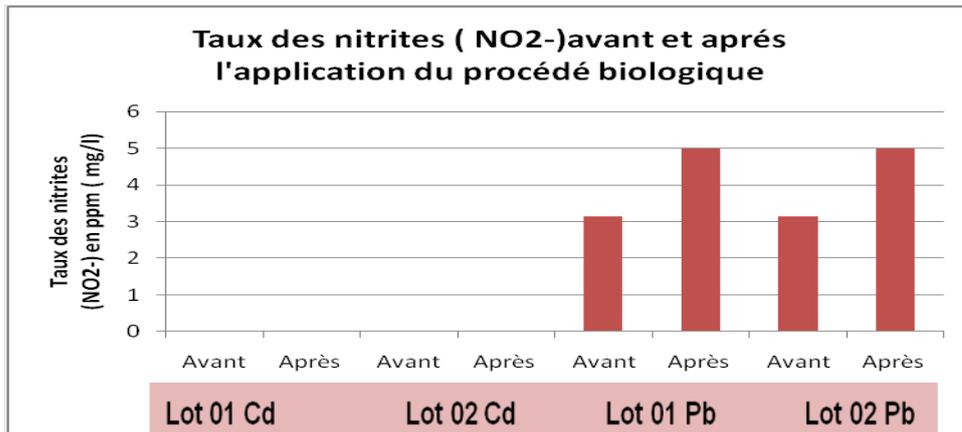


Figure 17 : Valeurs moyennes des taux des nitrites et leurs significations avant et après traitement de l'eau d'alimentation des rats. Nombre d'échantillons analysés pour chaque lot (N=7).

D'après les résultats des Figures 16 et 17 et le tableau VI de l'annexe 02, le traitement biologique utilisé pour l'élimination des métaux lourds des échantillons d'eau analysés, ne semble pas affecter leurs concentrations en nitrates ((NO₃⁻) 25-50 ppm).

Même chose a été constaté pour les nitrites ((NO₂⁻): 0-1 ppm), à l'exception des lots 01 Pb et 02 Pb qui montrent une faible augmentation des concentrations en ((NO₂⁻), les différences sont jugées statistiquement non significatives.

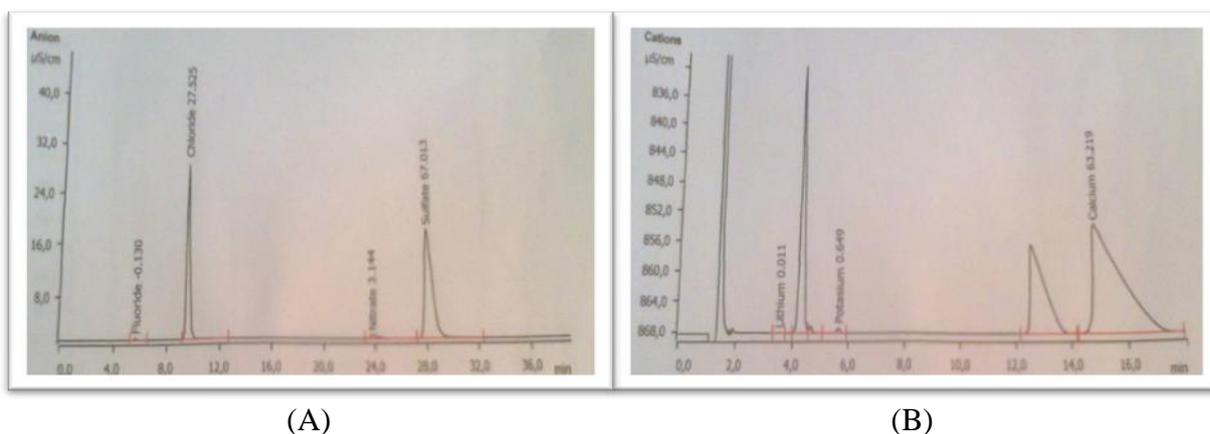
Tableau IX: Les valeurs moyennes du pH , la conductivité et les taux de nitrates et nitrites de l'eau d'alimentation des différents lots de rats de l'expérimentation .(Conformité à la norme algérienne).

Paramètres Contrôlés	Les eaux d'alimentation des différents lots des rats				
	Lot Témoin	Lot 01 Cd	Lot 02 Cd	Lot 01 Pb	Lot 02 Pb
pH à 20°C	7,1 ±0,1	6,5 ±0,08	5,94± 0,13	5,6 ± 0,081	5,07 ±0,009
NORME ALGERINNE NA6360 : 6.5-8.5					
Conductivité C (µS/cm)	2788,71 ±4,424	2913,71 ±38,29	3210,43 ±8,40	3412,57 ±13,9	3787,82 ±49,77
NORME ALGERINNE NA6360 : 2800 µS/cm					
Taux des nitrates (NO ³⁻) en ppm (mg/l)	10 -25	10 -25	10 -25	50-100	100
JORADP,2011 : 50 ppm (mg/l)					
Taux des nitrites (NO ²⁻) en ppm (mg/l)	0	0	0	<1	<1
JORADP,2011 : 0.2 ppm (mg/l)					

En récapitulatif des résultats du tableau 6, les points suivants sont tirés :

- L'eau d'alimentation du lot témoin semble répondre aux normes algériennes relatives aux paramètres de qualité de l'eau de consommation humaine en vigueur, en termes de paramètres physicochimiques pH, conductivité, taux des nitrates et des nitrites.
- L'eau d'alimentation du lot 01 Cd est conforme aux normes algériennes en terme de pH, taux de nitrates et des nitrites. Néanmoins les valeurs de la conductivité (2913,71± 38,29 µS/cm) dépassent les valeurs fixées par la législation en vigueur.
- L'eau d'alimentation du lot 02 Cd n'est pas conforme aux normes algériennes en terme de pH (5,94 ± 0,13). Par contre les taux des nitrates et des nitrites semblent répondre aux normes. Les valeurs de la conductivité (3210,4 ±8,40 µS/cm) dépassent les valeurs fixées par la législation en vigueur.
- L'eau d'alimentation des lots 01 Pb et 02 Pb n'est pas conforme à la norme algérienne, en terme de pH, les valeurs sont inférieures aux valeurs législatives (pH est de 5,6 ± 0,081 et 5,07 ± 0,009 des deux lots respectivement). D'après les valeurs de la conductivité des deux lots (3412,57 ±13,9 µS/cm et 3787,82 ±49,77 µS/cm respectivement), les taux de nitrates (50-100 ppm) et des nitrites (inférieur à 1 ppm) pour les deux lots respectivement, les taux enregistrés dépassent légèrement les concentrations fixées par la législation en vigueur.

III.1.1.2. Détermination des taux des anions et des cations par chromatographie ionique (IC)



(A) Chromatogrammes des composés anioniques d'échantillon d'eau témoin.

(B) Chromatogrammes des composés cationiques d'échantillon d'eau témoin.

Figure 18 : Chromatogrammes des divers composés ioniques d'échantillon d'eau du lot témoin.

Tableau 7: Concentrations des divers composés ioniques d'eau d'alimentation du lot témoin comparées aux valeurs limites fixées par la législation algérienne.

Nature et Nom du composé		Concentration de l'échantillon analysé (ppm)	Valeur limite du composé (ppm ou mg/l)
Composés anioniques	Fluoride	0	1.5 (*)
	Chloride	27.525	0.07 (*)
	Nitrate	3.144	50 (*)
	Sulfate	67.013	400 (**)
Composés cationiques	Lithium	0	Non cité par la législation
	Potassium	0.649	20 (***)
	Calcium	63.219	200 (***)

(*) JORADP, 2011 ;(**) NORME ALGERIENNE NA 6361,M NA 6361, 1992 ;

(**) NORME ALGERIENNE NA 6361, M NA 1652, 1992 ;

(***) NORME ALGERIENNE NA 6361, M NA 1655 ,1992.

D'après les résultats de la Figure 18 et le tableau 7 , on constate que l'eau d'alimentation du lot témoin est conforme aux normes algériennes en vigueur en terme de la charge ionique (anionique et cationique).

III.1.1.3. Dosage des traces de métaux lourds Cadmium et Plomb par Spectrophotométrie d'Absorption Atomique (SAA)

A/ Dosage des traces de Cadmium

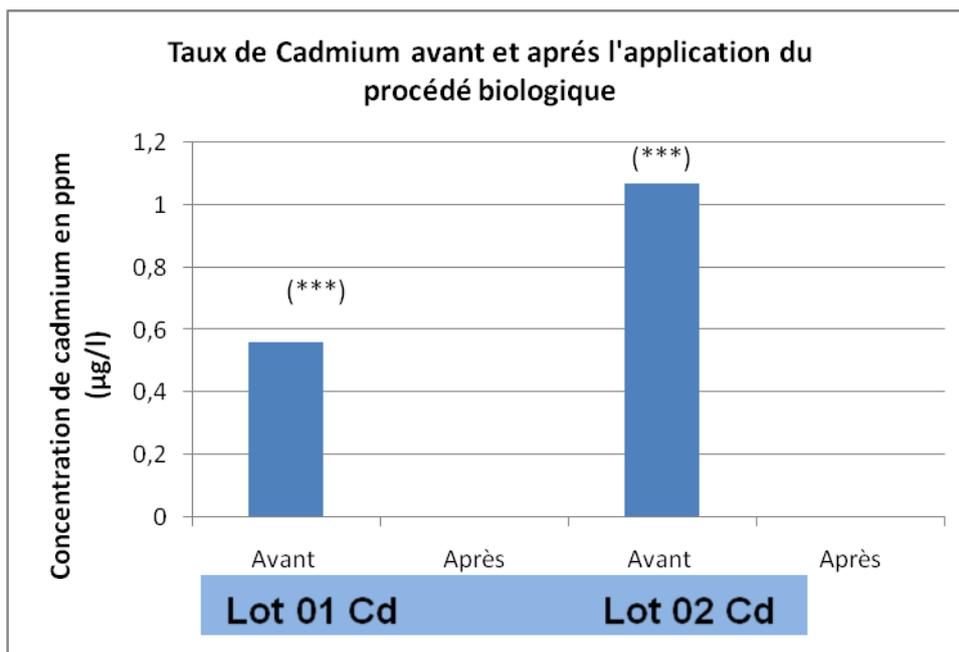


Figure 19: Valeurs des traces de Cadmium présentes dans les échantillons des lots 01 Cd et 02 Cd analysés, avant et après l'application du procédé biologique . Nombre d'échantillons analysés pour chaque lot (N=7).

Les résultats de la Figure 19 et le tableau VIII de l'annexe 02, montrent que les valeurs moyennes du Cadmium ont été dissoutes, et la différence statistique est hautement significative entre le début et la fin de l'application du procédé. (Avant Lot 01 Cd: $0,56 \pm 0,023$ ppm , Après : indéterminée et Lot 02 Cd Avant : $1,07 \pm 0,04$ ppm , Après : indéterminée) .

B/ Dosage des traces de Plomb

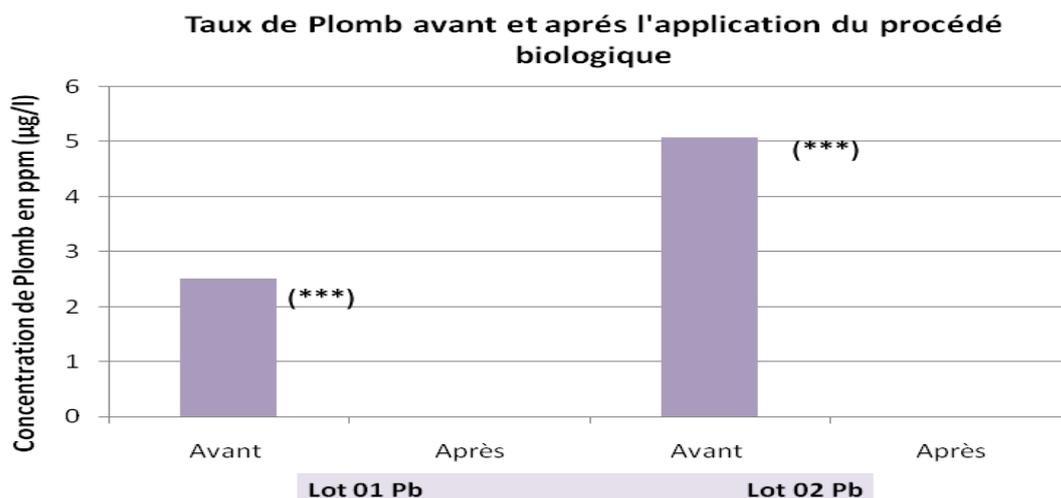


Figure 20: Valeurs moyennes des traces de plomb présentes dans les échantillons des lots 01 Pb et 02 Pb avant et après l’application du procédé biologique. Nombre d’ échantillons analysés pour chaque lot (N=7).

Les résultats de la Figure 20 et le tableau X de l’annexe 02, montrent que les valeurs moyennes du plomb ont été dissoutes, et la différence statistique est hautement significative avant et après l’application du procédé. (Avant Lot 01 Pb : $2,514 \pm 0,008$ ppm , Après: indéterminée et Lot 02 Pb Avant : $5,09 \pm 0,06$ ppm , Après: indéterminée).

III.1.2. Evolution des poids corporel et les poids des organes

III.1.2.1. Poids corporels

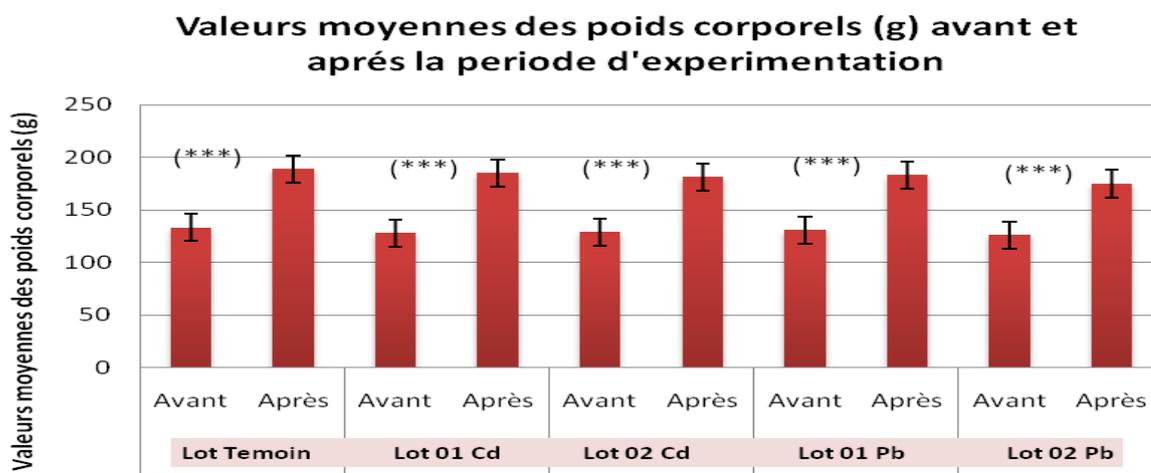


Figure 21: Valeurs moyennes des poids corporels (g) chez les rats témoins et traités avec les significations statistiques avant et après l’expérimentation. Nombre d’échantillon analysés pour chaque lot (N=8).

D'après les résultats de la Figure 21 et le tableau XI de l'annexe 02, une croissance considérable est notée chez tous les lots (Témoin : 55,64 g ; 01 Cd : 57,25 g ; 02 Cd : 52,35 g ; 01 Pb : 52,3 g ; 02 Pb : 48,68 g) . La différence est jugée hautement significative entre le début et la fin de l'expérimentation. Les différentes eaux utilisées pour l'alimentation des rats n'ont entraîné aucune perturbation des poids corporels des rats.

III.1.2.2. Poids des organes

A/ Poids du foie

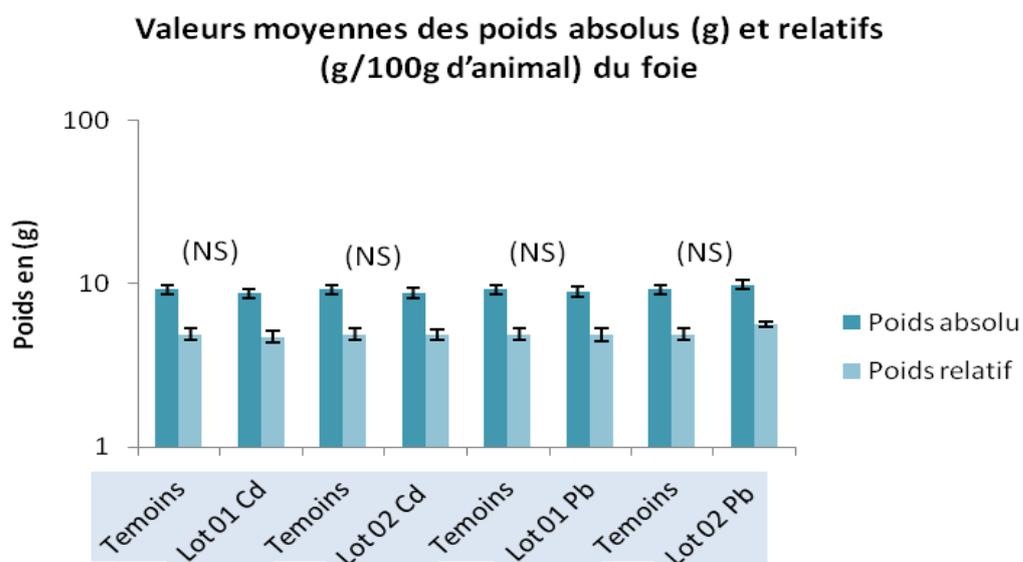


Figure 22: Valeurs moyennes des poids absolus (g) et relatifs (g/100g d'animal) du foie et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités. Nombre d'échantillons analysés pour chaque lot (N=8).

D'après les résultats de la Figure 22 et le tableau XII de l'annexe 02, les poids respectifs des foies de tous les rats sont inférieurs à celui des témoins (Lot 01 Cd : $8,761 \pm 0,66$; Lot 02 Cd : $8,85 \pm 0,385$; Lot 01 Pb : $8,97 \pm 0,508$; Temoins : $9,246 \pm 0,607$), excepté pour le Lot 02 Pb ($9,887 \pm 0,455$) qui présente une légère augmentation. Les différences sont jugées non significatives. Cependant les poids relatifs des foies n'ont présenté aucune variation significative avec tous les groupes de rats.

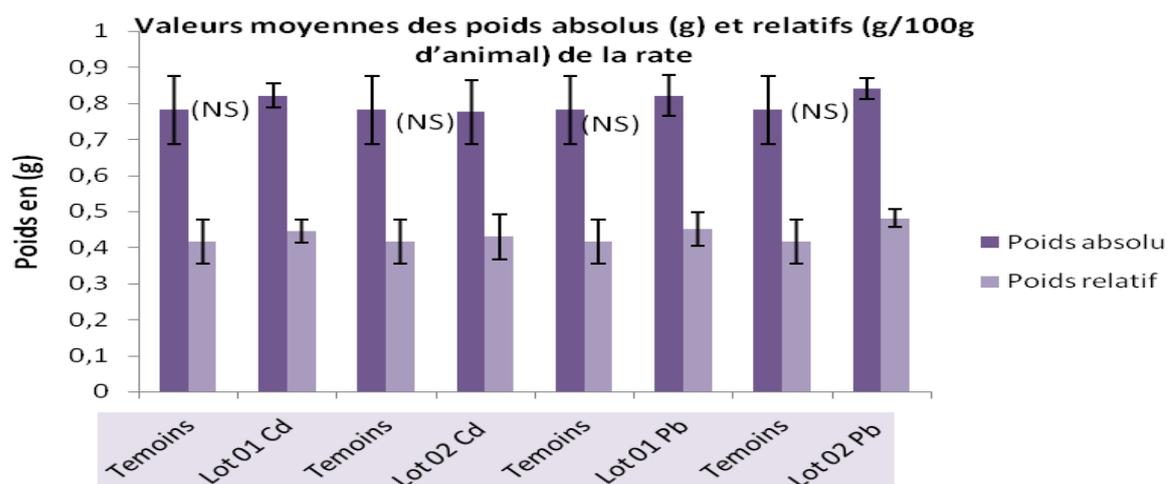
B/ Poids de la rate

Figure 23: Valeurs moyennes des poids absolus (g) et relatifs (g%) de la rate et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités. Nombre d'échantillons analysés pour chaque lot (N=8).

En comparaison avec les témoins ($0,781 \text{ g} \pm 0,094$), la différence des poids absolu de la rate des rats sont statistiquement non significative (Lot 01 Cd : $0,821 \text{ g} \pm 0,034$; Lot 02 Cd : $0,776 \text{ g} \pm 0,089$; Lot 01 Pb : $0,821 \text{ g} \pm 0,034$; Lot 02 Pb : $0,821 \text{ g} \pm 0,0562$). Toutefois, les poids relatifs de la rate chez les différents lots de rat n'a présenté aucune variation significative (Figure 23 et Tableau XIII de l'annexe 02).

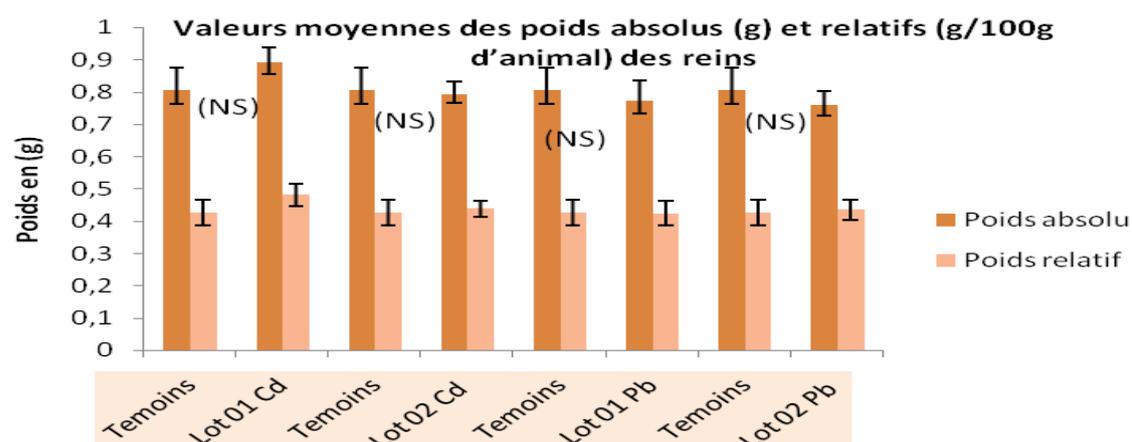
C/ Poids des reins

Figure 24: Valeurs moyennes des poids absolus (g) et relatifs (g/100g d'animal) des deux reins et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités. Nombre d'échantillons analysés pour chaque lot (N=8).

D'après les résultats présentés dans la Figure 24 et le tableau XIV de l'annexe 02, et comparée aux témoins (0,804 g ± 0,07), la régression enregistrée chez les différents lots (01 Cd: 0,89 g ± 0,0467 ; 02 Cd : 0,792g ± 0,039 ; 01 Pb : 0,773 g ± 0,0615 ; 02 Pb : 0,76 g ± 0,041) n'est pas jugée statistiquement significative. Les différentes eaux d'alimentation fournies ne semblent pas perturber le poids absolu des deux reins chez les rats.

Toutefois, le poids relatif des deux reins chez les rats des différents lots d'eau traitée n'a présenté aucune variation significative.

III.1.3. Dosage des paramètres hématologiques

III.1.3.1. Hémogramme (Formule Numérique Sanguine FNS)

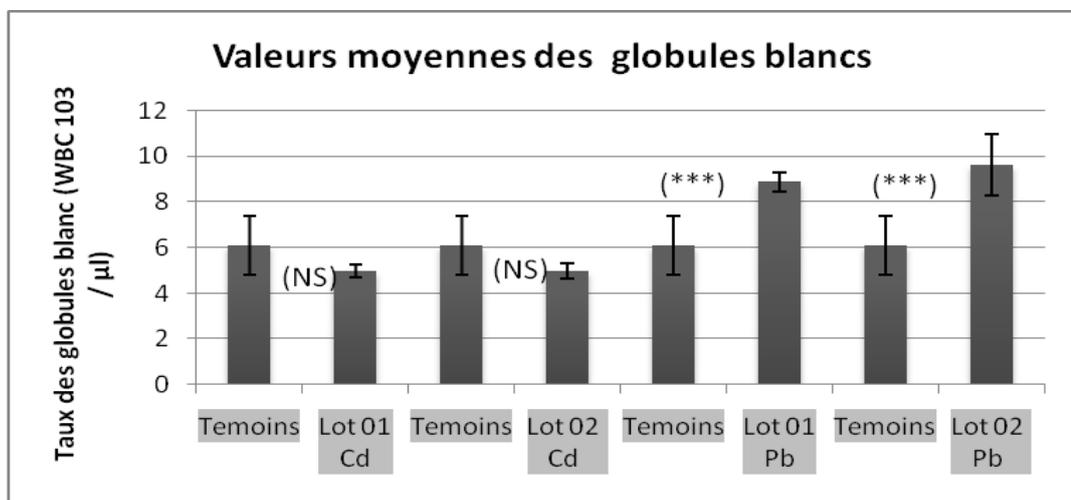


Figure 25 : Valeurs moyennes des taux des globules blancs et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités.

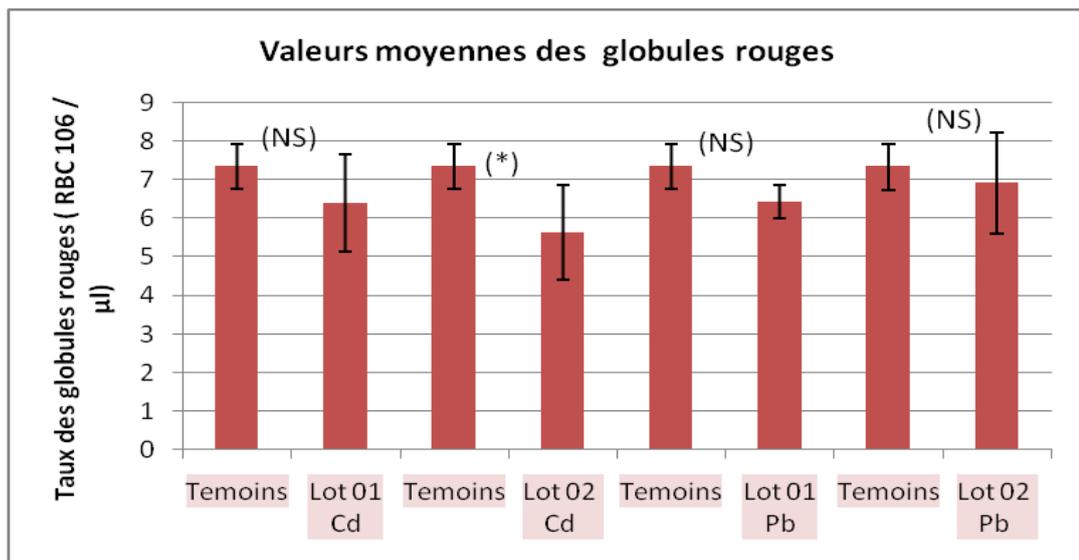


Figure 26: Valeurs moyennes des taux des globules rouges et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités.

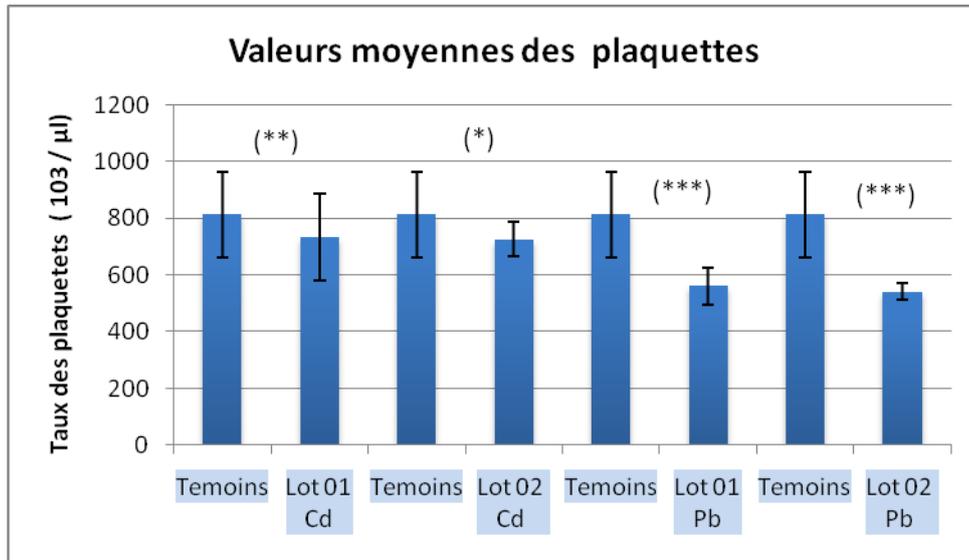


Figure 27: Valeurs moyennes des taux de plaquettes et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités.

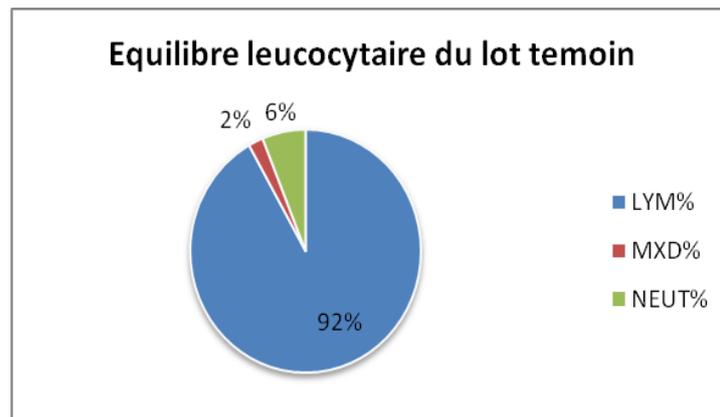


Figure 28: Valeurs moyennes des pourcentages des différents éléments de l'équilibre leucocytaire du sang des rats témoins.

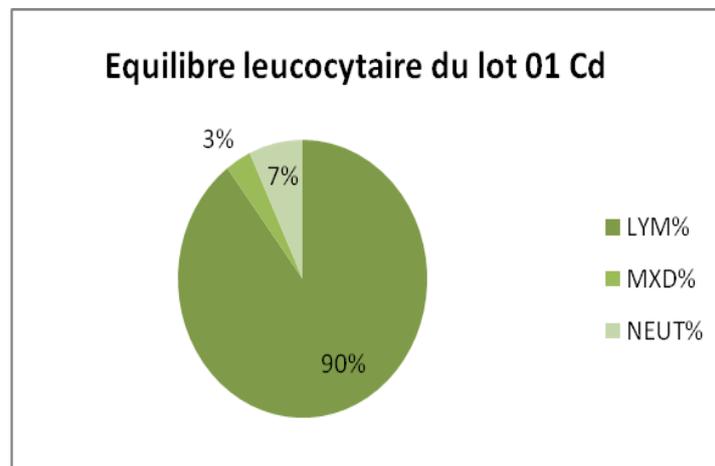


Figure 29: Valeurs moyennes des pourcentages des différents éléments de l'équilibre leucocytaire du sang des rats du lot 01 Cd.

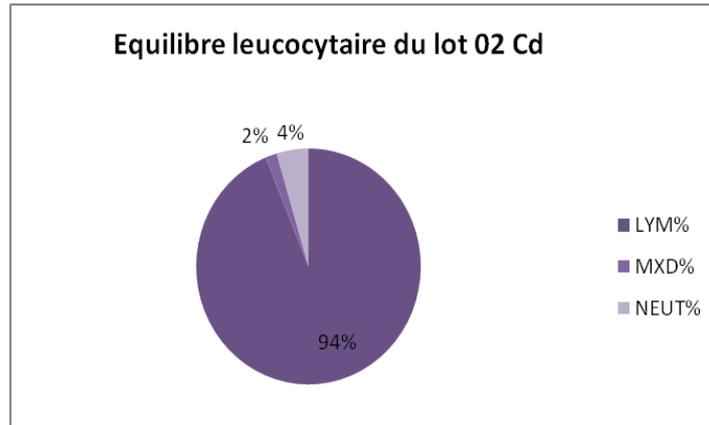


Figure 30: Valeurs moyennes des pourcentages des différents éléments de l'équilibre leucocytaire du sang des rats du lot 02 Cd.

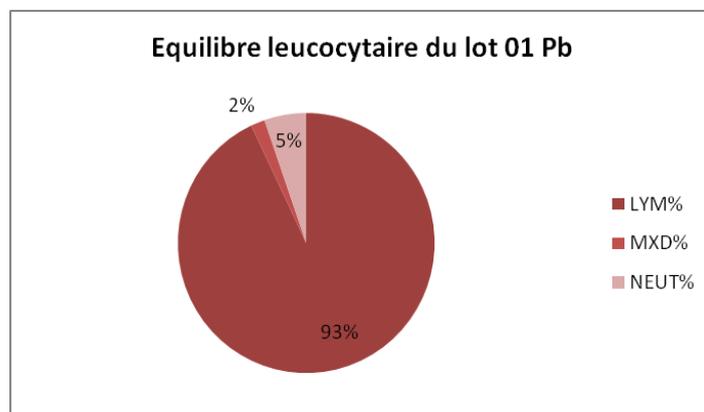


Figure 31: Valeurs moyennes des pourcentages des différents éléments de l'équilibre leucocytaire du sang des rats du lot 01 Pb.

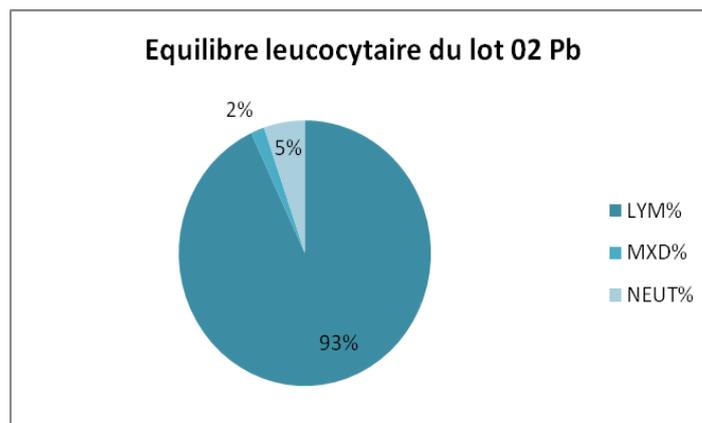


Figure 32: Valeurs moyennes des pourcentages des différents éléments de l'équilibre leucocytaire du sang des rats du lot 02 Pb.

D'après les Figures 25 ,26,27,28,29,30,31 et 32 et le tableau XV de l'annexe 02, les résultats tirés se résument dans les points suivants :

- Chez les rats lot 1 Cd

La concentration des différents éléments figurés du sang : Les globules blancs et ses différentes formes: Lymphocytes, Neutrophiles et Monocytes, les globules rouges et l'hémoglobine ne présentent aucun changement significatif par rapport au témoin.

En revanche le taux d'hématocrite ($35,5 \% \pm 1,7$) et le nombre des plaquettes ($734,1 \cdot 10^3 / \mu\text{l} \pm 152,2$) montrent une diminution par rapport au témoin ($38,9 \% \pm 1,39$ (Hématocrite) ; $814,4 \cdot 10^3 / \mu\text{l} \pm 150,8$ (Plaquettes)). La différence est statistiquement très et hautement significative respectivement pour les deux éléments sanguins.

- Chez les rats lot 2 Cd

Le nombre des Leucocytes et le taux d'hémoglobine ne montrent aucun changement significatif par rapport au témoin. En revanche le nombre des globules rouge ($5,632 \cdot 10^6 / \mu\text{l} \pm 1,24$), le taux d'hématocrite ($34,2\% \pm 1,79$) et le nombre des plaquettes ($725,810^3 / \mu\text{l} \pm 61,02$) montrent une diminution par rapport au témoin ($7,335 \% \pm 0,572$ (Globules rouges), ($35,5 \% \pm 1,7$ (hématocrite) ; $814,4 \pm 150,8 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$ (Plaquettes)). La différence est statistiquement significative pour chaque élément.

- Chez les rats lot 1 Pb

Le nombre des globules rouges, les taux d'hémoglobine, d'hématocrite et l'équilibre leucocytaire ne montrent aucun changement significatif par rapport au témoin. En revanche le nombre des globules blancs ($8,883 \cdot 10^3 / \mu\text{l} \pm 0,426$) et des plaquettes ($560,33 \cdot 10^3 / \mu\text{l} \pm 63,13$) montrent une différence jugée statistiquement hautement significative par rapport au témoin ($6,1 \pm 1,26 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$ (Globules blancs), $814,4 \pm 150,8 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$ (Plaquettes)).

- Chez les rats lot2 Pb

Le nombre des globules rouges , les taux d'hémoglobine , d'hématocrite et l'équilibre leucocytaire ne montrent aucun changement significatif par rapport au témoin. En revanche le nombre des globules blancs ($9,6103 / \mu\text{l} \pm 1,34$) et des plaquettes($540,83103 / \mu\text{l} \pm 29,150$) montrent une différence jugée statistiquement hautement significative par rapport au témoin ($6,1 \pm 1,26 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$ (Globules blancs), $814,4 \pm 150,8 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$ (Plaquettes)).

III.1.3.2. Etude de l'équilibre leucocytaire sur un frottis sanguin des rats

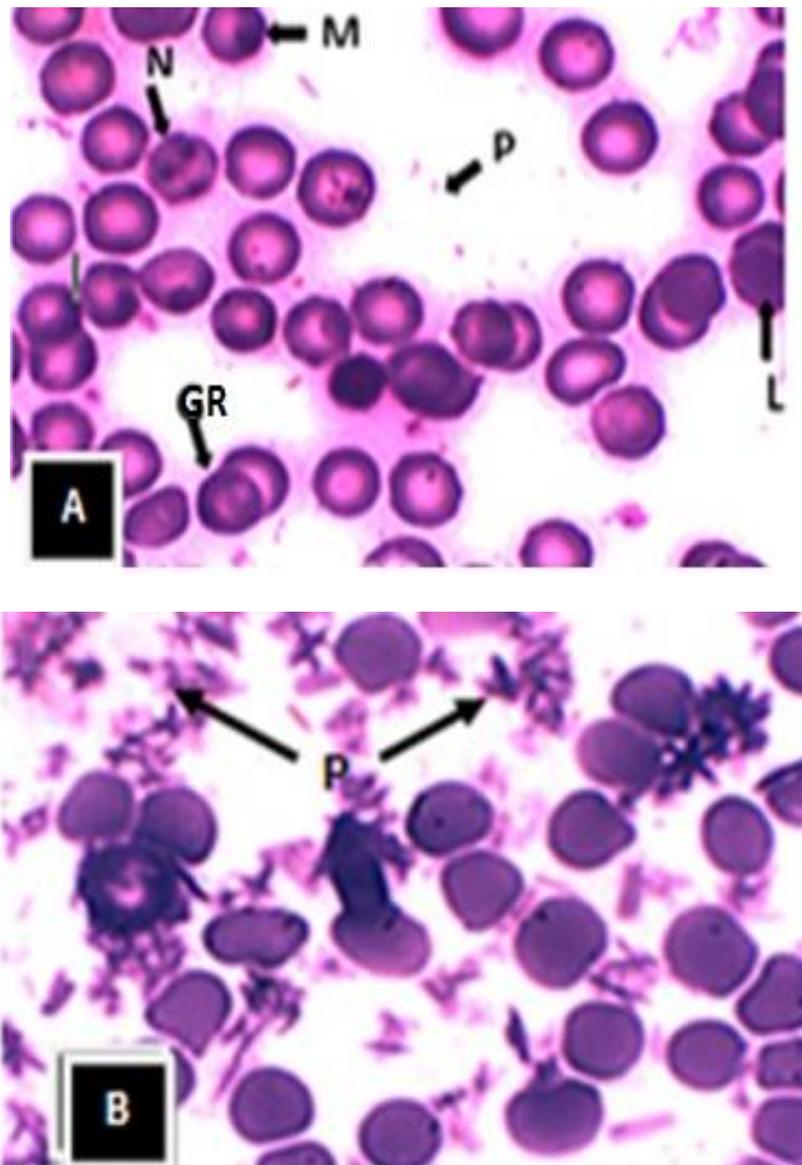


Figure 33 : Frottis sanguin d'un rat du lot témoin montrant les principaux éléments de l'équilibre leucocytaire (A) et (B) ;

Grossissements : G X 100 zoomé (A), G X 100 zoomé (B) ; Coloration May-Grünwald-Giemsa (MGG).

Frottis observés avec Microscope photonique Axio Scope – Camera OLYMPUS GT16MP.

L : Lymphocytes ; P : Agrégats des plaquettes ; N : Neutrophiles ; M : Monocytes ; GR : Globules rouges.

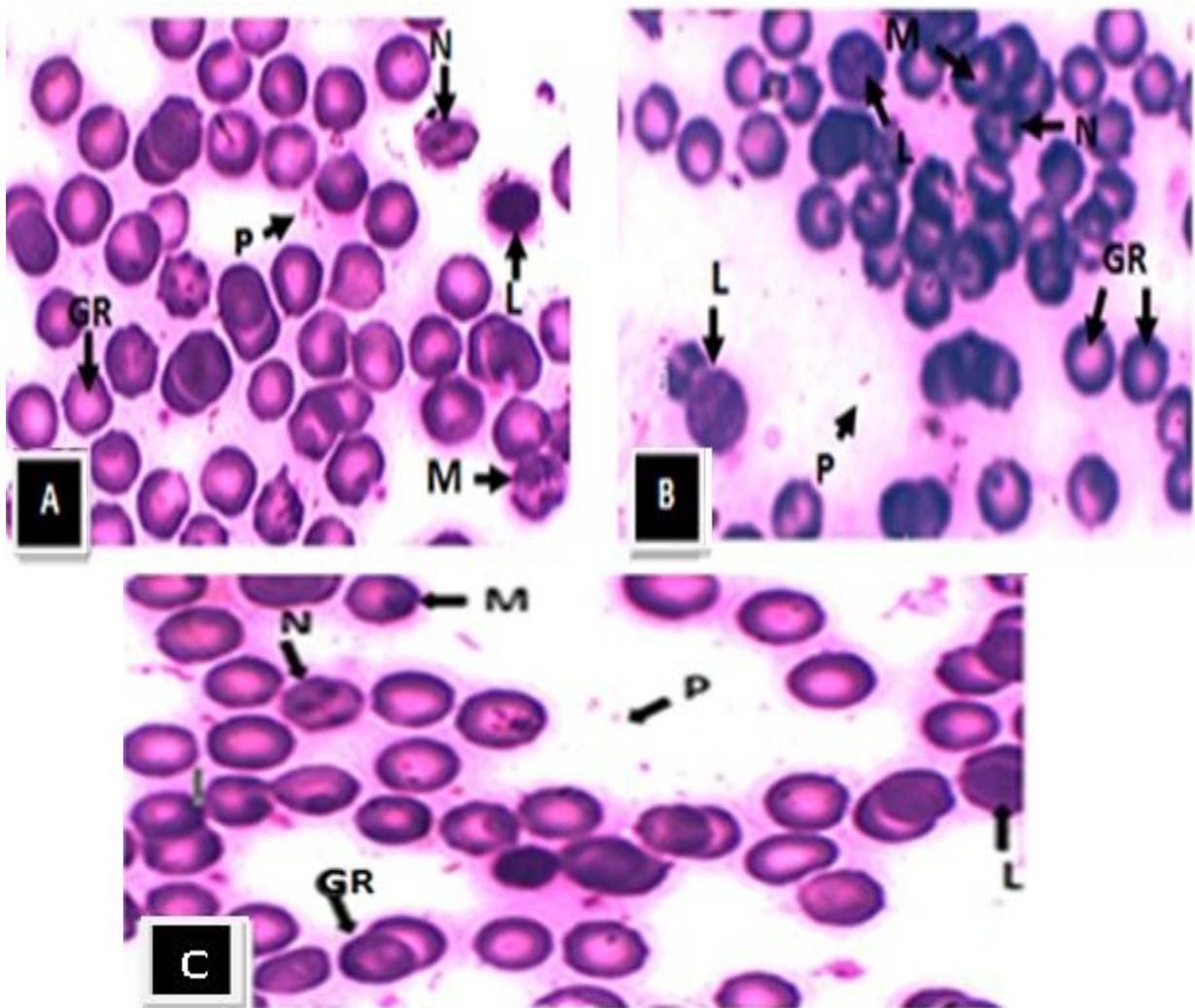


Figure 34: Frottis sanguin des rats du lot 01 Cd (A), lot 02 Cd (B) comparé au lot témoins (C) ;

Grossissements : G X 100 zoomé (A), G X 100 zoomé (B), G X 100 zoomé (C); Coloration May-Grünwald-Giemsa (MGG) ;

Frottis observés avec Microscope photonique Axio Scope – Camera OLYMPUS GT16MP.

L : Lymphocytes ; P : Agrégats des plaquettes ; N : Neutrophiles ; M : Monocytes ;
GR : Globules rouges.

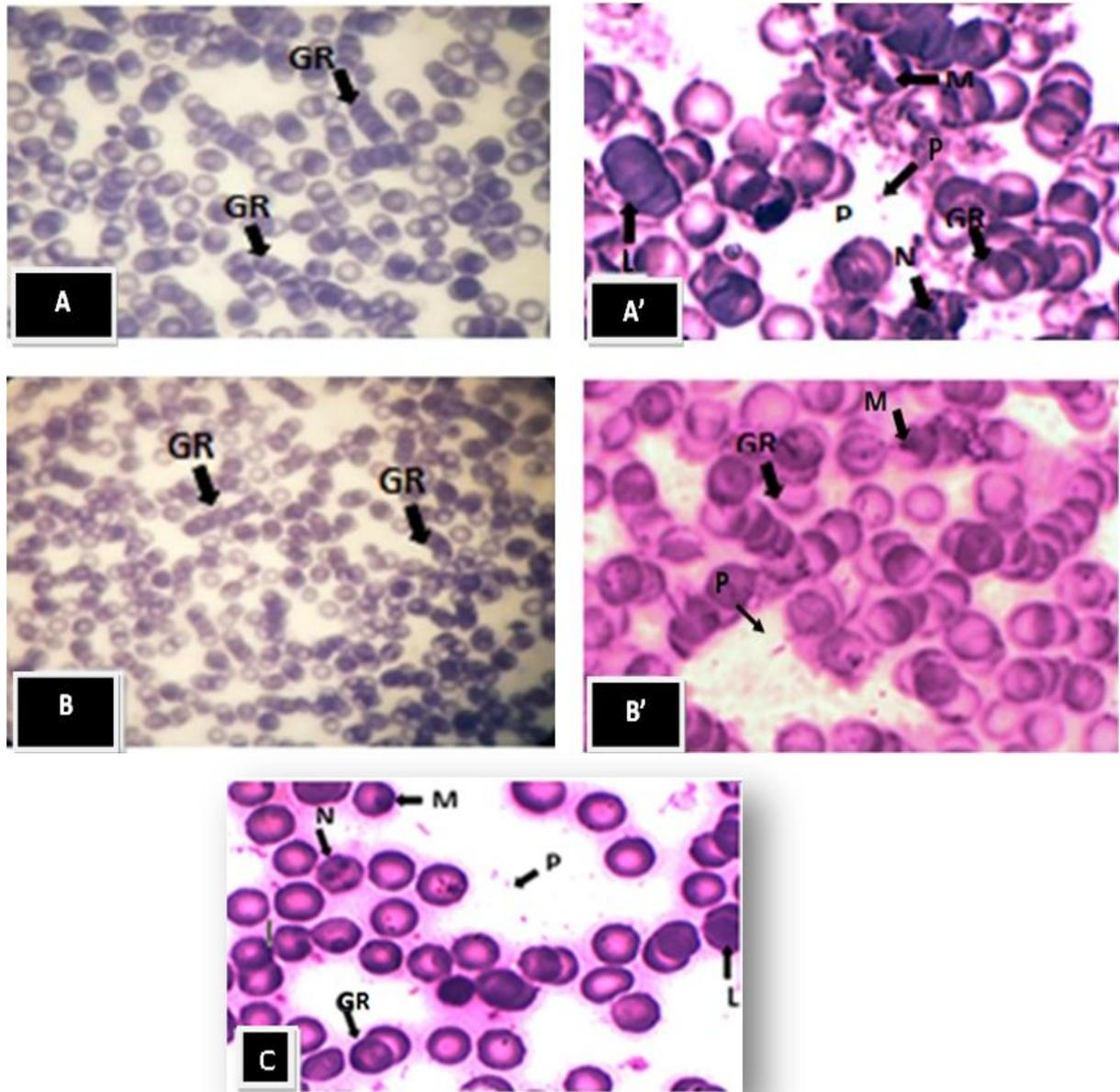


Figure 35 : Frottis sanguin des rats du lot 01 Pb (A, A'), lot 02 Pb (B, B') et du lot témoin (C) ;

Grossissements : GX 10 (A) , GX 100 zoomé (A'), GX 10 (B) , GX 10 (B'), (B) X 100 zoomé , GX 100 zoomé (C) X 100 zoomé ; Coloration May-Grünwald-Giemsa (MGG) ; Frottis observés avec Microscope photonique Axio Scope – Camera OLYMPUS GT16MP.

L : Lymphocytes ; P : Agrégats des plaquettes ; N : Neutrophiles ; M : Monocytes ;
GR : Globules rouges.

Le comptage microscopique des différents éléments figurés du sang, révèle un équilibre leucocytaire composé essentiellement, des neutrophiles avec un noyau violet foncé et plurilobé, des lymphocytes à noyau rond et chromatine très dense et enfin, les monocytes avec noyau de forme en haricot (Figure 33 A). D'autre part, les plaquettes présentent des agrégats plus au moins intenses et ce qui caractérise le frottis sanguin chez les rats (Figure 33 B). Les hématies sont nombreuses d'une forme de roues pleines marquées d'une dépression en leur centre.

Chez les rats des lots 1 Cd et 2 Cd, l'équilibre leucocytaire présente une dominance lymphocytaire avec la présence des neutrophiles et des monocytes. Cet aspect est similaire celui des rats témoins (Figure 34 A, B, A', B'). Les plaquettes sont présentes avec une agrégation similaire que chez les rats témoins. Le nombre des hématies ainsi que leurs aspects ne présentent aucune anomalie (Figure 34).

La lecture des différents champs microscopiques du frottis chez les rats du lot 1 Pb et les rats du lot 2 Pb été confuse ; les éléments de l'équilibre leucocytaire sont partiellement couverts par des hématies empilées (Figure 35 A, B, A', B'). L'aspect du frottis montre une diminution remarquable des agrégats plaquettaire (Figure 35).

III.1.4. Dosage des hormones thyroïdienne et de la thyroïdostimuline

III.1.4.1. Dosage de la triiodothyronine libre (FT3)

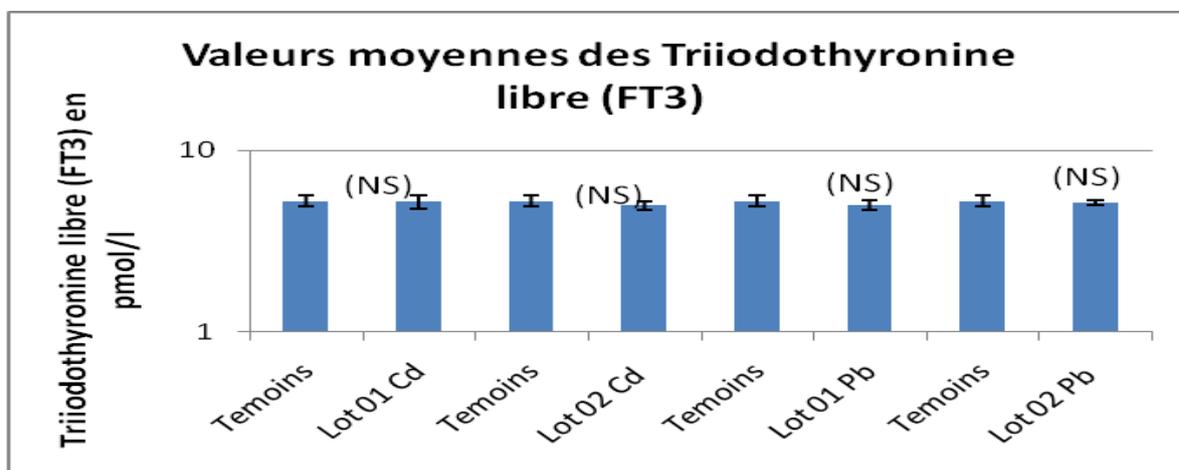


Figure 36: Valeurs moyennes des concentrations sériques de la triiodothyronine libre (FT3) en pmol/l et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités.

Une diminution statistiquement non significative de la concentration sérique de l'hormone triiodothyronine libre (FT3) est enregistrée chez les rats des différents lots (01 Cd : 5,225 pmol/l \pm 0,435; 02 Cd : 4,98 pmol/l \pm 0,26 ; 01 Pb : 5 pmol/l \pm 0,316; 02 Pb : 5,15 pmol/l \pm 0,152) comparé à celui des témoins (5,262 pmol/l \pm 0,358) (Figure 36 et tableau XVI de l'annexe 02).

III.1.4.2. Dosage de la thyroxine libre (FT4)

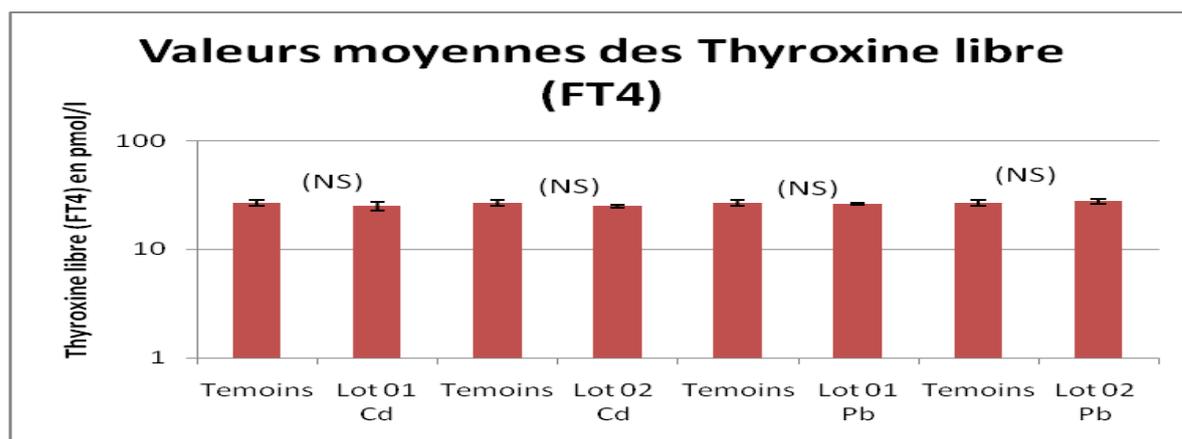


Figure 37: Valeurs moyennes de la concentration de la thyroxine libre (FT4) en pmol/l et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités.

Une diminution statistiquement non significative des concentrations moyennes sériques de l'hormone thyroxine libre (FT4) est enregistrée chez les rats des lots (01 Cd : 25,1pmol/l \pm 2,515; 02 Cd : 25,122 pmol/l \pm 0,72 ; 01 Pb : 26,09 pmol/l \pm 0,615) par rapport au témoin (26,664 pmol/l \pm 1,61). En revanche le lot 02 Pb présente une augmentation statistiquement non significative par rapport au témoin. (Figure 37 et tableau XVII de l'annexe 02).

III.1.4.3. Dosage de la thyroestimuline (TSH)

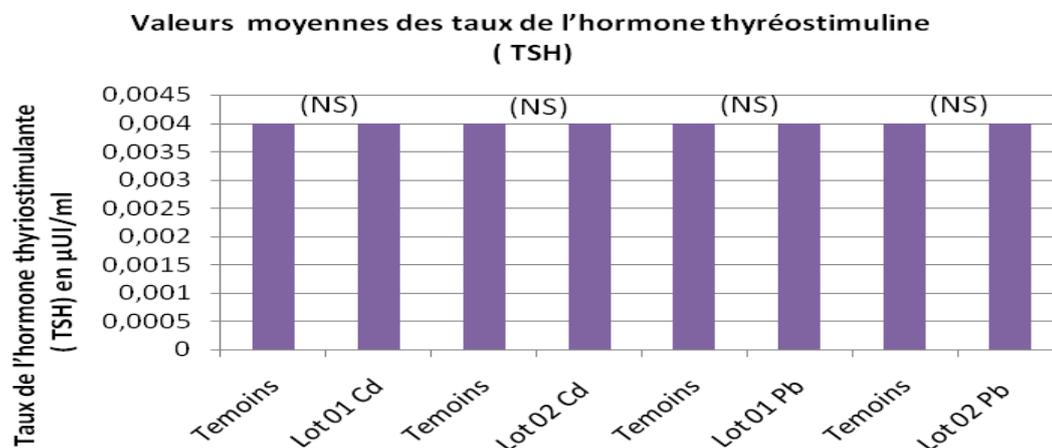


Figure 38: Valeurs moyennes des concentrations de la thyroestimuline (TSH) en µUI/ml et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités.

D'après les résultats de la Figure 38 et le tableau XVIII de l'annexe 02 , les valeurs moyennes de l'hormone thyroestimuline (TSH) , n'ont présentés aucune variation significative chez tous les rats des divers lots (01 Cd : inferieur à 0.005 µUI/ml ; 02 Cd : inferieur à 0.005 µUI/ml ; 01 Pb : inferieur à 0.005 µUI/ml ; 02 Pb : inferieur à 0.005 µUI/ml) par rapport au témoin (inferieur à 0.005 µUI/ml) .

III.1.5. Dosage sérique de la Protéine C-Réactive (CRP)

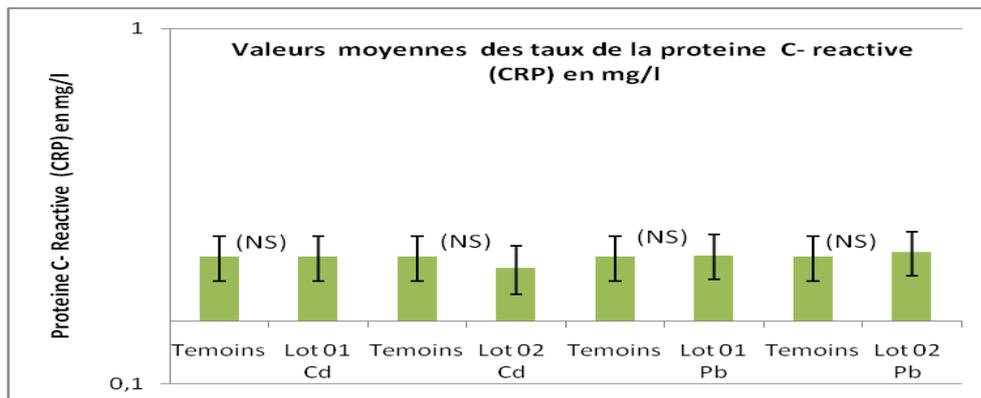


Figure 39: Valeurs moyennes des taux de la protéine C- réactive (CRP) en mg/l et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités.

D'après les résultats de la Figure 39 et tableau XIX de l'annexe 2 , une diminution statistiquement non significative du taux moyen de la protéine C- Réactive (CRP) est enregistrée chez les rats du lot 02 Cd ($0,212 \text{ mg/l} \pm 0,033$), par rapport au témoin ($0,228 \text{ mg/l} \pm 0,058$). Une augmentation statistiquement non significative par rapport au témoin à été notée pour les deux lots ; le lot 01 Pb ($0,23 \text{ mg/l} \pm 0,05$) et le lot 02 Pb ($0,235 \text{ mg/l} \pm 0,048$). Aucune variation n'a été notée pour les rats du lot 01 Cd ($0,228 \text{ mg/l} \pm 0,046$) par rapport au témoin.

III.1.6. Dosage et des métabolites d'oxyde nitrique (NOs)

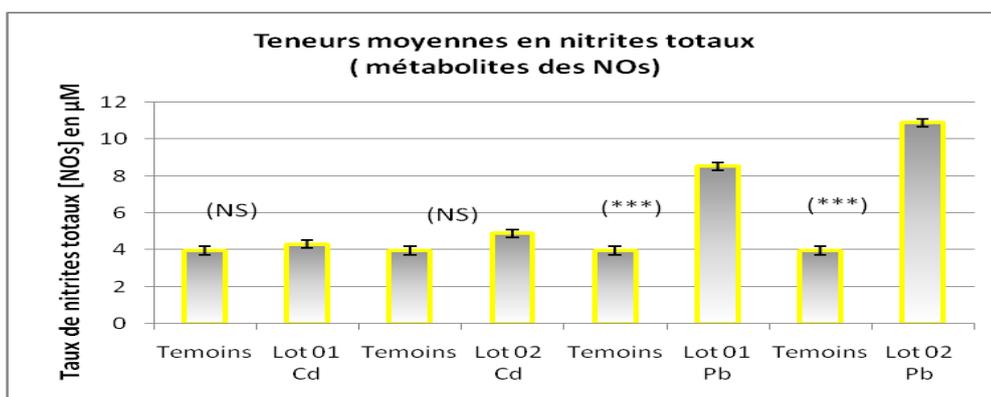


Figure 40: Teneurs moyennes en nitrites totaux (Métabolites des NOs) en µM plasmatiques et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités.

Les résultats de la Figure 40 et le tableau XXI de l'annexe 02, montrent une augmentation significative des taux plasmatique de monoxyde d'azote chez les rats du lot 01 Cd ($4,31 \text{ µM} \pm 0,134$) et le lot 02 Cd ($4,9 \text{ µM} \pm 0,26$) comparativement au témoin ($3,96 \text{ µM} \pm 0,22$). D'autre part, les taux moyens de monoxyde d'azote plasmatique des rats du lot 01 Pb ($8,53 \text{ µM} \pm 0,308$) et le lot 02 Pb ($10,9 \text{ µM} \pm 0,507$), présentent une augmentation statistiquement hautement significative par rapport aux témoins.

III.1.7. Etudes histologiques

III.1.7.1. Thyroïde

D'après la microscopie photonique, les coupes histologiques de la glande thyroïde des rats témoins présentent un parenchyme constitué de nombreux follicules de diamètres variables, situés dans un stroma –conjonctivo vasculaire (Figure 41 a, b, c).Chaque follicule est délimité d'un épithélium simple formé de thyrocytes possédant des noyaux ovoïdes de couleur sombres. Les thyrocytes entourent une lumière large remplie de colloïde (Figure 41 d, e, f).

Chez les rats des lots 1 Cd (Figure 42), 2 Cd (Figure 43), 1 Pb (Figure 44) et 2 Pb (Figure 45) ,le parenchyme thyroïdien ne révèle pas d'altération structurale (Figure 42 a et b ; Figure 43a ; Figure 44 a ; Figure 45 a).

Le nombre des follicules est similaire chez tous les rats traités, les follicules ne perdent pas de colloïde et ne présentent pas de nécrose tissulaire. D'autres parts, la lumière folliculaire ne présente pas des cellules desquamées donc absence de métaplasie squameuse (Figure 42 c et d ; Figure 43b ; Figure 44 b ; Figure 45 b).

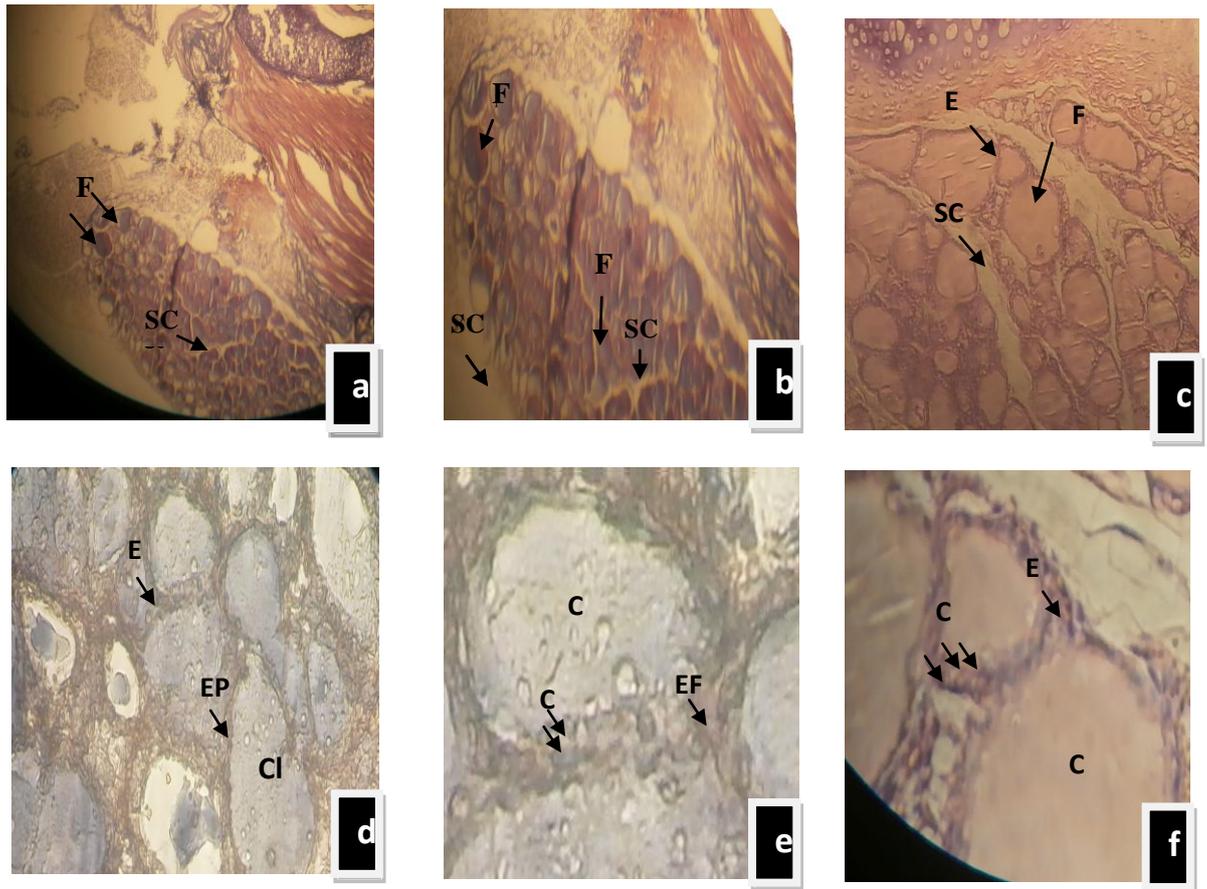


Figure 41

Figure 41 : Structure du parenchyme thyroïdien chez les rats témoins ((a), (b), (c), (d), (e) et (f)).

Grossissements :

G X 4 (a), GX 10 (b) , GX 40 Zoomé (d),GX 100 (e) ; Coloration : Trichrome de Masson (TM).

G X 40 (c) , GX 100 (f) ; Coloration : Hématoxyline et à l'Eosine (HE).

F: Follicules ; C : Thyrocytes ; Cl : Colloïde ; EF : Espace folliculaire ; E: Epithélium ;
SC : Stroma Conjonctivo –Vasculaire.

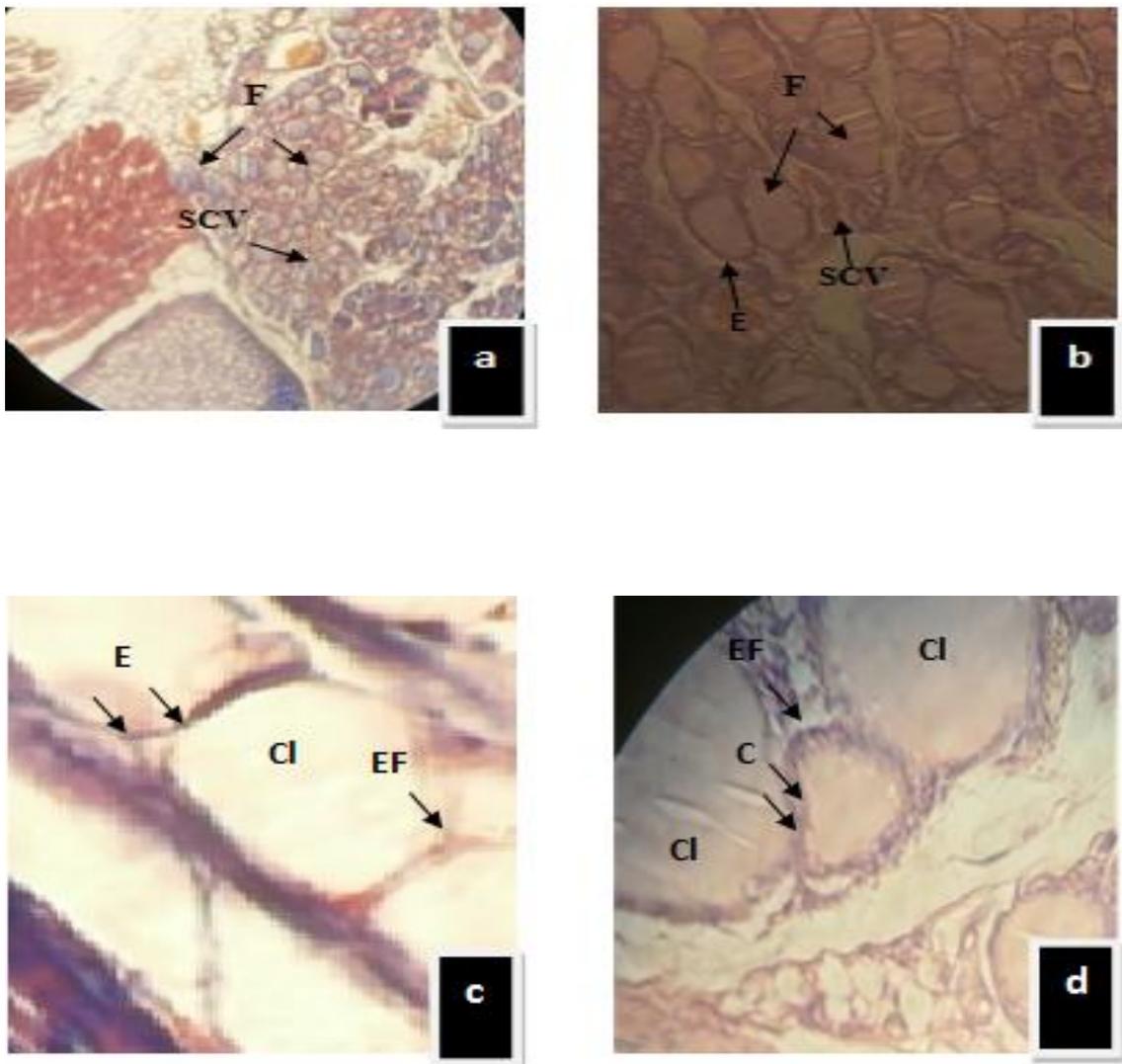


Figure 42

Figure 42 : Structure du parenchyme thyroïdien chez les rats du lot 01 Cd ((a), (b), (c), (d)).

Grossissements:

G X 4 (a), GX 100 (c) ; Coloration : TM.

G X 40 (b), G X 100 (d) ; Coloration : HE.

F : Follicules ; C : Thyrocytes ; Cl : Colloïde ; EF : Espace folliculaire ; E : Epithélium ;
SCV : Stroma Conjonctivo –Vasculaire.

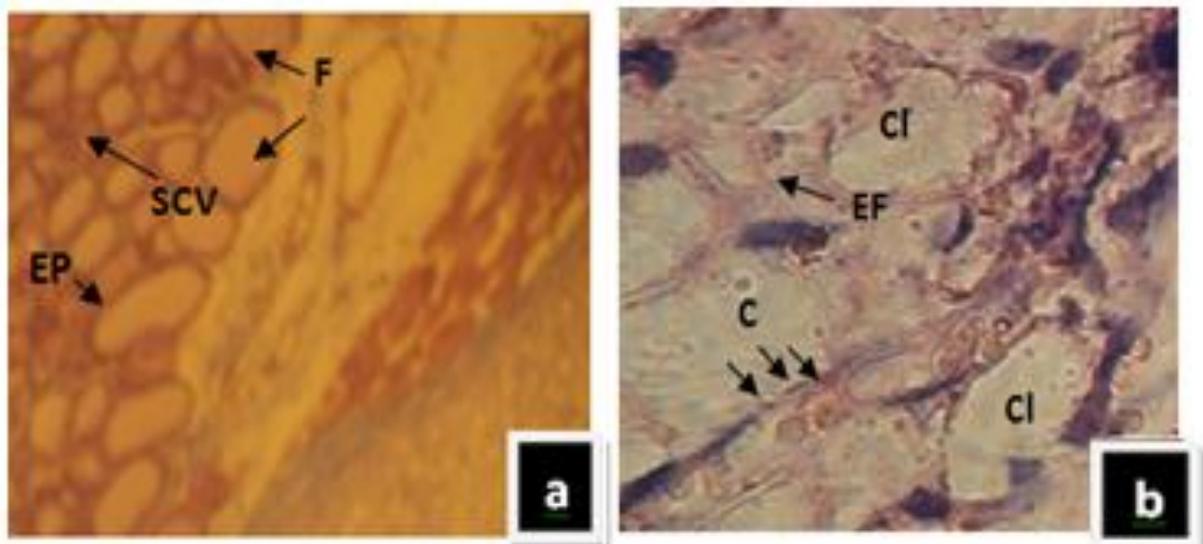


Figure 43

Figure 43 : Structure du parenchyme thyroïdien chez les rats du lot 02 Cd ((a) et (b)).

Grossissements:

G X 40 (a), GX 100 (b) ; Coloration :TM .

F : Follicules, C : Thyrocytes ; Cl : Colloïde; EF : Espace folliculaire ; EP : Epithélium ;
SCV : Stroma Conjonctivo –Vasculaire.

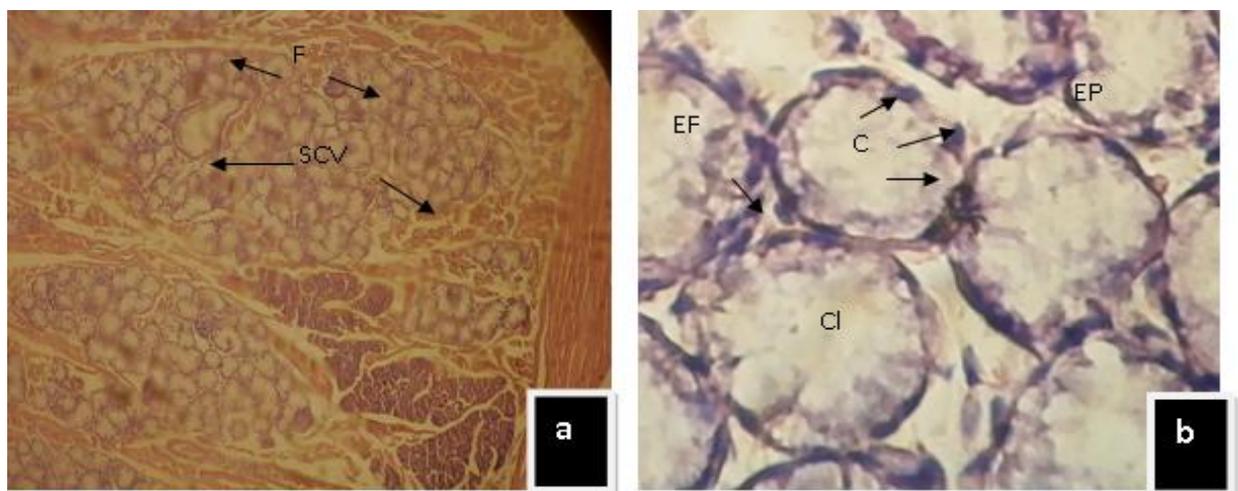


Figure 44

Figure 44: Structure du parenchyme thyroïdien chez les rats du lot 01 Pb ((a) et (b)).

Grossissements :

G X 10 (a), GX 100 (b); Coloration : TM.

F : Follicules ; C : Thyrocytes ; Cl : Colloïde ; EF : Espace folliculaire ; EP : Epithélium ;
SCV : Stroma Conjonctivo –Vasculaire.

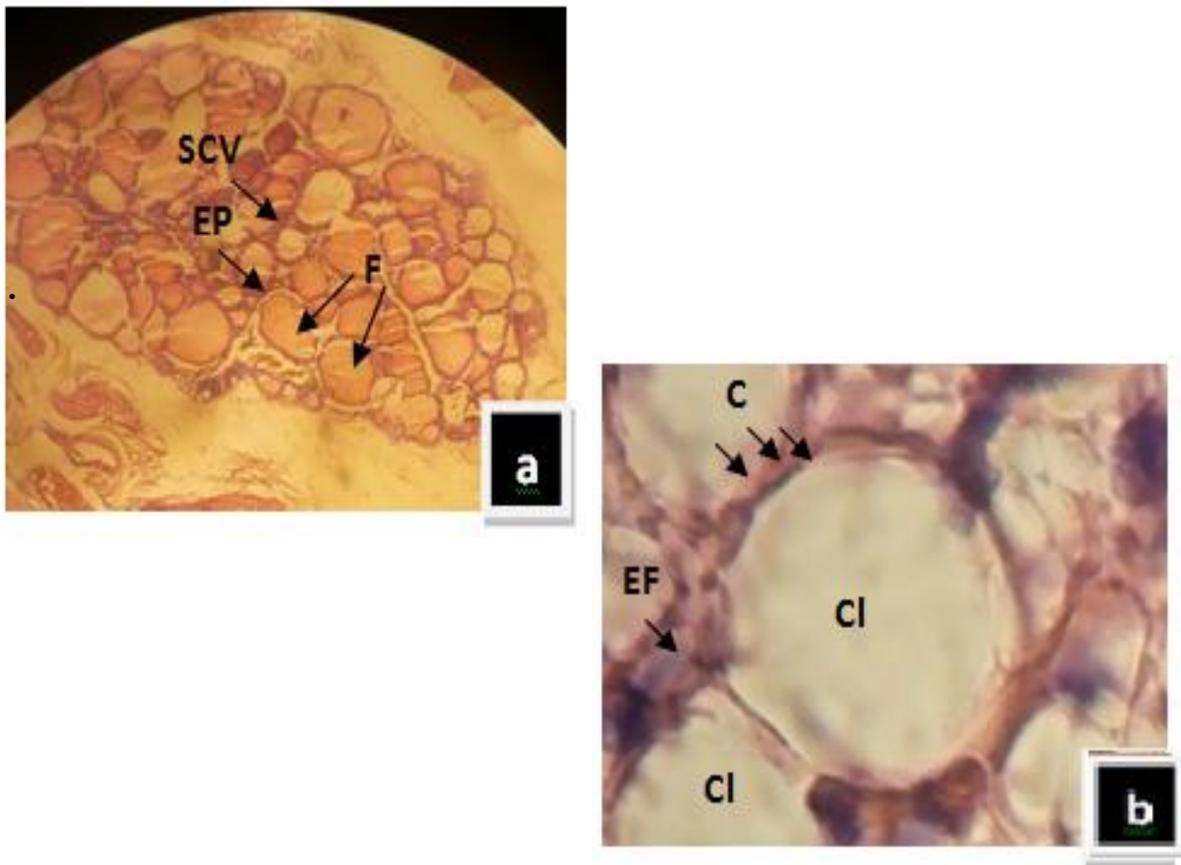


Figure 45

Figure 45: Structure du parenchyme thyroïdien chez les rats du lot 02 Pb (a) et (b).

Grossissements:

G X 40 (a), G X 100 (b); Coloration: HE.

F : Follicules ; C : Thyrocytes ; Cl : Colloïde ; EF : Espace folliculaire ; EP : Epithélium ;
SCV : Stroma Conjonctivo –Vasculaire.

III.1.7.2.Foie

Le parenchyme hépatique chez les rates témoins est constitué de plusieurs lobules de forme hexagonale centrée par une veinule centrolobulaire (Figure 46 a). Les espaces portes sont situés aux angles de l'hexagone. Chaque lobule hépatique est constitué de plusieurs lames hépatocytaires organisées en travées de Remek (Figure 46 b).

Les hépatocytes de forme polygonale possèdent un cytoplasme dense et un ou deux noyaux arrondis, de taille variable comportant une chromatine dispersée à la périphérie . Entre les lames hépatocytaires, des capillaires sinusoides sont bordés par les cellules endothéliales où les cellules de Kupffer sont dispersées entre elles (Figure 46 c et d).

Chez les rats des lots 1 Cd (Figure 47) , 2 Cd (Figure 48) ,1 Pb (Figure 49) et 2 Pb (Figure 50), le parenchyme hépatique ne présente pas d'altérations structurales (Figure 47 a ; Figure 48 a ; Figure 49 a ; Figure 50 a) . Ainsi les lames hépatocytaires sont bien individualisées. Le nombre des cellules hépatocytaires binucléés est similaire à celui des rats du lot témoin (Figure 47 b ; Figure 48 b ; Figure 49 b ; Figure 50 b). D'autres part, la chromatine des noyaux hépatocytaires est bien dispersée ainsi les cellules de Kupper ne présente pas un aspect nécrosée L'absence des cellules nécrosées est bien révélée par l'état intact du cytoplasme des hépatocytes et la dispersion homogène des cellules de Kupper (Figure 47 c ; Figure 48 b ; Figure 49 b ; Figure 50 c).

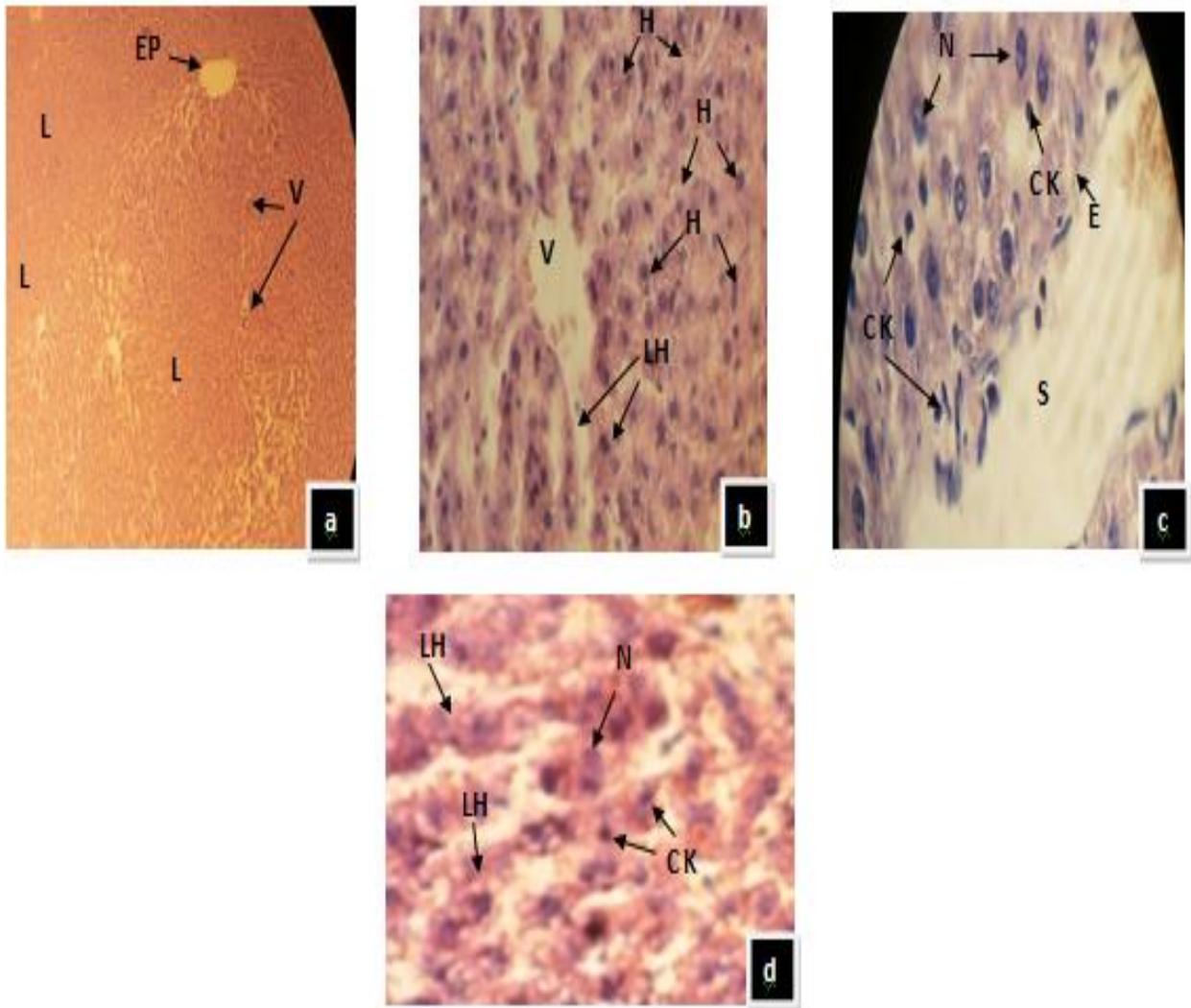


Figure 46

Figure 46 : Structure du parenchyme hépatique chez les rats témoins ((a), (b), (c) et (d)).

Grossissements:

G X 10 (a) , GX 40 (b) , GX 100 (d) ; Coloration : Hématoxyline et à l'Eosine (HE).

GX 100 (c) ; Coloration : Trichrome de Masson (TM).

EP : Espace porte ; E : Epithélium ; L : Lobules ; V : Veinules ; H : Hépatocytes ; LH : Lames hépatocytaires ; S : Capillaire Sinusoïde ; N : Noyaux binucléés des cellules hépatocytaires ; CK : Cellules de Kupffer.

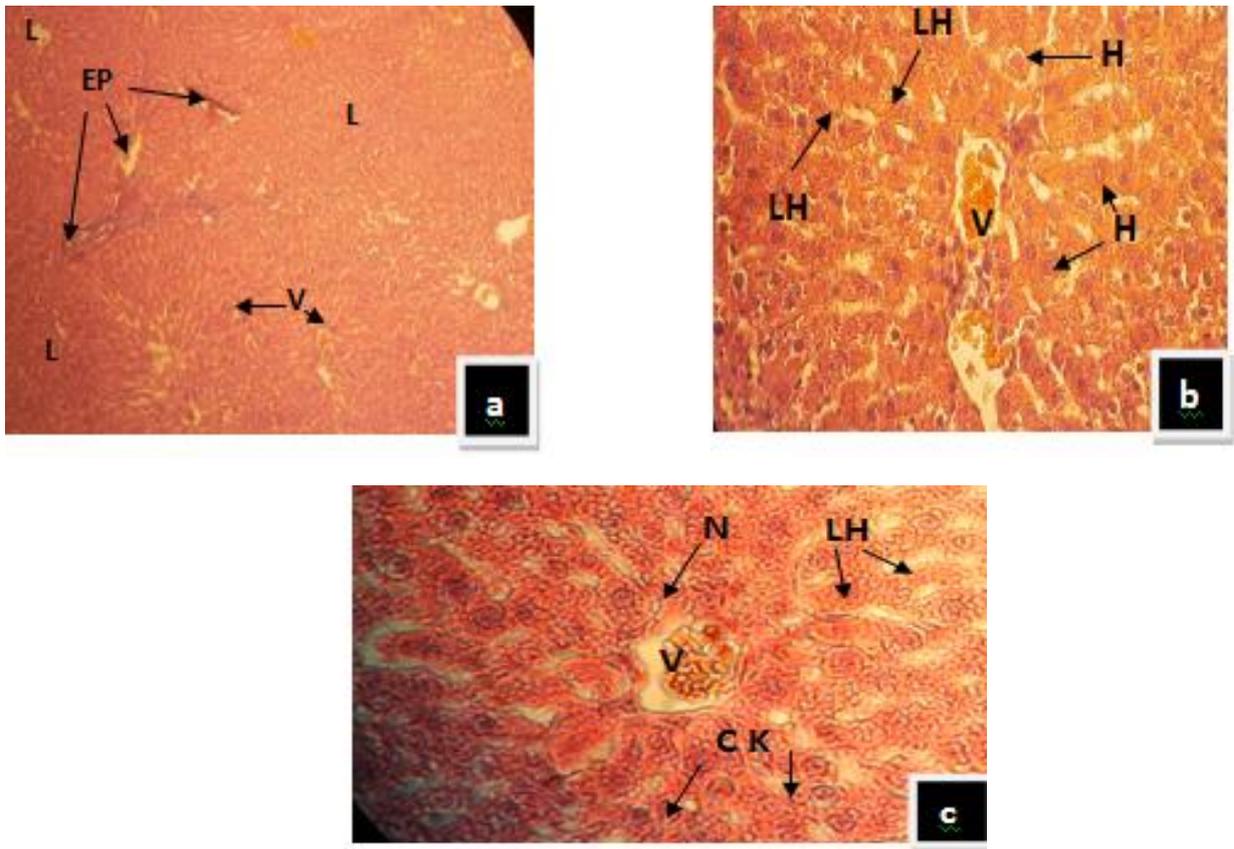


Figure 47

Figure 47 : Structure du parenchyme hépatique chez les rats du lot 01 Cd ((a), (b) et (c)).

Grossissements:

G X 10 (a) , G X 40 (b) , G X 100 (c); Coloration : HE.

EP : Espace porte ; L : Lobules ; V : Veinules ; H : Hépatocytes ; LH : Lames hépatocytaires ;
N : Noyaux binucléés des cellules hepatocytaires ; CK : Cellules de Kupffer.

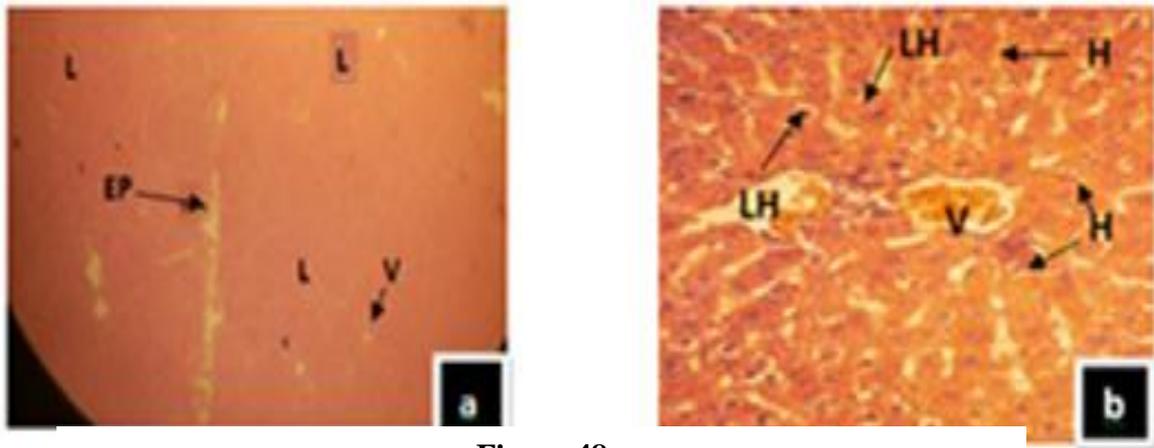


Figure 48

Figure 48 : Structure du parenchyme hépatique chez les rats du lot 02 Cd ((a) et (b)).

Grossissements :

G X 10 (a) , GX 40 (b) ; Coloration : HE .

EP : Espace porte ; L :Lobules ; V : Veinules ; H : Hépatocytes ; LH : Lames hépatocytaires .

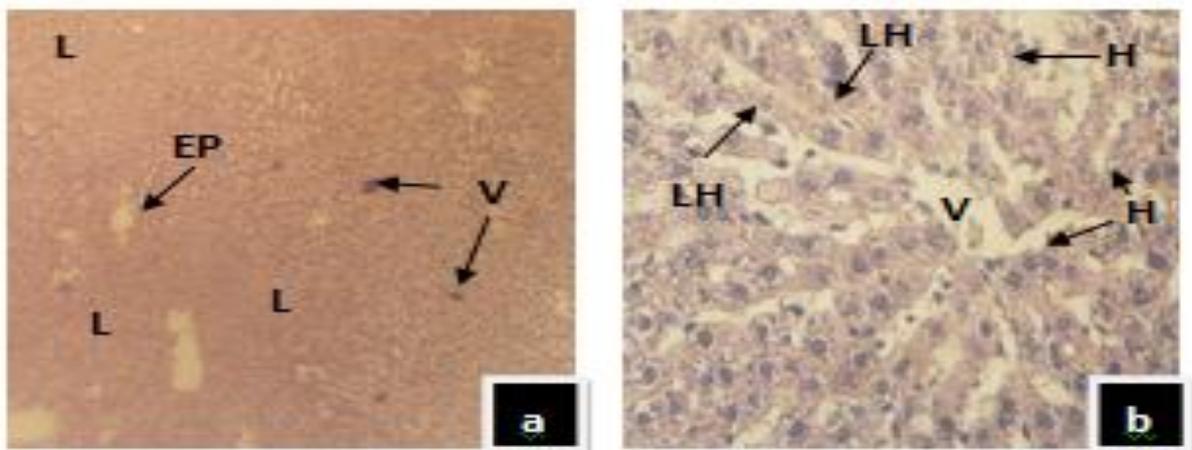


Figure 49

Figure 49 : Structure du parenchyme hépatique chez les rats du lot 01 Pb ((a) et (b)).

Grossissements:

G X 10 (a) ,GX 40 (b) ; Coloration : HE.

EP : Espace porte ; L : Lobules ; V : Veinules ; H : Hépatocytes ; LH : Lames hépatocytaires.

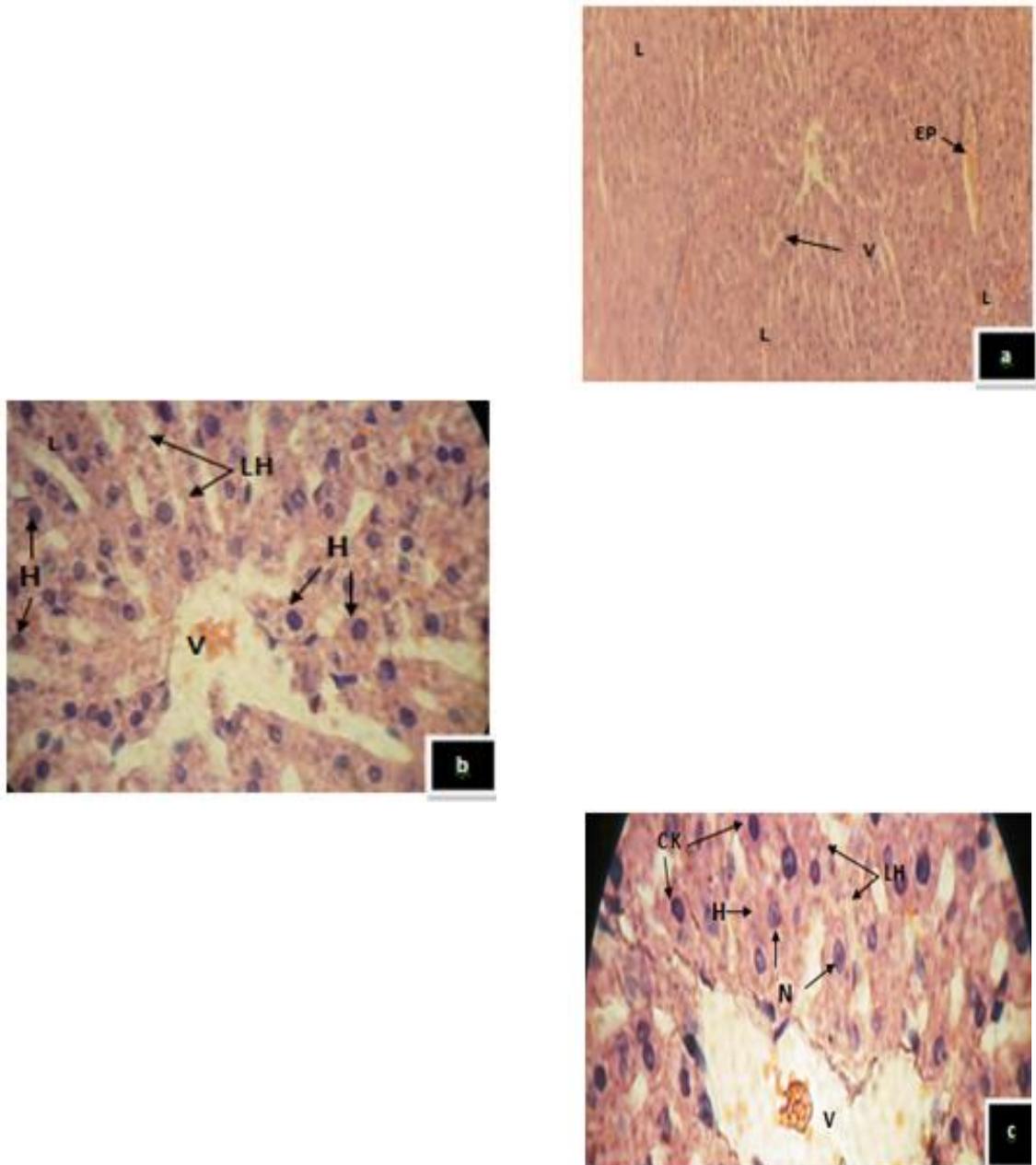


Figure 50

Figure 50 : Structure du parenchyme hépatique chez les rats du lot 02 Pb ((a), (b) et (c)).

Grossissements :

G X 10 (a) , GX 40 (b); Coloration : HE.

GX 100 (c) ; Coloration : TM.

EP : Espace porte ; E : Epithélium ; L : Lobules ; V : Veinules ; H : Hépatocytes ; LH : Lames hépatocytaires ; S : Capillaire Sinusoïde ; N : Noyaux binucléés des cellules hépatocytaires ; CK : Cellules de Kupffer.

III.1.7.3. Reins

Chez les rats témoins, le parenchyme rénal révèle une structure histologique composée de deux parties ; le cortex et la médullaire.

En observant la coupe transversale des reins de l'extérieur à l'intérieur ; le cortex rénal est constitué d'une capsule conjonctive mince sous laquelle se trouve un parenchyme formé des glomérules denses (Figure 51 a et b), de forme plus ou moins arrondie avec un contour irrégulier. Les glomérules sont entourés par des espaces de tubes contournés proximaux (Figure c et d).

La chambre glomérulaire est tapissées par les cellules épithéliales de la capsule de Bowman (Walker,2013), qui fait une continuité avec la médullaire superficielle , cette dernière est composée de tubes droits proximaux avec une lumière large et donne sur la médullaire interne qui renferme les tubes distaux (Figure 51b). L'épithélium des tubes contournés proximaux et distaux possède des noyaux arrondis et une membrane plasmique non visible (Figure 51 d).

Le parenchyme rénal des lots 1 Cd (Figure 52) , 2 Cd (Figure 53) , 1 Pb (Figure 54) et 2 Pb (Figure 55) ne présente pas d'altérations structurales (Figures 52 a ; 53 a ; 54 a ; 55 a). Les glomérules présentent des formes homogènes et similaires entourés par les tubes contournés proximaux, et ne présentent aucune différence comparé aux reins des témoins (Figures 52 b ; 53 b ; 54 b ; 55 b). L'espace glomérulaire de Bowman communique avec la médullaire avec les tubes droits proximaux et donne sur le regroupement des tubes distaux (Figures 52 b et c ; 53 b et c ; 54 b et c ; 55 b et c).

Les cellules des tubes contournés proximaux et les tubes distaux présentent des noyaux bien dispersés non condensés et ne montrent pas de nécrose cellulaire (Figures 52 c ; 53 c ; 54 c ; 55 c).

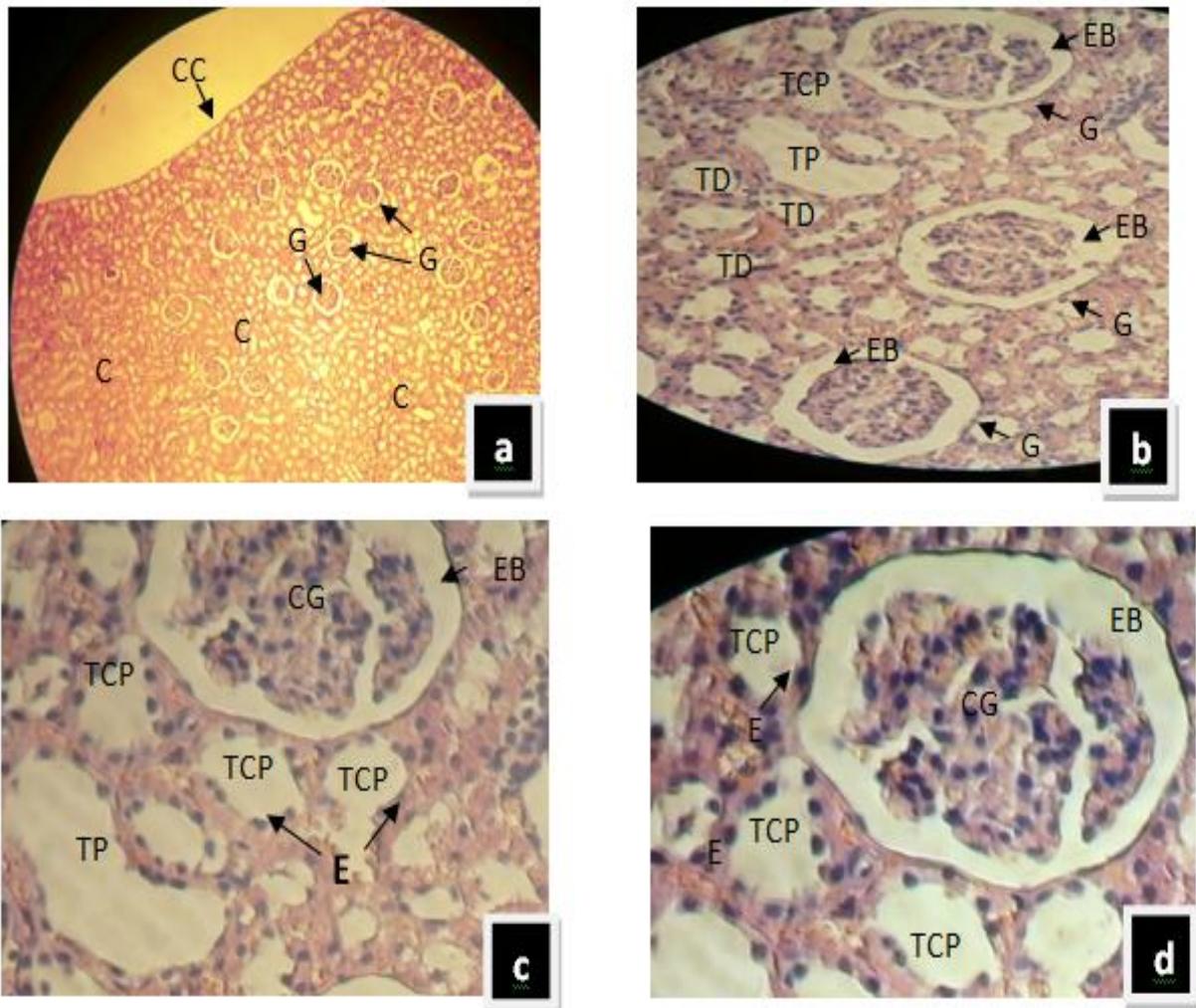


Figure 51

Figure 51: Structure du parenchyme rénal chez les rats témoins ((a), (b), (c) et (d)).

Grossissements:

G X 10 (a), G X 40 (b), GX 100 (c) ; Coloration : Hématoxyline et à l'Eosine (HE).

G X 100 (d) ; Trichrome de Masson (TM).

C : Cortex ; CC: Capsule corticale ; G : Glomérule ; TP : Tube proximal ; TD : Tube distal ;
 TCP : Tube contourné proximal ; EB : Espace de Bowman ; CG : Centre du glomérule ;
 E : Epithélium des tubes contournés proximaux.

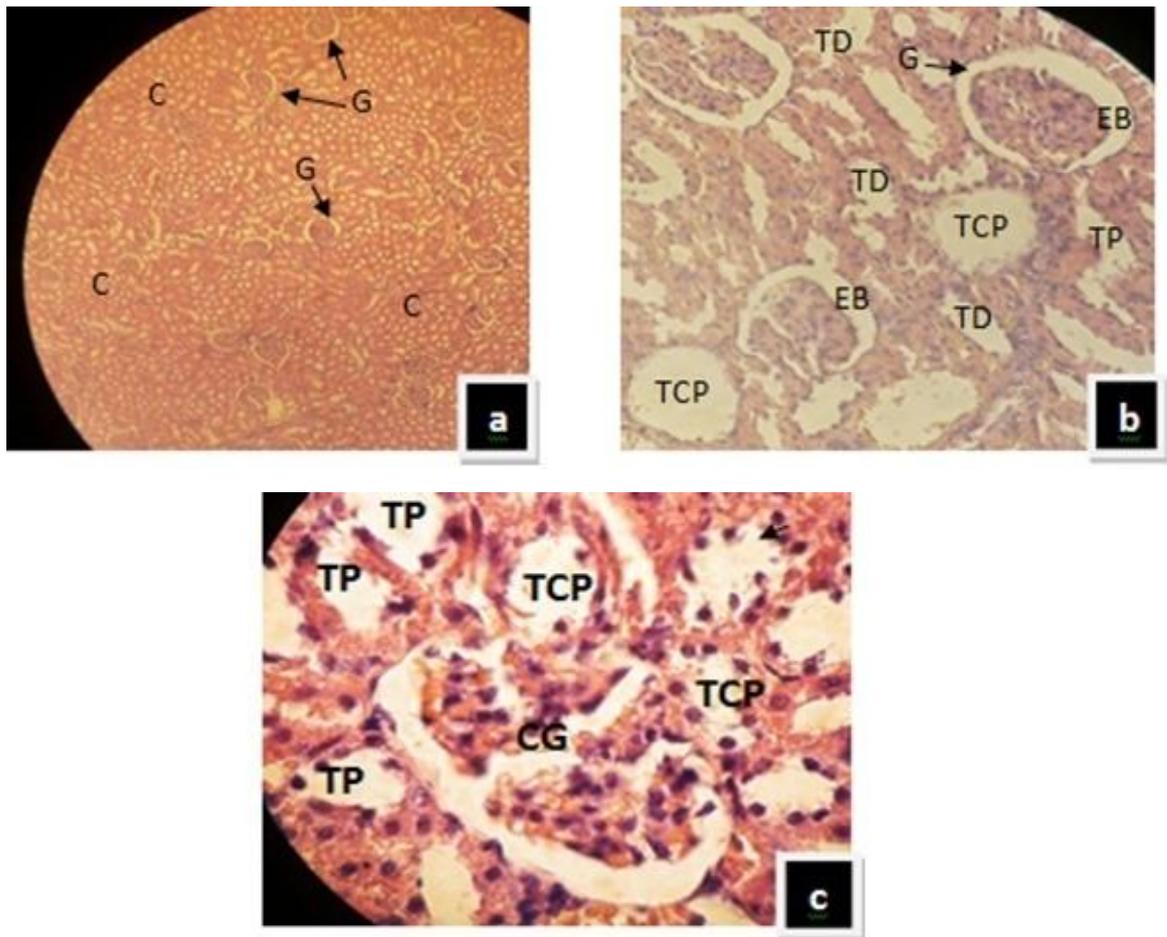


Figure 52

Figure 52: Structure du parenchyme rénal chez les rats du lot 1 Cd ((a),(b) et (c)).

Grossissements :

G X 10 (a), G X 40 (b) , GX 100 (c) ; Coloration : HE .

C : Cortex ; CC : Capsule corticale ; G:Glomérule ; TP : Tube proximal ; TD : Tube distal ;
 TCP : Tube contourné proximal ; EB : Espace de Bowman ; CG : Centre du glomérule ;
 E : Epithélium des tubes contournés proximaux.

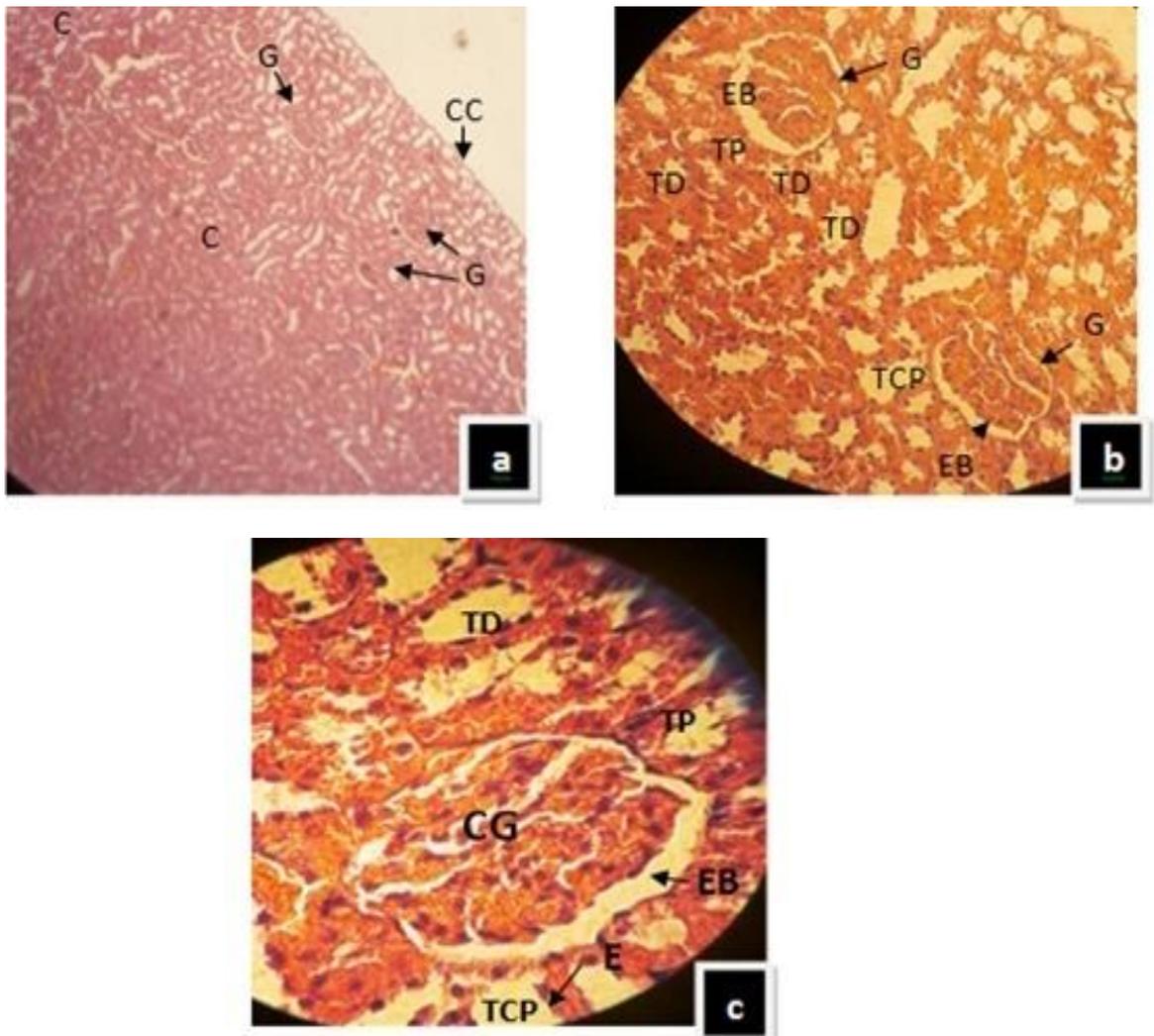


Figure 53

Figure 53 : Structure du parenchyme rénal chez les rats du lot 2 Cd ((a), (b) et (c)).

Grossissements:

G X 10 (a), G X 40 (b), GX 100 (c) ; Coloration : HE .

C : Cortex ; CC: Capsule corticale ; G:Glomérule ; TP : Tube proximal ; TD : Tube distal ; TCP : Tube contourné proximal ; EB : Espace de Bowman ; CG : Centre du glomerule ; E : Epithélium des tubes contournés proximaux.

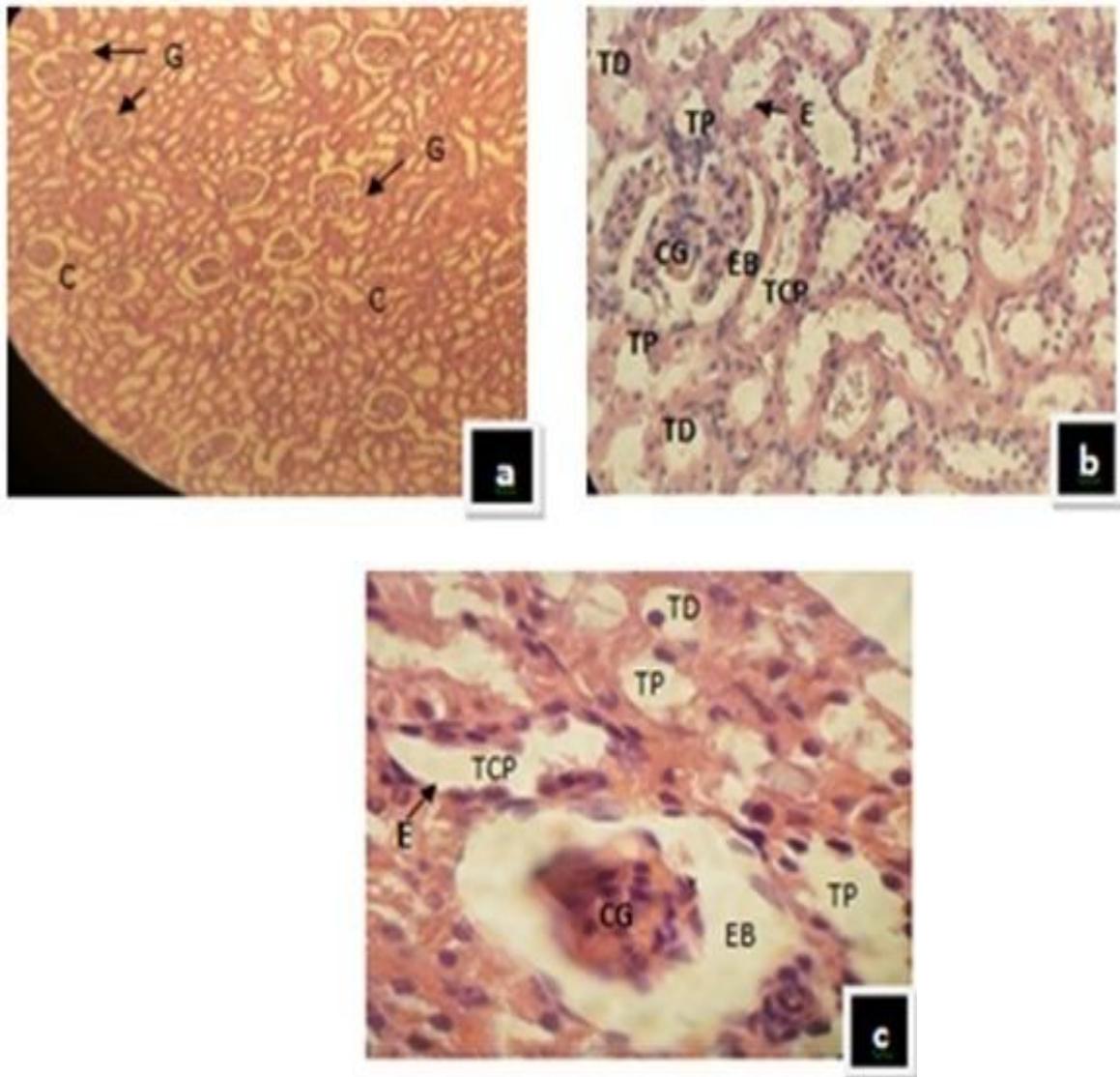


Figure 54

Figure 54: Structure du parenchyme rénal chez les rats du lot 1 Pb ((a), (b) et (c)).

Grossissements :

G X 10 Zoomé (a), G X 40 (b); Coloration : HE.

GX 100 (c) ; Coloration : TM.

C : Cortex ; CC : Capsule corticale ; G:Glomérule ; TP : Tube proximal ; TD : Tube distal ;
 TCP : Tube contourné proximal ; EB : Espace de Bowman ; CG : Centre du glomérule ;
 E : Epithélium des tubes contournés proximaux.

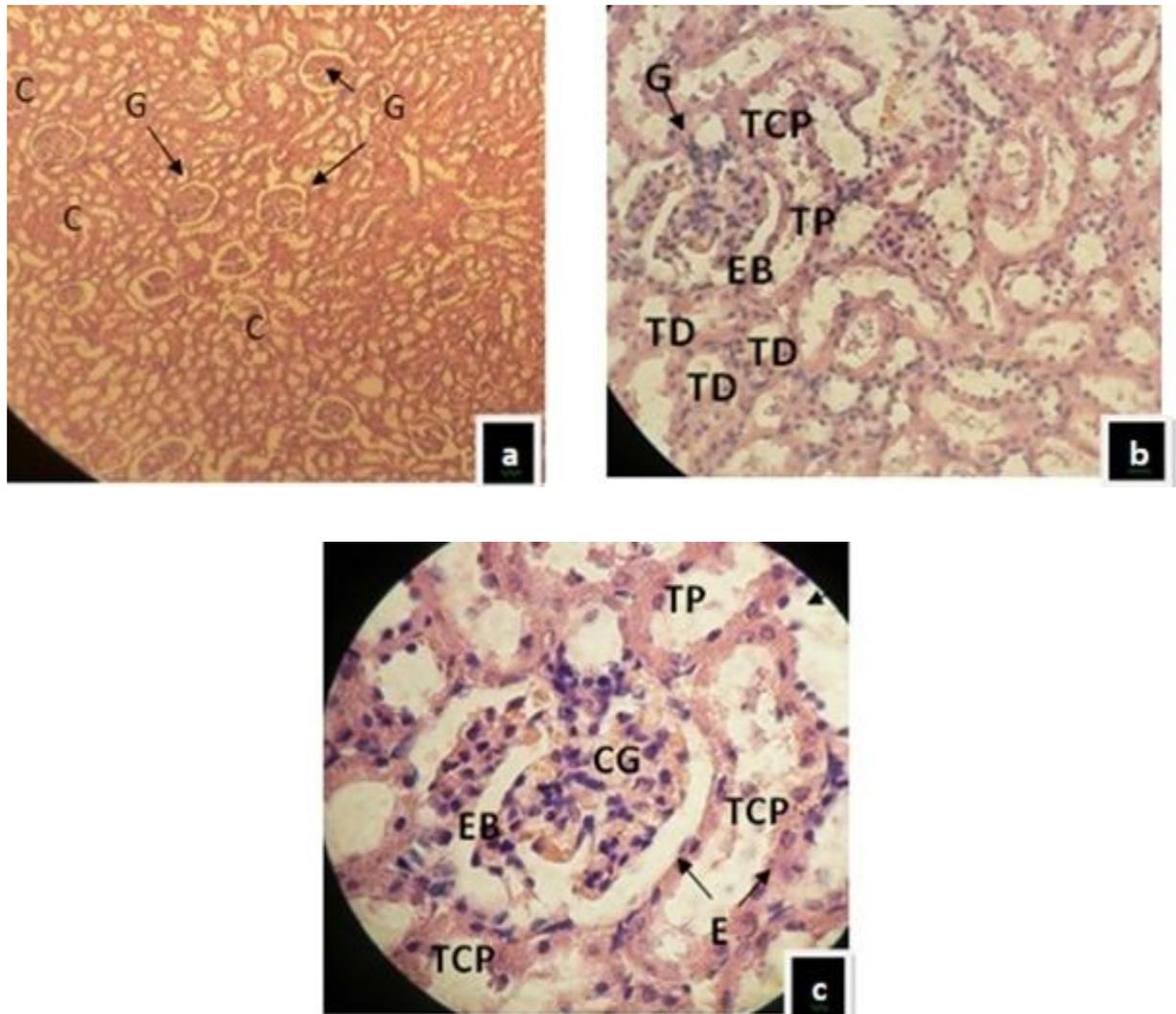


Figure 55

Figure 55 : Structure du parenchyme rénal chez les rats du lot 2 Pb ((a), (b) et (c)).

Grossissements:

G X 10 (a), G X 40 (b), GX 100 (c); Coloration: HE.

C : Cortex ; CC : Capsule corticale ; G : Glomérule ; TP : Tube proximal ; TD : Tube distal ;
 TCP : Tube contourné proximal ; EB : Espace de Bowman ; CG : Centre du glomérule ;
 E : Epithélium des tubes contournés proximaux.

III.1.7.4 Rate

Chez les rats témoins, la structure histologique montre que la rate, est bordée par une capsule conjonctive, en se dirigeant vers l'intérieur il ya de nombreux nodules lymphoïdes (corpuscules de Malpighi) traversés par une artériole (Figure 56 a). Les nodules lymphoïdes forment la pulpe blanche et sont disséminés dans la pulpe rouge qui constitue le reste du parenchyme (Vincke et *al.*, 2014) (Figure 56 a et b).

L'examen microscopique à faible grossissement permet de préciser la nature des pulpes spléniques. La pulpe blanche comprend de nombreux amas lymphoïdes avec un centre germinatif (Figures 56 b, c, d).

La pulpe rouge est un réseau d'espaces qui comprend de large vaisseaux et les sinusoides veineux séparés par des espaces réticulaires appelés les cordons de Billroth (Figure 56 d, e, f).

Chez les rats des lots 1 Cd (Figure 57), 2 Cd (Figure 58), 1 Pb (Figure 59) et 2 Pb (Figure 60), le parenchyme splénique ne présente pas d'altérations structurales (Figures 57 b ; 58 a ; 59 a ; 60 a).

La pulpe blanche constituée des nodules lymphatiques avec les centres germinatifs présentent un aspect homogène et similaire avec la rate du lot témoin (Figures 57 b, c et d ; 58 b, c et d ; 59 b, c et d ; 60 b, c et d).

La pulpe rouge se révèle bien irriguée par les vaisseaux sanguins larges et petits sinusoides séparés par les espaces réticulés des cordons de billroth avec l'absence des cellules nécrosées (Figures 57 d, e et f ; 58 d, e et f ; 59 d, e et f ; 60 d, e et f).

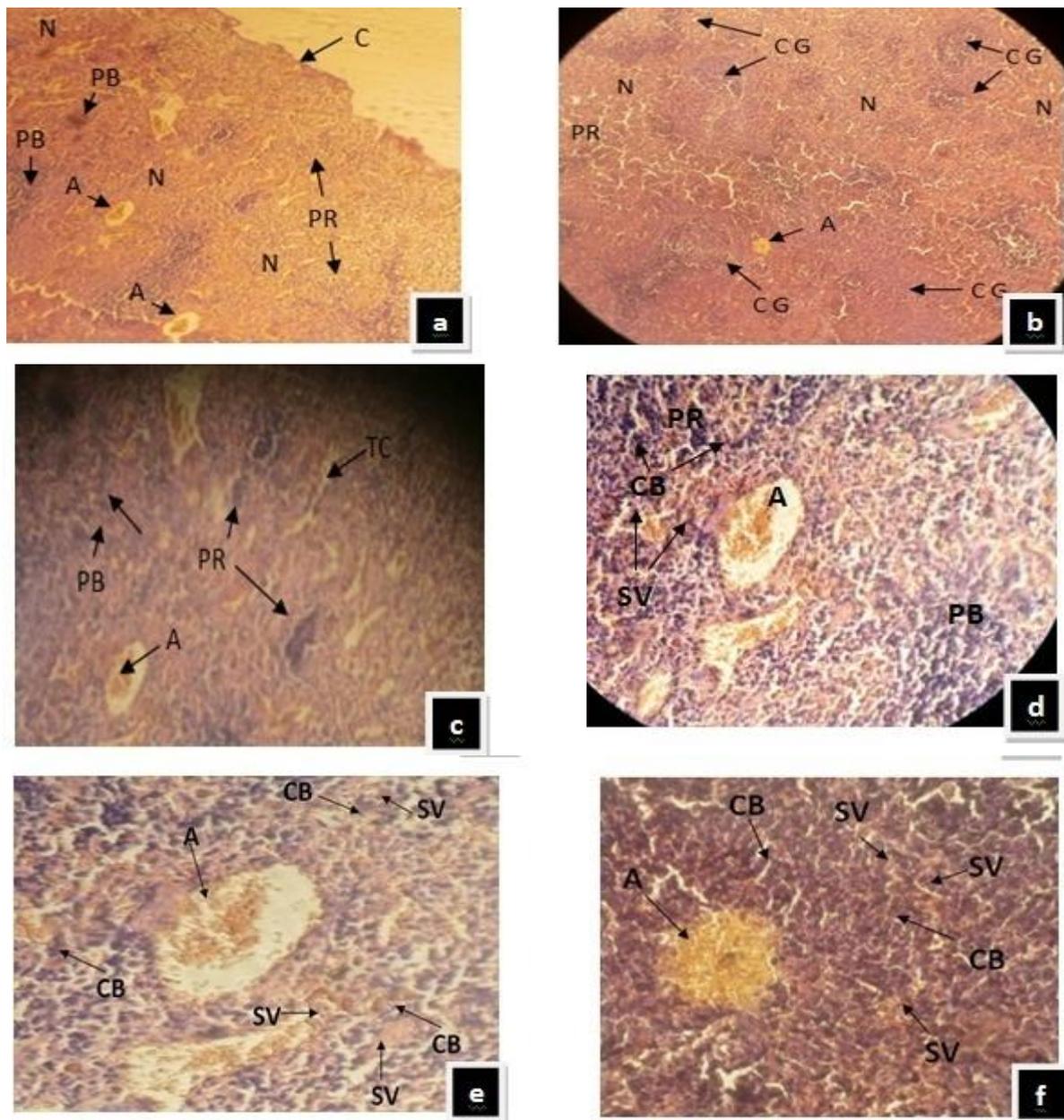


Figure 56

Figure 56 : Structure du parenchyme splénique chez les rats témoins ((a), (b), (c), (d), (e) et (f)).

Grossissements :

GX 10 (a), **GX 40** (c), **G X 40** (d), **GX 100 Zoomé** (e) ; **Coloration : Hématoxyline et à l'Eosine (HE).**

G X 10 (b), **G X 100** (f) ; **Coloration : Trichrome de Masson (TM).**

C : Capsule conjonctive ; PR : Pulpe rouge ; PB : Pulpe blanche ; A : Artériole folliculaire ; N : Nodules lymphatiques ; CG : Centre germinatif ; TC : Travée conjonctive ; CB : Cordons de Billroth ; SV : Sinusoïde veineux.

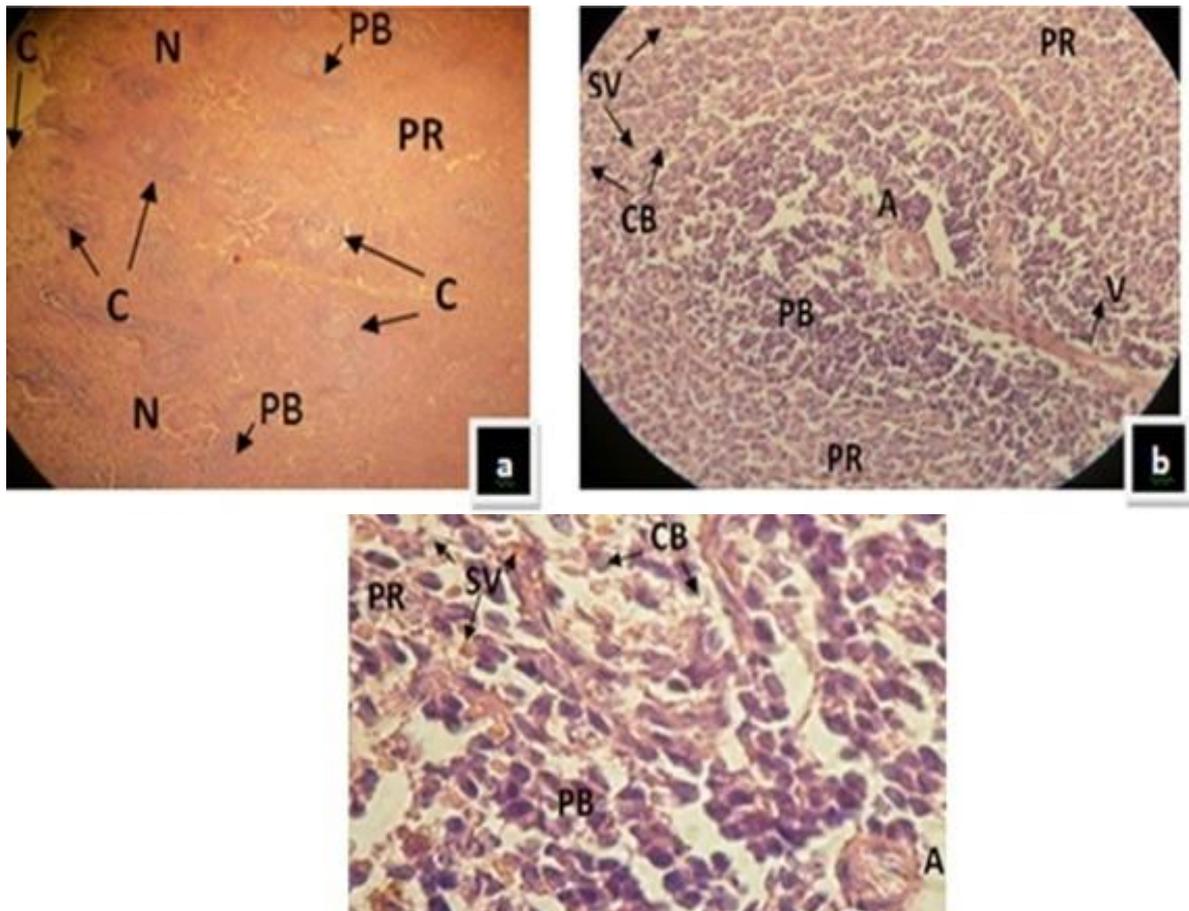


Figure 57

Figure 57 : Structure du parenchyme splénique chez les rats du lot 1 Cd (a), (b) et (c).

Grossissements :

GX 10 (a) , GX 40 (b) , GX 100 (c); Coloration : HE .

C : Capsule conjonctive ; PR : Pulpe rouge ; PB : Pulpe blanche ; A : Artériole folliculaire ; N : Nodules lymphatiques ; CG : Centre germinatif ; CB : Cordons de Billroth ; SV : Sinusoïde veineux ; V : Vaisseaux sanguin large.

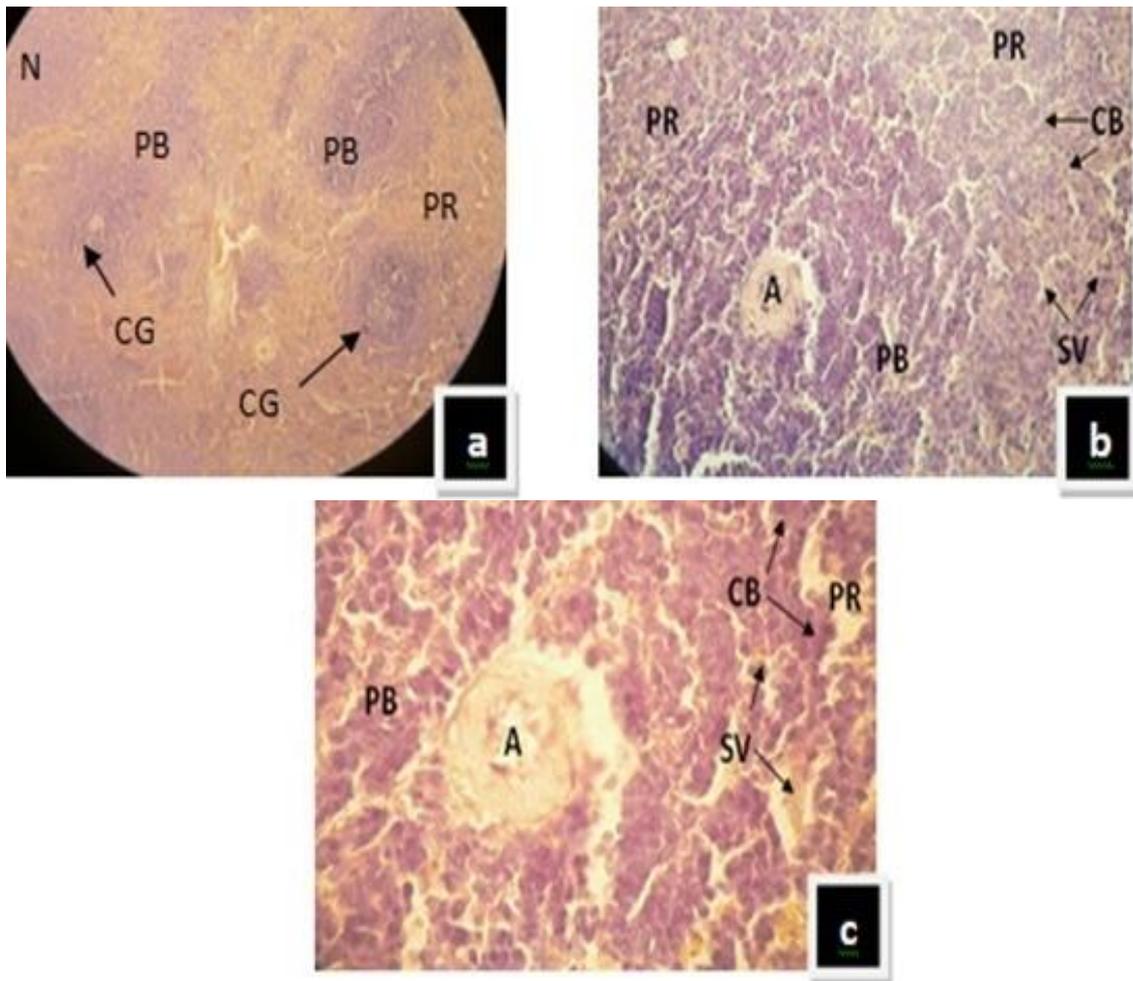


Figure 58

Figure 58 : Structure du parenchyme splénique chez les rats du lot 2 Cd ((a),(b) et (c)).

Grossissements :

GX 10 (a), GX 40 (b), GX 100 (c); Coloration : HE.

C : Capsule conjonctive ; PR : Pulpe rouge ; PB : Pulpe blanche ; A : Arteriole folliculaire ; N : Nodules lymphatiques ; CG : Centre germinatif ; CB : Cordons de Billroth ; SV : Sinusoïde veineux ; V : Vaisseaux sanguin large.

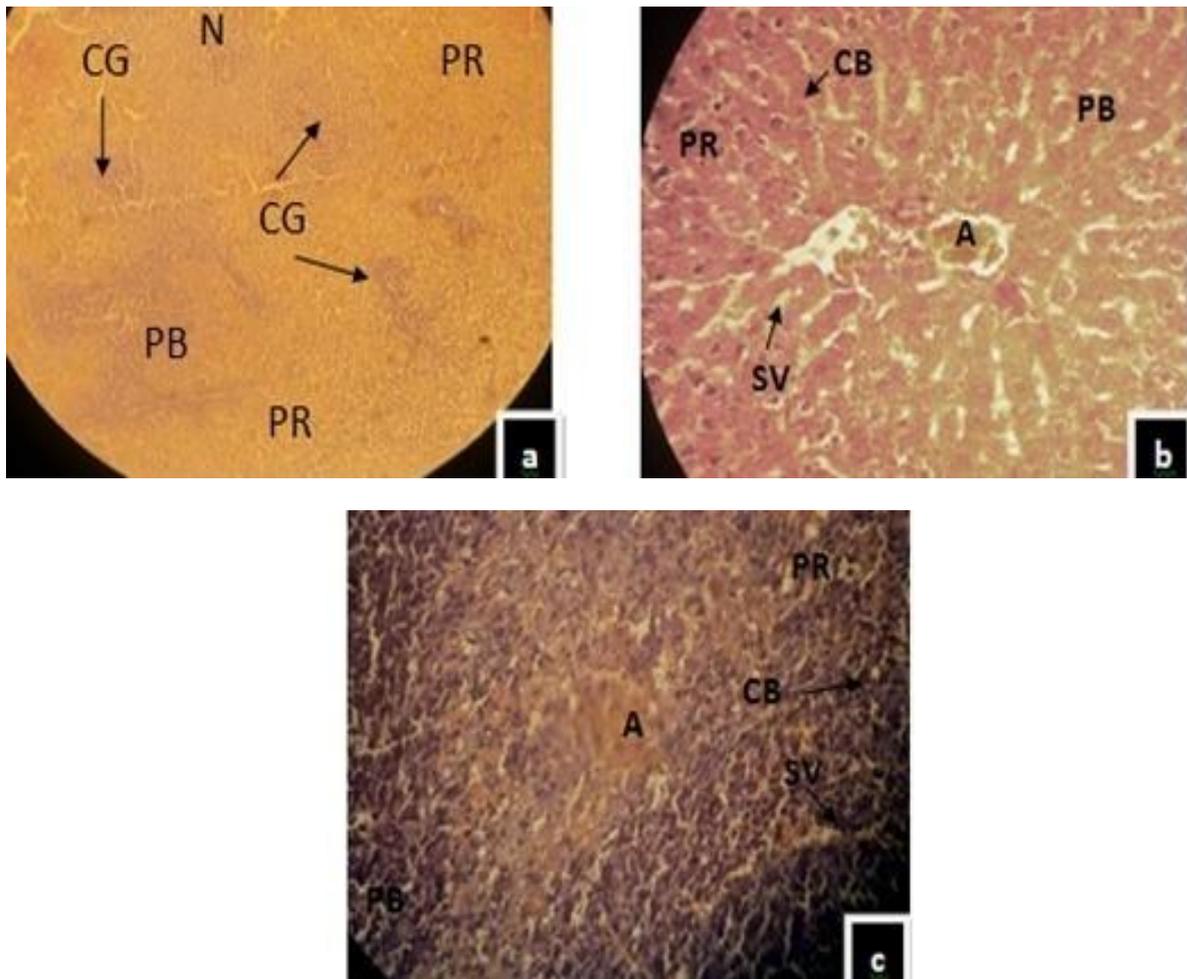


Figure 59

Figure 59: Structure du parenchyme splénique chez les rats du lot 1 Pb ((a), (b) et (c)).

Grossissements :

GX 10 (a), G X 40 (b) ; Coloration : HE.

G X 100 (c) ; Coloration : Trichrome de Masson (TM).

C : Capsule conjonctive ; PR : Pulpe rouge ; PB : Pulpe blanche ; A : Artériole folliculaire ;
N : Nodules lymphatiques ; CG : Centre germinatif ;CB : Cordons de Billroth ; SV : Sinusoïde
veineux.

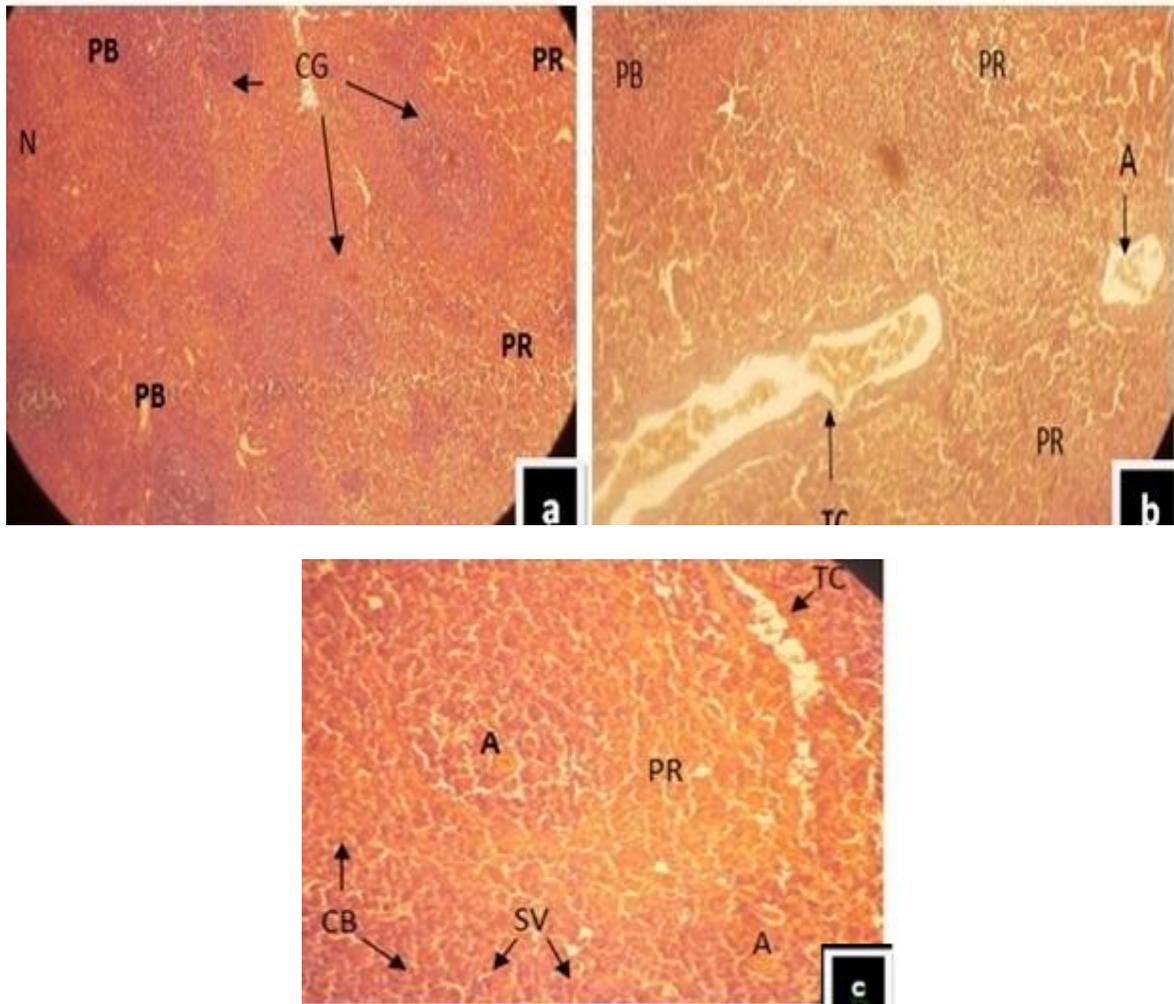


Figure 60

Figure 60: Structure du parenchyme splénique chez les rats du lot 2 Pb ((a),(b) et (c)).

Grossissements :

GX 10 (a) , GX 40(b) , G X 100 (c) ; Coloration : HE.

C : Capsule conjonctive ; PR : Pulpe rouge ; PB : Pulpe blanche ; A : Artériole folliculaire ; N : Nodules lymphatiques ; CG : Centre germinatif ; TC : Travée conjonctive ; CB : Cordons de Billroth ; SV : Sinusoïde veineux.

III.2 DISCUSSION

A travers cette étude chez les rats femelles 'WISTAR' adultes, nous cherchons les effets toxiques de l'eau d'alimentation fournie qui, a été préalablement exemptée de deux métaux lourds ; le Cadmium et le Plomb par procédé biologique enzymatique.

Au début de notre étude, l'eau d'alimentation des divers lots de rats à été exemptée des deux métaux lourds initialement présents à savoir le Cadmium (0,5 et 1 ppm) et le Plomb (2,5 et 5 ppm). Le procédé appliqué est de nature biologique enzymatique à base de la Peroxydase ; partiellement purifiée (6,5 UI/ml), à partir des racines du raifort *Armoracia Rusticana*.

En évaluant les résultats de cette étape par le contrôle de quelques paramètres de l'eau d'alimentation des rats, les observations suivantes ont été faites ;

- L'eau d'alimentation du lot témoin est une eau de robinet qui répond aux normes algériennes en vigueur ; relative aux paramètres de qualité de l'eau de consommation humaine en termes de paramètres physicochimiques pH, conductivité, taux des nitrates et des nitrites.

- Les eaux d'alimentation des rats pour les lots 01 Cd et 02 Cd , sont conformes aux normes algériennes pour le pH , taux de nitrates et de nitrites, néanmoins les valeurs de la conductivité des deux lots dépassent les valeurs fixées par la législation algérienne. Ceci s'explique par la charge ionique déjà contenue dans l'eau avant le traitement ainsi qu'a la salinité de l'extrait enzymatique utilisé.

- Les eaux d'alimentation des rats pour les lots 01 Pb et 02 Pb sont légèrement acides avec une charge ionique élevée avec des taux de nitrates et de nitrites assez importants. Les valeurs obtenues dépassent les valeurs fixées par la législation algérienne.

Ces résultats peuvent être expliqués par l'acidité, la charge nitrique et la salinité de l'eau avant le traitement. En fin , le traitement biologique à base de peroxydase utilisé ne peut pas être adapté pour ajuster les taux d'acidité, de salinité et de charge nitrique de l'eau.

En revanche l'application du traitement à base de peroxydase semble très efficace, quant à l'élimination des deux métaux lourds Cd et Pb.

Ce qui confirme quelques travaux de recherches en la matière ; des travaux de recherche menés par Gregus et Klaassen (1996) ont démontré que la peroxydase du raifort (HRP) est un modèle d'enzyme glutathion qui seul réagit avec plusieurs ions métalliques dont le Cd^{2+} et permet la détoxification des cellules.

D'autres recherches réalisées par Min-Lang Chang et al (2012) sur des cultures de riz, ont montrés la baisse de la concentration de Cd en présence de la peroxydase et ses isoenzymes .

A l'issue de la période d'expérimentation de trente (30) jours d'alimentation des rats avec l'eau préalablement exemptée de Cd et Pb ; aucun cas de mortalité , aucun changement de comportement ni signes de toxicité, diarrhée ou salivation n'ont été signalé chez tous les rats pendant l'expérimentation.

L'eau d'alimentation de tous les lots de rats ne semble pas perturber les poids corporel des rats , puisque tous les groupes (témoins et traités) ont montré un gain corporel remarquable qui témoigne une croissance chez les rats. Le gain de poids sert comme un index de la croissance (Palani et al., 1999). Ainsi chez les rats traités, les résultats des poids absolus des différents organes vitaux tels que le foie, la rate, et les reins n'ont montré aucune différence par rapport aux rats témoins.

Dans nos examens biologiques, nous n'avons pas pu rassembler les résultats hématologiques, biochimiques et hormonaux pour tous les rats à cause de la faible quantité de sang recueilli par rapport au grand nombre des paramètres étudiés.

- L'examen hématologique ne montre pas la présence d'anémie chez les différents lots de rats traités. L'absence d'anémie est témoignée par les concentrations en globules rouges et d'hémoglobine avec des taux similaires aux témoins.

Par contre le taux des plaquettes a présenté un taux diminué par rapport à celui du témoin . Ce taux s'est avéré plus important chez les rats des lots 1 Pb et 2 Pb , vue la concentration élevée en nitrates et en nitrites présente dans l'eau d'alimentation des rats . Ces résultats ont été confirmés par l'observation microscopique des frottis sanguins des rats des différents lots , qui a décelé une fluidité du sang de l'animal et une diminution d'agrégats plaquettaire seulement chez les rats des lots 1 Pb et 2 Pb alimentés d'eau chargée de nitrates et de nitrite ; ces ions qui semblent passer dans le sang de l'animal et augmentent les taux de nitrites plasmatiques par rapport au témoin. Ces résultats concordent avec les recherches de Park et al (2013).

Park et *al.*, ont noté un effet des taux des nitrites sur la fonction des plaquettes muriques .

Ces chercheurs considèrent que la fluidité du sang et la diminution des agrégations plaquettares sont dû à la présence des nitrites dans le sang.

- Quant à l'équilibre leucocytaire, aucune anomalie n'a été notée pour le nombre des lymphocytes, neutrophiles et des monocytes chez l'ensemble des rats ce qui révèle que le système immunitaire n'a pas été perturbé par la consommation de l'eau préalablement traitée via le procédé biologique enzymatique (HRP).

- L'analyse des coupes histologiques des organes étudiés chez les rats des différents lots ; n'ont pas révélé d'altérations structurales au niveau de leurs parenchymes.

• L'analyse des coupes histologiques de la thyroïde ne révèle pas d'altération au niveau du parenchyme, et ne montre aucun signe d'hyperplasie ou de réaction inflammatoire manifestée par la dégénérescence des follicules. Selon Tebourbi et *al.*, (2010) , la dégénérescence des follicules est une hyperplasie thyroïdienne marquant la présence d'une inflammation aigue. Pavel (2010) a expliqué aussi l'hyperplasie thyroïdienne par un changement de la forme des cellules folliculaires qui deviennent plus hautes et par la diminution du volume colloïdal intra folliculaire. Le nombre, la taille et la lumière folliculaire ne présentent pas de variations ni de cellules desquamées.

La thyroïde est variablement sensible à la plupart des agents cytotoxiques (Tieman, 2008), et d'après les résultats du dosages hormonal thyroïdien chez tous les rats des divers lots , les taux de FT3 , FT4 et TSH ; aucune différence n'a été notée par rapport au lot témoin.

Plusieurs études toxicologiques sur la recherche des perturbateurs endocriniens ont confirmé la sensibilité des hormones thyroïdiennes aux différents xénobiotiques (polluants, pesticides....) (Villanger et *al.*,2011).

Ce qui conclut que les eaux utilisées pour l'alimentation des rats ne semblent porter aucune perturbation de l'équilibre hormonal thyroïdien.

• Les coupes histologiques du foie chez les rats alimentés avec l'eau traitée n'ont montrés aucune altération du parenchyme hépatique, l'organisation et le nombre des hépatocytes binucléés restent mêmes que ceux des rats du lot témoin. De plus le parenchyme hépatique ne présente pas des signe d'hépatotoxicité ni des cellules nécrosées.

Le foie est l'organe majeur de multiples voies métaboliques (Guyton, 1995) , en plus de son rôle de détoxification des polluants et des pesticides (Kucuk ,1999), le foie joue un rôle hématopoïétique pendant la vie embryonnaire et conserve aussi chez l'adulte, au sein de son architecture, des cellules hématopoïétiques (Eustis et *al.*,1990).

D'après les résultats du dosage de la protéine C- Réactive (CRP) des divers lots de rats traités , nous ne constatons aucune variation par rapport au lot témoin . Friedman et Yong (2001) ont expliqué que la CRP est un des composants de la phase aigue, les plus sensibles, synthétisée par le foie et active la voie classique du complément en réponse à la réaction inflammatoire.

Ce qui conclut que les eaux utilisées pour l'alimentation des rats ne semblent dérégler l'équilibre hépatique.

- Les coupes histologiques des reins chez les rats témoins et les rats alimentés avec l'eau traitée ne révèle aucune altération du parenchyme rénal, aucune apparition de forme de dégénérescence des glomérules n'est signalée.

Une inflammation rénale et une néphrotoxicité sont à éliminer par le dosage de la créatinine. Dans notre étude nous n'avons pas pu effectuer les résultats des dosages biochimiques de la créatinine des rats, à cause de la faible quantité de sang recueilli.

En se basant uniquement sur l'étude histologique des reins des divers lots des rats ; il semble que les eaux utilisées pour l'alimentation des rats ne semblent pas désorganiser la structure morphologique rénale.

- En fin l'analyse à l'échelle structurale du parenchyme splénique avec ses deux composantes ; pulpe blanche et pulpe rouge ne révèle aucune altération chez l'ensemble des rats des divers lots.

La rate joue un rôle important dans la réponse immunitaire et participe à la destruction des cellules sanguines âgées ou anormales. Nos résultats de l'hémogramme des divers lots de rats n'ont révélé aucune différence quant à l'équilibre leucocytaire (lymphocytes) ceci est dû à la contribution de la rate dans le maintien de l'équilibre sanguin, ce qui concorde avec Dijkstra et *al.*, (1990) , qui ont expliqué que chez le rat adulte, la rate persiste toujours des foyers hématopoïétiques qui peuvent se réactiver en cas de besoin.

En se basant uniquement sur l'étude histologique de la rate des divers lots des rats, on constate que les eaux utilisées pour l'alimentation des ces rats ne semblent pas perturber la structure et le fonctionnement de la rate.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les objectifs ciblés par cette étude ont été atteints. Le premier visant l'élimination des métaux lourds de l'eau ; le deuxième vise la recherche des effets toxiques par expérimentation sur des rats. On constate pour le premier, la possibilité d'utiliser l'extrait de la HRP pour l'élimination définitive des traces de métaux lourds Cd et Pb dans l'eau.

Pour le deuxième objectifs , on a expérimenté sur des rats femelles de souche 'WISTAR' , en leur alimentant de l'eau exemptée des deux (02) métaux lourds Cd et Pb.

D'après les résultats, on peut conclure ceci :

- Aucun cas de mortalité, aucun changement de comportement ni signes de toxicité, diarrhée ou salivation n'ont été signalés chez les rats pendant l'expérimentation.
- L'eau d'alimentation de tous les lots de rats ne semble pas influencer les poids corporels des rats.
- L'absence d'anémie et de réaction inflammatoire chez tous les rats et le maintien des équilibres leucocytaires, hormonaux et hépatique .
- La fluidité du sang avec diminution des agrégations plaquettaires uniquement chez les rats des lots (1 Pb 2.5 ppm et 2 Pb 5 ppm).Ceci est dû à la présence des nitrites dans le sang de l'animal.
- Absence de réaction inflammatoire ou de perturbation des fonctions rénale et splénique.
- Absence d'altérations histologiques des divers organes vitaux à savoir ; la thyroïde, le foie, les reins et la rate.

Cette étude préliminaire mérite d'être approfondie, de ce fait il est indispensable :

- D'effectuer une étude histologique sur le système nerveux central afin d'évaluer les effets neurologiques suite à la consommation d'eau exemptée des métaux lourds.
- De mener une étude de recherche sur une période allant jusqu'à 01 an pour évaluer les effets immunotoxiques de consommation de l'eau exemptée de Cd et Pb.
- Explorer la toxicité au niveau du tissu pulmonaire.
- Doser d'autres paramètres biochimiques liés à l'activité rénale et d'autres molécules inflammatoires , telles que les IL 1 et 13 qui stimulent la diapédèse leucocytaire lors de l'inflammation.
- Introduire le procédé enzymatique à base de la peroxydase de raifort dans les étapes du traitement des eaux polluées avec les métaux lourds Cd et Pb.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (1999).** Toxicological profile for lead. US Department of health and human services.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2008).** Toxicological Profile for Cadmium. Atlanta, GA.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2012).** Toxicological Profile for Cadmium. Atlanta, GA.
- Ait khaldoun, I. (2011).** Optimisation du transport des cations Cu(II), Zn(II) et Cd(II) par le tri-n-BUTYLPHOSPHATE (TBP) à travers les membranes d'affinité. Mémoires de magister Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, 76 P.
- Alexander, F.W. (1974).** The uptake of lead by children in differing environments. *Environ Health Perspect*, 155-159.
- Alvares, A.P., Fischbein, A., Sassa, S., Anderson, K.E and Kappas, A. (1976).** Lead intoxication. effects on cytochrome P-450-mediated hepatic oxidations. *Clin Pharmacol Ther*, 183-190.
- Andersen, O., Nielsen, J.B., Nordberg, G.F. (2004).** Nutritional interactions in intestinal cadmium uptake-possibilities for risk reduction *Biometals*, 543-7.
- Andujar, P., Bensefa, C., Descatha, A. (2010).** Intoxication aiguë et chronique au cadmium - Acute and chronic cadmium poisoning, *La Revue de médecine interne*, 31, 107-115.
- Apostoli, P., Kiss, P., Porru, S., Bonde, J.P., Vanhoorne, M. (1998).** Male reproductive toxicity of lead in animals and humans. *Occup Environ Med*, 364-74.
- Anonyme 1. (2014).** *Armoracia rusticana* P.Gaertn., B.Mey., & Scherb, 17p.
- Anonyme 2. (2010).** **RCSB Protein Data Bank.** Structure of Horseradish Peroxidase C1A Compound I.
- Anonyme 3. (2010).** Architect system free T4. Manuel d'utilisation "Abbott Diagnostics" - REF 7K65.
- Anonyme 4. (2009).** Architect system free T3. Manuel d'utilisation "Abbott Diagnostics" - REF 7K63.

- Anonyme 5. (2013).** Manuel d'utilisation "BioSystem[®]"- REF M31321f 01/2013.
- Anonyme 6. (2011).** Manuel d'utilisation "Consort C 860[®]".
- Anonyme 7. (2008).** European Union Risk Assessment. Report (EURAR).
- Anonyme 8. (2010).** Manuel d'utilisation "VIDAS[®] TSH3" - REF 30 441.
- Bailly, Y., Duprat, P. (1990).** Monographs on Pathology of Laboratory Animals .Hemopoietic system. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 139 p,Berlin.
- Batuman, V. (1993).**Lead nephropathy, gout, and hypertension. Am J Med Sci , 23-43.
- Beckman, C.H. (1987).** The nature of wilt diseases of plants. APS Press, 455–461. St Paul, Minnesota.
- Bergeaud, P. (1991).** Rapport immunotoxicité des métaux lourds, 102-14.
- Carrier, P et al., (2012).** Intoxication par ingestion de plombs de pêche. La Revue de médecine interne, 1- 440.
- Clesquel., Emmanuelle. (2009).** Sols pollués – La phytoremédiation un procédé prometteur, Gazette des communes, 1-5.
- Cramer, K., Goyer, R.A., Jagenburg, R., Wilson, M.H. (1974).** Renal ultrastructure, renal function, and parameters of lead toxicity in workers with different periods of lead exposure . Br J Ind Med, 113-127.
- Dalmas, P. (2000).** Mesure de conductivité sur une eau pure ou comment appliquer la norme USP24-NF19. Gazette du laboratoire, N° Avril 2000,1-25.
- Delval, C. (1984).** Réactions du flet vis-à-vis des pollutions par les métaux (Cu, Zn,Cd et Pb) sur le littoral de la mer du Nord . IFREMER , 172 p.
- Dijkstra, C.D., VEERMAN, A.J.P. (1990).** Spleen. normal anatomy, histology, ultrastructure, Rat- Hemopoietic system .Springer Verlag , 249–256.
- Djerabaa, Z., Arroul-Lammalia, A., Medjebera, O.H., Belguendouza, D et al., (2010).** Le monoxyde d'azote, bio-marqueur de l'uvéïte auto-immune expérimentale induite par l'antigène S Nitric oxide. Journal français d'ophtalmologie , 693-700.

Eustis, S.L., Boorman, G.A., Harada, T., Popp, J.A. (1990). Pathology of the Fisher rat. Reference and Atlas- Academic Press, Chap 7, 71-81.

Evans, G.O., Fagg, R. (1994). Réticulocyte count in canine and rat blood made by flow Cytométrie. Journal Comp Pathology, 499-502.

Folkes, L.K., Wardman, P. (2001). Oxidative activation of indole-3-acetic acids to cytotoxic species-a potential new role for plant auxins in cancer therapy. Biochem Pharmacol, 129-36.

Fournet. (2002). Flore illustrée des phanérogames de Guadeloupe et de Martinique. CIRAD, Montpellier - Gondwana Editions, 2538 p.

Friedman, Y. (2001). Effect of disease on clinical laboratory test. AACCC Press, 4^{ème} édition, 201 p.

Garnier, R et al., (2000). Toxicologie clinique. Flammarion Médecine-sciences, 365-371. Paris.

Garnier, R. (2005). Toxicité du plomb et de ses dérivés : Toxicity of lead and lead compounds. EMC-Toxicologie Pathologie, 67-88.

Gregus, Z., Klaassen, C.D. (1996). Mechanisms of toxicity - Casarett and Doull's toxicology, the basic sciences of poisons, fifth Edition. McGraw-Hill, 224 p. Montréal.

Guyton, A.C. (1995). Textbook of medical physiology 13rd edition., W.B.Saunders Company, 230 p. Philadelphia and London.

Hames, B.D., Hooper, N.M. (2001). Instant notes of Biochemistry. 2nd edition on Biosystem and Science, 73 p, UK

Handley, R.S., Akhavan-Tafti, H., Schaap, A.P. (1998). Chemiluminescent Detection in High Volume Ligand-Binder Assays. J Clin Ligand Assay, 2065-2066.

Hise, E.C., Fulkerson, W.I.N., Fulkerson, W., Goeller, H.E. (1973). Environmental impact of cadmium flow in cadmium the dissipated element. Chapter VI. Oak Ridge National Library, 604 p.

Holbrook., Eric, H., Donald, A. (2003). Anosmia, diagnosis and management : Current Opinion in Otolaryngology and Head and Neck Surgery, 54-60.

IARC. (1987). Lead and lead compounds-Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans Overall evaluations of carcinogenicity. Volume 28. 200 p , Paris.

IARC. (1993). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry. Volume 33. 190 p , Paris.

INSERM. (1999). Expertise collective 'INSERM' Plomb dans l'environnement. Editions 1999. Paris.

IPCS . (1995). Environmental health criteria 165- Inorganic lead 'WHO 1995'. 200 p. Geneva.

Journal Officiel de la République Algérienne Démocratique et Populaire. (JORADP) N°18,
Du 23 Mars 2011. Paramètre de qualité de l'eau de consommation humaine.

Kathryn, A., Armstrong, A., Bruce, T. (2003). Re-engineering Enzyme Catalysis Using Computer Modeling and Combinatorial Libraries Computer Science and Artificial Intelligence Laboratory (CSAIL).

Kimura, M., Otaki, N. (1972). Percutaneous absorption of cadmium in rabbit and hairless mouse. Ind Health, 7-10.

Knapp, J.S., CLARK , V.L. (1984). Anaerobic growth of *Neisseria gonorrhoeae* coupled to nitrite reduction. Infect Immun, 6043-6047.

Kobayashi, A., Koghuchi, Y., Kanzaki, H., Kajiyama, SL., Kawazu. (1994). A new type of antimicrobial phenolics produced by plant peroxidase and its possible role in the chemical defense systems against plant pathogens. Zeitschrift für Naturforschung 49, 411-414.

Kucuk, S. (1999). Effect of diel un ionized ammonia fluctuation on juvenile hybrid striped bass, channel catfish and tilapia. Mémoire de master , Mississippi State University, USA, 150 P.

Lacoue-Labarthe. (2007).Incorporation des métaux dans les œufs de la seiche commune *Sepia officinalis* et effets potentiels sur les fonctions digestives et immunitaires. PhD thesis, Université de la Rochelle, France. 200 P.

Léger, J.F. (2007). Noms vernaculaires des taxons de la BDTFX *Armoracia rusticana* P.Gaertn., B.Mey. & Scherb. eFlore : La flore électronique de Tela Botanica. BDTFX v.2.01.

Laroche, M. J., Rousselet, F. (1990). Les animaux de laboratoire. Éthique et bonnes pratiques. Éditions Masson, 393 p, France.

Lester, P. (1996). Methods in enzymology: Nitric oxide-Part A 'Source and detection of NO-NO synthase'. Academic Press, 555p . San Diego – London.

Luckey, T.D ., Venugopal, B. (1977). Physiological and chemical basis for metal toxicity: Tome 1. 38 p. Canada.

Lydyard, P.M., Whelan, A., Fanger, M.W. (1978). Office international de l'eau. Les micropolluants minéraux dans les eaux superficielles continentales : le Zinc et le Cadmium . Rapport N°4. Tec & Doc, Paris.

Maximilian, K., Andreas, S., Kai-Henning, V. (2002). Introduction à la pratique de la chromatographie ionique.120 p.

Martoja , R ., Martoja, M. (1967). Initiation aux techniques de l'histologie animale, Edition Masson, 347 p , USA.

Min-Lang, C et al. (2012). Effect of cadmium on peroxidase isoenzyme activity in roots of two *Oryza sativa* cultivars. Botanical Studies, 307–324.

Mitruka, B.M., Rawnsleyh, M. (1977). Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals. Masson pub , 35-43, USA.

Mojdehi, G., Gurtner, J. (1996). Childhood lead poisoning through kohl. Am J Public Health, 587–8.

Monnet-Tschudi, F., Zurich, M.G., Boschat, C., Corbaz, A., et Honegger, P. (2006). Involvement of environmental mercury and lead in the etiology of neurodegenerative diseases. Rev Environ Health, 105–117.

Moore, M.R., Meredith, P.A, Watson, W.S., Sumner, D.J., Taylor, M.K. et Goldberg A. (1980). The percutaneous absorption of lead²⁰³ in humans from cosmetic preparations containing lead acetate, as assessed by whole-body counting and other techniques. Food Cosmet Toxicol,390-9 .

Morin, Y., et al., (2003). Larousse médical. Edition Larousse.1219 p. France.

Norme algérienne NA6360- Méthode NA 749. (1992). IANOR . Norme de potabilité des eaux de consommation, Première édition. 1992-08-20.

Norme algérienne NA 6361-Méthode NA 6361. (1992). IANOR . Norme de potabilité des eaux de consommation, Première édition. 1992-08-20.

Norme algérienne NA 6361- Méthode NA 1655. (1992) . IANOR . Norme de potabilité des eaux de consommation, Première édition. 1992-08-20.

Norme algérienne NA 6361- Méthode NA 1652.(1992). IANOR .Norme de potabilité des eaux de consommation, Première édition. 1992-08-20.

Nortier, J.W., Sangster, B., Van Kestern, R.G. (1980). Acute lead poisoning with hemolysis and liver toxicity after ingestion of red lead. *Vet Hum Toxicol* , 145-8.

Nriagu, J.O. (1980). Production, Uses, and Properties of Cadmium Environment, Part 1. *Ecological Cycling* .John Wiley and Sonsp, 35–70.

Osman, K., Pawlas, K., Schutz, A., Gazdzik, M., Sokal, J.A. et Vahter, M. (1999). Lead exposure and hearing effects in children in Katowice. *Environ Res* , 1-8.

Palani, V., Senthikumar, R.K., and Govindawamy, S . (1999). Biochemical evaluation of antitumor effect of Muthu marunthu (a herbal formulation) on experimental fibrosarcoma in rats. *J Ethno pharmacol* , 257-65.

Park, J.W., Pikhova, B., Huang, P.L., Noguchi, C.T., Schechter, A.N. (2013). Effect of blood nitrite and nitrate levels on murine platelet function. *PLoS ONE*, 8(2),1-4.

Pavel, L. (2010). The impacts of organochlorines and other persistent pollutants on thyroid and metabolic health. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 497-518.

Pinta, M., Baudin, G., Bourdon, R. (1980). Spectrophotométrie d’Absorption Atomique :Tome 1- Problème générale. Edition Masson O.R.S.T.O.M , 259 p,USA.

Pradyt, P. (2004). Dean's Analytical Chemistry Handbook :Second edition. 1114 p.

Quantofix ® MACHEREY- NAGEL GmbH & Co. (2014). Notice d’utilisation-REF 91313.

Ramadan, A.A., Paleodimos, M., Fiona, J. (2011). Highly specific, sensitive and rapid enzyme immunoassays for the measurement of acetaminophen in serum. *Anal Bioanal Chem*, 2195-204.

- Rapport OMS Plomb. (2014).** Site officiel de l'Organisation Mondiale de la Santé. Bureau régional de l'OMS pour l'Europe UN.
- Roche Hoffmann, F. (2014).** Dosage of C-Reactive Protein. IOSRI Journal, 72-82.
- Rodier, J., Bernard, L., Nicole, M., Regis, B. (2009).** Technique et Ingénierie : 9ème édition. Dunod , 1600 p , France.
- Rose, C.S., Heywood, P.G., Costanzo, R.M. (1992).** Olfactory impairment after chronic occupational cadmium exposure. J Occup Med, 600-5.
- Satarug, S., Nishijo, M., Lasker, J.M., Edwards, R.J., Moore, M.R. (2006).** Kidney dysfunction and hypertension: role for cadmium, p450 and heme oxygenases. Tohoku J Exp Med, 179-202.
- Scipioni, R.L., Diters, R.W., Myers, W.R., Hart, S.M. (1997).** Clinical and clinicopathological assessment of serial phlebotomy in the Sprague-Dawley rat . Lab Anim Sci, 293-9.
- Schwartz, DA. (1987).** Acute inhalational injury. Occup Med, 265–271.
- Shazia, K., Muhammad, ZQ., Abida, I., Zahid, N., Amina, S et Muhammad, I. (2012).** Production and purification of horseradish peroxidase in Pakistan. International Journal of the Physical Sciences, 2706-2712.
- Shenker, B.J., Datar, S., Mansfield, K., et Shapiro, I.M. (1997).** Induction of apoptosis in human T-Cell by organomercuric compounds :a flow cytometric analysis. Toxicol Appl Pharmacol, 397- 406.
- Sigma-Aldrich . (2014).** Fiche de données de sécurité Version 4.4 / 2014, SIGMA-ALDRICH 3208 p, USA.
- Salomon, L. (2009).** Racines : Du raifort au navet du Pardailhan, Broché – 1. France.
- Skerman, V.B.D. (1967).** A guide to the identification of the genera of bacteria. The Williams & Wilkins Co, 181 p, Baltimore.
- Soldatkin, A.P., Elskaya, V.A., Ashulga, A., et al., (1993).** Glucose sensitive field effect transistor with additional Nafion membrane . reduction of influence of buffer capacity on the sensor response and extension of its dynamic range. Anal Chem Acta , 24-26.

Spriewald, B.M., Rascu, A., Schaller, K.H., Angerer, J., Kalden, J.R., Harrer, T., et al., (1999). Lead induced anaemia due to traditional Indian medicine: a case report. *Occup Environ Med*, 282-3.

Tupper, J., Stratford, M.R., Hill, S., Tozer, G.M., Dachs, G.U. (2010). In vivo characterization of horseradish peroxidase with indole-3-acetic acid and 5-bromoindole-3-acetic acid for gene therapy of cancer. *Cancer Gene Ther*, 657–662.

Tebourbi, O., Hallegue, D., Yacoubi, M.T., Sakly, M., Benrhouma, K. (2010). Subacute toxicity of p,p-DDT on rat thyroid. Hormonal and hispathological changes. *Environmental toxicology and Pharmacology*, 271-279.

Tieman, U. (2008). In vivo and invitro effects of the organochlorine pesticides DDT, TCPM, methoxychlor, and lindane on the femalereproductive tract of mammal . *Reprod.Toxicol*, 25(3), 316-326.

Tognolli, M., Penel, C., Simon, H.P. (2002). Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana* Gene. *PubMed PMID*, 129-38.

Touil-Boukoffa, C., Bauvois, B., Sancéau, J., Hamrioui, B., Wiezerbin, J. (1998). Production of nitric oxide (NO) in human hydatidosis. relationship between nitrite production and interferon-gamma levels. *Journal of Biochemistry* , 739 - 44.

Villanger, G.D., Lydersen, C., Kovacs, K.M., Lie, E., Skaare, JU., et Jenssen, B.M. (2011). Disruptive effects of organohalogen contaminants on thyroid function in white whales (*Delphinapterus leucas*) from Svalbard. *Science of the Total Environment*, 2511-2524.

Vincke, G et al., (2014). Atlas d'Histologie humaine et animale. Lésions élémentaires en pathologie rénale. *Probio Publications (FUNDP)*.

Vitch, N.C ., Smith, A.T. (2001). Horseradish peroxidase. *Adv Inorg Chem*, 107-162.

Walker, F. (2013). Rein et voies urinaires : Cours n° 17 Anatomopathologie.200p.

Wardaman, P. (2002). Indole-3-acetic acids and horseradish peroxidase: A new prodrug/enzyme combination for targeted cancer therapy. *Curr Pharm*, 1363-74.

Welinder, K.G., Justesen, A.F., Kjaersgard, I.V.H., Jespersen, H.M., Duroux, L. (2002). Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem*, 6063-81.

Wester, R.C., Maibach, H.I., Sedik, L., Melendres, J., Dizio, S., Wade, M. (1992). In vitro percutaneous absorption of cadmium from water and soil into human skin. *Fundam Appl Toxicol*, 1-5.

Wu, H.M., Lin-Tan, D.T., Wang, M.L., Huang, H.Y., Wang, H.S., Soong, Y.K et al., (2008). Cadmium level in seminal plasma. *Reprod Toxicol*, 481-484.

Ye, L., Hengjian, Z., Fangming, C.A.O. (2011). Analysis of phenolic compounds catalyzed by immobilized horseradish peroxidase in silica glass. *Journal of Sol-Gel Science Technology*, 156-63.

ANNEXE 01

Tableau I : Appareillages, réactifs, produits chimiques, verreries et consommables utilisés dans la partie expérimentale.

- **Appareillage**

				
SYMSEX KX21N Hematology Analyzer	Turbidimètre Biosystem	Balance analytique Sartorius	pH mètre Crison	Conductimètre C 860
				
Chromatographie ionique IC 881		Spectrométrie d'absorption Atomique SAA : Buck modèle 210VGP)		Lampes a cathode creuse Cd & Pb
				
VIDAS @ TSH3		ARCHITECT SYSTEM I 4000 SR@		
				
UV-Visible 1601 SHIMADZU		Microscope photonique Axio Scope avec camera		
				
Trousse de dissection	Bain marie Memmert	Cage utilisé pour l'élevage des rats		

ANNEXE 01

- Réactifs et produits chimiques

			
Souche bactérienne E.coli ATCC 25922	Quantofix® Nitrate Nitrite	Eukitt	May-Grünwald & Giemsa
<ul style="list-style-type: none"> - Colorants topographique (Hemalun de Mayer et éosine). - Colorants topographique Trichrome de Masson. - Formaldehyde solution ACS reagent, 37 wt .(.Sigma-Aldrich). - Ethanol- 97° (VWR). - Nitrate de Sodium (VWR). - Réactif de Griess. (VWR). - Xylene (VWR). AnalaR NORMAPUR® ACS, Reag. Ph. Eur. pour analyses. 			

- Verrerie et consommables

			
Erlenmeyer, Tubes à essai et Becher	Cassettes et Moules d'inclusion	Tubes EDTA et tubes secs	Lames et lamelles microscope

Tableau II : Composition de l'alimentation des animaux .

Protéines (%)	20
Matières grasses brutes (%)	4
Cendres brutes	6.5
Cellulose brute (%)	5.5
Calcium (%)	1.1
Phosphore (%)	0.8
Vitamine A (UI/Kg)	22000
Vitamine D3 (UI/Kg)	2200
Vitamine E (mg/Kg)	100
Sulfate de cuivre pentahydraté/cuivre (mg/Kg)	8

-Dosage de FT3

Kit de dosage: ARCHITECT SYSTEM Free T3, REF 7K63	
<u>MICROPARTICLES</u>	Microparticules recouvertes d'anticorps anti-T3 (mouton) dans du tompon MES contenant des stabilisants d'IgG de mouton Conservateur : Agent anti-microbien
<u>Conjugate</u>	Conjugué de T3 marqué à l'acridinium dans du tompon citrate contenant des stabilisants Nacl et Triton X-100. 0.33 ng/ml. Conservateur : Agent anti-microbien
Autres réactifs:	
<u>PRE-TRIGGER Solution ARCHITECT i</u>	Solution de préactivation: contenant 1.32% m/v d'eau oxygénée.
<u>TRIGGER Solution ARCHITECT i</u>	Solution d'activation: contenant 0.35 N d'hydroxyde de sodium.
<u>WASH BUFFER ARCHITECT i</u>	Tompon de lavage : Solution saline tomponnée au phosphate . Conservateurs : Agents anti-microbien

-Dosage de FT4

Kit de dosage: ARCHITECT SYSTEM Free T4, REF 7K65	
<u>MICROPARTICLES</u>	Microparticules recouvertes d'anticorps anti-T4 (mouton) dans du tompon Tris contenant des stabilisants d'IgG de mouton .0.08% de particules solides. Conservateur : Agent anti-microbien
<u>Conjugate</u>	Conjugué de T4 marqué à l'acridinium dans du tompon MES contenant des stabilisants Nacl et Triton X-100. 0.2 ng/ml. Conservateur : ProClin
Autres réactifs:	
<u>PRE-TRIGGER Solution ARCHITECT i</u>	Solution de préactivation: contenant 1.32% m/v d'eau oxygénée.
<u>TRIGGER Solution ARCHITECT i</u>	Solution d'activation: contenant 0.35 N d'hydroxyde de sodium.
<u>WASH BUFFER ARCHITECT i</u>	Tompon de lavage : Solution saline tomponnée au phosphate . Conservateurs : Agents anti-microbien

-Dosage de TSH

Coffret de dosage : VIDAS ® TSH3 , REF 30 441						
Cartouches	Chaque cartouche est composée de 10 puits dans lesquels les réactions sont effectuées.					
	Puits 01 : Puits échantillon	Puits 2-3-4 : Puits Vides	Puits 5 : <u>Conjugué :</u> Immunoglobulines monoclonales de souris anti – TSH Marqué à la phosphatase alcaline +azoture de soduim 0.9g/l (400µl)	Puits 6-7-8-9 : <u>Tompon de lavage :</u> tompon Tris pH 7.6 + Nacl +Tween 1%+azoture de soduim 0.9g/l (600µl)	Puits 10 : <u>Cuvette de lecture avec substrat</u> 4-Methyl-ombelliferyl phosphate + Diéthanolamine +Azoture de soduim 1g/l (300µl)	
	Cônes	Cones sensibilisés par des immunoglobulines monoclonales de souris anti-TSH				
	Contrôles TSH3	Contrôle C1 : Contrôle négatif (Eau distillée)		Contrôle C2 : Contrôle positif (Présence TSH humaine)		
	Diluant TSH3	Sérum de veau traité+ azoture de sodium 0.9g/l				

-Dosage de la CRP

BioSystem Protein C- Reactive M31321f-13	
Réactif A	Tompon de glycine 0.1 mol/l , azide sodium 0.95 g/l, p H 8.6
Réactif B	Suspension de particules de latex sensibilisées avec les anticorps anti – CRP humaine, azide sodium 0.95 g/l
Etalon de CRP	Sérum humain.la concentration en CRP est indiquée par le fournisseur BioSystem

Etapes de l'étude histologique



Déshydratation et éclaircissement
(photos originale)



Inclusion et mise en bloc (photos originale)



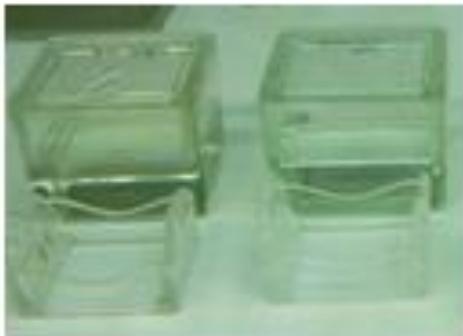
Confection des coupes (photos originale)



Collage des rubans sur les lames en verre



Séchage dans l'étuve à 37°C (photos originale)



Déparaffinage : Bains de xylène



100 ° 96 ° 70 ° 50 °

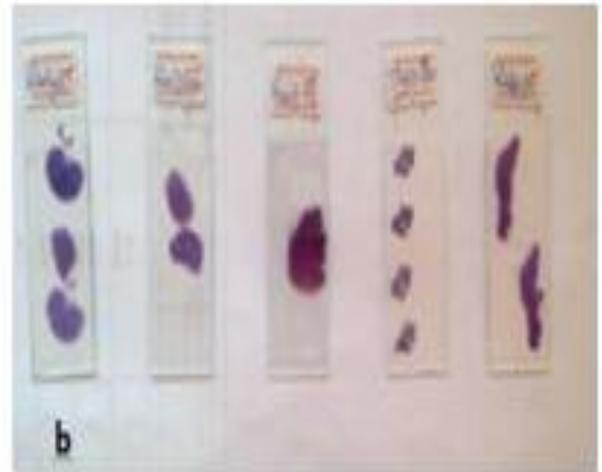
Réhydratation : Bains d'alcool éthylique (photos originale)



Bains de coloration des lames



**Montage des lames colorées avec
lamelle via l'EUKITT.
(Photos originale)**



- a. Lames des organes (Reins, Thyroïde, Foie, Rate) colorées avec HE.
(Photos originale).**
- b. Lames des organes (Reins, Thyroïde, Foie, Rate) colorées avec
Trichrome de Masson. (Photos originale).**

ANNEXE 01

Tableau III: Table pour la dilution de l'alcool (Table de Gay-Lussac) appelée aussi Table de mouillage de l'alcool.

Les chiffres en noir indiquent la quantité d'eau en ml à ajouter à 100ml d'alcool de concentration initiale x (en bleu) pour obtenir la concentration désirée.

		Concentration initiale													
		100	99	98	97	96	95	90	85	80	75	70	65	60	50
Concentration finale	95	6,5	5,15	3,83	2,53	1,25									
	90	13,25	11,83	10,43	9,07	7,73	6,41								
	85	20,54	19,05	17,58	16,15	14,73	13,33	6,56							
	80	28,59	27,01	25,47	23,95	22,45	20,95	13,79	6,83						
	75	37,58	35,9	34,28	32,67	31,08	29,52	21,89	14,48	7,2					
	70	47,75	45,98	44,25	42,54	40,85	39,18	31,05	23,14	15,35	7,64				
	65	59,37	57,49	55,63	53,81	52	50,22	41,53	33,03	24,66	16,37	8,15			
	60	72,82	70,80	68,8	65,85	64,92	63	53,65	44,48	35,44	26,47	17,58	8,76		
	55	88,6	86,42	84,28	82,16	80,06	77,99	67,87	57,9	48,07	38,32	28,63	19,02	9,47	
	50	107,44	105,08	102,75	100,44	98,15	95,89	84,71	73,90	63,04	52,43	41,73	31,25	20,47	
	45	130,26	127,67	125,11	122,57	120,06	117,57	105,34	93,30	81,38	69,54	57,78	46,09	34,46	11,41
	40	158,56	155,68	152,84	150,02	147,22	144,46	130,8	117,34	104,01	90,76	77,58	64,48	51,43	25,55
	35	194,63	191,39	188,19	185,01	181,85	178,71	163,28	148,01	132,88	117,82	102,84	87,93	73,08	43,59
	30	242,38	238,67	234,99	231,33	227,70	224,08	206,22	188,57	171,05	153,61	136,04	118,94	101,71	67,45
	25	308,9	304,52	300,18	295,86	291,56	287,28	266,12	245,15	224,3	203,61	182,83	162,21	141,65	100,73
	20	408,5	403,13	397,79	392,47	387,17	381,9	355,8	329,84	304,01	278,26	252,58	226,98	201,43	150,55
	15	574,75	567,43	560,53	553,55	546,59	539,66	505,27	471	436,85	402,81	368,83	334,91	301,07	233,64
10	907,09	896,73	886,4	876,1	865,15	855,15	804,5	753,65	702,89	652,21	601,6	551,06	500,50	399,85	

Tableau IV: Valeurs moyennes du pH et leurs significations avant et après traitement de l'eau d'alimentation des rats. Nombre d'échantillons analysés pour chaque lot (N=7)

		Lot 01 Cd 0.5 ppm		Lot 02 Cd 1 ppm		Lot 01 Pb 2.5 ppm		Lot 02 Pb 5 ppm	
		Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après
Valeurs de p H à 20°C	Moyenne ± Ecart type	4,06 ± 0,053	6,5 ± 0,08	3,76 ± 0,127	5,94 ± 0,13	3,24 ± 0,07	5,6 ± 0,081	2,84 ± 0,162	5,07 ± 0,009
	L'écart réduit (t) Tc : T calculé Tt : T tableau	ddl=12 Tc= 17,70 Tt=2,179		ddl=12 Tc=8,59 Tt=2,179		ddl=12 Tc=14,7 Tt=2,179		ddl=12 Tc= 8,39 Tt=2,179	
	% de risque (p)	p<0,01		p<0,01		p<0,01		p<0,01	
	La différence	Hautement significative		Hautement significative		Hautement significative		Hautement significative	

Tableau V: Valeurs moyennes de la conductivité et leurs significations avant et après traitement de l'eau d'alimentation des rats.

		Lot 01 Cd 0.5 ppm		Lot 02 Cd 1 ppm		Lot 01 Pb 2.5 ppm		Lot 02 Pb 5 ppm	
		Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après
Valeurs de la conductivité à 20°C (µS/cm)	Moyenne ± Ecart type	3003 ± 3,05	2913, 7± 38,3	3408 ± 5,26	3210,4 ± 8,40	3501,5 ± 4,58	3412,6 ± 13,9	4044,3 ± 5,30	3787,8 ± 49,77
	L'écart réduit (t) Tc : T calculé Tt : T tableau	ddl=12 Tc= 5,69 Tt=2,179		ddl=12 Tc= 48,81 Tt=2,179		ddl=12 Tc=14,89 Tt=2,179		ddl=12 Tc= 12,55 Tt=2,179	
	% de risque (p)	p<0,01		p<0,01		p<0,01		p<0,01	
	La différence	Hautement significative		Hautement significative		Hautement significative		Hautement significative	

Tableau VI : Valeurs moyennes des taux des nitrates et de nitrites et leurs significations avant et après traitement de l'eau d'alimentation des rats. Nombre d'échantillons analysés pour chaque lot (N=7).

		Lot 01 Cd 0.5 ppm		Lot 02 Cd 1 ppm		Lot 01 Pb 2.5 ppm		Lot 02 Pb 5 ppm	
		Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après
Taux des nitrates (NO ³⁻) en ppm (mg/l)	Moyenne ± Ecart type	10 - 25	10 - 25	10 -25	10 - 25	50- 100	50-100	100	100
	L'écart réduit (t) Tc :T calculé Tt :T tableau	ddl=12 Tc= 0 Tt=2,179		ddl=12 Tc= 0 Tt=2,179		ddl=12 Tc= 0 Tt=2,179		ddl=12 Tc= 0 Tt=2,179	
	% de risque (p)	p> 0.05		p> 0.05		p> 0.05		p> 0.05	
	La différence	Non significative		Non significative		Non significative		Non significative	
Taux des nitrites (NO ²⁻) en ppm (mg/l)		Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après
	Moyenne ± Ecart type	0	0	0	0	0	< 1	0	< 1
	L'écart réduit (t) Tc : T calculé Tt : T tableau	ddl=12 Tc= 0 Tt=2.179		ddl=12 Tc= 0 Tt=2.179		ddl=12 Tc= 0 Tt=2.179		ddl=12 Tc= 0 Tt=2.179	
	% de risque (p)	p> 0,05		p> 0,05		p> 0,05		p> 0,05	
	La différence	Non significative		Non significative		Non significative		Non significative	

ANNEXE 02

Tableau VII: Valeurs des concentrations et d'absorbance des solutions standards utilisées pour le dosage des traces de Cadmium contenues dans l'eau analysée.

	Standard 1 Cd	Standard 2 Cd	Standard 3 Cd	Standard 4 Cd	Standard 5 Cd	Solution Blanc
Abs	0,0098	0,0179	0,1659	0,6523	0,8611	0
[Cd] en ppm	0,005	0,01	0,1	0,9	1	0

Tableau VIII : Valeurs des traces de Cadmium présentes dans les échantillons des lots 01 Cd et 02 Cd analysés avant et après l'application du procédé biologique. (N=7).

		Lot 01 Cd 0.5 ppm		Lot 02 Cd 1 ppm		JORADP 2011
		Avant	Après	Avant	Après	
Concentrations de Cadmium en ppm ($\mu\text{g/l}$)	Moyenne \pm Ecart type	0,56 \pm 0,023	IND	1,07 \pm 0,04	IND	3
	L'écart réduit (t) Tc : T calculé Tt : T tableau	ddl=12 Tc= 61,344 Tt=2,179		ddl=12 Tc= 68,44 Tt=2,179		
	% de risque (p)	p<0,01		p<0,01		
	La différence	Hautement significative		Hautement significative		

Tableau IX: Valeurs des concentrations et d'absorbance des solutions standards utilisées pour le dosage de plomb dans les différents échantillons analysés.

	Standard 1 Pb	Standard 2 Pb	Standard 3 Pb	Standard 4 Pb	Standard 5 Pb	Solution Blanc
Abs	0,0013	0,0105	0,0215	0,0425	0,0731	0
[Pb] en ppm	0,1	1	5	10	15	0

Tableau X : Valeurs moyennes des traces de plomb présentes dans les échantillons des lots 01 Pb et 02 Pb avant et après l'application du procédé biologique. (N=7).

		Lot 01 Pb 2.5 ppm		Lot 02 Pb 5 ppm		JORADP 2011
		Avant	Après	Avant	Après	
Concentrations de plomb en ppm ($10 \mu\text{g/l}$)	Moyenne \pm Ecart type	2,514 \pm 0,008	IND	5,09 \pm 0,06	IND	10
	L'écart réduit (t) Tc : T calculé Tt : T tableau	ddl=12 Tc=782,75927 Tt=2,179		ddl=12 Tc= 196,0163 Tt=2,179		
	% de risque (p)	p<0,01		p<0,01		
	La différence	Hautement significative		Hautement significative		

ANNEXE 02

Tableau XI : Valeurs moyennes des poids corporels (g) chez les rats témoins et traités avec les significations statistiques avant et après l'expérimentation. Nombre d'échantillons analysés pour chaque lot (N=8).

LOTS DES RATS	Lot Temoins		Lot 01 Cd 0.5 ppm		Lot 02 Cd 1 ppm		Lot 01 Pb 2.5 ppm		Lot 02 Pb 5 ppm	
	Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après
Moyenne	133,2	188,84	127,75	185	128,91	181,25	130,83	183,13	126,2	174,88
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
Ecart type	5,15	9,35	5,39	7,35	7,02	9,85	12,92	13,97	7,351	5,69
L'écart réduit (t)	ddl= 14		ddl= 14		ddl= 14		ddl= 14		ddl= 14	
Tc : T calculé	Tc = 13,79		Tc = 16,62		Tc = 11,443		Tc = 7,269		Tc = 13,851	
Tt : T tableau	Tt =2,145		Tt =2,145		Tt =2,145		Tt =2,145		Tt =2,145	
% de risque (p)	p<0,01		p<0,01		p<0,01		p<0,01		p<0,01	
La différence	Hautement significative		Hautement significative		Hautement Significative		Hautement significative		Hautement significative	

Tableau XIII: Valeurs moyennes des poids absolus (g) et relatifs (g%) de la rate et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités. Nombre d'échantillons analysés pour chaque lot (N=8).

		Lot Temoins	Lot 01 Cd 0.5 ppm	Lot Temoins	Lot 02 Cd 1 ppm	Lot Temoins	Lot 01 Pb 2.5 ppm	Lot Temoins	Lot 02 Pb 5 ppm
Poids absolu (g)	Moyenne ± Ecart type	0,781 ± 0,094	0,821 ± 0,034	0,781 ± 0,094	0,776 ± 0,089	0,781 ± 0,094	0,821 ± 0,0562	0,781 ± 0,094	0,84 ± 0,029
	L'écart réduit (t) Tc : T calculé Tt : T tableau	ddl= 14 Tc = 1,055 Tt =2.145		ddl= 14 Tc = 1,139 Tt =2.145		ddl= 14 Tc = 1,007 Tt =2.145		ddl= 14 Tc = 2,453 Tt =2.145	
	% de risque (p)	p> 0,05		p> 0,05		p> 0,05		p> 0,05	
	La différence	Non significative		Non significative		Non significative		Non significative	
Poids relatif (g/100g d'anim al)	Moyenne ± Ecart type	0,415 ± 0,061	0,445 ± 0,032	0,415 ± 0,061	0,43 ± 0,062	0,415 ± 0,061	0,451 ± 0,046	0,415 ± 0,061	0,48 ± 0,02
	L'écart réduit (t) Tc : T calculé Tt : T tableau	ddl= 14 Tc = 1,34 Tt =2,145		ddl= 14 Tc = 1,245 Tt =2,145		ddl= 14 Tc = 1,86 Tt =2,145		ddl= 14 Tc = 1,152 Tt =2,145	
	% de risque (p)	p> 0,05		p> 0,05		p> 0,05		p> 0,05	
	La différence	Non significative		Non significative		Non significative		Non significative	

ANNEXE 02
Tableau XV: Valeurs moyennes des différents paramètres hématologiques et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités.

LOTS Paramètres Hématologiques	Lot Témoins (N=8)	Lot 01 Cd 0.5 ppm (N=7)	Lot Témoins (N=8)	Lot 02 Cd 1 ppm (N=6)	Lot Témoins (N=8)	Lot 01 Pb 2.5 ppm (N=6)	Lot Témoins (N=8)	Lot 02 Pb 5 ppm (N=6)
WBC ($10^3 / \mu\text{l}$)								
Moyenne \pm Ecart type	6,1 \pm 1,265	5 \pm 0,283	6,1 \pm 1,265	5 \pm 0,335	6,1 \pm 1,26	8,883 \pm 0,42	6,1 \pm 1,26	9,6 \pm 1,34
L'Ecart réduit (t) Tc : T calculé Tt : T tableau	ddl=13 Tc =2,097 Tt =2,16		ddl=12 Tc = 1,62 Tt =2,179		ddl=12 Tc = 3,846 Tt =2,179		ddl=12 Tc = 4,631 Tt =2,179	
% de risque (p)	p> 0,05		p> 0,05		p<0,01		p<0,01	
La différence	Non Significative		Non significative		Hautement significative		Hautement significative	
RBC ($10^6 / \mu\text{l}$)								
Moyenne \pm Ecart type	7,335 \pm 0,572	6,40 \pm 1,266	7,335 \pm 0,57	5,632 \pm 1,24	7,335 \pm 0,57	6,412 \pm 0,43	7,33 \pm 0,6	6,91 \pm 1,3
L'Ecart réduit (t) Tc : T calculé Tt : T tableau	ddl=13 Tc =1,735 Tt =2.16		ddl=12 Tc = 3,217 Tt =2.179		ddl=12 Tc = 1,7588 Tt =2.179		ddl=12 Tc =0,775 Tt =2.179	
% de risque (p)	p> 0,05		0,02<p<0,05		p> 0,05		p> 0,05	
La différence	Non significative		Significative		Non significative		Non significative	

ANNEXE 02

HGB (g/dl)								
Moyenne ± Ecart type	12,6±0,78	11,1±1,77	12,6±0,78	11,8±0,89	12,6±0,78	11,53±0,94	12,6±0,8	11,8±1,2
L'Ecart réduit (t) Tc : T calculé Tt : T tableau	ddl=13 Tc =1,94 Tt =2.16		ddl=12 Tc = 2,114 Tt =2.179		ddl=12 Tc = 1,254 Tt =2.179		ddl=12 Tc = 1,266 Tt =2.179	
% de risque (p)	p> 0,05		p> 0,05		p> 0,05		p> 0,05	
La différence	Non significative		Non significative		Non significative		Non significative	
HCT (%)								
Moyenne ± Ecart type	38,9±1,39	35,5±1,7	38,92±1,39	34,2±1,8	38,92±1,39	35,5±3,161	38,9±1,39	37,28±3,2
L'Ecart réduit (t) Tc : T calculé Tt : T tableau	ddl=13 Tc =2,95 Tt =2.16		ddl=12 Tc = 2,223 Tt =2.179		ddl=12 Tc = 2,157 Tt =2.179		ddl=12 Tc = 2,175 Tt =2.179	
% de risque (p)	0,02<p<0,05		0,02<p<0,05		p> 0,05		p> 0,05	
La différence	Significative		Significative		Non significative		Non significative	
PLT (10³ /µl)								
Moyenne ± Ecart type	814,4± 150,8	734,1± 152,2	814,4± 150,8	725,8± 61,02	814,4± 150,8	560,33± 63,13	814,4± 150,78	540,83± 29,150
L'Ecart réduit (t) Tc : T calculé Tt : T tableau	ddl=13 Tc =3,53 Tt =2,16		ddl=12 Tc = 4,12 Tt =2,179		ddl=12 Tc = 2,599 Tt =2,179		ddl=12 Tc = 4,058 Tt =2,179	
% de risque (p)	0,01<p<0,02		0,02<p<0,05		p<0,01		p<0,01	
La différence	Très significative		Significative		Hautement significative		Hautement significative	

ANNEXE 02

Equilibre leucocytaire % (Nombre d'éléments /100 Cellules)								
LYM%								
Moyenne ± Ecart type	89±7,709	87,714±8,38	89±7,709	85,5±3,45	89±7,709	88±4,94	89±7,709	88,5±3,21
L'Ecart réduit (t)	ddl=13		ddl=12		ddl=12		ddl=12	
Tc : T calculé	Tc =1,0812		Tc =1,003		Tc = 0,069		Tc = 0,138	
Tt : T tableau	Tt =2,16		Tt =2,179		Tt =2,179		Tt =2,179	
% de risque (p)	p> 0,05		p> 0,05		p> 0,05		p> 0,05	
La différence	Non significative		Non significative		Non significative		Non significative	
MXD%								
Moyenne ± Ecart type	2±1,603	3,286±1,8	2±1,603	1,5±0,836	2±1,60	1,667±1,03	2±1,603	1,667±0,82
L'Ecart réduit (t)	ddl=13		ddl=12		ddl=12		ddl=12	
Tc : T calculé	Tc =0,59		Tc = 0,217		Tc = 0,122		Tc = 0,431	
Tt : T tableau	Tt =2,16		Tt =2,179		Tt =2,179		Tt =2,179	
% de risque (p)	p> 0,05		p> 0,05		p> 0,05		p> 0,05	
La différence	Non significative		Non significative		Non significative		Non significative	
NEUT%								
Moyenne ± Ecart type	5,875±3,270	6,857±2,91	5,875±3,27	4,166±1,2	5,875±3,27	5±2,83	5,875±3,3	5±1,265
L'Ecart réduit (t)	ddl=13		ddl=12		ddl=12		ddl=12	
Tc : T calculé	Tc =1,953		Tc = 1,05		Tc = 1,013		Tc = 1,575	
Tt : T tableau	Tt =2,16		Tt =2,179		Tt =2,179		Tt =2,179	
% de risque (p)	p> 0,05		p> 0,05		p> 0,05		p> 0,05	
La différence	Non significative		Non significative		Non significative		Non significative	

ANNEXE 02

Tableau XVI: Valeurs moyennes des taux de l'hormone triiodothyronine libre (FT3) en pmol/l et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités.

		Lot Temoins (N=8)	Lot 01 Cd 0.5 ppm (N=5)	Lot Temoins (N=8)	Lot 02 Cd 1 ppm (N=6)	Lot Temoins (N=8)	Lot 01 Pb 2.5 ppm (N=5)	Lot Temoins (N=8)	Lot 02 Pb 5 ppm (N=6)
Triiodothyronine libre (FT3) en pmol/l	Moyenne ± Ecart type	5,262 ± 0,358	5,225 ± 0,435	5,262 ± 0,358	4,98 ± 0,26	5,262 ± 0,358	5 ± 0,316	5,262 ± 0,358	5,15 ± 0,152
	L'écart réduit (t) Tc : T calculé Tt : T tableau	ddl= 11 Tc =0,14 Tt =2,201		ddl=12 Tc =0,367 Tt =2,179		ddl=11 Tc =0,433 Tt =2,201		ddl=12 Tc = 0,217 Tt =2,179	
	% de risque (p)	p> 0,05		p> 0,05		p> 0,05		p> 0,05	
	La différence	Non significative		Non significative		Non significative		Non significative	

Tableau XVII: Valeurs moyennes des taux de l'hormone thyroxine libre (FT4) en pmol/l et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités.

		Lot Temoins (N=6)	Lot 01 Cd 0.5 ppm (N=6)	Lot Temoins (N=6)	Lot 02 Cd 1 ppm (N=5)	Lot Temoins (N=6)	Lot 01 Pb 2.5 ppm (N=6)	Lot Temoins (N=6)	Lot 02 Pb 5 ppm (N=7)
Thyroxine libre (FT4) en pmol/l	Moyenne ± Ecart type	26,664 ± 1,61	25,1 ± 2,515	26,664 ± 1,61	25,122 ± 0,72	26,664 ± 1,61	26,09 ± 0,615	26,664 ± 1,61	27,62 ± 1,43
	L'écart réduit (t) Tc :T calculé Tt : T tableau	ddl= 10 Tc = 1,171 Tt =2,228		ddl= 9 Tc = 1,793 Tt =2,262		ddl= 10 Tc = 0,745 Tt =2,228		ddl= 11 Tc = 1,043 Tt =2,201	
	% de risque (p)	p> 0,05		p> 0,05		p> 0,05		p> 0,05	
	La différence	Non significative		Non significative		Non significative		Non significative	

ANNEXE 02

Tableau XVIII: Valeurs moyennes des taux de l'hormone thyroïdienne (TSH) en μ UI/ml et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités.

		Lot Temoins (N=7)	Lot 01 Cd 0.5 ppm (N=6)	Lot Temoins (N=7)	Lot 02 Cd 1 ppm (N=6)	Lot Temoins (N=7)	Lot 01 Pb 2.5 ppm (N=6)	Lot Temoins (N=7)	Lot 02 Pb 5 ppm (N=7)
Thyriostimulante (TSH) en μUI/ml	Moyenne	inf 0,005	inf 0,005	inf 0,005	inf 0,005	inf 0,005	inf 0,005	inf 0,005	inf 0,005
	\pm Ecart type	\pm 0.000	\pm 0.000	\pm 0.000	\pm 0.000	\pm 0.000	\pm 0.000	\pm 0.000	\pm 0.000
	L'écart réduit (t)	ddl=11		ddl=11		ddl=11		ddl=12	
	Tc : T calculé	Tc= 0		Tc= 0		Tc= 0		Tc= 0	
	Tt : T tableau	Tt=2,179		Tt=2,179		Tt=2,179		Tt=2,179	
% de risque (p)	p> 0,05		p> 0,05		p> 0,05		p> 0,05		
La différence	Non significative		Non significative		Non significative		Non significative		

Tableau XIX: Valeurs moyennes des taux de la protéine C- réactive (CRP) en mg/l et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités.

		Lot Temoins (N=8)	Lot 01 Cd 0.5 ppm (N=8)	Lot Temoins (N=8)	Lot 02 Cd 1 ppm (N=6)	Lot Temoins (N=8)	Lot 01 Pb 2.5 ppm (N=6)	Lot Temoins (N=8)	Lot 02 Pb 5 ppm (N=6)
Protéine C- Réactive (CRP) en mg/l	Moyenne	0,228	0,228	0,228	0,212	0,228	0,23	0,228	0,235
	\pm Ecart type	\pm 0,058	\pm 0,046	\pm 0,058	\pm 0,033	\pm 0,058	\pm 0,05	\pm 0,058	\pm 0,048
	L'écart réduit (t)	ddl= 14		ddl= 12		ddl= 12		ddl= 12	
	Tc : T calculé	Tc =0,0312		Tc = 0,699		Tc = 0,052		Tc = 0,222	
	Tt : T tableau	Tt =2,145		Tt =2,179		Tt =2,179		Tt =2,179	
% de risque (p)	p> 0,05		p> 0,05		p> 0,05		p> 0,05		
La différence	Non significative		Non significative		Non significative		Non significative		

ANNEXE 02

Tableau XX : Valeurs des concentrations et d'absorbance des solutions standards utilisées pour le dosage des nitrites sériques des rats. (Spéctrophotomètre SHIMADZU UV- 1601).

	Solution Standard 01	Solution Standard 02	Solution Standard 03	Solution Standard 04	Solution Standard 05	Solution Blanc
Abs	0,94	0,56	0,3	0,16	0,05	0
[Nitrites] en μM	100	50	25	10	1	0

Tableau XXI: Teneurs moyennes en nitrites totaux plasmatiques (métabolites des NOs) en μM et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités.(Spéctrophotometre SHIMADZU UV- 1601).

		Lot Temoins (N=7)	Lot 01 Cd 0.5 ppm (N=7)	Lot Temoins (N=7)	Lot 02 Cd 1 ppm (N=7)	Lot Temoins (N=7)	Lot 01 Pb 2.5 ppm (N=6)	Lot Temoins (N=7)	Lot 02 Pb 5 ppm (N=7)
Taux de nitrites totaux [NOs] en μM	Moyenne	3,96	4,31	3,96	4,9	3,96	8,53	3,96	10,9
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	Ecart type	0,22	0,134	0,22	0,26	0,22	0,308	0,22	0,507
	L'écart réduit (t) Tc :T calculé Tt : T tableau	ddl= 12 Tc= 3,364 Tt= 2,179		ddl= 12 Tc= 3,680 Tt = 2,179		ddl= 11 Tc= 28,525 Tt= 2,201		ddl= 12 Tc= 30,734 Tt= 2,179	
	% de risque (p)	p>0,05		p>0,05		p<0,01		p<0,01	
La différence	Non significative		Non significative		Hautement significative		Hautement significative		

2. Calcul statistique**2.1 La moyenne**

Soit $X_1, X_2, X_3, X_4, \dots, X_n$, une suite fini de nombre.

La moyenne arithmétique (m) est le rapport :

$$m = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + X_4 + \dots + X_n}{n} = \frac{\sum X_i}{n}$$

m : La moyenne arithmétique.

N : L'effectif.

X : Caractère quantitatif.

2.2 La variance

La variance (v) est une mesure de la dispersion de X autour de m.

La valeur arithmétique de la variance est donnée par la formule :

$$v = \frac{\sum (X_i - m)^2}{n}$$

v : La variance.

m : La moyenne arithmétique

X_i : Le caractère quantitatif

N : L'effectif.

2.3 L'écart type

L'écart type (σ) de X est la racine carrée de la variance.

$$\sigma = \sqrt{v}$$

σ : L'écart type .

v : La variance.

2.4 Test d'homogénéité de deux échantillons

- Loi de Student (n < 30)

- Hypothèse nulle (H_0) : Les deux échantillons sont semblables : il y'a pas de différence entre les deux échantillons.

- Hypothèse alternative (H_a) : Les deux échantillons sont pas semblables : il y'a une différence entre les deux échantillons.

Pour accepter ou rejeter l'hypothèse nulle (H_0), il faut calculer :

- La variance commune estimée (δ)

$$\delta = \sqrt{\frac{(N_1\sigma^2_1 + N_2\sigma^2_2)}{N_1 + N_2 - 2}}$$

- L'écart réduit (t)

$$t = \frac{|m_1 - m_2|}{\delta \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}}$$

m_1 : La moyenne arithmétique de l'échantillon 1.

m_2 : La moyenne arithmétique de l'échantillon 2.

δ : La variance commune estimée.

N_1 : Nombre d'échantillon 1.

N_2 : Nombre d'échantillon 2.

- Degré de liberté ddl :

ddl = $(N_1 + N_2 - 2)$.

On compare ce t calculé (t_c) avec la valeur de t table (t_t) tiré de la table de Student :

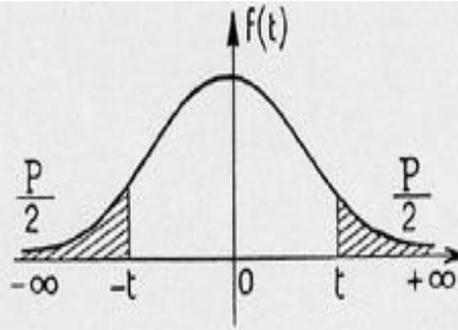
- Si $t_c < t_t$: L'hypothèse nulle est retenue ; il y'a pas de différence entre les échantillons.
- Si $t_c > t_t$: L'hypothèse nulle est rejetée ; il y'a une différence entre les échantillons.

- p value :

On calcul à la fin le p value pour connaître le degré de signification de la différence entre les deux échantillons. Les différences sont jugées :

- Non significative quand $p > 0,05$.
- Significative quand $0,02 < p < 0,05$.
- Très significative quand $0,01 < p < 0,02$.
- Hautement significatives quand $p < 0,01$.

Tableau XXII: Table de Student.



$\frac{P}{v}$	0,90	0,80	0,70	0,60	0,50	0,40	0,30	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	0,001
1	0,158	0,325	0,510	0,727	1,000	1,376	1,963	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657	636,619
2	0,142	0,289	0,445	0,617	0,816	1,061	1,386	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	31,598
3	0,137	0,277	0,424	0,584	0,765	0,978	1,250	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	12,929
4	0,134	0,271	0,414	0,569	0,741	0,941	1,190	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	8,611
5	0,132	0,267	0,408	0,559	0,727	0,920	1,156	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869
6	0,131	0,265	0,404	0,553	0,718	0,906	1,134	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959
7	0,130	0,263	0,402	0,549	0,711	0,896	1,119	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	5,408
8	0,130	0,262	0,399	0,546	0,706	0,889	1,108	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	5,041
9	0,129	0,261	0,398	0,543	0,703	0,883	1,100	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,781
10	0,129	0,260	0,397	0,542	0,700	0,879	1,093	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587
11	0,129	0,260	0,396	0,540	0,697	0,876	1,088	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,437
12	0,128	0,259	0,395	0,539	0,695	0,873	1,083	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318
13	0,128	0,259	0,394	0,538	0,694	0,870	1,079	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	4,221
14	0,128	0,258	0,393	0,537	0,692	0,868	1,076	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,140
15	0,128	0,258	0,393	0,536	0,691	0,866	1,074	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073
16	0,128	0,258	0,392	0,535	0,690	0,865	1,071	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	4,015
17	0,128	0,257	0,392	0,534	0,689	0,863	1,069	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,965
18	0,127	0,257	0,392	0,534	0,688	0,862	1,067	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922
19	0,127	0,257	0,391	0,533	0,688	0,861	1,066	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,883
20	0,127	0,257	0,391	0,533	0,687	0,860	1,064	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,850
21	0,127	0,257	0,391	0,532	0,686	0,859	1,063	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,819
22	0,127	0,256	0,390	0,532	0,686	0,858	1,061	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,792
23	0,127	0,256	0,390	0,532	0,685	0,858	1,060	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,767
24	0,127	0,256	0,390	0,531	0,685	0,857	1,059	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745
25	0,127	0,256	0,390	0,531	0,684	0,856	1,058	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,725
26	0,127	0,256	0,390	0,531	0,684	0,856	1,058	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,707
27	0,127	0,256	0,389	0,531	0,684	0,855	1,057	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,690
28	0,127	0,256	0,389	0,530	0,683	0,855	1,056	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,674
29	0,127	0,256	0,389	0,530	0,683	0,854	1,055	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,659
30	0,127	0,256	0,389	0,530	0,683	0,854	1,055	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,646
40	0,126	0,255	0,388	0,529	0,681	0,851	1,050	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,551
80	0,126	0,254	0,387	0,527	0,679	0,848	1,046	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	3,460
120	0,126	0,254	0,386	0,526	0,677	0,845	1,041	1,289	1,658	1,980	2,358	2,617	3,373
∞	0,126	0,253	0,385	0,524	0,674	0,842	1,036	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,291

SOMMAIRE

INTRODUCTION	01
CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	
I. 1. Généralités sur les métaux lourds	03
I.1.1. Plomb	03
I.1.2. Cadmium	07
I.2. Généralités sur la Peroxydase de raifort	10
I.2.1. Le Raifort (<i>Armoracia rusticana</i>)	10
I.2.2. La Peroxydase de raifort	11
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	
II.1. Matériel	13
II. 1.1 Matériel biologique	13
II.1.2 Matériel non biologique	14
II.2. Méthodes	14
II.2.1. Expérimentation	14
II.2.2. Préparation de l'eau d'alimentation des animaux	15
II.2.3. Dosage de quelques paramètres de contrôle de l'eau d'alimentation des rats	16
II.2.4. Sacrifice des animaux	23
II.2.5. Prélèvement des échantillons	23
II.2.6. Dosage des paramètres hématologiques	24
II.2.7. Dosage des hormones thyroïdienne et de la thyrostimuline	26
II.2.8. Dosage de la Protéine C- Réactive (CRP)	28
II.2.9. Dosage des métabolites de l'oxyde nitrique par la méthode de Griess modifiée	29
II.2.10. Etude histologiques	31
II.2.11. Analyse statistique	34

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. RESULTATS	35
III.1.1. Dosage de quelques paramètres de contrôle de l'eau d'alimentation des rats	35
III.1.2. Evolution des poids corporel et les poids des organes	41
III.1.3. Dosage des paramètres hématologiques	44
III.1.4. Dosage des hormones thyroïdienne et de la thyroïdostimuline	51
III.1.5. Dosage sérique de la Protéine C- Réactive (CRP)	53
III.1.6. Dosage et des métabolites d'oxyde nitrique (NOs)	53
III.1.7. Etudes histologiques	54
III.2. DISCUSSION	76
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	80
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	

GLOSSAIRE

Saturnisme : Ensemble des manifestations dues à une intoxication par le plomb ou par les sels de plomb (Morin et *al.*, 2003).

Bioremediation : Elle consiste en la décontamination de milieux pollués au moyen de techniques issues de la dégradation chimique ou d'autres activités d'organismes vivants (Clesquel ,2009).

Plombémie : Elle est la mesure du taux de plomb présent dans le sang, chez l'homme (Carrier et *al.*, 2012).

Anosmie : C'est un trouble de l'odorat qui se traduit par une perte ou une diminution forte de la sensibilité aux odeurs et est fréquemment causé par l'altération du nerf olfactif (Holbrook et *al.*, 2003).

Biosenser : C'est un outil analytique composé d'un élément biologique appelé biorécepteur lié à un transducteur. Le biorécepteur reconnaît spécifiquement une molécule du milieu et l'information biochimique qui en résulte est convertie par le transducteur en un signal analytiquement utile (Soldatkin et *al.*, 1993).

Hyperplasie : Augmentation bénigne du volume d'un tissu par multiplication des cellules qui le constituent (Morin et *al.*, 2003).