

UNIVERSITE BLIDA 1
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département d'agronomie

MEMOIRE DE MAGISTER

En Sciences Agronomiques

Spécialité : Nutrition et transformation des aliments

EFFETS DE L'INCORPORATION D'UN PESTICIDE SEUL OU
COMBINE A` LA SPIRULINE DANS L'ALIMENTATION ANIMALE SUR
LA PHYSIOLOGIE DU RAT DE LABORATOIRE (*Rattus norvegicus*)

Ahmed Chiheb BOUZAR

Devant le jury composé de:

A. BENRIMA	Professeur	Université Blida 1	Présidente
A. DOUMANDJI	Maître de conférences (A)	Université Blida 1	Promotrice
L. BENHADJA	Maître de conférences (A)	Université Blida 1	Co promotrice
A. HADJZIANE	Maître de conférences (A)	Université Blida 1	Examinatrice
A. BITAM	Maître de conférences (A)	ENSA	Examineur

Blida, Décembre 2013

RESUME

L'utilisation des pesticides s'est largement vulgarisée depuis une soixantaine d'années et ce dans le but d'optimiser le rendement agricole. Cependant, les pesticides sont soupçonnés de présenter un risque pour la santé de l'homme et pour son environnement dans sa totalité : Ne pouvant plus contourner leur utilisation, des études scientifiques se sont orienté à la recherche de molécules ayant comme effet de purifier le corps et de faciliter l'élimination des toxines dont nous sommes exposés en permanence.

La présente étude met en évidence les effets soupçonnés d'un insecticide (**lambda-cyhalothrine**, qui appartient à la famille des **pyréthrinoides + primicarbe**, qui appartient à la famille chimique des **carbamates**) sur la santé des rats (*Rattus norvegicus*) suite à son introduction dans leur ration alimentaire d'une part, et les effets antitoxiques que pourrait avoir la spiruline (*Athrospira platensis*) sur cet insecticide.

Introduit à 0,1 mL/750 mL d'eau l'insecticide provoque la baisse de consommation des rats en aliment d'une part et d'autre part, une dose de spiruline à 1% à concentration identique diminuerait les effets du pesticide.

Entre 0,4 et 1 mL/ 750 mL d'eau, l'insecticide a des effets négatifs sur la fécondité des rates(diminution du taux de fécondité jusqu'80 %), le poids des ratons à la mise bas (une baisse de la moyenne des poids des portés de 1,7g), la longévité et les malformations congénitales (augmentation du taux de tératogenèse jusqu'66 %), dès l'introduction de la spiruline à 1% , ces différents troubles diminuent considérablement.

Les rates ayant ingérées une dose de pesticide de 2,5 mL/ 750 mL d'eau et dont leurs alimentation était exempte de spiruline présentaient des lésions du tube digestif des kystisations, des dysplasies et des ulcérations .La létalité des rates à été signalée.

Mots clés: Spiruline, insecticide, longévité, fécondité, malformation congénitale.

Abstract

The use of pesticide has been widely popularized since the sixties and that in order to optimize crop yield. However, pesticides are suspected of being a risk to human health and the environment as a whole: No longer able to circumvent their use, scientific studies has been directed to the search for molecules that have the effect of purifying the body and facilitate the elimination of toxins we are constantly exposed.

This current study high lights the suspected effects of insecticide on the health of rats (*Rattus norvegicus*) by its introduction into their diet, on one hand, and anti toxic effects that may spirulina (*Athrospira platensis*) have on this insecticide on the other hand.

Introduced to 0.1 mL/750 mL water, the insecticide causes reduction of feed consumption of rats, in the other side, a dose of spirulina 1% at identical concentration would decrease the effects of the pesticide.

Between 0.4 and 1 mL / 750 mL of water, the insecticide has negative effects on the fertilization of rates (rate of decrease is 80 %), on the malformations (rate of increase is 66 %) and on the weight of pups at birth (rate of decrease is 1,7 g). Since the introduction of Spirulina 1%, the weight of pups at birth, the longevity and the congenital malformations decrease considerably.

Rats that ingested a dose of pesticide 2.5 mL / 750 mL of water and free food spirulina had shown lesions of the gastrointestinal tract, cyst formations, dysplasia and ulcerations. Lethality in rats was also registered.

Key words: *Spirulina*, insecticide, longevity, fertility, congenital malformation.

ملخص

قد شاع استخدام المبيدات الحشرية على نطاق واسع منذ سنوات الستينات من أجل تحسين الأداء الزراعي. ومع ذلك، فإنه يشتبه أن تشكل خطراً على صحة الإنسان والبيئة ككل.

ولم نعد قادرين على الإستغناء عنها و عدم استخدامها، والدراسات العلمية تسعى لتوجيه عملية البحث عن المواد التي تحتوي على مفعول تعقيم و حماية الجسم وتسهيل عملية القضاء على السموم التي نتعرض لها باستمرار .

تلقي هذه الدراسة الضوء على الآثار المحتملة لمبيد حشري على صحة الفئران (*Rattus norvegicus*) و ذلك بعد إدراجه ضمن نظامهم الغذائي من ناحية، والآثار الترياقية (مضادة للسموم) التي تحتوي عليها سبيروولينا للقضاء على سموم هذه المبيدات من ناحية أخرى.

بإضافة 0.1 مل/750 مل من الماء يتسبب المبيد الحشري في انخفاض استهلاك الفئران للغذاء و من جهة الأخرى جرعة مقدارها 1% من سبيروولينا تركيز مماثل تحد من آثار سموم المبيد. بين 0.4 و 1 مل / 750 مل من الماء المبيد يحتوي على آثار سلبية على عملية الإخصاب لدى الفئران (نقص قد يصل إلى 80%)، انخفاض وزن الجراء (نقص متوسط الوزن قد يصل إلى 1,7 غ) و حدوث تشوهات خلقية (زيادة قد تصل إلى 66%) بالإضافة إلى إجهاض و وفيات، و بعد إضافة نسبة 1% من سبيروولينا تضاءلت هذه الاضطرابات إلى حد كبير . الفئران الذين تناولوا جرعة من المبيدات 2.5 مل / 750 مل من الماء، و كان طعامها خالياً من سبيروولينا تعرضت إلى آفات و جروح على مستوى الجهاز الهضمي و تشكل دمل، تقرحات و أعراض كثيرة أخرى أدت إلى هلاك الفئران.

الكلمات الجوهرية: سبيروولينا، مبيدات الحشرات، الإخصاب، تشوه خلقي، وفيات.

REMERCIEMENTS

Mes sincères remerciements s'adressent à ma promotrice A. DOUMANDJI et ma Co promotrice L. BENHADJA pour leur patience, leur dévouement,leur disponibilité et leurs attentions constantes portées à la réalisation de ce travail.

À ma présidente de mémoire: MmeA. BENRIMA
Qui a bien voulu nous faire l'honneur de présider le jury de ce mémoire.
Mes vifs remerciements et mes respectueux hommages à mon jury de mémoire:

Mme HADJ ZYANE,D. ELHADI et A. BITAMqui nous font l'honneur d'accepter d'examiner ce travail. Sincères remerciements.

Un grand merci à tous les membres du laboratoire de l'ITELV de BABA ALI, pour leur accueil ainsi que leur précieuse aide, particulièrement à MmeZADI.Spour sa patience, son aide, sa disponibilité durant toute la période de réalisation de ce travail sans oublier, ISSAD.N, SADI.S et qui m'ont beaucoup aidé à la réalisation de ce travail.

Je désire également remercier Mlle A. BENATELA, Mlle F.MAPROU, Mme D.SAYEDJ et Mr R.KEDOUR technicien au laboratoire Anapathologie à l'école nationale supérieure vétérinaire et qui m'ont énormément aidé.

Tous mes remerciements s'adressent également à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin, à la réalisation de ce travail, veuillez trouver l'expression de ma sympathie et de ma profonde reconnaissance.

J'exprime aussi mes très sincères remerciements aux deux femmes de ma vie ma mère et ma femme ainsi que mon père, les trois prunelles de mes yeux ainsi que mes deux frères Islem et Yakoub pour leurs aides et leurs sacrifices à mon égard ; ainsi que toute ma famille que je ne peux pas citer en entier mais qui chaque membre saura se reconnaître...

SOMMAIRE

INTRODUCTION	9
Bibliographie Pesticide	
CHAPITRE 1. PESTICIDES ET SANTE HUMAINE	
1. DEFINITIONS DES PESTICIDES	11
2. EXEMPLES DE LA COMPOSITION DES INSECTICIDES	12
3. CLASSIFICATION ET CARACTERISTIQUES	15
4. L'EXPOSITION AUX PESTICIDES	18
5. CONSEQUENCES SUR LA SANTE	21
6. MODE D'ACTION SUR LES INSECTES	23
7. TOXICOLOGIE	24
8. REVUES DE LITERATURE ET EXPERTISES COLLECTIVES	35
9. TOXICITE CHRONIQUE CHEZ L'ENFANT	38
CHAPITRE 2. LA SPIRULINE	40
1. DEFINITION	40
2. CARACTERISTIQUES STRUCTURALES	41
3. CROISSANCE ET REPRODUCTION DE LA SPIRULINE	42
4. ASPECTS ET INTERETS NUTRITIONNELS DE LA SPIRULINE	42
5. EFFETS SECONDAIRES ET DE SURDOSAGE LIE A LA CONSOMMATION DE LA SPIRULINE	47
6. LA SPIRULINE DANS LA PHARMACOPEE	48
PROBLEMATIQUE	49
CHAPITRE 3 : MATERIELS ET METHODES	
1. COBAYES ET ALIMENTS	50
2. ANALYSES	55
3. DISSECTION DES RATS	63
4. COUPES HISTOLOGIQUES	63
5. ANALYSE STATISTIQUES	64
CHAPITRE 4 : RESULTATS ET DISCUSSION	
1. CONTROLE DE LA QUALITE PHYSICOCHIMIQUE DE L'ALIMENT DES RATS (CONCENTRE)	66
2. CONFIRMATION DE LA PURETE DE LA SOUCHE DE SPIRULINE	68
3. EFFET DE L'INTRODUCTION DES DIFFERENTES DOSES DE PESTICIDES SEULS OU COMBINEES AVEC LA SPIRULINE SUR LA PHYSIOLOGIE DES RATS	69
4. DISSECTION DES RATS	81
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	88
APPENDICE	90
REFERENCES	93

LISTES DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1: Mécanismes de transferts et de transformations des pesticides dans les milieux de l'environnement (d'après le schéma conceptuel du CORPEN, INERIS 2005)	20
Figure 1.2 : Relation entre la dose et l'effet	22
Figure 1.3 : Relation entre la dose et la réponse	23
Figure 2.1: <i>Spirulina platensis</i> observée au microscope	41
Figure 2.2: Filaments des deux espèces de spiruline observés au microscope optique	42
Figure 3.1: représentation de la répartition des groupes de rat selon leur régime alimentaire	52
Figure 4.1: Photographie de L'aliment pour rat simple (Photographie originale)	66
Figure 4.2: Photographie de L'aliment pour rat enrichi en spiruline (Photographie originale)	66
Figure 4.3 : Photographie de la spiruline	68
Figure 4.4: Photographie d'une spirale de spiruline après coloration De Gram (photographie originale) à grossissement (Gr : $100 \times 1,25 \times 10 \times 0,25$).	68
Figure 4.5 : Effet des différentes doses de pesticides sur l'appétit du rat	69
Figure 4.6 : Effet de la spiruline inhibant les effets de différentes doses de pesticides sur l'appétit des rats	70
Figure 4.7 : Etude de l'influence de l'insecticide sur la quantité d'aliment ingéré	71
Figure 4.8 : Etude de l'influence de la spiruline sur la quantité d'aliment ingéré	71
Figure 4.9 : Effet de plusieurs doses d'insecticide sur la fécondation des rates.	72
Figure 4.10 : Influence d'une alimentation enrichie avec la spiruline freinant les effets du pesticide sur la fécondation des rates.	73
Figure 4.11 : Etude de l'influence de l'insecticide sur le taux de fécondité	74

Figure 4.12 : Etude de l'influence de la spiruline sur le taux de fécondité	74
Figure 4.13 : Effet de l'insecticide à différentes doses sur le poids des portées des rates	75
Figure 4.14 : Etude de l'influence de l'insecticide sur le poids des ratons à la mise bas	76
Figure 4.15: Effet du pesticide à différentes doses, sur les malformations congénitales chez les rats	77
Figure 4.16: Influence d'une alimentation enrichie avec la spiruline freinant les effets du pesticide sur le taux de malformations congénital	78
Figure 4.17: Effet d'une dose de pesticide seul ou combinés avec la spiruline dans la ration animale sur la longévité des rats	79
Figure 4.18 : Etude de l'influence de l'insecticide sur la longévité des rats	80
Figure 4.19 : Étude de l'influence de la spiruline sur la longévité des rats	80
Figure 4.20: Photographie du duodénum atteint d'un rat	81
Figure 4.21: Trois coupes histologique prélevées d'un duodénum	83
Figure 4.22: Photographie d'un ganglion sur l'appareil digestif d'un rat	84
Figure 4.23 : Tissu conjonctif intestinal à Gr : $100 \times 1,25 \times 10 \times 0,25$	85
Tableau 1.1 : Catégories de menace présentée par un produit selon l'OMS	17
Tableau 1.2 : Groupes de classification des cancérigènes par le CIRC	17
Tableau 1.3 : Classes de toxicité établies par l'INERIS	18
Tableau 1.4 : Classes de toxicité établies par l'US EPA. (Depuis 1999)	18
Tableau 1.5: Toxicocinétique des substances retenues	27
Tableau 1.6 : Récapitulatif de la toxicité aiguë expérimentale des 5 substances	30
Tableau 1.7: Signes et symptômes rapportés dans certains cas d'intoxication aux insecticides	34
Tableau 1.8 : Principales associations mises en évidence entre santé et exposition chronique à des pesticides	36

Tableau 2.1: Teneur en vitamines en $\mu\text{g/g}$ de matière sèche de spiruline d'après	45
Tableau 2.2 : Composition en minéraux de la Spiruline cultivée en $\mu\text{g/g}$ de sa matière sèche d'après	47
Tableau 3.1 : Tableau récapitulatif des expériences in vivo effectuées sur les rattes	54
Tableau 3.2 : Tableau récapitulatif des analyses physico chimiques et microbiologiques effectuées sur l'aliment et la spiruline.	63
Tableau 4.1 : comparaison des résultats d'analyses de l'aliment seul ou enrichie avec 1% de spiruline	66
Tableau 4.2 : Tableau récapitulatif des besoins en nutriments de chaque stade physiologique des rats	67

INTRODUCTION

Avant l'utilisation des produits phytosanitaires, les systèmes de culture étaient conçus pour assurer le meilleur compromis entre le risque phytosanitaire et le potentiel de production de la culture. Cependant, les pertes en rendement des productions agricoles dues aux maladies, aux ravageurs et aux adventices (ou mauvaises herbes) pouvaient atteindre des proportions importantes [1].

Après la seconde guerre mondiale, les pesticides ont permis le développement de l'agriculture et ont contribué à l'augmentation des rendements et à la régulation de la production agricole.

De plus, certains experts estiment que l'augmentation des rendements des terres agricoles a permis de limiter la déforestation [2]. L'utilisation des produits phytosanitaires a également limité ou éradiqué un certain nombre de maladies parasitaires très meurtrières.

Cependant, aujourd'hui, les pesticides sont soupçonnés de présenter un risque pour la santé de l'homme et pour son environnement. Des effets cancérigènes, neurotoxiques ou de type perturbation endocrinienne des pesticides ont été mis en évidence chez l'animal. La question des risques pour l'homme est donc posée tant au niveau professionnel qu'à celui du consommateur.

A l'heure actuelle il est difficile de retourner vers l'agriculture biologique à cause d'obstacles politico-économiques, et en vue de limiter les dégâts que peuvent engendrer ces produits phytosanitaires, les scientifiques sont à la recherche de matières actives antitoxiques d'origine végétale comme les algues et dont la spiruline en fait partie.

La spiruline (Cyanobactérie, *Athrospira platensis*) est une algue microscopique, cultivée originellement dans les lacs du Tchad (chez les Kanembous) et dans la vallée de Texcoco au Mexique (chez les Aztèques)..

De manière générale, cette algue est considérée comme riche en protéines (60 à 70 % de son poids avec neuf acides aminés essentiels), en acides gras essentiels (linoléique), en minéraux (fer, calcium, potassium, phosphore, manganèse, cuivre, zinc, magnésium...), en oligoéléments, en vitamines (A, B1, B2, B6, B12, E et K) et contient de la chlorophylle, des fibres et un pigment bleu (la phycocyanine). Cette algue fait l'objet d'un véritable « culte », dans de nombreuses publications Internet (2600 sites à ce jour à partir du mot clé « spiruline ») avec des résultats réputés spectaculaires dans la malnutrition infantile, sans arguments scientifiques [3][4]. Elle a même été testée sur 52 sujets VIH-positifs, comparant un groupe de patients ayant une supplémentation en spiruline et un groupe ayant une supplémentation avec du soja [5]. Cette étude montre une efficacité comparable pour la spiruline avec le

soja en terme de prise de poids, mais également un regain significatif des marqueurs d'immunité dans le groupe traité avec la spiruline, mais non dans le groupe sous soja, aussi des travaux récents indiquent qu'une supplémentation en spiruline de quelques semaines permet d'améliorer l'état de santé de patients âgés souffrant d'anémie et d'immunosénescence [6].

L'Algérie fait partie des rares pays dans le monde où l'on cultive de la spiruline, une algue très riche en nutriments considérée comme une ressource alimentaire d'une importance stratégique.

Les USA détiennent 50% de la production mondiale [7].

En Algérie, on est au stade de la production artisanale et expérimentale. L'unique Algérien qui connaît parfaitement le processus de production de cette espèce d'algue est Monsieur Hiri Abdelkader. Il a réussi à la faire déplacer de son environnement naturel (El Guelta) vers un bassin d'une superficie légèrement au-dessus de 20 m² et produit 20 kg de spiruline sèche par an. C'est dans la région de Tamanrasset que cela se passe. Quatre mois après l'ensemencement du bassin, on peut déjà récolter la spiruline. Le kilogramme de spiruline est vendu sur le marché mondial à 560 euros. Les principales fermes de production de spiruline se trouvent aux USA (Californie et Haïti), en Thaïlande et en Chine. Selon les conclusions des dernières recherches du mois de mai 2005, il s'avère qu'un kilogramme de spiruline équivaut à une tonne de légumes et de fruits [7].

Si les connaissances fondamentales concernant les vertus que peut avoir la spiruline sur la santé ont été plus ou moins approfondies, il n'on demeure pas moins qu'au cours de ces dernières années, les effets antitoxiques de cette dernière sont encore mal connus.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail dont l'objectif est de mettre en évidence le rôle de la spiruline comme complément alimentaire en dévoilant son impact sur la diminution des effets toxiques d'un insecticide sur la santé des rats de laboratoire (*Rattus norvegicus*) et cela à très faible dose.

La première étape de cette présente étude consiste à l'identification de la souche de spiruline provenant de France fournie par le professeur GORODETZKY, E de la ferme Biovie.

La seconde étape consiste à introduire un insecticide à différentes doses seul ou combinés à la spiruline dans l'alimentation des rats pendant près de deux mois et mettre en exergue leurs impacts sur la physiologie des rats et leurs influences sur :

- ✓ L'alimentation (doses ingérées par les rats)
- ✓ Fécondité des rats
- ✓ La longévité des rats
- ✓ Le poids des portés
- ✓ Détecter d'éventuelles malformations congénitales
- ✓ Des éventuelles anomalies anatomopathologiques

CHAPITRE 1: PESTICIDES ET SANTE HUMAINE

1. Définitions des pesticides

Le terme « pesticide » est une appellation générique pour toutes les substances (molécules) ou produits (formulations) éliminant les organismes nuisibles, qu'ils soient utilisés dans le secteur agricole ou pour d'autres applications [8].

Selon le code de conduite de la FAO (Food and agricultural organization) sur la distribution et l'utilisation des pesticides (Version novembre 2002), « un pesticide est une substance ou association de substances qui est destinée à repousser, détruire ou combattre les ravageurs, y compris les vecteurs de maladies humaines et animales, et les espèces indésirables de plantes ou d'animaux ».

Du point de vue réglementaire les pesticides sont :

- ✓ Des produits phytopharmaceutiques (PPP), appelés plus communément « produits phytosanitaires », les produits utilisés principalement pour la protection des végétaux en agriculture ou dans d'autres secteurs (sylviculture, aménagement des paysages, entretien des abords d'axes de transport, jardinage amateur) ;
- ✓ sont des biocides, c'est à dire des substances actives et des préparations contenant une ou plusieurs substances actives utilisées, par exemple dans des applications comme la conservation du bois, la désinfection ou la lutte antiparasitaire, pour détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, en prévenir l'action ou les combattre de toute autre manière par une action chimique ou biologique.

Ainsi, les pesticides ont pour objectif de détruire ou prévenir l'action des animaux, végétaux ou micro-organismes nuisibles à la production agricole. Ils sont également utilisés pour l'entretien et la protection des voies ferrées, routes, espaces urbains communs... et à titre privé, par des particuliers, tant dans leur habitat que dans les jardins [9]. Ces produits peuvent également être utilisés dans la lutte contre les vecteurs de certaines maladies humaines (la destruction des anophèles vecteurs du paludisme, des mouches tsé-tsé vectrices de la maladie du sommeil, etc.) ou, dans des spécialités pharmaceutiques, contre certains ectoparasites (gale, poux, etc.) [9].

Le terme pesticide au sens large comprend les substances utilisées comme :

- ✓ Régulateur de croissance des plantes ;
- ✓ Défoliant ;
- ✓ Agent de dessiccation ;
- ✓ Agent d'éclaircissage des fruits ;
- ✓ Agent empêchant la chute prématurée des fruits ;

- ✓ Substances appliquées sur les cultures, avant ou après la récolte, pour protéger les produits contre la détérioration durant l'entreposage et le transport.

Un pesticide comprend une ou des matières actives et des matières additives. La présentation sous laquelle un pesticide est vendu et utilisé, est appelée « formulation ».

Une formulation peut se présenter sous forme liquide (homogène ou suspension) ou solide, de granulés ou de poudre, etc.

Les matières actives sont responsables de l'effet et de la toxicité intrinsèque d'un pesticide. Des exemples de matières actives sont : endosulfan, fénitrothion, atrazine, malathion, paraquat, deltaméthrine, DDT (Dichloro Diphenyl Trichloroethane), dièldrine, glyphosate, lindane, etc.

Les matières additives permettent l'utilisation de la formulation, assurent la stabilité des matières actives durant le stockage et/ou l'utilisation. Les matières additives sont souvent appelées des adjuvants, des solvants, ou des excipients. Il peut s'agir d'huiles, de poudres, de solutions, ou de mélanges divers. Les matières additives peuvent potentialiser l'effet des matières actives. Mais, en principe, elles sont inactives sur les organismes cibles bien qu'elles puissent s'avérer toxiques pour la santé et l'environnement [10].

2. Exemples de la composition des insecticides

La majorité des insecticides modernes sont composés de différents éléments : une substance active (ou plusieurs pour éviter l'apparition de résistances de la part des insectes) et un ou plusieurs additifs dits "inertes". La nature exacte des additifs n'est généralement pas communiquée au public. Pourtant, bon nombre de ces ingrédients ne sont ni biologiquement, ni toxicologiquement, ni chimiquement "inertes".

2.1. Les substances actives

La substance active est l'ingrédient principal sélectionné pour sa capacité d'action contre l'insecte visé. Elle peut avoir une origine végétale, minérale, organique de synthèse, microbiologique. Nous allons énumérer les principales substances entrant dans la composition des insecticides pour chacune de ces familles.

2.1.1. Les substances d'origine végétale

Ce sont les substances les plus anciennement connues. Les plus utilisées sont :

- les huiles essentielles de plantes choisies pour leurs composés aromatiques répulsifs (la citronnelle, le clou de girofle, le camphre ...) ;
- le pyrèthre naturel, extrait des plantes de la famille des astéracées (pyrèthre, chrysanthèmes...) dont les fleurs desséchées ont des propriétés insecticides. Le pyrèthre est un mélange d'esters des acides pyréthrique et chrysanthémique, deux dérivés de l'acide cyclopropane-carboxylique.

Ces substances ne présentent pas d'effets indésirables pour l'environnement et sont peu dangereuses pour l'Homme. Elles peuvent tout de même être à l'origine de réactions allergiques dues à des impuretés de la plante (pollens).

2.1.2. Les substances d'origine organique de synthèse

Les grandes familles de produits organiques de synthèse présentant une activité insecticide sont les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates et les pyréthriinoïdes. Certains composés issus d'autres familles sont également très utilisés ; on peut citer le fipronil de la famille des phénylpyrazolés, l'amitrazé de la famille des formamidines, la liste n'étant pas exhaustive.

✓ **Les organochlorés**

Les organochlorés ont été les premiers insecticides organiques utilisés. Issus de l'industrie du chlore, ce sont pour la plupart des POPs (Polluants Organiques Persistants).

Certains de ces produits, comme l'aldrine, le dieldrine et l'endrine, font partie des substances interdites par la Convention de Stockholm (22 mai 2001, cf. réglementation) [11].

Le DDT est le plus ancien organochloré commercialisé. Il a joué un rôle très important dans la lutte contre les vecteurs du typhus, de la malaria et du choléra. Il a cependant été interdit du fait de sa toxicité et de sa rémanence.

Le lindane, interdit en agriculture, est susceptible d'être transporté par les courants atmosphériques. On l'a ainsi retrouvé jusque dans les glaces des régions arctiques. De plus, il s'accumule dans les graisses et y reste stocké pendant des années.

Pourtant, le lindane est toujours présent dans les rayons droguerie et les pharmacies (lotions antipoux, insecticides à usage ménager).

✓ **Les pyréthriinoïdes de synthèse**

Les pyréthriinoïdes sont les insecticides les plus courants en usage domestique. [12] Ce sont des molécules de synthèse copiées sur les principes actifs de la fleur de pyrèthre. Ils ont l'avantage d'être peu rémanents et peu toxiques pour les mammifères. [13] C'est un groupe varié qui comprend des composés assez photolabiles (alléthrine, tétraméthrine et resméthrine) et des halogénés plus stables et plus persistants (perméthrine, deltaméthrine, fenvalérate et cyperméthrine).

Très peu volatils et très lipophiles, ils sont quasiment insolubles dans l'eau. Ils sont actifs longtemps (de 3 à 4 semaines, voire plus), sauf ceux qui s'altèrent à la lumière et en présence d'oxygène.

✓ Les organophosphorés

Les insecticides organophosphorés sont la 2^{ème} famille la plus représentée. Ce sont des substances de la génération précédant les pyréthriinoïdes. On les trouve donc dans des produits présents sur le marché depuis plus longtemps.

Ils ont en général une toxicité aiguë plus élevée que les organochlorés mais ils se dégradent beaucoup plus rapidement. En effet, contrairement aux pyréthriinoïdes, la plupart des composés sont peu rémanents dans l'environnement car ils sont hydrolysés rapidement (dégradation en quelques heures à quelques jours). Cependant, les aromatiques et les dérivés soufrés sont plus persistants. Ils ne s'accumulent pas dans les organismes vivants. Ils sont en général peu volatils, sauf le chlorpyrifos, le dichlorvos et le fenthion, et très lipophiles. Comme les organochlorés, ce sont des neurotoxiques.

✓ Les carbamates

Les carbamates, et plus particulièrement les N-méthyl carbamates d'aryle, de formule générale $\text{CH}_3\text{-NH-CO-O-R}$ sont des insecticides puissants ; la première molécule, le dimétan, a été synthétisée par Ciba-Geigy en 1945, puis le carbaryl, toujours très utilisé, par Union Carbide en 1957. Les N-méthyl carbamates d'oxime, comme l'aldicarbe, sont également nématicides et miticides. La plupart sont peu volatils et liposolubles (sauf le pirimicarbe, très hydrosoluble). Les principaux carbamates retrouvés dans les insecticides à usage domestique sont le carbaryl et le propoxur.

Les carbamates sont principalement présents dans les aérosols anti-cafards et dans les colliers antiparasitaires pour chien.

✓ Les phénylpyrazolés (le fipronil)

Le fipronil est le principal membre de la famille des phénylpyrazolés. Le fipronil était utilisé en agriculture dans la protection des semences, mais sa probable toxicité pour les abeilles a conduit à son interdiction provisoire (suspension d'autorisation de commercialisation) en France depuis février 2004 pour les usages agricoles en vertu du principe de précaution. En revanche, il reste très utilisé pour la désinsectisation des locaux (lutte contre les cafards et blattes) et dans les produits antiparasitaires à usage vétérinaire [13].

2.2.2. Les substances d'origine microbiologique

A partir de 1975, suite à la prise de conscience de la toxicité de certains produits, la recherche insecticide se tourne vers d'autres substances radicalement différentes et d'origine microbiologique. Des substances, produites par la fermentation des actinomycètes (champignons), sont alors découvertes.

A l'heure actuelle, la recherche vise à développer l'utilisation de bactéries, de virus et de protozoaires pour lutter contre les insectes tout en limitant les risques pour l'environnement et les populations humaines.

2.2. Les additifs ou substances « inertes »

Dans les produits vendus, un certain nombre d'additifs sont associés à la substance active. On trouve ainsi des solvants (dérivés du pétrole) et des adjuvants (tensioactifs, huiles minérales ou végétales).

Ces adjuvants renforcent l'efficacité et améliorent l'utilisation du produit. Ils peuvent être de plusieurs types :

- agents mouillants qui réduisent la tension superficielle de l'eau et permettent à la gouttelette de bien couvrir la surface de l'organisme nuisible ;
- émulsifiants qui favorisent un bon mélange entre l'insecticide et l'eau ;
- agents adhésifs qui permettent de faire adhérer l'insecticide sur la surface traitée ;
- agents anti-moussants qui préviennent la formation de mousse lors de l'agitation de l'emballage ;
- agents épaississants qui réduisent le fractionnement des gouttelettes ;
- agents activateurs qui facilitent l'absorption du produit dans la cuticule de l'insecte ;
- agents de prolongation qui servent à prolonger l'activité de l'insecticide ;
- agents anti-agglutinants qui maintiennent une bonne dispersion de la substance active dans le mélange.

Il faut souligner que l'étiquetage des spécialités commerciales ne renseigne que sur le nom ou la famille de la substance active contenue dans la préparation. Une spécialité commerciale peut donc s'avérer plus dangereuse que la substance active elle-même, notamment car les additifs peuvent améliorer l'absorption cutanée de la substance active [14].

La dégradation de la substance active peut être plus ou moins rapide et plus ou moins totale. Dans certains cas, la substance active sera dégradée totalement et rapidement alors que dans d'autres cas la dégradation sera incomplète et aboutira à la formation de composés secondaires appelés métabolites. Ces produits de dégradation (comme l'isomalathion, contaminant le malathion), ainsi que les impuretés de fabrication (des dioxines par exemple) ou les isomères (l'alpha-HCH dans le cas du lindane) sont parfois beaucoup plus toxiques que la substance active elle-même, ou augmentent son potentiel toxique.

3. Classification et caractéristiques

La classification des pesticides peut se faire en fonction des caractéristiques phytopharmaceutiques des pesticides ou en fonction caractéristiques toxicologiques des pesticides.

➤ Caractéristiques phytopharmaceutiques des pesticides

Les pesticides sont des composés minéraux ou organiques de structures très diverses, aux propriétés physicochimiques et rémanentes également multiples et aux effets toxiques recherchés, ou non, très différents.

Classiquement, ils sont répartis entre cinq groupes, selon leur action :

- ✓ insecticides, acaricides, nématocides,
- ✓ fongicides,
- ✓ molluscicides,
- ✓ rodenticides,
- ✓ herbicides, contre adventices et « mauvaises herbes ».

Les pesticides se présentent sous diverses formes (poudres, granulés, émulsions, préparations micro-encapsulées, solutions, aérosols, fumigants, appâts...). Parmi les solvants utilisés pour la formulation ou lors de l'utilisation des pesticides, certains sont parfois plus toxiques que les pesticides utilisés ; de plus, certains résidus de pesticides sont également plus toxiques que les pesticides dont ils sont issus [15]. Les pesticides peuvent être utilisés seuls ou en association [9].

➤ Caractéristiques toxicologiques des pesticides

Aucun pesticide n'est spécifique d'un nuisible ou d'une adventice mais tous sont écotoxiques : leurs modes d'action très différents conduisent à des effets très variés sur l'environnement mais également chez les vertébrés dont la population humaine. Les classifications utilisées pour les produits chimiques s'appliquent aux pesticides. Ces classifications reposent sur les propriétés toxicologiques des produits concernés. Les classifications présentées ci-après sont notamment celles de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) et du CIRC (Centre international de recherche sur le cancer), de l'US EPA (United States Environmental Protection Agency), de l'Union européenne, de l'INERIS (Institut national de l'environnement industriel et des risques), d'AGRITOX et du PAN (Pesticide action network).

La classification des produits chimiques, dont les pesticides, mise en place par l'OMS est présentée ci-dessous [16]. Cette classification repose sur les catégories de dangerosité toxique aiguë par voie orale et cutanée définies par le SGH (Système général harmonisé).

Cette classification présente cinq niveaux de dangerosité, indiqués dans le tableau 1.1 suivant.

Tableau 1.1 : Catégories de menace présentée par un produit selon l'OMS [16].

Niveau de classification	Intitulé du niveau	DL ₅₀ pour le rat (mg/kg de poids corporel)	
		voie orale	voie cutanée
Ia	extrêmement dangereux (ED)	< 5	< 50
Ib	fortement dangereux (FD)	5 - 50	50 – 200
II	modérément dangereux (MD)	50 – 2000	200 – 2 000
III	légèrement dangereux (LD)	> 2000	
U	non connu comme présentant un danger aigu (ND)	5 000 ou plus	

Parmi les effets des pesticides sur la santé humaine suspectés figurent les cancers. A ce titre, le CIRC structure dépendant de l'OMS, a réalisé des monographies à partir des données de la littérature. Les différents niveaux de la classification établie par le CIRC des produits chimiques, dont les pesticides, selon leur cancérogénicité, sont présentés dans le tableau 1.2 suivant.

Tableau 1.2 : Groupes de classification des cancérogènes par le CIRC [17].

Groupe de classification	Intitulé du groupe
1A	Cancérogènes
2A	probablement cancérogènes
2B	possiblement cancérogènes
3	Inclassifiables
4	probablement non cancérogènes

L'INERIS propose également une classification de la toxicité des produits chimiques, dont les pesticides, dans la base de données SIRIS (système d'intégration des risques par interaction des scores pour les pesticides) accessible sur Internet. Les cinq classes de toxicité proposées par l'INERIS sont présentées dans le tableau 1.3 suivant.

Tableau 1.3 : Classes de toxicité établies par l'INERIS [18].

Classes de toxicité	Limites de toxicité des classes selon la DJA (mg/kg de poids vif)
A	DJA < 0,0001
B	0,0001 < DJA < 0,001
C	0,001 < DJA < 0,01
D	0,01 < DJA < 0,1
E	0,1 < DJA

La classe la plus toxique est notée A ; la classe la moins toxique est notée E.

L'US EPA propose une classification de la toxicité des produits chimiques, dont les pesticides, disponible en ligne. Les cinq classes de toxicité proposées par l'US EPA sont présentées dans le tableau 1.4 suivant.

Tableau 1.4 : Classes de toxicité établies par l'US EPA. (Depuis 1999) [19].

Classes	Caractère cancérigène
A	cancérigène
B	probablement cancérigène
C	éléments de preuve suggérant la cancérigénicité mais insuffisants pour évaluer le potentiel carcinogène
D	données insuffisantes pour évaluer le potentiel carcinogène
E	probablement non cancérigène

4. L'exposition aux pesticides

4.1. L'exposition humaine aux pesticides

Selon l'InVS (Institut de veille sanitaire), parmi les facteurs favorisant l'imprégnation aux pesticides, figurent : « l'alimentation, le fait d'utiliser des pesticides à son domicile, le fait de résider à proximité de zones agricoles, mais parfois plus en zone urbaine. » Les pesticides peuvent être présents dans tous les milieux sans que la part de chacune de ces sources de contamination soit connue, alors qu'elle varie probablement selon la substance et les circonstances d'exposition [20].

En l'absence de connaissances sur la contamination par les pesticides présents dans l'air intérieur et extérieur, il est classiquement considéré que la principale voie de contamination est la voie alimentaire. La consommation d'eau en représente 10 %, les 90 % restants les aliments. Toutefois, certains auteurs suggèrent que la voie de contamination par les aliments est surestimée alors que celle par l'eau est sous-estimée [21,22]

Il est à noter qu'au sein de la population générale, les enfants constituent les individus les plus sensibles et les plus exposés à la contamination orale par les pesticides. [23] Le comportement des enfants représente un facteur majeur de leur contamination non alimentaire par les pesticides. En effet, des études ont montré que les mains des enfants représentent un véhicule et une source de pesticides importants dans des communautés agricoles [24] mais également en zone urbaine [25].

4.2. Les voies d'exposition aux pesticides

4.2.1. L'exposition professionnelle aux pesticides

Les expositions professionnelles aux pesticides surviennent lors de la fabrication des pesticides, lors de leur préparation et lors de leur utilisation, notamment en aspersion.

Ainsi, une étude a permis de constater que l'emploi de tenues de protection n'évite pas la contamination cutanée des agriculteurs, notamment de leurs mains, en particulier lors de la préparation de la solution de pesticides aspergée [26].

Malgré les limites liées aux modalités de recueil des informations la constituant, la base de données européenne CAREX (carcinogen exposure) indique que 32 millions de travailleurs de 15 pays d'Europe, soit 23 % de l'ensemble des travailleurs, sont exposés à des carcinogènes, dont 6 millions en France, entre 1990 et 1993 [27].

4.2.2. Présence de pesticides dans l'environnement et l'alimentation

Les usages de pesticides sont multiples et variés. Principalement destinés à l'agriculture, les pesticides sont également utilisés pour le désherbage des accotements des voies de communication (routières et ferroviaires), des zones industrielles, l'entretien et le traitement des jardins et potagers individuels, des terrains de sport, des espaces verts, lors de soins vétérinaires d'animaux domestiques et d'élevage, mais également pour traiter le bois des exploitations forestières et des habitations, et, dans certains revêtements muraux et de sol, pour prévenir l'apparition de moisissures dans l'habitat [28,29].

De caractéristiques physicochimiques variées (solubilités, points de fusion et d'évaporation notamment), de modes et de conditions d'application divers (météorologie, fréquence, sols...), les pesticides et leurs résidus (matières trouvées dans l'environnement après l'emploi d'un pesticide. Il s'agit donc de la substance initiale, de ses métabolites, des coformulants et adjuvants utilisés dans la formulation commercialisée.) Peuvent contaminer et polluer tous les milieux : l'eau, l'air (extérieur et intérieur), le sol, les aliments. Dans le cas de leur utilisation agricole, il est possible de considérer que les pesticides passent d'un compartiment à un autre selon le schéma dans la figure 1.1 suivante. L'exposition humaine passe donc par l'eau de consommation, les aliments, l'air extérieur, l'air intérieur, les poussières. [28, 29, 30]. Selon les pesticides et les modalités de leur épandage, une fraction seulement des pesticides épandus par voie aérienne atteint leurs cibles agricoles. Entre 30 et 99 % des quantités utilisées contaminent ainsi l'eau, l'air ou le sol [31].

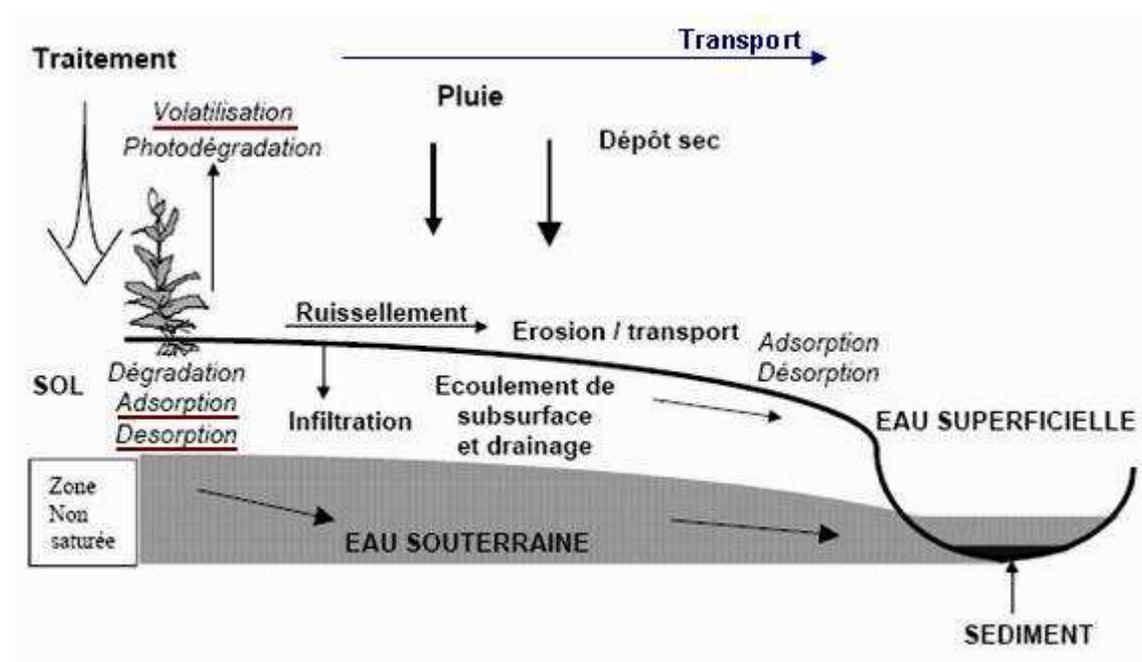


Figure 1.1: Mécanismes de transferts et de transformations des pesticides dans les milieux de l'environnement (d'après le schéma conceptuel du CORPEN, INERIS 2005) [32].

4.2.3. Les pesticides dans le sol et dans les eaux continentales

Les sols sont contaminés par les pesticides utilisés en agriculture et par les herbicides utilisés pour l'entretien des routes, voies ferrées, espaces verts et jardins mais également sur des sites industriels. L'importance de la pollution liée aux pesticides est fonction de leur rétention et de leur dégradation par le sol, ainsi que de leurs propriétés physicochimiques et de la nature du sous-sol. Les sols riches, épais et imperméables sont les plus aptes à retenir les pesticides et à limiter la pollution des ressources hydriques sous-jacentes ou en aval [29].

4.2.4. Les pesticides dans l'eau de consommation

Depuis le 1er septembre 2008, le règlement européen CE n° 396/2005 s'applique à la teneur en résidus de pesticides (pesticides encore présents en faibles quantités sur les récoltes traitées, exposant les consommateurs à leurs effets) Les LMR (Limite maximale de résidus)

Sont fixées à partir de constatations scientifiques. Ainsi, l'Agence européenne de sécurité des aliments conduit une évaluation de l'ingestion de résidus par les consommateurs avant de se prononcer sur l'innocuité d'une LMR. Cette agence s'appuie sur la toxicité du pesticide, les teneurs maximales attendues dans les aliments et les différents régimes alimentaires des consommateurs européens. Des aliments destinés à l'alimentation humaine et animale. Les limites maximales applicables aux résidus (LMR) ont pour but de protéger les consommateurs contre l'exposition à des niveaux inacceptables de résidus de pesticides dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux. Ce règlement permet ainsi que chaque catégorie de consommateurs, y compris les plus vulnérables (nourrissons et enfants) et les végétariens, soit protégée de manière suffisante [33].

5. Conséquences sur la santé

Par l'effet toxique inhérent à leur fonction, les pesticides peuvent constituer une menace pour la santé humaine. Dans la mesure où les mécanismes d'action des insecticides peuvent également perturber le métabolisme humain, ces pesticides sont plus préoccupants que les herbicides et les fongicides. Toutefois, certains fongicides peuvent être toxiques pour les mammifères [30]. D'autre part, les métabolites des pesticides et solvants requis pour leur utilisation sont parfois plus toxiques que les pesticides eux-mêmes [15].

Les intoxications par des pesticides peuvent résulter [9]:

- ✓ d'une ingestion accidentelle (surtout chez l'enfant) ou d'un contact avec la peau ou les muqueuses,
- ✓ d'une tentative de suicide, principalement par ingestion,
- ✓ d'une exposition professionnelle lors de la fabrication, de la formulation ou de l'application, par voie essentiellement respiratoire ou transcutanée,
- ✓ de l'ingestion d'aliments contaminés,
- ✓ de l'accumulation de certains pesticides dans la chaîne alimentaire,
- ✓ de leur présence dans l'air ou dans l'eau.

L'OMS et la FAO estiment que le nombre annuel d'intoxications par les pesticides se situe entre 1 et 5 millions. Plusieurs milliers de cas en découlant sont mortels, dont 99 % dans les pays en développement « où les mesures de protections sont souvent inadéquates voire inexistantes. » Par sa plus grande sensibilité (accrue par la malnutrition et la déshydratation) et sa plus grande exposition (par son comportement), l'enfant présente un risque plus élevé d'être exposé et intoxiqué par les pesticides. En effet, l'alimentation est une source majeure d'exposition pour l'enfant, proportionnellement à l'adulte [23].

5.1 Relation entre la dose et l'effet toxique d'un poison

Un principe important en toxicologie veut que **toutes les substances chimiques soient toxiques**, car il existe toujours une dose pouvant causer un effet nocif. Mais le fait d'inhaler, de toucher et même d'ingérer des substances chimiques n'entraîne pas nécessairement l'apparition d'un tel effet.

La **dose** est la quantité d'une substance à laquelle un organisme est exposé. Des doses croissantes résultent généralement en une augmentation de l'intensité et de la diversité des effets toxiques.

C'est ce qu'on appelle la **relation dose-effet** ou **exposition-effet** (relation entre l'exposition et l'intensité d'un effet). L'exemple suivant illustre bien cette relation : si une personne inhale accidentellement une substance très volatile, la manifestation des effets toxiques dépend de la quantité de vapeurs inhalées et du seuil d'apparition de ces effets (figure 1.2). Ainsi, au delà de la dose seuil, les effets seront d'autant plus toxiques que la personne aura inhalé davantage de vapeurs.

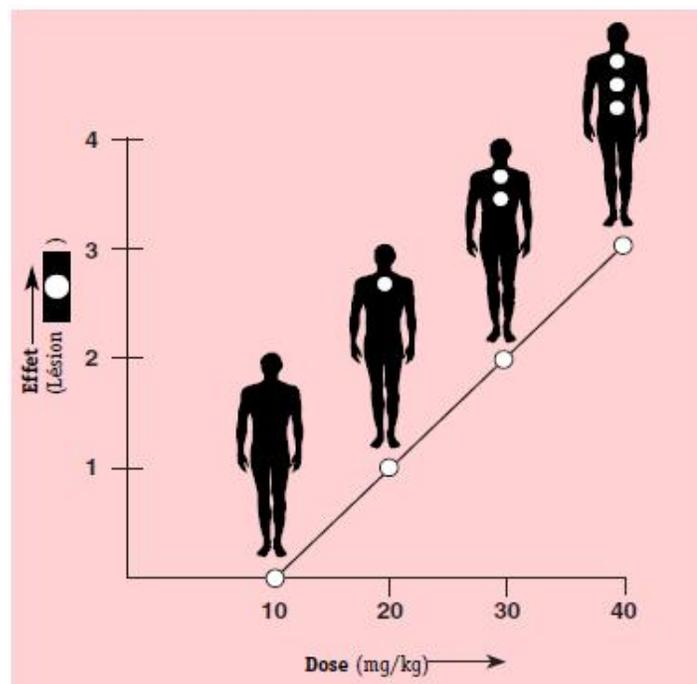


Figure 1.2 : Relation entre la dose et l'effet [34]

La notion de seuil toxique est importante, car elle peut servir à fixer des normes. La valeur seuil représente la quantité minimale sous laquelle il ne se produit pas d'effet. Au-dessus de ce seuil, l'effet observé dépend de la dose, et ce, bien qu'il y ait théoriquement des exceptions : par exemple, les cancérogènes génotoxiques. Ce seuil s'explique par le fait que le corps humain est constitué d'un grand nombre de cellules, de tissus et d'organes ayant une sensibilité variable et qu'il possède des mécanismes de défense ou d'adaptation.

Le même principe s'applique à une population d'individus, car l'effet ou les nombreux effets possibles peuvent se manifester différemment chez plusieurs personnes exposées à une même dose d'un toxique. C'est ce qu'on appelle la **relation dose-réponse** ou **exposition-réponse**, soit la relation entre l'exposition et le nombre d'individus qui présentent un effet donné. La figure 1.3 illustre bien qu'à certaines doses toutes les personnes ne sont pas atteintes.

Ainsi,

- une augmentation de la dose peut entraîner une augmentation des effets chez un individu ; et
- la proportion des individus affectés par une dose donnée devrait augmenter avec l'accroissement de la dose.

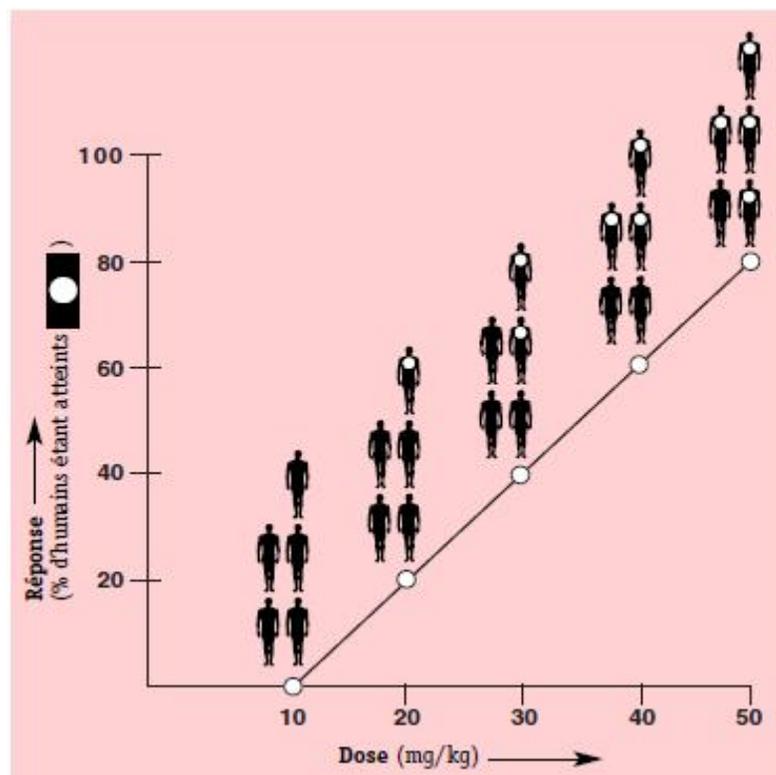


Figure 1.3 : Relation entre la dose et la réponse [34]

6. Mode d'action sur les insectes

Les insecticides présentent deux voies d'action :

- la voie externe : l'insecticide pénètre dans l'organisme de l'insecte au travers de sa cuticule après contact ;
- la voie interne : l'insecticide est soit ingéré par l'insecte et pénètre dans son organisme lors de la digestion, soit inhalé.

Les insecticides peuvent être rémanents, c'est à dire agir pendant une période de plusieurs jours à plusieurs mois, après leur application.

Les cibles des insecticides sont, selon les composés, le système nerveux, les cellules responsables de la biosynthèse de la chitine (qui constitue la cuticule), de la production d'énergie ou encore de l'hydratation des insectes. Les hormones qui contrôlent les mues et les médiateurs chimiques permettant la communication entre insectes ou entre les insectes et les plantes peuvent également être visée par les insecticides [35].

On trouve donc de nombreux modes d'action des substances :

- Les **pyréthriinoïdes** sont des perturbateurs endocriniens, agissant par contact et par ingestion. Ils bloquent la liaison entre une hormone et son récepteur ce qui entraîne la sidération immédiate puis la mort de l'insecte indésirable. Des synergistes, comme le pipéronyl-butoxyde, augmentent leur activité insecticide.
- Les **organophosphorés** agissent par contact et par ingestion, parfois également par inhalation, sur une grande variété d'insectes et de vers. Certains ont une diffusion systémique dans la plante ou l'animal.
- Les **organochlorés** attaquent le système nerveux de l'insecte, en inhibant la transmission de la cholinestérase, ce qui perturbe la transmission de l'influx nerveux.
- Les **carbamates** ont un large spectre d'action ; certains sont systémiques. Ils agissent par contact et par ingestion, parfois également par inhalation, sur une grande variété d'insectes et de vers, par effet neurotoxique.
- Le **fipronil**, quant à lui, agit comme antagoniste non compétitif et réversible du récepteur GABA, en bloquant le canal chlore des cellules.

7. Toxicologie

Dans ce qui suit est exposé quelques exemples de données toxicologiques pour les familles retenues (substances organiques de synthèse) et plus précisément pour les 5 substances citées précédemment.

7.1 Toxicocinétique

✓ Organochlorés

Les organochlorés étant très lipophiles, ils peuvent être absorbés chez l'animal et chez l'Homme par les différentes voies (orale, respiratoire et cutanée).

Ils s'accumulent dans les tissus riches en graisses (tissus adipeux, foie, système nerveux central). Ils franchissent la barrière placentaire et peuvent être, par cette route, retrouvés chez le fœtus. Ils passent facilement dans le lait maternel et le nourrisson allaité peut y être exposé. La concentration d'organochlorés dans le sang semble être en équilibre avec la quantité stockée dans les autres tissus. La détermination de leur concentration plasmatique permet ainsi d'apprécier leur charge corporelle.

Le métabolisme varie beaucoup selon la substance et l'espèce. Nous pouvons tout de même citer les données concernant le lindane. Des études in vitro suggèrent que les enzymes hépatiques de l'homme transforment le lindane en pentachlorocyclohexène (un chlorophénol) puis de façon ultime en époxyde chloré stable.

Chez le rat, des chlorophénols sont également retrouvés comme métabolites du lindane.

Les métabolites du lindane retrouvés chez l'homme et chez le rat étant similaires, cela indique une bonne cohérence inter-espèces. Ils sont lentement éliminés par les urines et les selles lorsque toute exposition cesse. [36].

✓ **Organophosphorés**

L'absorption cutanée n'est pas uniforme mais elle peut être très importante dans les zones les plus sensibles (visage, ventre). Les températures élevées et l'humidité relative favorisent cette absorption. L'absorption par inhalation est importante pour les aérosols d'organophosphorés et l'absorption orale non négligeable.

Une fois absorbés, les organophosphorés et leurs métabolites sont rapidement distribués dans tous les organes et les tissus, bien que les concentrations les plus importantes soient observées dans le foie et les reins. L'élimination par les urines et la bile est pratiquement totale (entre 24 et 48 heures après l'administration) sauf pour les composés les plus lipophiles qui peuvent être stockés en petite proportion dans les tissus gras et le tissu nerveux, d'où une possible libération à posteriori. Les métabolites apparaissent rapidement après absorption du fait de l'action d'enzymes hépatiques. Ce sont des phénols phosphorés. [37].

✓ **Carbamates**

L'absorption des carbamates est importante et rapide quelle que soit la voie d'exposition.

Leur métabolisme est complexe et fournit des composés plus polaires et plus hydrosolubles dont l'élimination (urinaire en majorité) est rapide, quasiment complète en 2 à 3 jours après absorption orale. [38].

✓ **Pyréthroïdes**

En théorie, le caractère liposoluble des pyréthroïdes autorise leur passage transcutané.

Mais une controverse existe au sein du monde scientifique quant à cette absorption.

L'absorption par voie respiratoire est faible, car les pyréthroïdes sont très peu volatils.

L'absorption orale des pyréthriinoïdes est limitée, les composés étant hydrolysés par des enzymes du tube digestif. Ces substances se répartissent de façon homogène dans l'organisme du fait de leur lipophilie et de leur neutralité acido-basique. Elles se concentrent d'abord dans le foie puis dans les tissus adipeux, le cœur et la rate.

Dans le plasma sanguin et dans le sang des mammifères, les pyréthriinoïdes subissent des hydrolyses et des oxydations rapides et intenses. Ces biotransformations expliquent leur faible toxicité pour les mammifères.

Du fait de leur lipophilie et de leur forte densité, ces substances sont principalement éliminées par les selles. Mais l'élimination peut être contrecarrée par la présence d'organophosphorés dans l'organisme. [38].

✓ **Fipronil (Pyrazol)**

Le fipronil est bien absorbé par voie orale alors que sa biodisponibilité est faible par la voie cutanée. Les résidus d'une exposition par voie orale s'accumulent dans les tissus adipeux mais se retrouvent également dans les surrénales, la thyroïde et les ovaires. Il n'existe pas d'études démontrant clairement que le fipronil n'est pas bioaccumulable suite à des expositions répétées.

Le fipronil est efficacement métabolisé au niveau du foie, majoritairement en sulfone. La majorité des métabolites sont éliminés par la bile et dans une moindre mesure par l'urine. [39].

Le Tableau 1.5 suivant présente la toxicocinétique des familles étudiées en indiquant les voies d'absorptions privilégiées et les organes de stockage. Il met en évidence que ces substances organiques de synthèse, plus ou moins bien absorbées par le corps, se stockent dans les tissus et organes riches en lipides principalement. Le foie et le sang les hydrolysent en métabolites (pouvant présenter des effets toxiques). L'élimination est principalement urinaire mais aussi biliaire et fécale.

Tableau 1.5: Toxicocinétique des substances retenues [11].

Famille (substance)	Voies d'absorption	Organes de stockages	Métabolisme	Elimination
Organochlorés (Lindane)	Orale Respiratoire Cutanée	Foie, SNC (Fœtus, lait maternel)	Par les cellules hépatiques→ Chlorophénols	Lente →Urines, selles
Organophosphorés (Dichlorvos)	Orale Respiratoire Cutanée	Foie, Reins, Tissus adipeux, SNC	Par les cellules hépatiques→ phénols phosphorés	Rapide (la majorité) →Urines, bile
Carbamates (Propoxur)	Orale Respiratoire Cutanée		Composés polaires hydrosolubles	Rapide (la majorité) →Urines
Pyréthriinoïdes (Tetraméthrine)	Orale (Respiratoire)	Foie, Tissus adipeux, cœur, rate	Dans le tube digestif, le plasma et le sang →Alcools et acides (Hydrolyses, oxydations)	Selles
Pyrazolés (Fipronil)	Orale	Tissus adipeux, surrénales, thyroïde, ovaires	Par les cellules hépatiques→ Sulfones	Bile, Urine

7.2 Toxicodynamique

7.2.1. Toxicité expérimentale

Cette toxicité est évaluée en laboratoire sur des populations animales (principalement rats, souris mais aussi lapins, chiens, chats...). Elle permet d'avoir une idée sur le comportement des substances sur les organismes et d'entamer une éventuelle comparaison avec l'homme.

7.2.1.1. Toxicité aiguë expérimentale

Nous allons exposer pour chaque famille de substances organiques de synthèse la toxicité aiguë expérimentale. Les DL_{50} et CL_{50} varient énormément selon la substance, l'espèce animale, le sexe et les conditions environnementales. Nous citerons donc dans les paragraphes qui suivent des valeurs moyennes ou des intervalles.

✓ Organochlorés

L'effet toxique à fortes doses est une stimulation du système nerveux central (SNC) avec tremblements, convulsions puis coma. Sont également recensés, pour des expositions aiguës uniques ou répétées (jusqu'à 14 jours), des effets hépatiques ainsi que des effets sur le développement embryofœtal, pour des doses relativement fortes (de 15 mg/kg pour la dieldrine à 25-30 mg/kg pour le lindane et 125 mg/kg pour le chlordécone).

Le lindane est irritant pour la peau et les muqueuses oculaires et respiratoires. Pour le lindane, chez le rat, la DL₅₀ orale varie de 88 à 125 mg/kg et la DL₅₀ cutanée est comprise entre 900 et 1000 mg/kg. Chez la souris on observe des DL₅₀ comprises entre 72 et 480 mg/kg en exposition orale. [36 ; 38 et 40]

✓ Organophosphorés

Les organophosphorés sont responsables d'une inhibition irréversible de l'acétylcholinestérase. L'activité cholinestérasique de départ est récupérée en trois mois environ. Certains composés peuvent également favoriser l'apparition de neuropathies retardées (dus à une dégénérescence axonale et à une démyélinisation secondaire) après intoxication. Le parathion-éthyl, extrêmement dangereux, présente une DL₅₀ orale de 3,6 à 13 mg/kg selon la formulation et l'espèce animale alors que le malathion, très utilisé dans la lutte contre les vecteurs de parasitoses, est très peu toxique, sa DL₅₀ orale variant de 480 à 1150 mg/kg. [38].

Pour le dichlorvos, on observe des DL₅₀ orales de 17-80 mg/kg pour le rat, 61-135 mg/kg pour la souris, 10-12,5 mg/kg chez lapin, 100 mg/kg pour le chien. [41] Une DL₅₀ cutanée a été mesurée à 107 mg/kg chez le rat.

✓ Carbamates

Les carbamates inhibent aussi l'acétylcholinestérase, en quelques heures. Les symptômes régressent en 24 heures la plupart du temps. L'enzyme n'est pas détruite comme avec les organophosphorés. Cependant, l'intoxication massive avec coma, défaillance respiratoire entraînant la mort ou des séquelles de type neuropathie retardée sont observées, notamment avec l'aldicarbe ou le carbofuran.

La toxicité aiguë des carbamates varie selon la substance : l'aldicarbe est extrêmement toxique avec une DL₅₀ orale de 1 mg/kg, alors que le carbaryl présente une DL₅₀ de 850 mg/kg et le fénoxy-carbe une DL₅₀ de 10 g/kg (très peu toxiques). [38].

Le propoxur présente une DL₅₀ orale de 100 mg/kg et une DL₅₀ cutanée de 800 mg/kg pour le rat.

✓ Pyréthriinoïdes

Ils sont peu toxiques pour les mammifères, notamment grâce à leur rapide inactivation par hydrolyse en acides et alcools. Les effets systémiques diffèrent globalement selon le type de pyréthriinoïdes, qui ont été classés historiquement selon leur structure chimique en deux types.

Ceux de type I provoquent un syndrome dit « T », caractérisé par des tremblements, des convulsions et une hyperexcitation, ceux de type II provoquent un syndrome dit « CS », caractérisé par une choréoathétose et une hypersalivation.

Cependant, certains composés peuvent provoquer une symptomatologie mixte, ce qui démontre les limites de cette classification en deux groupes. En fait, les pyréthriinoïdes sont des perturbateurs endocriniens. Les DL₅₀ orales varient de 50 mg/kg (deltaméthrine) à plus de 8000 mg/kg (bioresméthrine). [38].

La Tetraméthrine présente une DL₅₀ orale de 4640 mg/kg et une CL₅₀ de 2,5 mg/l pour le rat.

Les vétérinaires et des centres antipoison vétérinaires ont remarqué de nombreuses intoxications aux Pyréthriinoïdes chez les chats.

✓ Fipronil (Pyrazol)

L'intoxication, due à une inhibition du récepteur GABA, conduit à des troubles de la marche, une léthargie, puis des tremblements et des convulsions. Un état de coma peut s'installer.

De nombreux essais de toxicité aiguë ont été réalisés chez le rat, la souris, le lapin et le cobaye pour le fipronil et certains de ses métabolites.

La DL₅₀ orale moyenne du fipronil, pour le rat, est de 97 mg/kg, Elle augmente pour la plupart des métabolites (de 83 à 467mg/kg).

Des essais de toxicité aiguë par voie respiratoire chez le rat ont permis de calculer une DL₅₀ de 0,39 mg/L pour le fipronil.

Des essais de toxicité cutanée ont montré qu'une dose de 2 g/kg n'entraînait aucune toxicité pour le rat, alors que chez le lapin, la toxicité cutanée du fipronil s'observe pour une DL₅₀ de 354 mg/kg. Pour cette substance, de nombreuses intoxications chez les chats et les chiens ont été relevées par les centres de pharmacovigilance et les vétérinaires (même lors d'utilisations en conditions normales). [39].

Le Tableau 1.6 présente, pour chacune des substances retenues, les symptômes d'intoxication aiguë, ainsi que les DL₅₀ et CL₅₀ retrouvées dans la littérature.

Tableau 1.6 : Récapitulatif de la toxicité aiguë expérimentale des 5 substances [11].

Substance (famille)	Symptômes / Effets toxiques	DL ₅₀ orale minimum (mg/kg)	DL ₅₀ cutanée minimum (mg/kg)	CL ₅₀ minimum (mg/L)	Classe OMS
Lindane 58-89-9 (Organochlorés)	Troubles SNC, hépatiques, embryofœtaux, immunologiques et rénaux Irritations (peau, muqueuses)	88 (rat) 72 (souris)	900 (rat)	NR	II
Dichlorvos 62-73-7 (Organophosphorés)	Inhibition de l'acétylcholinestérase Neuropathies	10 (lapin) 17 (rat) 100 (chien)	107 (rat)	NR	Ib
Propoxur 114-26-1 (Carbamates)	Inhibition de l'acétylcholinestérase Neuropathies	100 (rat)	800 (rat)	NR	II
Tetraméthrine 7696-12-0 (Pyréthroïdes)	Troubles SNC, Hyperexcitation Choréoathétose, Hypersalivation	4640 (rat)	NR	2,5 (rat)	Sans risque prévisible
Fipronil 120068-37-3 (Pyrazolés)	Troubles de la marche, léthargies Troubles SNC	97 (rat)	2 (rat) 354 (lapin)	0,39 (rat)	II

Troubles SNC = tremblements, convulsions, coma.

NR= Non renseignée

7.2.1.2.Toxicité subchronique et chronique expérimentale

Les différentes familles d'insecticides étudiées ont été testées sur des animaux pour déterminer les effets qu'ils induisent lors d'une exposition chronique.

✓ **Organochlorés**

Lors d'une exposition chronique aux organochlorés, les principaux effets rencontrés sont hématologiques, rénaux, immunologiques ainsi que des lésions hépatiques et des troubles de la reproduction.

Le système nerveux central est une des cibles de la toxicité du lindane. Les effets rapportés aux plus faibles doses chez l'animal sont des convulsions, pour des expositions orales chroniques et subchroniques. Les LOAEL (Lowest observed adverse effect level) orales les plus basses rapportées dans la littérature sont de l'ordre de 10 mg/kg/j.

Les effets rénaux (inflammation et augmentation du poids du rein) du lindane chez le rat ont été mis en évidence pour des LOAEL orales de 2 à 20 mg/kg/j. Des LOAEL orales de 22 à 25 mg/kg/j ont été observées chez le rat, pour une diminution de certains paramètres hématologiques (concentration en hémoglobine et nombre de leucocytes, érythrocytes), pour une exposition de 1 mois.

La réponse immunologique (production d'anticorps) semble être diminuée chez plusieurs espèces animales (rat, souris, lapin) après une exposition subchronique au lindane. Les effets apparaissent pour des doses plus faibles et une LOAEL de 0,012 mg/kg/j a été identifiée.

Le lindane est cancérigène par voie orale chez la souris. Les tumeurs les plus souvent rapportées concernent le foie. Toutefois, des tumeurs pulmonaires ont également été mises en évidence dans une étude. Les quantités de toxique varient de 13 à 34 mg/kg/j chez la souris et de 50 mg/kg/j chez le rat (exposition de 18 à 26 mois). Certains auteurs estiment que les métabolites du lindane sont en partie responsables de l'activité cancérigène.

Les tests de mutagenèse sont généralement contradictoires et aucun effet tératogène n'a été mis en évidence. D'une manière générale, les mécanismes d'action conduisant à la toxicité des organochlorés ne sont pas tous élucidés.

✓ Organophosphorés

Les organophosphorés sont à l'origine de troubles neurologiques. Certains composés ont une toxicité testiculaire. Certaines études portant sur l'animal montrent que l'exposition à certains organophosphorés pendant la gestation et en période post-natale affecte le développement neurologique et est responsable d'une diminution du poids de naissance ainsi que d'une altération de la croissance. Mais ils ne sont pas reconnus comme mutagènes. Les études de cancérogenèse animale sont négatives, sauf pour le dichlorvos qui a provoqué l'apparition de cancers (adénome pancréatique, leucémie et cancer de l'estomac) chez l'animal. [38].

Le dichlorvos présente une LOAEL orale pour des effets neurologiques de 2,5 mg/kg/j pour le rat, 10 mg/kg/j pour souris et 3,2 mg/kg/j pour le chien lors d'une exposition de 2 ans par la nourriture.

La NOAEL (No observed adverse effect level) par inhalation est de 0,05 mg/m³/j pour une exposition de 2 ans. Des cancers apparaissent pour une exposition de 20-40 mg/kg/j, 5 jours/semaine durant 103 semaines chez la souris (cancer de l'estomac). Chez le rat, des cancers du pancréas, des leucémies et des fibroses mammaires apparaissent pour une exposition de 4-8 mg/kg/j ,5 jours/semaine pendant 103 semaines. [41]

✓ **Carbamates**

Les études de cancérogenèse et de tératogenèse chez l'animal sont négatives. [38].

✓ **Pyréthrinoïdes**

Les pyréthrinoïdes sont très peu tératogènes et mutagènes. [38].

Aucune valeur de LOAEL/NOAEL n'a été trouvée pour le propoxur et la tétraméthrine.

✓ **Fipronil (Pyrazol)**

Pour de nombreux animaux (rats, chiens, souris), l'exposition orale à moyen terme et long terme au fipronil et à certains de ses métabolites est responsable :

- de diminutions de la consommation d'aliments, du poids corporel ou de gain de poids corporel ;
- d'augmentations de la masse du foie avec dégénérescence des hépatocytes, de la masse de la thyroïde (pour le rat seulement), de certains paramètres sanguins hématologiques et biochimiques ;
- d'effets neurotoxiques : agressivité, hypersalivation, convulsions, tremblements et irritabilité.

Les effets neurotoxiques sont observés après administration orale de fipronil selon les doses suivantes :

- LOAEL de 10 mg/kg/j dans une étude de 90 jours sur le chien ;
- NOAEL de 0,2 mg/kg/j et LOAEL de 1 mg/kg/j pour une étude de 1 an sur le chien ;
- NOAEL de 0,07 mg/kg/j pour le rat pour une étude de 90 jours ;
- NOAEL comprise entre 0,019 et 0,025 mg/kg/j chez le rat pour une étude de 2 ans.

Les mêmes effets sont observés chez le rat et la souris, pour des doses de métabolites administrées inférieures à celles du fipronil (LOAEL de 1 mg/kg/j et NOAEL entre 0,025 et 0,032 mg/kg/j dans des études de 28 jours et 90 jours).

Les études de tératogenèse et de mutagenèse sont négatives ; cependant, des tumeurs d'origine non mutagène sont observées à forte dose. [38 et 39].

7.2.2. Toxicité des pesticides chez l'Homme

Les connaissances sur les liens entre santé et exposition aux pesticides reposent principalement sur des données issues d'études menées en milieu professionnel ou dans un contexte professionnel, y compris auprès d'enfants dont les parents auraient été exposés à des pesticides du fait de leur activité professionnelle. Quelques études écologiques permettent d'aborder en population générale, les éventuels liens entre pesticides et santé.

Ainsi, même si documenter les relations entre une exposition aux pesticides et certaines pathologies paraît difficile, il semble que les effets chroniques des pesticides sur la santé humaine seraient principalement des cancers, des troubles de la reproduction et des troubles neurologiques, et dans une moindre mesure d'autres pathologies comme des troubles de l'immunité, des troubles ophtalmologiques, des pathologies cardiovasculaires, des pathologies respiratoires et des troubles cutanés [42; 43; 44 et 45].

Malgré tout, ces intoxications aiguës, quoique rares, ne sont pas exclues du milieu domestique. Elles peuvent résulter de manœuvres accidentelles ou d'une utilisation imprudente des insecticides et les enfants en sont souvent les premières victimes.

7.2.2.1. Toxicité aiguë chez l'Homme

Les intoxications aiguës associées à l'ingestion d'aliments contaminés par des pesticides sont rares et dues à des erreurs de manipulation, des fraudes ou à l'utilisation de pesticides non indiqués pour certaines cultures [46].

Les intoxications professionnelles touchent les personnes manipulant des pesticides depuis leur fabrication jusqu'à leur utilisation. Les voies de contamination sont essentiellement respiratoires, transcutanées et cutano-muqueuses.

Le tableau 1.7 qui suit illustre quelques signes et symptômes causés par des insecticides.

Tableau 1.7: Signes et symptômes rapportés dans certains cas d'intoxication aux insecticides [47]

Signes et symptômes les plus fréquents lors d'une intoxication aux insecticides	Signes et symptôme lors d'une intoxication modérée à sévère aux insecticides
<ul style="list-style-type: none"> - Maux de tête - Nausées - Vomissements - Etourdissements - Fatigue - Perte d'appétit - Irritation cutanée ou oculaire 	<ul style="list-style-type: none"> - Crampes abdominales - Diarrhée - Nervosité - Transpiration excessive - Difficulté d'attention - Troubles de vision - Difficultés respiratoires - Convulsions et coma

7.2.2.2. Toxicité chronique chez l'Homme

✓ Organochlorés

Les principaux effets reportés chez l'homme dans le cas d'expositions à long terme (quelques mois à toute la vie) aux organochlorés sont essentiellement des effets hépatiques et des effets endocriniens.

Le chlordécone, le lindane ou la dieldrine, sont impliqués dans des perturbations de l'équilibre hormonal chez l'homme ou chez la femme [47].

Des effets cancérogènes sont fortement suspectés et investigués aujourd'hui par la communauté scientifique, en particulier, les lymphomes non hodgkiniens (LNH), les leucémies, les sarcomes des tissus mous, les cancers du pancréas, du poumon, du sein.

Le lindane, comme facteur de risque des LNH, des cancers de la prostate et des cancers du sein, est particulièrement étudié mais les résultats sont toujours équivoques du fait de nombreux facteurs de confusion (exposition à des cocktails) [47]. Ces études ne permettent généralement pas de conclure sur l'incrimination de telle ou telle molécule organochlorée ni sur la réalité d'une relation causale entre l'exposition aux organochlorés et certains cancers hormonodépendants [47] [12] et [38].

✓ Organophosphorés

Chez l'homme, les effets à long terme d'une exposition chronique chez les professionnels sont discutés : certains auteurs ont décrit un syndrome neuropsychique alliant troubles de l'humeur, céphalées, asthénie et baisse de la libido avec des anomalies de l'électroencéphalogramme et de l'électromyogramme, d'autres études n'ont pas retrouvé d'effets significatifs. Certaines mettent également en évidence une diminution de la vitesse de conduction au niveau des nerfs moteurs

et sensitifs, ainsi qu'une diminution des seuils de sensibilité thermique et vibratoire, combinés à une baisse des capacités de mémorisation, d'abstraction et d'attention. Des liens ont été établis entre une exposition chronique aux organophosphorés et l'apparition de LNH et de leucémies [47].

Chez l'homme, les effets cancérigènes d'une exposition des agriculteurs à certains carbamates sont suspectés, notamment dans le cas des LNH. [38].

✓ **Pyréthroïdes**

Les produits évalués par le CIRC ont été classés dans le groupe 3 (cancérogénicité non évaluable) ; les pyréthroïdes sont très peu tératogènes et mutagènes. Aucun effet chronique n'a été décelé chez l'Homme à l'heure actuelle. [38].

✓ **Fipronil (Pyrazol)**

Les intoxications chroniques concernent majoritairement des professionnels mais aussi des particuliers dont l'habitat ou l'animal ont été traités par des produits à base de fipronil. Les symptômes décrits sont des réactions allergiques, des forts taux de fipronil dans le sang, des neuropathies, des douleurs musculaires, gastriques, des urticaires généralisés, des prurits. Le fipronil est classé "cancérigène humain possible avec mis en évidence limitée sur animal" par l'US EPA (classe C). [39].

8. Revues de littérature et expertises collectives

La revue de littérature de Blair souligne les liens entre exposition agricole et cancer : lymphome non hodgkinien (LNH), cancer de la prostate, leucémie, cancer du pancréas, sarcome des tissus mous, cancer du poumon, cancer du sein, cancer de la peau, cancer des ovaires [48].

La revue de littérature de Dich souligne que seul un nombre limité d'études concerne le lien entre pesticides et cancer chez l'homme. Cependant, certaines associations positives sont relevées : sarcomes des tissus mous, lymphomes, LNH, leucémies. [49]

Le tableau 1.8 suivant résume les éléments de la revue de littérature d'Alavanja sur les effets sanitaires d'une exposition chronique aux pesticides. Selon cette revue de littérature, les études épidémiologiques mettent en évidence un éventuel lien entre agriculture ou exposition à des pesticides et LNH, leucémies, myélomes multiples, cancers de la prostate, du pancréas, du poumon, de l'ovaire et la maladie de Hodgkin. Les observations ne permettent pas de conclure à l'association avec les cancers suivants : foie, rein, rectum, sein, testicule, sarcomes des tissus mous, cerveau et SNC (Système nerveux central), estomac, utérus. [50].

Tableau 1.8 : Principales associations mises en évidence entre santé et exposition chronique à des pesticides [50].

effets sanitaires	force de la relation avec activité agricole ou exposition à des pesticides	pesticides en cause
LNH	majorité d'études épidémiologiques montrant le lien avec activité agricole et/ou application de pesticides mais RR (Risque relatif) < 2 la recherche du lien avec un pesticide en particulier donne des résultats d'absence de lien	acide phénoxyacétique organochlorés organophosphorés carbamates fumigants fongicides
leucémies	majorité d'études épidémiologiques montrant le lien avec activité agricole et/ou exposition à des pesticides mais RR < 1,5 ; la recherche du lien avec un pesticide en particulier donne des résultats d'absence de lien	organochlorés organophosphorés carbamates
myélomes multiples	majorité d'études épidémiologiques montrant excès de risque mais faible	pesticides
cancer de la prostate	majorité d'études épidémiologiques montrant une association avec exposition aux pesticides ou activité agricole, mais RR < 1,5	organochlorés organophosphorés triazines thiocarbamates fumigants
cancer du pancréas	quelques études associant utilisation de pesticides ou production de pesticides mais pas toutes	DDT fongicides
cancer du poumon	associé à l'exposition aux composés arsenicaux autres pesticides non clairement associés	composés arsenicaux acides phénoxyacétiques contaminants des acides phénoxyacétiques (furanes, dioxines...)
cancer de l'ovaire	deux études CT (Cas-témoins) suggèrent association avec triazines et l'étude de l'AHS (Agricultural health study)	triazines
maladie de Hodgkin	plus de 30 études épidémiologiques faible lien mais non significatif en population agricole	DDT acides phénoxyacétiques

Selon la revue de littérature de Zahm, les cancers plus fréquemment retrouvés chez les personnes exposées professionnellement aux pesticides sont : cancers des lèvres, du poumon, de l'estomac, de la prostate, du cerveau, des testicules, les sarcomes des tissus mous, les mélanomes et autres cancers cutanés, le LNH, la maladie de Hodgkin, les myélomes multiples et les leucémies. En population générale, les cancers de l'adulte associés à une exposition environnementale aux pesticides sont principalement des tumeurs cérébrales. Chez les enfants, il s'agit notamment de tumeurs cérébrales et d'hémopathies malignes. [51].

La revue de littérature de Baldi présente une synthèse des effets retardés des pesticides sur la santé, en tenant compte de la diversité des effets étudiés. Ces effets sont les cancers, les pathologies neurologiques et les troubles de la reproduction. Baldi note que les hémopathies malignes ont été particulièrement étudiées. Ces travaux indiquent une association possible entre pesticides et LNH, tricholeucocytose, myélomes multiples. Parmi les cancers des tissus mous, les associations entre pesticides et tumeurs sont inconstamment retrouvées. Les divergences entre les résultats de ces études seraient liées à plusieurs difficultés méthodologiques : latence entre exposition et apparition de la maladie de 15 à 30 ans ; mesures rétrospectives de l'exposition plus ou moins affinées mais toujours imparfaites ; multiplicité des produits utilisés et diversité des modes d'application ; rareté de certaines localisations cancéreuses. Concernant la maladie de Parkinson, même si certaines études cas-témoins sont en faveur d'une association entre exposition aux pesticides et maladie de Parkinson, des contradictions persistent entre les études épidémiologiques sur ce lien qui ne permettent pas de conclure formellement sur ce lien. Les études sur les liens entre l'exposition à des pesticides et d'autres pathologies ou troubles ne permettent pas de conclure à une association. [38]

La revue de littérature menée par Doherty au sujet de la neuropathogénicité des pesticides indique que seule une association entre organophosphorés et neuropathies a été mise en évidence. Les résultats divergents d'autres études ne permettent pas de conclure à un lien entre maladie de Parkinson et certains pesticides (paraquat, manèbe, roténone, organochlorés), et entre sclérose amyotrophique latérale et acides phénoxyacétiques chez les salariés d'usine de production de pesticides et chez les travailleurs agricoles. Enfin, la maladie d'Alzheimer, l'autisme et les troubles psychiatriques ne semblent pas associés à une exposition aux pesticides. [52].

Plus récemment, une nouvelle analyse de la littérature menée par Baldi compare les observations des méta-analyses de Blair en 1992 et Acquavella en 1998. La figure suivante présente cette comparaison. Les résultats de ces deux méta-analyses sont concordants, sauf pour le mélanome malin. Le risque de cancer en milieu agricole est dans l'ensemble moindre qu'en population générale, à l'exception des cancers suivants : cancer de la peau (probablement du fait de l'exposition plus élevée au soleil), de l'estomac, du cerveau, de la prostate ; LNH, myélomes multiples, leucémies et maladie de Hodgkin. [53]

9. Toxicité chronique chez l'enfant

La revue de littérature menée par Daniels indique que des liens sont possibles entre une exposition parentale aux pesticides (professionnelle et domestique) et certains cancers de l'enfant, notamment les cancers du SNC, du cerveau en particulier, et les leucémies [54]. La revue de littérature de Sanborn précise que différentes études montrent un lien entre l'exposition parentale aux pesticides et différentes tumeurs solides (cerveau, rein), leucémies et LNH, des effets sur le développement neurologique notamment [55].

Selon la revue de littérature de Nasterlack à partir d'études publiées entre 1998 et 2004, une augmentation du risque de cancer de l'enfant en cas d'exposition aux pesticides est suggérée mais n'est pas formelle, ce qui serait notamment lié au fait que l'exposition aux pesticides est catégorisée en « toujours » contre « jamais » dans notion de durée ou d'intensité d'exposition [56]. Malgré la nécessité d'approfondir les observations, la revue de littérature de Turner met en évidence un lien entre leucémie de l'enfant et exposition domestique aux pesticides [57]. La revue de littérature de Métayer rapporte une association positive entre leucémie de l'enfant et usage domestique de pesticide ; le lien est moins net lorsque les expositions domestiques et environnementales sont associées [58].

L'étude de cohorte menée par Meinert en Allemagne indique un lien entre leucémie de l'enfant et le fait de vivre dans une ferme, ainsi qu'entre lymphome de l'enfant et l'usage domestique de pesticides ou le fait que les parents travaillent dans le contrôle des organismes nuisibles [59].

Menée dans quatre Etats de l'est des USA (United States American) auprès d'enfants nés entre 1993 et 1997, une étude cas – témoins a montré un léger sur-risque de cancer du cerveau chez les enfants dont les parents ont été exposés professionnellement ou au domicile à des pesticides [60]. Une autre étude cas – témoins menée en Californie du Nord, suggère une association entre leucémie de l'enfant et exposition environnementale à des pesticides utilisés en agriculture [61]. Egalement menée en Californie du Nord, une étude cas - témoins indique que l'exposition aux pesticides domestiques est associée à un risque élevé de leucémie infantile [62].

Une étude cas – témoins du groupe d'études des cancers de l'enfant, avait montré un risque plus élevé de leucémie aiguë non-lymphocytaire chez les enfants dont les parents sont exposés professionnellement aux pesticides [63]. Plus récemment, ce même groupe d'études a mis en évidence un risque plus élevé de LNH en cas d'utilisation domestique de pesticides et d'exposition post-natale [64].

Cependant, une étude cas – témoins menée au Texas auprès d'enfants atteints de cancer entre 1990 et 1998, utilisant la distance entre lieu de résidence à la naissance et cultures agricoles comme indicateur d'exposition aux pesticides, n'a pas montré de lien entre cancer et pesticides, sauf pour les tumeurs des cellules germinales. Cette étude suggère un lien entre proximité avec des cultures et LNH ainsi que lymphome de Burkitt [65].

Cependant, une autre étude cas – témoins n'a pas mis en évidence un lien entre exposition aux pesticides des parents et tumeurs des cellules germinales de l'enfant [66]. De même, mais probablement du fait d'un manque de puissance de l'analyse, l'étude de cas groupés de leucémie de l'enfant dans le comté de Churchill au Nevada, n'a pas montré de relation entre exposition environnementale et leucémie [67].

Enfin, une étude écologique menée au Brésil a mis en évidence un lien entre utilisation parentale de pesticides et prématurité, petit poids de naissance et mort foetale [68].

CHAPITRE 2: LA SPIRULINE

1- Définition

La spiruline est considérée comme une algue bleu-verte planctonique microscopique souvent de forme spiralée, ce pour plusieurs raisons [69] :

- Son habitat : aquatique,
- La présence d'un système photosynthétique producteur d'oxygène.
- Son aptitude à développer des biomasses importantes.
- Sa morphologie proche de celle des algues.
- Sa couleur liée à sa teneur en pigments bleu (phycocyanine) et vert (chlorophylle).

Plus précisément c'est une cyanobactérie filamenteuse, c'est-à-dire une bactérie réalisant la photosynthèse (présence de chlorophylle). Née il y a plus de 3 milliards et demi d'années si l'on en croit les traces de cyanobactéries trouvées dans des stromatolithes en Afrique du sud. [70].

Il existe à ce jour 200 genres et environ 1500 espèces de cyanobactéries connues étant très difficiles à détecter, il en reste sans doute encore beaucoup à découvrir [71]. Les scientifiques étudiant la spiruline ont donc d'abord pensé qu'il existait de nombreuses espèces d'*Arthrospira* ; en fait, l'analyse de leurs caractéristiques génétiques, effectuées par Scheldeman et *al.* en 1999, basées sur l'ARDA n'a fait apparaître que deux espèces presque identiques d'*Arthrospira*. Ils supposent donc que de ces deux espèces dérivent plusieurs souches. C'est deux espèces sont : *Arthrospira platensis* initialement originaire du Kanem (Tchad) et *Arthrospira geitleri* ou *maxima*, originaire du Mexique [72].

La spiruline est la plus connue de toutes ; d'un point de vue taxonomique elle appartient à : [73]

Règne: Monera;

Sous règne: Procaryota; Phylum: Cyanophyta

Classe: Cyanophyceae

Ordre: Nostocales; Famille: *Oscillatoriacelae*;

Genre: *Arthrospira*.

Espèce et sous-espèce: *A. Platensis*, *A. Maxima*, *A. Toliara*, *A. Lonar*, *Crater Mexicana*, *Paracas* etc.

2 –Caractéristiques structurales

Les cyanobactéries peuvent être unicellulaires ou pluricellulaires; dans ce dernier cas, leurs cellules s'arrangent en amas de type colonies ou, le plus souvent, en filaments composés de cellules alignées (ces filaments sont appelés trichomes). C'est trichomes sont hélicoïdales, observables uniquement en milieu liquide, et ils sont caractéristiques du genre. C'est d'ailleurs de là que la spiruline tient son nom [74].

La taille des cellules de cyanobactéries se situe généralement entre 1 et 10 microns [75]. Leur paroi est de type Gram-négatif classique. Ce sont de vrais procaryotes (organismes dépourvus de membrane nucléaire), malgré leur système photosynthétique proche de celui des eucaryotes [76].

L'espèce *Spirulina platensis* est la plus connue et la plus utilisée lors des travaux de recherche ou lors de l'ensemencement de nouvelles cultures. Elle se compose de trichomes un peu rétrécis au niveau des articulations (figure 2.1). Les tours de spire ont un diamètre de 20 à 50 μm , diminuant légèrement vers les extrémités.



Figure 2.1: *Spirulina platensis* observée au microscope [72].

Par contre l'espèce *Spirulina maxima* se caractérise par des trichomes légèrement effilés aux extrémités et ne rétrécissent pas au niveau de l'extrémité.ils forment une spire régulière de 3 à 8 tours et de 40 à 60 μm de diamètre (figure 2.2).



Figure 2.2: Filaments des deux espèces de spiruline observés au microscope optique [77].

3– Croissance et reproduction de la spiruline

La spiruline est une cyanobactérie photo-autolitotrophe aérobie, grâce à ces pigments chlorophylliens. Contrairement aux photo-autolitotrophes anaérobies qui n'ont que le photosystème I, elle est dotée des photosystèmes I et II [78]. Pour sa photosynthèse, la spiruline a besoin d'eau, de carbone, et d'éléments nutritifs dont l'azote en particulier. Elle assimile une source de carbone minéral (le CO₂ atmosphérique) et la convertit en énergie biochimiquement utilisable représentée par le glucose. Son point commun avec les autres cyanobactéries est qu'elle ne possède pas le cycle de Krebs complet [71].

Le mode de reproduction de la spiruline est la bipartition par scission simple. C'est une reproduction asexuée, par segmentation des filaments, ce processus ne doit pas être confondu avec la mitose, laquelle n'existe que chez les eucaryotes. Sa vitesse de multiplication est particulièrement rapide dès que la température dépasse 30°C à l'ombre, lorsque ces conditions sont réunies et que le milieu est favorable, le temps de génération est très court (7 heures).

4 –Aspects et intérêts nutritionnels de la spiruline

L'intérêt d'un aliment dans un programme de nutrition consiste d'une part en sa composition d'éléments nutritifs (nutriments, oligoéléments, etc.), et d'autre part en son innocuité et sa digestibilité. Pour ça, différentes analyses approfondies sur la spiruline ont été effectuées, montrant de nombreux points sur le plan nutritionnel à savoir sa composition protéique équilibrée, présence de lipides essentiels rares, de nombreux minéraux et vitamine [79].

La spiruline semble actuellement l'une des meilleures solutions pour la production simple d'un complément alimentaire de haute qualité. Mentionnons aussi que les conditions extrêmes (salinité et pH) dans lesquelles la spiruline se développe assurent l'hygiène des cultures, car bien peu d'autres micro-organismes sont capables de survivre dans de telles conditions.

Les différentes méthodes de culture, récolte, séchage et conservation des échantillons influencent davantage les écarts de composition biochimique de la spiruline [80].

4 –1. Analyse nutritionnelle qualitative et quantitative

4 – .1.1.Protéines

La teneur en protéines de la spiruline varie entre 50 et 70% de sa masse sèche [71 ;81].

La spiruline possède la plupart des acides aminés dont les acides aminés essentiels représentent 47% du poids totales des protéines [82].

Ce micro-organisme ne possède pas de paroi cellulosique mais une enveloppe relativement fragile, constituée de polysaccharides. Cette faible teneur en cellulose explique sa digestibilité de l'ordre de 75 à 83% [83]. De ce fait, la spiruline ne nécessite pas de cuisson ni des traitements spéciaux pour rendre ces protéines accessibles, de surcroît, l'utilisation protéique nette de la spiruline est estimée entre 53 et 61%-soit 85 à 92% de celle de la caséine [84].

4 –1.2. Lipides

4 –1.2.1. Lipides totaux

Le pourcentage des lipides totaux est compris entre 6 et 13 % du poids sec en spiruline.

Ils se subdivisent en deux fractions: une fraction saponifiable «ou acides gras» (83%) et une fraction insaponifiable (17%) [81].

4 –1.2.2. Acides gras

Avec quelques huiles végétales peu connues comme l'huile d'orange, de bourrache, de cassis, la spiruline figure parmi les meilleures sources d'acides gras essentiels [85] (L'acide gamma-linolénique en constitue 10 à 20% des acides gras chez *Spirulina maxima* et jusqu'à 40% chez *S. platensis*) [86].

L'importance de ces acides gras essentiels tient à leur devenir biochimique : ce sont les précurseurs des prostaglandines, des leukotriènes et des thromboxanes qui sont des médiateurs chimiques des réactions inflammatoires et immunitaires (Flaquet, 2006).

Après le lait maternel la spiruline est l'aliment naturel le plus riche en acides gras. [84].

4 – 1.2.3.Fraction insaponifiable

Elle est composée de stérols, de terpènes et de paraffines. Certains de ces stérols pourraient partiellement expliquer l'activité antimicrobienne de la spiruline [81].

4 – 1.3.Glucides

Les hydrates de carbone, ils représentent une bonne part dans la composition des spirulines, entre 15 et 25 %, avec, fait important, une teneur en cellulose très basse (0,5 à 0,7 %), ce qui constitue un facteur favorable à l'efficacité alimentaire des protéines [87].

Du point de vue nutritionnel, la seule substance glucidique intéressante par sa quantité chez la spiruline est le méso- inositol phosphate qui constitue une excellente source de phosphore organique ainsi que d'inositol (350- 850 mg/kg mat. sèche) [88].

4 – 1.4.Acides nucléiques

La dégradation biochimique des composants (les purines : adénine et guanine) des acides nucléiques conduit à la production d'acide urique. A un taux élevé l'acide urique produit à la longue des calculs rénaux et des crises de goutte.

Généralement la dose maximum admissible à long terme d'acides nucléiques est autour de 4 g par jour pour un adulte [89]. Chez *S. Platensis* comme chez *S. Maxima*, on rapporte des valeurs de 4.2 à 6% d'acides nucléiques totaux dans la matière sèche [90 ; 91].

A une moyenne de 5% du taux en acides nucléiques chez la spiruline, la limite quotidienne de 4 grammes d'acides nucléiques représente le contenu de 80 grammes de spiruline sèche. Cette quantité équivaut à environ huit fois la dose de spiruline recommandée comme supplément alimentaire. On peut donc raisonnablement penser que la teneur en acides nucléiques de la spiruline ne pose pas de problèmes, même à long terme et pour des doses élevées [92].

4 – 1.5.Vitamines

La spiruline contient une large gamme de vitamines (Tableau 2.1):

On note une teneur très élevée en bêta-carotène. Cette provitamine A représenterait 80% des caroténoïdes totaux [93], le reste étant principalement composé de xanthophylle, de crypto xanthine, d'echinénone, de zéaxanthine et de lutéine.

Une étude récente de Wang et *al.* (2008) portant sur des chinois adultes montre que l'ingestion de 4.5 mg de β -carotène provenant de la spiruline apporte 1mg de vitamine A.

Même si la teneur en vitamine E de la spiruline est insuffisante pour satisfaire l'apport journalier recommandé, ses propriétés anti-oxydantes pour les acides gras insaturés expliquent la bonne conservation de ces derniers dans la spiruline séchée. Parmi les vitamines hydrosolubles, on note la présence de vitamines du

groupe B. la spiruline est l'une des seules sources d'origine végétale disponibles, contient quatre fois plus de vitamine B12 que le foie de bœuf cru, longtemps donné comme sa meilleure source. Cette teneur exceptionnelle la fait recommander aux personnes atteintes d'anémie pernicieuse [94].

Tableau 2.1: Teneur en vitamines en µg/g de matière sèche de spiruline d'après [80]

Vitamine	teneur	vitamine	teneur
Vitamines hydrosolubles		Vitamines liposolubles	
B1 (thiamine)	34-50	Provitamine A (b- carotène)	700-1700
B2 (riboflavine)	30-46	cryptoxanthine	100
B3 (niacine)	130	Vitamine E (alpha-tocophérol)	50-190
B5 (pantothénate)	4,6-25		
B6 (pyridoxine)	5-8		
B8 (biotine)	0,05		
B9 (folate)	0,5		
B12 (cobalamine)	0,10-0,34		
C (acide ascorbique)	traces		

4 – 1.6.Pigments et enzymes

L'origine de la couleur de la spiruline vient des différents pigments, d'où son surnom d'arc-en-ciel. Ces pigments sont :

La chlorophylle, le plus visible des pigments de la spiruline, c'est une molécule verte commune aux plantes, capable de capter l'énergie de radiations solaires-son taux d'environ 1% est l'un des plus élevés que l'on puisse trouver dans la nature [73].

La phycocyanine, d'après Vonshak, (1997), la fraction protéique pourrait contenir jusqu'à 20 % de phycocyanine. La phycocyanine aurait une activité anti-tumorale, elle induirait un mécanisme d'apoptose (autodestruction) des cellules cancéreuses [95]. Elle aurait aussi une activité antioxydante [96 ; 97]. En outre, la forte teneur en ce pigment pourrait être d'un grand intérêt industriel.

Les caroténoïdes, sont la plupart des provitamines A et sont indispensables aux humains et aux animaux. La spiruline est l'un des aliments les plus riches qui soit en bêta carotène- elle en contient entre 20 et 25 fois plus que la carotte.

Parmi les enzymes identifiées de la spiruline, il ya principalement le superoxyde dismutase ou SOD, qui joue un rôle d'antioxydant primaire, éliminant facilement les radicaux libres primaires dès leurs formation, avec une teneur d'environ 1,5 millions d'unités / kg de spiruline sèche [98].

4 – 1.7.Minéraux et oligoéléments

En quantités importantes de minéraux, on trouve :

Le fer, avec sa biodisponibilité élevée, il fait de la spiruline une source de fer particulièrement adéquate pour les femmes enceintes souvent anémiées. [99].

Du magnésium, du calcium, du phosphore, du zinc et le sélénium, en quantités comparables à celles trouvées dans le lait. Les quantités relatives de ces éléments sont équilibrées ce qui exclut le risque de décalcification par excès de phosphore. [80].

Les différents minéraux qui composent la spiruline sont mis en exergue dans le tableau 2.2 qui va suivre.

Tableau 2.2 : Composition en minéraux de la Spiruline cultivée en µg/g de sa matière sèche d'après [80].

Minéraux	Teneur (µg/g)	Minéraux	Teneur (µg/g)
Calcium	1300-14000	Cuivre	8-10
Phosphore	6700-9000	Chrome	2.8
Magnésium	2000-2900	Manganèse	25-37
Fer	580-1800	Sodium	4500
Zinc	21-40	Potassium	6400-15400

5– Effets secondaires et de surdosage lié à la consommation de la spiruline

Malgré sa richesse en nutriments, en micronutriments et sa digestibilité, la spiruline reste toujours un aliment, qui peut présenter des effets secondaire lors d'un surdosage [80] :

- Teneur en acides nucléiques : les complications dues à des taux élevés d'acide urique à long terme produits des calculs rénaux et de la goutte.
- Vitamines A : présente une toxicité à une forte dose, contrairement à son précurseur le bêta-carotène (présent dans la spiruline), qui est éliminé sans risque de surdosage quelque soit sa concentration et l'organisme ne transforme en vitamine A que la quantité nécessaire de bêta-carotène.
- Toxicités des minéraux : la spiruline comme toute algue absorbe les métaux lourds (plomb, mercure, arsenic, fluor) présents dans les milieux de culture. Ces problèmes de toxicité (d'après Falquet, 2006) semblent inexistantes pour la spiruline cultivée en milieu artificiel. Il reste donc fortement conseillé d'effectuer des contrôles sur les teneurs en métaux lourds des spirulines destinées à l'alimentation humaine.
- Cyanotoxine: produite par d'autres algues, qui envahissant le milieu de culture de la spiruline agit sur le système nerveux et le foie. Cette contamination peut être évitée dans le cas de la spiruline cultivée.

- Contamination microbiologique : est due aux mauvaises conditions et règles d'hygiène de culture de spiruline, que certains microbes pathogènes introduits dans le milieu deviennent résistants au pH élevés. Une analyse bactériologique de vérification devrait être faite sur le produit fini de temps en temps. En raison des risques de contamination après récolte, une pasteurisation du produit fini peut être nécessaire.

6- La spiruline dans la pharmacopée

Quelques études cliniques suggèrent, en effet, des effets thérapeutiques tels que :

L'effet contre l'hyperlipidémie (réduction du cholestérol sanguin) par la spiruline.

Confirmée par les essais réalisés sur l'homme, qui avec un régime régulier à la Spiruline de 4,2 g / jour pendant 4 semaines engendrait une diminution du cholestérol et une baisse significative de dépôts graisseux dans les artères [100].

Effet contre des cancers par stimulation du système immunitaire et la réduction de la toxicité des reins par les métaux lourds et les drogues, grâce à la phycocyanine (pigment bleu de la spiruline) [101].

Effet sur la flore intestinale, par l'augmentation des Lactobacilles de la flore intestinale, qui facilitent la digestion et l'absorption des nutriments, protègent contre les infections et stimulent le système immunitaire [102].

La protection contre les radiations, grâce aux molécules protectrices présentes dans l'extrait de spiruline, qui agissent comme facteurs stabilisant de l'ADN [103].

Sa bonne composition en fer et en vitamine, la spiruline prévient contre l'anémie ferriprive (fer), l'anémie pernicieuse (vitamine B12), avitaminose (provitamine A).

PROBLÉMATIQUE

De par sa composition, la spiruline a des effets anticoagulants (*Spirulane Calciq*ue (Sp-Ca) et au *Spirulane-Sodique* (Sp-Na)), agit sur le système immunitaire (polysaccharides), et est un antioxydant (phycocyanine), antiviral, anti tumorale (phycocyanine), anti-inflammatoire articulaire et anti diabétique chez l'homme.

L'hypothèse que nous nous sommes proposée et que nous avons émis par l'intermédiaire de cette étude se résume à :

Immense potentiel nutritionnel qui rend possible son utilisation comme agent antioxydant et par conséquent comme un agent antitoxique pouvant limiter ou mieux inhiber totalement les effets toxiques des pesticides.

✓ Est-ce que la spiruline incorporée dans l'alimentation même à très faible dose pourrait avoir un effet inhibiteur sur les effets pouvant être provoqués, par l'insecticide ?

La réalisation de ce travail s'est déroulée à travers les étapes suivantes :

- ✓ Identification de la souche de spiruline.
- ✓ Etude des conséquences de différentes doses d'insecticide seules ou combinées à la spiruline dans l'alimentation animale sur:
 - L'alimentation (doses ingérées par les rats)
 - Fécondité des rats
 - La longévité des rats
 - Le poids des portés
 - Malformations congénitales
 - Anomalies anatomopathologiques

L'objectif ultime de ce travail reste de mettre en exergue le pouvoir antitoxique que peut jouer la spiruline sur l'insecticide.

CHAPITRE 3: MATERIEL ET METHODES

1-. Cobayes et aliments

1- 1. Cobayes

Les expériences sont réalisées sur 34 rates consanguines de l'espèce *Rattus norvegicus* fournies par l'animalerie de l'université Houari Boumediene de Bab Ezzouar. Ce sont des animaux âgés de 3 à 4 mois au moment de l'expérimentation, acclimatée avant manipulation pendant une semaine sur le lieu de l'expérimentation.

Les rats sont réparties aléatoirement en 7 groupes de 5 rates chacun. Chaque groupe est soumis à un régime différent.

1- 2. Conditions d'élevage

Les animaux sont hébergés dans une pièce convenablement aérée. Ils sont logés dans des cages en acier inoxydable qui sont nettoyées généralement deux fois par semaine, et soumises à un cycle d'environ 10 heures de lumière suivies de 14 heures d'obscurité. L'eau et la nourriture sont présentés *ad-libitum* à nos rats afin de ne pas leur générer un stress inutile.

1- 3. Choix du lot

Les lots ont été choisis fonction des paramètres suivant :

- âge
- poids
- Race

Fixer leurs paramètres d'alimentation (concentré pour rat et concentré enrichie avec 1% de spiruline (*Athrospira platensis*)).

Diviser nos lots en lot témoin et lots expérimentaux auxquels on ajoutera de la spiruline et un insecticide (**lambda-cyhalothrine**, qui appartient à la famille des **pyréthrinoïdes + primicarbe**, qui appartient à la famille chimique des **carbammates**) dans leur alimentation.

1- 4. Régimes

Toutes les rates sont nourries exclusivement avec des granulés pendant toute l'expérimentation. Les rats témoins ont reçu durant l'expérimentation un régime à base de concentré simple (voir composition nutritionnelle et schéma de fabrication et de son enrichissement en spiruline en annexe), les autres groupes ont eu des régimes différents selon le but de chaque étape expérimentale et qui vont être mis en exergue dans ce qui suit:

1- 5. Suivi des animaux

Les animaux ont été suivis durant leurs différents stades physiologiques à savoir :

1. Le stade de croissance
 - ✓ Pour faire le suivi du refus alimentaire : peser le refus alimentaire hebdomadaire.
2. Le stade de l'accouplement
 - ✓ Pour détecter la gestation des femelles : afin d'apprécier le taux de fécondité.
3. Le stade de gestation
 - ✓ Pour faire le suivi des gestations de femelles : afin de détecter des éventuelles avortements.
4. Le stade des mises bas
 - ✓ Pour suivre le bon déroulement des mises bas et détecter les éventuelles anomalies congénitales des ratons au *post partum* des femelles.
5. Le stade de l'allaitement
 - ✓ Pour faire le suivi de croissance des ratons : afin d'apprécier l'évolution du poids des ratons.

Aussi, en fin d'expérience les animaux sont sacrifiés en vue d'une dissection afin de pouvoir observer d'éventuelles anomalies sur leurs viscères.

Les 34 rats sont repartis en 7 groupes de 5 chacun comme est illustré dans la figure 3.1 qui suit :

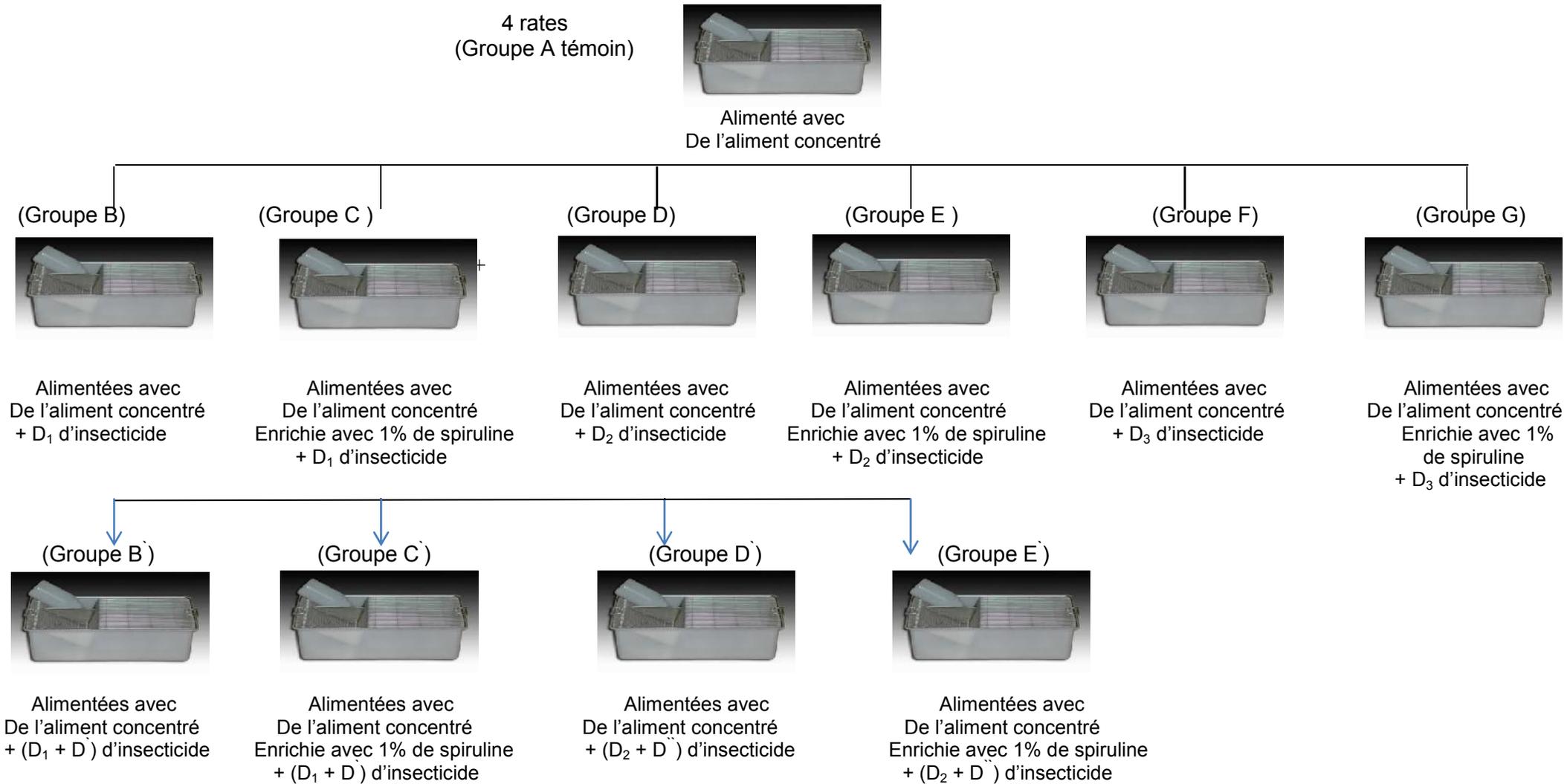


Figure 3.1: représentation de la répartition des groupes de rat selon leur régime alimentaire

Où

D_1 : 0,4 mL d'insecticide /750 mL d'eau pendant deux semaines puis nous avons augmenté la dose jusqu'à atteindre 1 mL d'insecticide /750 mL d'eau pendant les deux dernières semaines

D_2 : 0,2 mL d'insecticide /750 mL d'eau pendant deux semaines puis nous avons augmenté la dose jusqu'à atteindre 0,8 mL d'insecticide /750 mL d'eau pendant les deux dernières semaines

D_3 : 0,1 mL d'insecticide /750 mL d'eau pendant deux semaines puis nous avons augmenté la dose jusqu'à atteindre 0,6 mL d'insecticide /750 mL d'eau pendant les deux dernières semaines

$(D_1 + D_2)$: 5 mL d'insecticide /750 mL d'eau

$(D_2 + D_3)$: 2,5 mL d'insecticide /750 mL d'eau

Le tableau 3.1 qui suit illustre un récapitulatif des expériences *in vivo* effectuées sur les rates

Tableau 3.1 : Tableau récapitulatif des expériences in vivo effectuées sur les rates

Expérimentation <i>in vivo</i>	Groupes	Alimentation	Buts
Première étape	A	Alimenté avec du concentré pour rat	Observer l'effet de différentes doses d'insecticide seul ou combiné dans la ration animale avec la spiruline sur l'acceptance alimentaire des rats.
	B	Alimenté avec du concentré pour rat+ D ₁ d'insecticide	
	C	Alimenté avec du concentré pour rat Enrichie avec 1% de spiruline + D ₁ d'insecticide	
	D	Alimenté avec du concentré pour rat+ D ₂ d'insecticide	
	E	Alimenté avec du concentré pour rat enrichie avec 1% de spiruline + D ₂ d'insecticide	
	F	Alimenté avec du concentré pour rat+ D ₃ d'insecticide	
	G	Alimenté avec du concentré pour rat enrichie avec 1% de spiruline + D ₃ d'insecticide	
Deuxième étape	A	Alimenté avec du concentré pour rat	Observer l'effet d'une forte dose d'insecticide seul ou combiner dans la ration animale avec la spiruline sur longévité des rats (effet freinant de la spiruline sur le pesticide).
	B	Alimenté avec du concentré pour rat+ (D ₁ + D) d'insecticide	
	C	Alimenté avec du concentré pour rat Enrichie avec 1% de spiruline + (D ₁ + D) d'insecticide	
Troisième étape	D	Alimenté avec du concentré pour rat + (D ₂ + D) d'insecticide	Voir les différences de l'évolution des viscères des rats témoins et expérimentaux (taille, forme, couleurs ...).
	E	Alimenté avec du concentré pour rat Enrichie avec 1% de spiruline + (D ₂ + D) d'insecticide	

- ✓ Le choix du pesticide été basé sur son degré de toxicité, l'insecticide appartient à la famille des pyréthrinoïdes, perturbateurs endocriniens ils sont réputés pour leur très grande toxicité.
- ✓ Afin de provoquer une réaction de toxicité aigu chez nos cobayes nous avons administré l'insecticide en augmentant ses doses à travers le temps jusqu'à avoir les doses adéquates (D₁, D₂...ect).
- ✓ Pour la spiruline nous voulions mettre en exergue son effet antitoxique et à faible dose.

2- Analyses

Nous avons effectué des analyses physico-chimies sur le régime alimentaire des rats (le concentré). Afin d'apprécier son apport nutritionnel par rapport aux besoins nutritionnels de ces derniers.

Le contrôle physico-chimique est réalisé par le dosage de la matière minérale, les protéines brutes, la cellulose brute, de matière sèche et de la matière grasse.

2- 1. Détermination de la matière sèche

La matière sèche est la masse restante après dessiccation complète, elle est habituellement indiquée en fraction massique et elle est conventionnellement exprimée en pourcentage en masse.

❖ Principe

La teneur en matière sèche est la masse restante après dessiccation complète de la matière. Elle est conventionnellement exprimée en pourcentage massique [104].

❖ Mode opératoire

Placer le panier contenant l'échantillon dans l'étuve à 102 ± 2 °C pendant 24 h. Refroidir au dessiccateur puis peser.

❖ Expression des résultats

La matière sèche, est exprimée en pourcentage en masse qui est égale :

$$MS = ((M2-M0) / (M1-M0)) \times 100$$

Où

M0 : la masse en gramme du panier + couvercle

M1 : la masse en gramme du panier + couvercle+ la prise d'essai

M2 : la masse en gramme du panier + couvercle+ la prise d'essai sèche

2- 2. Détermination des cendres

Ce sont des substances résultantes de l'incinération de la matière sèche des fourrages exprimées en pourcentages en masse.

❖ Principe

Incinerer la matière sèche à 550 °C \pm 25 °C dans un lent courant d'air et peser le résidu obtenu.

❖ Mode opératoire

Porter au four à moufle le creuset, plus la prise d'essai d'environ 2g de l'échantillon, chauffer progressivement, afin d'obtenir une carbonisation sans inflammation de la masse : 1h30mn à 2h30mn avec une température de 550°C.

L'incinération doit être poursuivie s'il y'a lieu, jusqu'à combustion complète du carbone formé (résidu blanc ou gris clair) placer le creuset dans le dessiccateur et l'y laisser refroidir à la température ambiante. Peser à 0,1 mg près [105].

❖ Expression des résultats

Les cendres de l'échantillon, exprimées en pourcentage en masse doivent être égales à :

$$((M2-M0)/M1-M0) \times 100$$

Où

M0 : la masse en gramme du creuset

M1 : la masse en gramme du creuset+ la prise d'essai

M2 : la masse en gramme du creuset+ la prise d'essai sèche

2- 3. Dosage du phosphore total

❖ Principe

L'échantillon est minéralisé, soit par voie sèche (pour les aliments organiques), soit par voie humide (pour les composés minéraux et les aliments liquides) et mis en solution acide. La solution est traitée par le réactif vanado-molybdique. La densité optique de la solution jaune est ainsi formée est mesurée au spectrophotomètre à 430 nm.

❖ Mode opératoire [106]

1. Préparation de la solution : selon la nature de l'échantillon, préparer une solution comme indiqué en ce qui suit :

Peser, à 1 mg près, 1g ou plus de l'échantillon. Introduire la prise d'essai dans un matras de Kjeldahl, ajouter 20 ml d'acide sulfurique , agiter pour imprégner complètement la matière d'acide et éviter qu'elle n'adhère aux parois du ballon, chauffer et maintenir pendant 10 minute à ébullition. Laisser refroidir légèrement, ajouter 2 mL d'acide nitrique, chauffer doucement, laisser refroidir légèrement, ajouter de nouveau un peu d'acidenitrique et porter à ébullition. Répéter ces opérations jusqu'à obtention d'une solution incolore. Refroidir, ajouter un peu d'eau, transvaser le liquide dans un ballon jaugé de 500 mL en rinçant le matras à l'eau chaude. Laisser refroidir, compléter au volume avec de l'eau, homogénéiser et filtrer.

Échantillon contenant des matières organiques et exemptes de dihydrogénophosphates de calcium et de magnésium : Peser 1 mg de l'échantillon dans un creuset à incinération. Mélanger intimement la prise d'essai à 1 g de carbonate de calcium. Calciner au four à $550^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ jusqu'à obtention de cendres blanches ou grises (une petite quantité de charbon ne gêne pas).

Transvaser les cendres dans un bécher de 250 mL. Ajouter 20 mL d'eau et de l'acide chlorhydrique jusqu'à cessation de l'effervescence. Ajouter ensuite 10 mL d'acide chlorhydrique en excès. Porter le bécher sur un bain de sable et évaporer à sec pour insolubiliser la silice. Reprendre le résidu par 10 mL d'acide nitrique et faire bouillir pendant 5 minutes sur le bain de sable, sans évaporer à sec. Transvaser le liquide dans un ballon jaugé de 500 mL en rinçant le bécher à plusieurs reprises à l'eau chaude. Laisser refroidir, compléter au volume avec de l'eau, homogénéiser et filtrer.

2. Développement de la coloration et mesure de la densité optique : Diluer une partie aliquote du filtrat obtenu en 1.1 pour obtenir une concentration en phosphore atteignant au maximum $40\mu\text{g/mL}$. Introduire 10 mL de cette solution dans un tube à essai et y ajouter 10 mL du réactif vanado-molybdique. Homogénéiser et laisser reposer 10 minutes au moins à la température de 20°C . Mesurer la densité optique au spectrophotomètre à 430 nm par comparaison avec une solution obtenue par addition de 10 mL du réactif vanado-molybdique à 10 mL d'eau.
3. Courbe d'étalonnage : Préparer à partir de la solution étalon des solutions contenant respectivement 5, 10, 20, 30 et $40\mu\text{g}$ de phosphore par mL. Prélever 10 mL de chacune de ces solutions et y ajouter 10 mL du réactif vanado-molybdique. Homogénéiser et laisser reposer 10 minutes au moins à la température de 20°C . Mesurer les densités optiques dans les conditions indiquées 2.

Tracer la courbe d'étalonnage en portant en ordonnée les valeurs de la densité optique et en abscisse les quantités correspondantes de phosphore. La courbe est linéaire pour les concentrations comprises entre 0 et $40\mu\text{g/mL}$.

❖ Calcul des résultats

Déterminer la quantité de phosphore de la prise d'essai en se référant à la courbe d'étalonnage.

Exprimer le résultat en pour cent de l'échantillon.

Répétabilité : La différence entre les résultats de deux déterminations parallèles effectuées sur un même échantillon ne doit pas dépasser :

3% en valeur relative pour les teneurs en phosphore inférieures à 5% ;
0,15 en valeur absolue pour les teneurs en phosphore égales ou supérieures à 5%.

2- 4. Dosage du calcium total [107]

❖ Principe

Incinération d'une prise d'essai, puis traitement ces cendres à l'acide chlorhydrique et précipitation du calcium sous forme d'oxalate de calcium. Dissolution du précipité dans l'acide sulfurique et titrage de l'acide oxalique formé à l'aide d'une solution titrée de permanganate de potassium.

❖ Mode opératoire

Transfer les cendres dans bécher; ajouter 40 mL d'acide chlorhydrique et 60 mL d'eau distillée et quelques gouttes d'acide nitrique. Porter à ébullition et l'y maintenir 30 minutes. Refroidir et transvaser la solution dans la fiole de 250 mL, rincer et compléter au trait de jauge avec l'eau.

Prélever à l'aide d'une pipette une partie aliquote contenant de 20 à 40 mg de calcium, selon la teneur présumée en calcium et la verser dans un bécher de 250 mL. Ajouter 1 mL d'acide citrique et 5 mL de solution chlorure d'ammonium, diluer à environ 100 mL avec de l'eau porté à ébullition, ajouter quelques gouttes de solution de vert de bromocrésol et 30 mL de solution d'oxalate d'ammonium chaude. Neutraliser très lentement avec l'ammoniaque en agitant constamment, jusqu'à obtention d'un pH à 4,4 à 4,6, laisser décanter une nuit.

Filtrer dans le creuset filtrant porosité 4, laver le bécher et le creuset à l'eau jusqu'à élimination complète de l'excès d'oxalate d'ammonium. Prendre 50 mL d' H₂SO₄ chaud et rincer le creuset pour récupérer le dépôt qui doit être mis dans l'erien. Compléter le rinçage du creuset à l'eau chaude ensuite compléter le volume à 100 mL. Amener la température de la solution à 70-80°C, titrer la solution en utilisant le permanganate de potassium (0,1N) jusqu'à obtention d'une couleur rose.

❖ Expression des résultats

$$\text{Ca \%} = (V \times 2,004) / P$$

Où

V : le volume de permanganate de potassium (0,1N).

P : la prise d'essai

2- 5. Détermination des protéines brutes

❖ Principe

L'azote total est dosé par titrimétrie, après minéralisation et distillation.

❖ Mode opératoire [108]

1. Prise d'essai : introduire dans les matras environ 0,5 à 1 g de l'échantillon suivant la teneur présumée en azote et le degré de l'homogénéisation du produit.
2. Minéralisation : placer le matras sur le dispositif de chauffage, après avoir ajouté environ 1 à 2 g de catalyseur et 12,5 mL d'acide sulfurique concentré, chauffer doucement en agitant de temps en temps. Augmenter la température progressivement jusqu'à ce que le liquide devienne limpide et de coloration verte stable. Poursuivre le chauffage environ 2 heures et laisser refroidir les matras. Compléter en ajoutant 100 mL d'eau distillée.
3. Distillation : mettre le matras dans l'appareil à distillation. Alcaliser le milieu en introduisant lentement dans le matras environ 50 ml de solution NaOH (soude à 47%), il se produit un échauffement notable du produit, peser 333 g de NaOH puis ajouter de l'eau distillée préalablement refroidie, puis mélanger avec le verre en verre puis mettre sur l'agitateur pour avoir un mélange homogène dilué avec l'eau distillée (333g de NaOH dans 1L d'eau distillée).
L'entraînement de l'ammoniac commence peu après. L'ammoniac libéré par l'alcalisation est distillé. Le distillat est recueilli dans un erlenmeyer contenant 20 ml de la solution absorbante (solution d'acide borique et l'indicateur : rouge de méthyle+ vert de bromocrésol). Poursuivre la distillation jusqu'à récupération d'environ 100ml de distillat.
- 4 . Titrage : le titrage doit être effectué aussi rapidement après la distillation par une solution d'acide sulfurique à 0,1 N jusqu'à persistance du point de titrage. Un essai à blanc doit être inclus dans chaque série de dosage.

❖ Expression des résultats

La teneur en azote total exprime en gramme d'azote pour 100g d'échantillon est donnée par la formule :

$$((V1-V0) \times 14/m) \times 100$$

Où

V1 : volume en millilitre de la solution d'H₂SO₄ utilisée pour la prise d'essai.

V0 : volume en millilitre de la solution d'H₂SO₄ utilisée pour l'essai à blanc.

M : la masse en gramme de la prise d'essai. Le résultat de la détermination est exprimé en protéine après multiplication de la teneur en azote total par un coefficient approprié correspondant à la position du produit 6,25.

2- 6. Détermination de la cellulose brute [109]

❖ Principe

Cette méthode est basée sur la solubilisation des composants non cellulosiques par des solutions d'acide sulfurique et d'hydroxyde de potassium.

❖ Mode opératoire

Placer 1 g de l'échantillon, l'introduire dans un creuset a porosité 0,2μ et placer le tout sur le fibertec qui est menu d'un réfrigérant. Ajouter 100 ml d'une solution aqueuse contenant 12,5g d'acide sulfurique pour 1000 ml.

Chauffer pour obtenir une ébullition rapide et maintenir 30minutes.

- Après 30minutes laver à l'eau le résidu à plusieurs reprises jusqu'à ce que l'eau de lavage ne soit pas acide, refaire l'opération avec la solution NAOH 12,5g de soude dans 1000 ml
- Mettre creuset +résidu à l'étuve à 105 °C jusqu'à poids constant
- Effectuer les peser après refroidissement au dessiccateur.
- Incinérer dans le four à moufle à 400 °C durant 5h puis refroidir au dessiccateur et peser à nouveau.

❖ Expression des résultats

La différence de poids entre les deux pesées représente les matières cellulosiques, une grande partie de cellulose vraie, une partie de la lignine et les résidus d'hémicellulose.

$$\text{CB \%MS} = ((A-B) / (C \times \text{MS})) \times 100$$

Où

A : poids du creuset + résidu après dessiccation

B : poids du creuset après incinération

C : Poids de l'échantillon de départ

2- 7. Détermination de la matière grasse [110]

❖ Principe

Le solvant organique (extracteur) est très peu polaire, il extrait les triglycérides et les acides gras libres à chaînes longues.

❖ Mode opératoire

Après préparation du système Soxhelt, nous pesons 1 g de l'échantillon (P₀) dans une cartouche en cellulose et nous mettons 150 ml d'éther de pétrole dans un ballon préalablement lavé séché et tiré (P₁).

La cartouche est placée dans le système Soxhelt, le ballon est placé dans le bain-marie qui est réglé à une température égale à celle du degré d'ébullition du solvant (95°C).

L'extraction se fait par ébullition du solvant et condensation de ses vapeurs par un réfrigérant, le système de siphonage assure le passage des gouttelettes de la matière grasse vers le ballon.

Cette extraction dure environ 6 heures, et l'éther peut être récupéré avant la fin de l'opération.

Après les 6 heures, les ballons sont retirés et mis dans une étuve réglée à la même température de celle du bain-marie afin d'évaporer l'excès d'éther. Le ballon est ensuite refroidi jusqu'à poids constant dans un dessiccateur et pesé de nouveau (P_2).

❖ Expression des résultats

Le pourcentage de la matière grasse est calculé par différence de pesée du ballon :

$$\text{MGT (\%)} = ((P_2 - P_1) / P_0) \times 100$$

Où

P_0 : la prise d'essai de l'échantillon

P_1 : poids du ballon

P_2 : poids du ballon contenant l'extrait gras

2- 8. Analyses microbiologiques

La spiruline utilisée nous a été envoyée conditionnée sous forme de paillettes séchée de France par la firme BIOVIE.

Nous avons effectué des analyses pour apprécier la pureté de cette souche de spiruline.

2- 8.1. Coloration de Gram

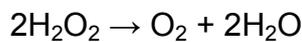
La coloration de Gram doit son nom au bactériologiste danois Hans Christian Gram qui a mis au point le protocole en 1884. C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer. Son avantage est de donner une information rapide sur les bactéries présentes dans un produit ou un milieu tant sur le type que sur la forme. L'opération effectuée sur la souche de spiruline de provenance de France suit les étapes suivantes:

➤ En premier lieu procéder à la fixation de la cyanobactérie en la plongeant en contact avec de l'alcool pendant quelques secondes puis la sécher avec le bec benzène.

- Mettre une goutte contenant l'algue à identifier dans une lame stérile et l'imprégner avec le violet de Gentiane entre 30 secondes à 1 minute puis rincer avec l'eau.
 - Ajouter quelques gouttes de Lugol pendant 30 secondes à 1 minute puis rincer avec de l'alcool.
 - Ajouter de la fuschine pendant 30 secondes à 1 minute puis rincer avec de l'eau.
 - Laisser sécher la lame puis mettre une goutte de vaseline sur la lame et faire la lecture sous l'objectif 100.
- Lecture des résultats : les bactéries Gram + apparaissent en bleu noir et les Gram – apparaissent en rouge.

2- 8.2. Teste catalase

La catalase est un enzyme catalysant la dite mutation de l'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène):



Cet enzyme est utilisé en bactériologie systématique pour l'identification des bactéries. Il s'agit de mettre en contact une colonie de la bactérie à étudier en présence d'eau oxygénée . Une effervescence (due à un dégagement de dioxygène) signe la présence d'une catalase.

❖ Technique

- Sur une lame de verre propre, déposer une goutte de H_2O_2 , puis la mettre en contact avec une colonie isolée, prélevée directement avec une pipette pasteur ou une anse plastique à usage unique. Il ne faut pas utiliser une anse en métal car elle serait alors oxydante.

- Si formation de bulle, la bactérie possède la catalase.

Si rien n'est observable, la bactérie ne possède pas l'enzyme.

Le tableau 3.2 qui suit récapitule les analyses physico chimiques et microbiologiques effectuées sur l'aliment et la spiruline.

Tableau 3.2 : Tableau récapitulatif des analyses physico chimiques et microbiologiques effectuées sur l'aliment et la spiruline.

Analyses		But
Physicochimiques : sur l'aliment pour rat simple et enrichie en spiruline	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Détermination de la matière sèche ✓ Détermination des cendres ✓ Dosage du phosphore total ✓ Dosage du calcium total ✓ Détermination de la cellulose brute ✓ Détermination de la matière grasse 	appréciation de la composition photochimique des deux aliments par rapport aux besoins nutritionnels des rats.
Microbiologiques : sur la spiruline	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Coloration de Gram ✓ Teste catalase 	Contrôle de la pureté de la souche de spiruline

3- Dissection des rats

La dissection a été effectuée sur les rats du groupe témoin et de quelques groupes expérimentaux afin de détecter des éventuelles anomalies qui peuvent apparaître sur leurs viscères.

4- Coupes histologiques

Au moment du dernier sacrifice, des fragments de l'intestin des rats du groupe D qui présentaient une inflammation sont placés dans des bains d'alcool (formol) pour la fixation des cellules intestinales Dans le but de réaliser des coupes histologiques.

Par ailleurs, de nombreuses études histo-pathologiques ont porté sur des tissus d'animaux que ce soit sur le foie, le cerveau, les reins, la thyroïde ect [111].

Pour notre part, nous avons effectué des coupes histologiques uniquement sur le l'intestin des rats appartenant au groupe D après 55 jours d'expérimentation.

Ces coupes ont été réalisées au niveau du laboratoire d'anapathologie de l'école nationale supérieur vétérinaire d'El-Harrach (ENSV).

La technique utilisée est celle proposée par Martoja et Martoja (1967) à l'hématoxyline / éosine.

Les différentes étapes sont présentées comme suit :

- ✓ Prélèvement des tissus (de dimension 1cm/0,5) et leurs fixation (au minimum 48h) dans du formol à 10%.
- ✓ Déshydratation des pièces d'intestins Dans des bains successifs d'alcool à concentrations croissantes 70°-90°-100° (deux pour chaque concentration d'une heure chacun) ;

- ✓ Eclaircissement des tissus par deux bails de solvant hydrocarbure (toluène ou le xylène ou benzène) une heure pour chaque bain.
- ✓ imprégnation dans un bain de paraffine à l'étuve à 58°C (température de fusion de la paraffine) pendant 12 heures
- ✓ blocage ou inclusion :
- ✓ utilisation de cassette et de moule en inox : verser une couche mince de paraffine liquide dans le moule, la pièce bien centrée puis on met la cassette dans le moule puis verser la paraffine sur la cassette (nous obtenant un bloc après une vingtaine de minutes).
- ✓ Le microtome
- ✓ Réalisation de rubans de coupes à l'aide de microtome (type Leica) réglé à 5 microns.
- ✓ Dépôt de rubans dans un bain d'eau à 37 °C puis à l'aide d'une lame nous chassons notre prélèvement et nous obtenant une lame blanche (non colorée).
- ✓ Séchage des lames dans l'étuve à 30°C pendant 12 heures ;
- ✓ Coloration :
- ✓ Déparaffinage par dépôt des lames dans une batterie contenant :
 - _ 2 bails de toluène de 5 mn chacun;
- ✓ Réhydratation
 - _ 3 bails d'alcool à concentration décroissantes : 100° - 90° - 70° d'une minute chacun;
 - _ 1 bain d'eau distillée d'une minute.
 Coloration :
- ✓ La première coloration par l'Hemalin de Harris pendant 45 secondes;
- ✓ Passage a l'eau ammoniacale (2 mL/250mL d'eau distillée) ;
- ✓ Rinçage par l'eau distillée pendant 1 minute;
- ✓ La deuxième coloration (coloration du cytoplasme) à l'éosine pendant 5 minutes;
- ✓ Rinçage à l'eau distillée pendant une minute;
- Déshydratation des lames par l'alcool éthylique à concentration croissante chaque bain dure une minute;
- ✓ Eclaircissement par deux bails de toluène pendant 5 minutes pour chaque bain;
- ✓ Montage à la résine (deux gouttes de résine EUKITT) ;
- ✓ Mise en contact de la lamelle à 30° avec la lame puis la déposer pour chasser les bulles d'aire ;
- ✓ observation au microscope photonique à grandissement : × 40 puis × 100 ;
- ✓ prise de photos micrographiques.

5- Analyse statistiques

L'analyse statistique est effectuée par le logiciel Systat.

Nous avons utilisé le modèle linéaire global (G.L.M.) et cela afin de connaître les effets et les interactions entre et les différents facteurs étudiés. Par exemple, si on désire connaître l'effet des facteurs A, B et C et seulement l'interaction entre A et C, il suffit de sélectionner explicitement ces trois (3) catégories.

La probabilité a été estimée au seuil de 5%.

5- 1. Le plan expérimental

Le plan expérimental retenu pour évaluer et comparer l'influence des différentes doses de pesticides seuls ou combinés à la spiruline (incorporées dans l'alimentation des rats (*Rattus norvegicus*) sur les paramètres suivants :

- L'alimentation (doses ingérées par les rats)
- Fécondité des rats
- La longévité des rats
- Le poids des portés
- Détecter d'éventuelles malformations congénitales
- Des éventuelles anomalies anatomopathologiques

CHAPITRE 4: RESULTATS ET DISCUSSION

1-Contrôle de la qualité physicochimique de l'aliment des rats (concentré)

Durant toute l'expérimentation, le groupe témoin a reçu un régime de base composé exclusivement de concentré pour rat (figure 4.1), alors qu'un régime spécial à base de concentré enrichie avec 1% de spiruline a été donné à quelques lots expérimentaux afin de mettre en exergue l'effet antitoxique que pourrait avoir cette dernière chez nos rats (figure 4.2).



Figure 4.1: Photographie de L'aliment pour rat simple (Photographie originale)



Figure 4.2: Photographie de L'aliment pour rat enrichi en spiruline (Photographie originale)

Le tableau 4.1 regroupe les résultats comparatifs des analyses physicochimiques effectuées sur l'aliment de rat enrichi en spiruline et sans spiruline. Une fois comparées ceux du tableau 4.2 représentant les besoins nutritionnels des cobayes à différents stades physiologiques, nous permettra d'apprécier leurs taux de recouvrement.

Tableau 4.1 : comparaison des résultats d'analyses de l'aliment seul ou enrichie avec 1% de spiruline

	Matière Azoté Totale (g)/kg d'aliment	Matières grasse (g)/kg d'aliment s	Calcium (g)/kg d'aliment	Phosphore (g)/kg d'aliment
Concentré	118,1	34,4	13,2	2,8
Concentré enrichie en spiruline	126,8	43,8	12,8	2,8

D'après les résultats des analyses des aliments de rat nous remarquons que l'aliment enrichi en spiruline représente un taux plus élevés en matière azoté et en matière grasse, respectivement ils sont de l'ordre de 6,86 % et 21,46 %.

Les deux aliments représentent un même taux en phosphore, tandis qu'un taux de 3,03 % est en déficit dans l'aliment enrichi en spiruline.

Tableau 4.2 : Besoins en nutriments de chaque stade physiologique des rats [118]

Nutriments Quantité (g) / kg d'aliment	Stade physiologique	Entretien	Croissance	Gestation	Lactation
Matière Azoté Totale		> 50 à 70	150	150	150
Matières grasses		50	50	50	50
Calcium		5	5	6,3	6,3
Phosphore		3	3	3,7	3,7

D'après les résultats des analyses des aliments de rat nous remarquons que leur composition n'adhère pas à l'intervalle de leur besoins à travers les différents stades physiologiques se traduisant par :

- ✓ Un excédent en calcium de 6 à 8 (g) / kg d'aliment
- ✓ Une déficience en phosphore de 0,2 à 0,9 (g) / kg d'aliment
- ✓ Une déficience en matières azotés de 6,2(g) / kg pour l'aliment enrichie en spiruline et 15,6 (g) / kg pour l'aliment simple.

Aussi nous remarquons que spiruline améliore la qualité nutritionnel de l'aliment qui permet de recouvrir mieux les besoins des rats par rapport à l'aliment simple, ce qui pourrait atténuer les effets du déséquilibre nutritionnel.

2- Confirmation de la pureté de la souche de spiruline

Les analyses qui suivent ci-dessous ont été effectuées sur la spiruline de provenance de France figure (4.3) afin de confirmer sa pureté.

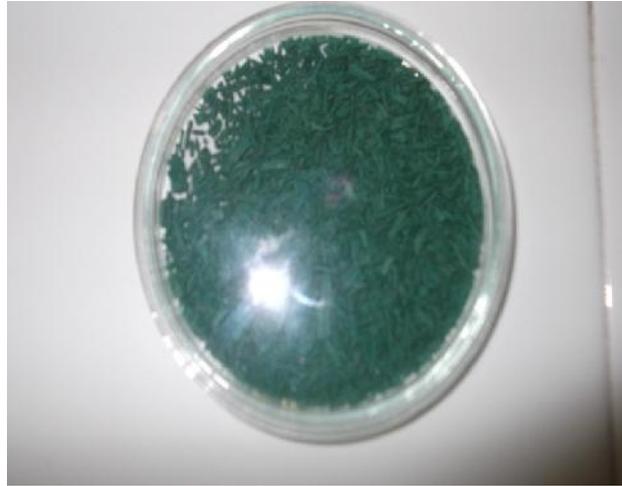


Figure 4.3 : Photographie de la spiruline

2- 1.La coloration de Gram

Soumise à la coloration de Gram, le test prouve que la souche de spiruline est une cyanobactérie à Gram négatif, pas de coloration violette (figure 4.4), Ces résultats confirment les travaux de Lindblad et *al.* (1998).

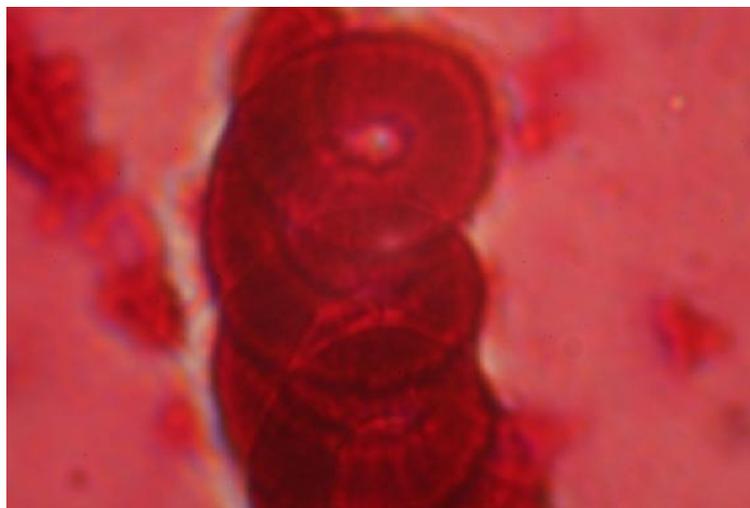


Figure 4.4: Photographie d'une spirale de spiruline après coloration De Gram (photographie originale) à grossissement (Gr : $100 \times 1,25 \times 10 \times 0,25$).

2- 2.Le test catalase

Le test catalase s'est révélé négatif, il n'y a pas eu d'effervescence lors de son contact avec l'eau oxygénée donc pas de dégagement gazeux (du dioxygène), la cyanobactérie ne catalyse pas le H_2O_2 .

Les résultats obtenus sous le microscope après le test catalase nous confirment la pureté de la souche de spiruline.

3- Effet de l'introduction des différentes doses de pesticides seuls ou combinées avec la spiruline sur la physiologie des rats

Nous avons suivi l'influence des différentes doses du pesticide seul et combiné à la spiruline introduites dans la ration alimentaire à travers les paramètres suivants :

- ✓ Le refus alimentaire des rates.
- ✓ La fécondité des rates.
- ✓ La longévité des rates.
- ✓ Le poids des portées des rates.
- ✓ Les malformations congénitales.
- ✓ Les anomalies anatomopathologiques

3- 1. Effet du pesticide à différentes doses, seul ou combinés avec la spiruline sur l'appétit du rat

Les figures 4.5 et 4.6 illustrent respectivement l'influence de différentes doses d'insecticide ingérées sur l'appétit des rats, et l'effet inhibiteur de la spiruline sur l'influence que pourrait avoir l'insecticide sur l'appétit des cobayes.

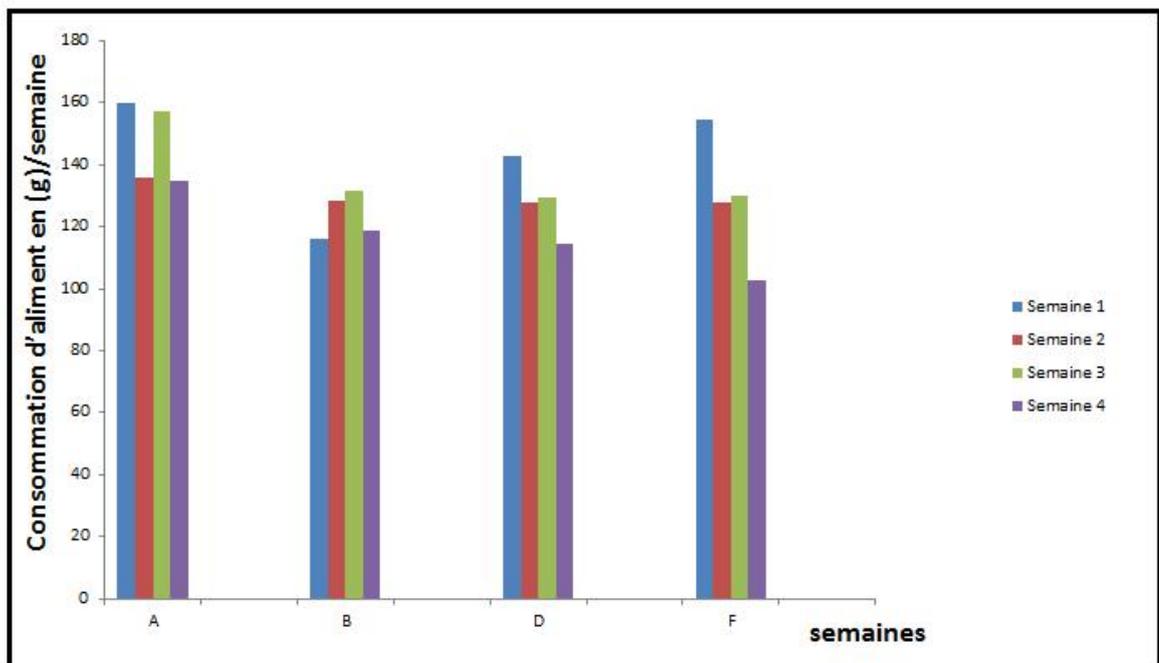


Figure 4.5 : Effet des différentes doses de pesticides sur l'appétit du rat

A : Lot témoin (Alimenté avec du concentré pour rat)
B : Lot expérimental (alimenté avec du concentré pour rat + 0,4 mL d'insecticide /750 mL d'eau pendant deux semaines puis nous avons augmenté la dose jusqu'à atteindre 1mL d'insecticide /750 mL d'eau pendant les deux dernières semaines.)
D : Lot expérimental (alimenté avec du concentré pour rat + 0,2mL d'insecticide /750 mL d'eau pendant deux semaines puis nous avons augmenté la dose jusqu'à atteindre 0,8 mL d'insecticide /750 mL d'eau pendant les deux dernières semaines.)
F : Lot expérimental (alimenté avec du concentré pour rat + 0,1mL d'insecticide /750 mL d'eau pendant deux semaines puis nous avons augmenté la dose jusqu'à atteindre 0,6 mL d'insecticide /750 mL d'eau pendant les deux dernières semaines.)

L'histogramme (figure4.5) montre que la consommation d'aliment du groupe A (témoin) est bien supérieure que celle des autres groupes ayant consommées différentes doses d'insecticide.

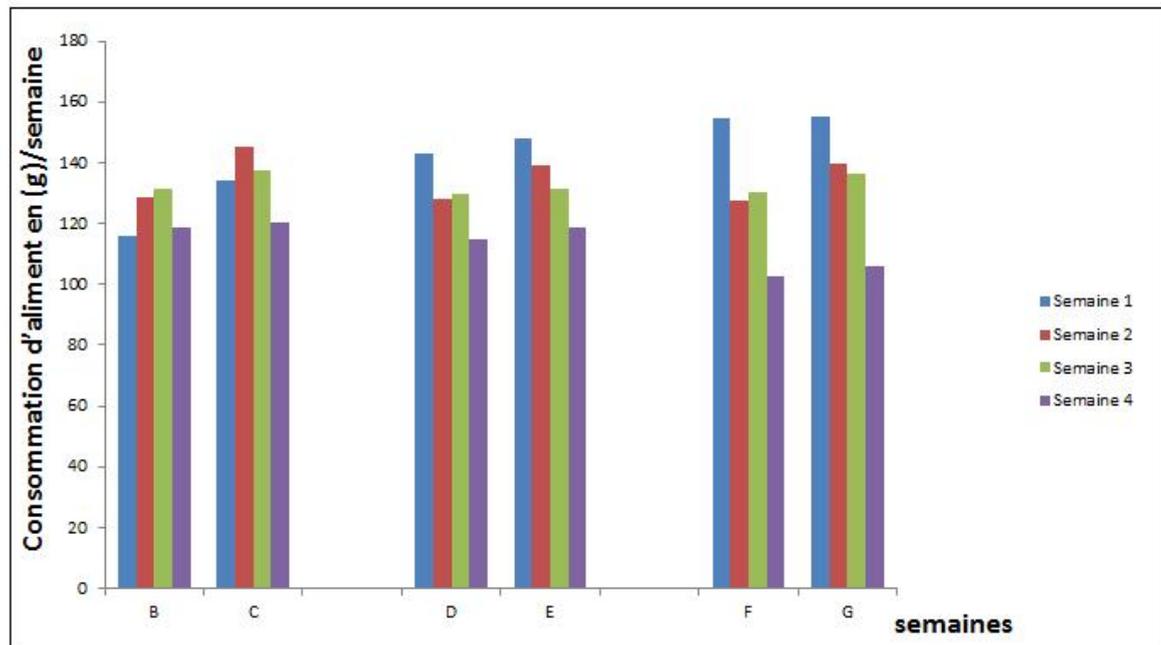


Figure 4. 6 : Effet de la spiruline inhibant les effets de différentes doses de pesticides sur l'appétit des rats

B : Lot expérimental (alimenté avec du concentré pour rat + 0,4 mL d'insecticide /750 mL d'eau pendant deux semaines puis nous avons augmenté la dose jusqu'à atteindre 1mL d'insecticide /750 mL d'eau pendant les deux dernières semaines.)
C : Lot expérimental (alimenté avec du concentré pour rat Enrichie avec 1% de spiruline + 0,4 mL d'insecticide /750 mL d'eau pendant deux semaines puis nous avons augmenté la dose jusqu'à atteindre 1mL d'insecticide /750 mL d'eau pendant les deux dernières semaines.)
D : Lot expérimental (alimenté avec du concentré pour rat + 0,2mL d'insecticide /750 mL d'eau pendant deux semaines puis nous avons augmenté la dose jusqu'à atteindre 0,8 mL d'insecticide /750 mL d'eau pendant les deux dernières semaines.)
E : Lot expérimental (alimenté avec du concentré pour rat Enrichie avec 1% de spiruline + 0,2mL d'insecticide /750 mL d'eau pendant deux semaines puis nous avons augmenté la dose jusqu'à atteindre 0,8 mL d'insecticide /750 mL d'eau pendant les deux dernières semaines.)
F : Lot expérimental (alimenté avec du concentré pour rat + 0,1mL d'insecticide /750 mL d'eau pendant deux semaines puis nous avons augmenté la dose jusqu'à atteindre 0,6 mL d'insecticide /750 mL d'eau pendant les deux dernières semaines.)
G : Lot expérimental (alimenté avec du concentré pour rat Enrichie avec 1% de spiruline + 0,1mL d'insecticide /750 mL d'eau pendant deux semaines puis nous avons augmenté la dose jusqu'à atteindre 0,6 mL d'insecticide /750 mL d'eau pendant les deux dernières semaines.)

L'histogramme (figure4.6) démontre que chaque groupe ayant reçu l'insecticide dans son alimentation combiné avec la spiruline a une forte consommation en aliments contrairement à ceux ayant reçus la même concentration d'insecticide sans spiruline.

L'étude statistique (figure 4.7) démontre que le "facteur dose" d'insecticide agit d'une manière significative sur l'évolution du poids des rats ($F\text{-ratio}=8,59$, $P=0,013$, $P<0,05\%$), alors que l'effet du facteur aliment n'est pas significative sur l'évolution du poids des cobayes ($F\text{-ratio}=1,16$, $P=0,301$, $P>0,05\%$) (Figure 4.8).

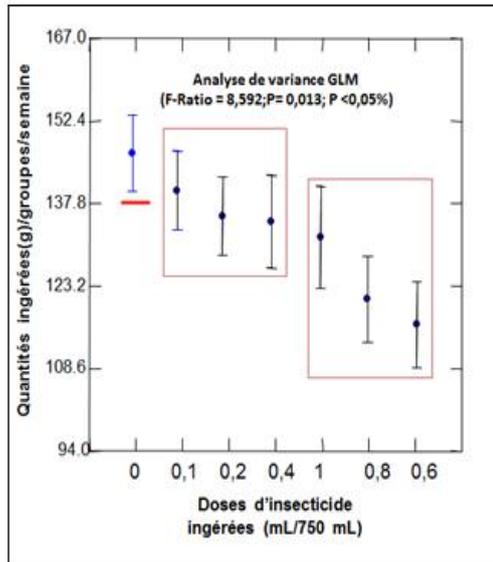


Figure 4.7 : Etude de l'influence De l'insecticide sur la quantité D'aliment ingéré

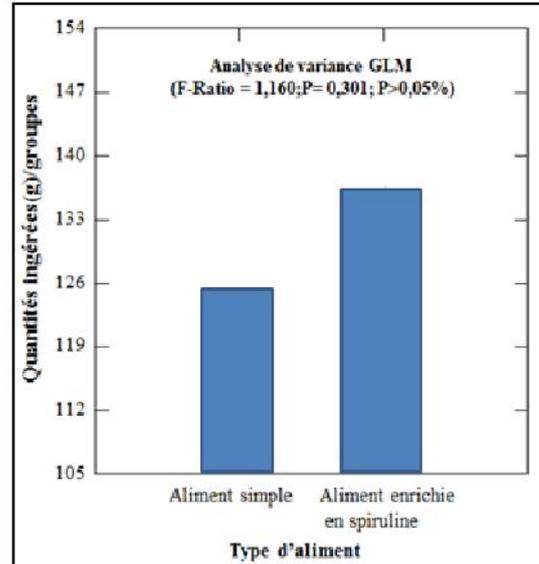


Figure 4.8 : Etude de l'influence De la spiruline sur la quantité D'aliment ingéré

L'analyse de la variance confirme la présence d'un effet abaissant la consommation d'aliment à travers le temps et qui est causé par l'insecticide (figure 4.7), aussi la figure 4.8 illustre que la consommation des cobayes en aliment enrichi à 1% de spiruline est bien supérieure à celle des cobayes ayant consommés l'aliment simple mais l'effet de la spiruline n'est pas significatif sur cette dernière.

Ainsi le pesticide peut avoir un effet sur la baisse d'alimentation des rats d'une part, d'autre part la spiruline peut avoir un effet inhibiteur de l'influence de ce dernier.

3- 2. Effet de la présence de l'insecticide à plusieurs doses, seul ou combinées avec la spiruline dans sur la fécondité des rates

La figure 4.9 qui suit montre l'influence de plusieurs doses d'insecticide sur le taux de fécondité des rates, alors que la figure 4.10 illustre l'effet d'une alimentation enrichie en spiruline inhibant l'influence du pesticide sur ce dernier.

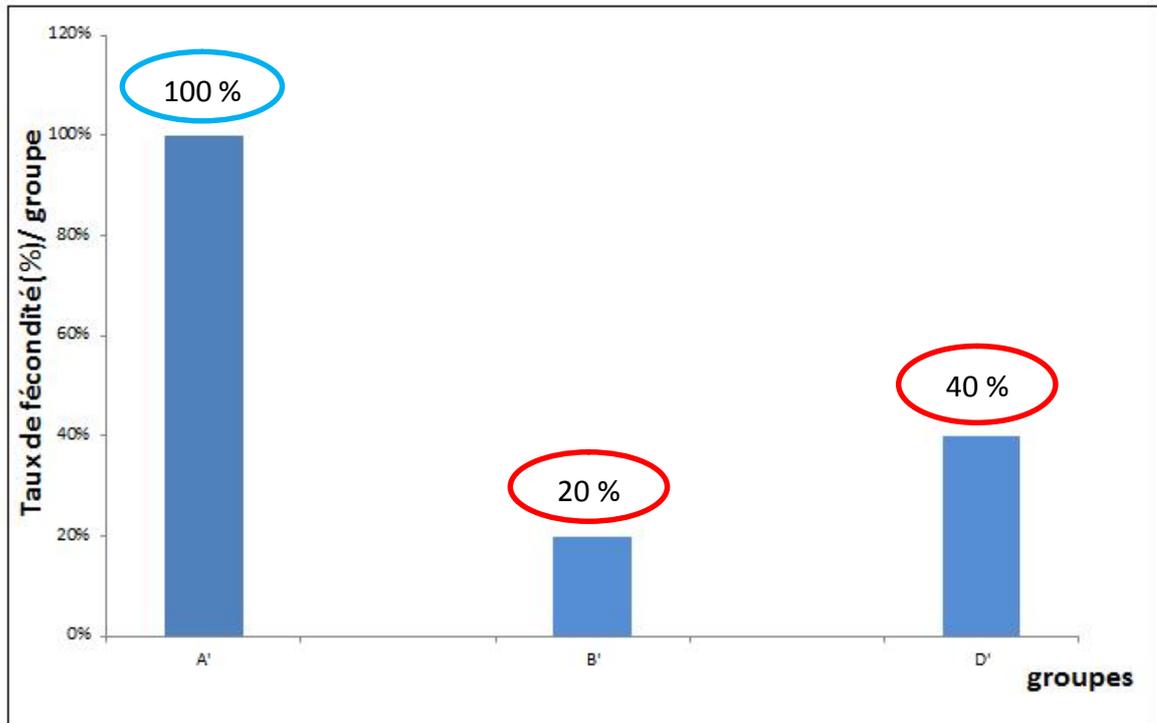


Figure 4.9 : Effet de plusieurs doses d'insecticide sur la fécondité des rates.

A : Lot témoin (Alimenté avec du concentré pour rat)

B : Lot expérimental (alimenté avec du concentré pour rat + $(D_{1+} D)$ = 5mL d'insecticide /750 mL d'eau)

D : Lot expérimental (alimenté avec du concentré pour rat + $(D_{2+} D)$ D_5 = 2,5mL d'insecticide /750 mL d'eau)

La figure 4.9 met en exergue l'influence de l'ingestion de différentes doses d'insecticide sur le taux de fécondité de nos cobayes, cela se traduisant par une diminution de ce dernier. Notons que l'histogramme du groupe A` (témoin) indique un taux de fécondité maximum qui est de 100%, alors que celui des lots expérimentaux est d'autant plus faible que la dose d'insecticide ingérée est élevée. Le lot ayant ingérer une concentration d'insecticide de 5 mL a eu un taux de fécondité de 20 %, alors que celui ayant ingérer une concentration d'insecticide de 2,5 mL a vue sont taux de fécondité augmenter jusqu'à atteindre 40 %

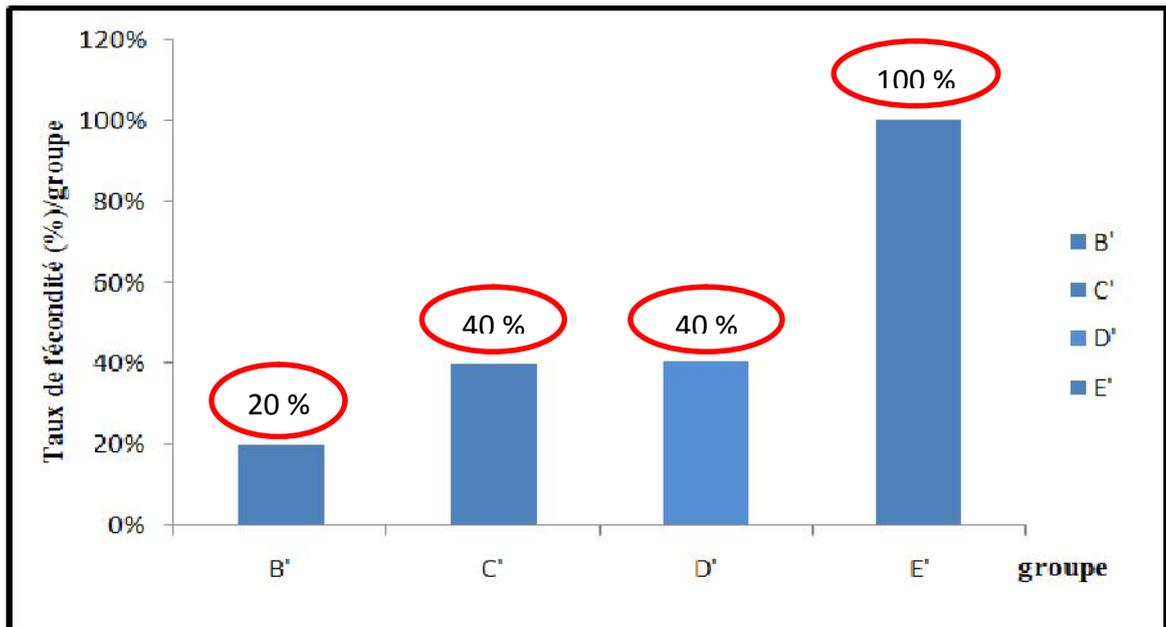


Figure 4.10 : Influence d'une alimentation enrichie avec la spiruline freinant les effets du pesticide sur la fécondité des rates.

B : Lot expérimental (alimenté avec du concentré pour rat + $(D_{1+} D)$ = 5mL d'insecticide /750 mL d'eau)

C : Lot expérimental (alimenté avec du concentré pour rat Enrichie avec 1% de spiruline + $(D_{1+} D)$ = 5mL d'insecticide /750 mL d'eau)

D : Lot expérimental (alimenté avec du concentré pour rat + $(D_{2+} D)$ = 2,5mL d'insecticide /750 mL d'eau)

E : Lot expérimental (alimenté avec du concentré pour rat Enrichie avec 1% de spiruline + $(D_{2+} D)$ = 2,5mL d'insecticide /750 mL d'eau)

La figure 4.10 illustre que chaque groupe ayant reçu l'insecticide dans son alimentation combiné avec la spiruline a un taux de fécondité plus élevé comparé à ceux ayant reçus la même concentration d'insecticide sans spiruline. Le lot ayant ingérer une concentration d'insecticide de 5 mL a eu un taux de fécondité de 20 %, alors que celui ayant ingérer la même concentration d'insecticide combiné avec la spiruline a vu son taux de fécondité augmenter jusqu'à atteindre 40 %.

L'étude statistique (figure 4.11) montre que le facteur dose d'insecticide agit d'une manière hautement significative sur le taux de fécondité des rates (F-ratio=5,62, P=0,000, P<0.01%), il en est de même pour le facteur aliment dont l'effet est très hautement significative apparent sur le taux de fécondité des rates (F-ratio=7,50, P=0,000, P >0,01%) (Figure 4.12).

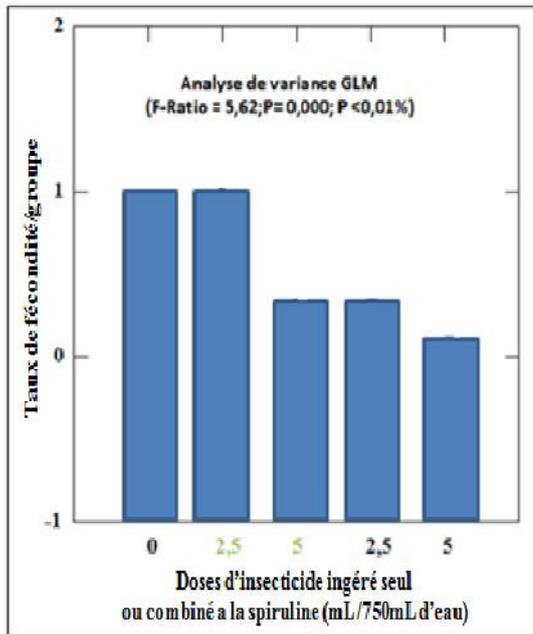


Figure 4.11 : Etude de l'influence De l'insecticide sur le taux De fécondité

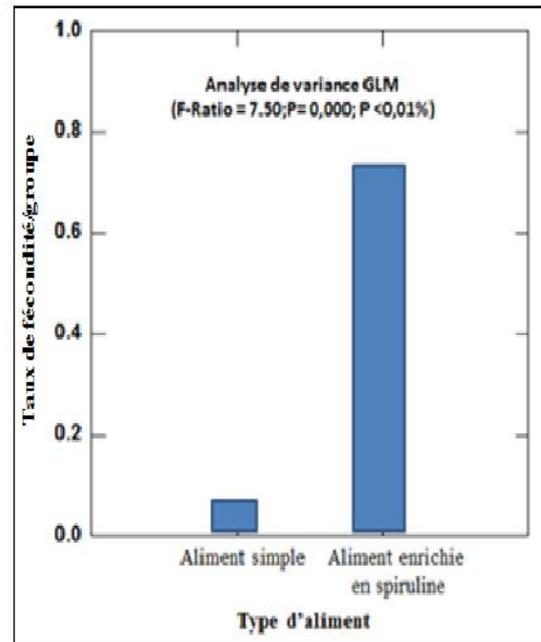


Figure 4.12 : Etude de l'influence De la spiruline sur le taux De fécondité

L'analyse de la variance confirme la présence d'un effet abaissant la fécondité des rates causé par l'insecticide (figure 4.11), la même analyse confirme aussi l'augmentant du taux de fécondité chez les rates causé par la consommation d'aliment enrichie avec 1% de spiruline (la figure 4.12).

D'autres études confirment que le lien entre exposition aux pesticides et risque d'infertilité masculine et/ou féminine, de mortalité foetale, ou de répercussion sur le fœtus est largement mis en avant [112]. D'autres études tendent à démontrer une association entre l'exposition aux pesticides et les issues de grossesses défavorables [113].

Ainsi le pesticide pourrait avoir un effet sur la diminution du taux de fécondité de nos rates d'une part, par contre la spiruline pourrait avoir un effet inhibiteur du dit pesticide.

3- 3. Effet de l'insecticide à différentes doses, sur le poids des portées des rates

La figure 4.13 qui suit montre l'influence de plusieurs doses d'insecticides abaissant le poids des portées des rates.

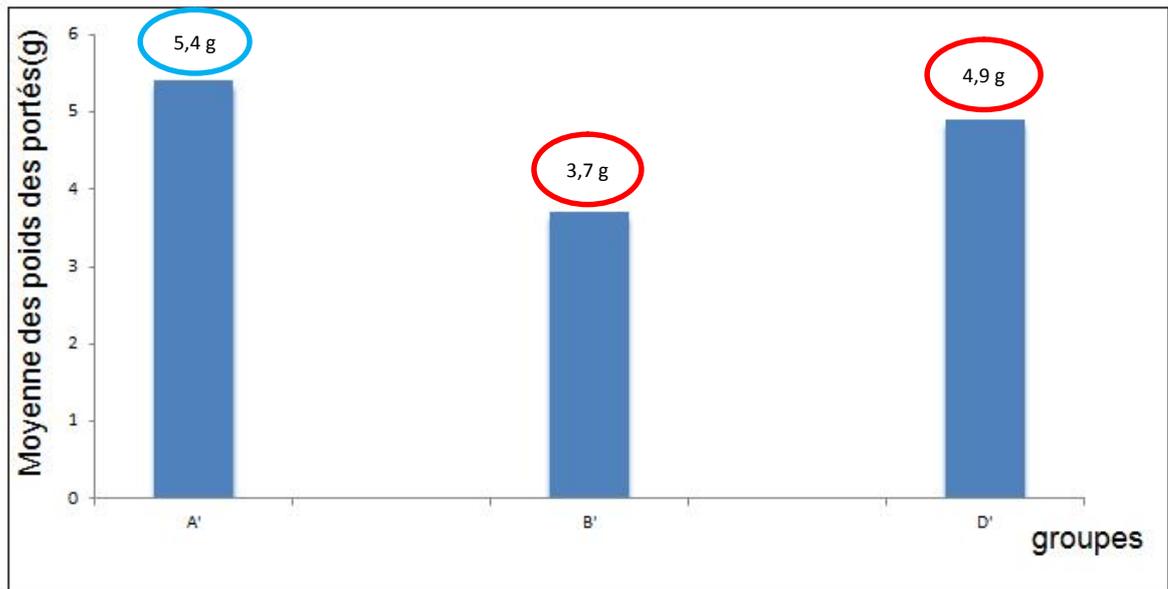


Figure 4.13 : Effet de l'insecticide à différentes doses sur le poids des portées des rates

A : Lot témoin (Alimenté avec du concentré pour rat)

B : Lot expérimental (alimenté avec du concentré pour rat + $(D_{1+} D)$ = 5mL d'insecticide /750 mL d'eau)

D : Lot expérimental (alimenté avec du concentré pour rat + $(D_{2+} D)$ = 2,5mL d'insecticide /750 mL d'eau)

L'histogramme (figure 4.13) illustre la moyenne des poids des portées de rats dont les mères porteuses ont été exposées à la prise de l'insecticide durant leur gestation.

L'histogramme du groupe A` (témoin) indique une moyenne pondérale de portée de 5,4 g qui est bien supérieure à ceux dont les mères porteuses ont été exposées à des doses d'insecticide.

L'histogramme met en exergue que moins la mère porteuse est exposée à l'insecticide plus le poids de sa portée à la naissance est élevée, car le lot ayant ingérer une concentration d'insecticide de 5 mL a eu un poids moyen de 3,7 g, alors que celui ayant ingérer une concentration d'insecticide de 2,5 mL a vue sont poids moyen augmenter jusqu'à atteindre 4,9 g.

La figure 4.14 montre que le facteur dose d'insecticide agit d'une manière significative sur le poids des rats à la mise bas (F-ratio=5,25, P =0,031, P<0.05%).

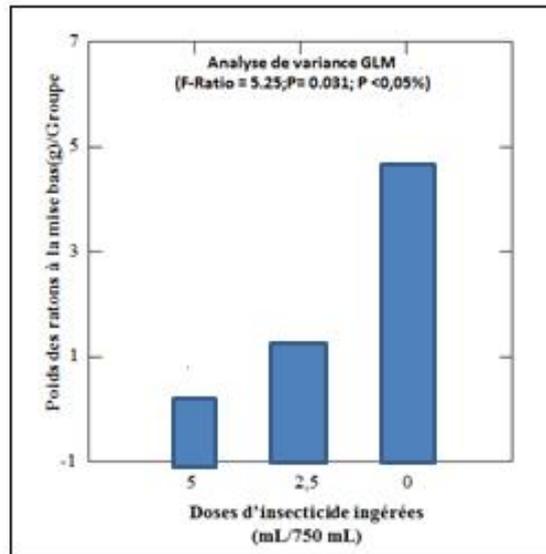


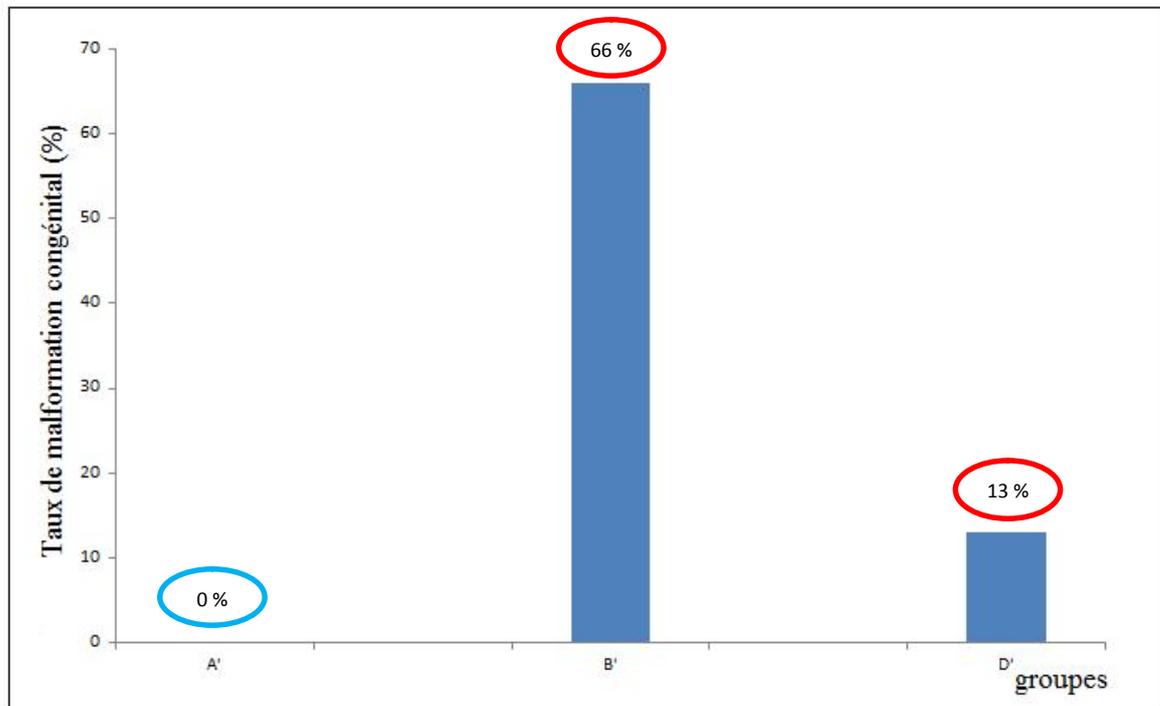
Figure 4.14 : Etude de l'influence de l'insecticide sur le poids des ratons à la mise bas

L'analyse de la variance confirme la présence d'un effet abaissant le poids des ratons mis bas et qui est causé par l'insecticide (figure 4.14).

Les résultats ci-dessus mettent clairement en évidence une relation directe entre l'exposition à l'insecticide et l'évolution négative du poids des ratons à la mise bas.

3- 4. Effet du pesticides à différentes doses, seuls ou combinées avec la spiruline dans sur les malformations congénitales chez les rats

La figure 4.15 qui suit montre l'influence de plusieurs doses d'insecticides ingérées augmentant le taux de tératogénèse.



13

Figure 4.15: Effet du pesticide à différentes doses, sur les malformations congénitales chez les rats

A : Lot témoin (Alimenté avec du concentré pour rat)

B : Lot expérimental (alimenté avec du concentré pour rat + $(D_{1+} D)$ = 5mL d'insecticide /750 mL d'eau)

D : Lot expérimental (alimenté avec du concentré pour rat + $(D_{2+} D)$ = 2,5mL d'insecticide /750 mL d'eau)

L'histogramme (figure 4.15) illustre des taux de malformations congénitales des rats dont les mères porteuses ont été exposées à différentes doses d'insecticide. Il reflète les points suivants :

- ✓ l'histogramme du groupe A` (témoin) n'exprime aucune malformation congénitale des rats.
- ✓ Moins les portés de rats sont exposés à l'insecticide plus le taux de malformations diminue, car le lot ayant ingéré une concentration d'insecticide de 5 mL a eu un taux de malformation congénital de 66 %, alors que celui ayant ingéré une concentration d'insecticide de 2,5 mL a vu son taux de malformation diminuer jusqu'à atteindre 13%.

La figure 4.16 qui suit met en exergue l'influence d'une alimentation enrichie avec la spiruline freinant les effets du pesticide sur le taux de malformations congénitales chez les rats

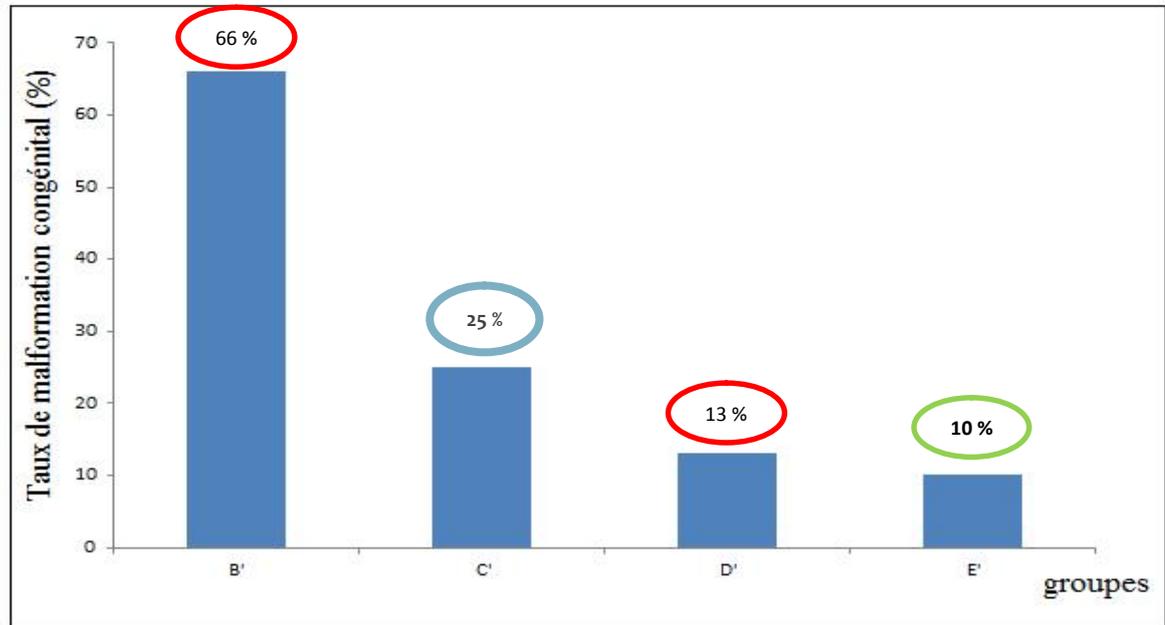


Figure 4.16: Influence d'une alimentation enrichie avec la spiruline freinant les effets du pesticide sur le taux de malformations congénitales

B : Lot expérimental (alimenté avec du concentré pour rat + $(D_{1+} D)$) = 5mL d'insecticide /750 mL d'eau)

C : Lot expérimental (alimenté avec du concentré pour rat Enrichie avec 1% de spiruline + $(D_{1+} D)$) = 5mL d'insecticide /750 mL d'eau)

D : Lot expérimental (alimenté avec du concentré pour rat + $(D_{2+} D)$) = 2,5mL d'insecticide /750 mL d'eau)

E : Lot expérimental (alimenté avec du concentré pour rat Enrichie avec 1% de spiruline + $(D_{2+} D)$) = 2,5mL d'insecticide /750 mL d'eau)

Les rats exposés à des doses d'insecticides combinées à la spiruline présentent des taux faibles de malformations congénitales comparées à ceux exposés à la même dose d'insecticides seuls (figure 4.16). Le lot ayant ingéré une concentration d'insecticide de 5 mL a eu un taux de malformation congénital de 66 %, alors que celui ayant ingéré la même concentration d'insecticide combiné avec la spiruline a vu son taux de malformation congénital diminuer jusqu'à atteindre 25 %.

D'autres études ont montré qu'à des doses très faibles, les pesticides peuvent être des perturbateurs endocriniens qui pourraient, par exemple, rendre des grenouilles de laboratoire hermaphrodites. Les risques causés aux populations par leur exposition aux pesticides sont aussi de mieux en mieux connus et les études scientifiques de plus en plus nombreuses. Certaines

prouvent aujourd'hui que les publics exposés, au premier rang desquels figurent les agriculteurs, développent plus que les autres certains cancers, des maladies neurodégénératives, des malformations, des syndromes divers, des problèmes de fertilité [113].

Aussi d'après l'étude de Fedkovic et *al.* (1993) les antioxydants comme le β -carotène contenus dans la Spiruline permettraient d'inhiber à la fois l'effet mutagène et l'effet régulateur induit par les radicaux libres, préservant ainsi nos tissus.

Nous pouvons supposer que l'insecticide peut avoir un effet sur l'apparition de malformations congénitales d'une part, et que la spiruline pourrait avoir un effet inhibiteur non négligeable sur celui du pesticide.

3- 5. Effet du pesticide à dose unique seul ou combinées avec la spiruline sur la longévité des rats

La figure 4.17 qui suit montre l'influence d'une alimentation enrichie avec la spiruline freinant les effets du pesticide sur la longévité des rats

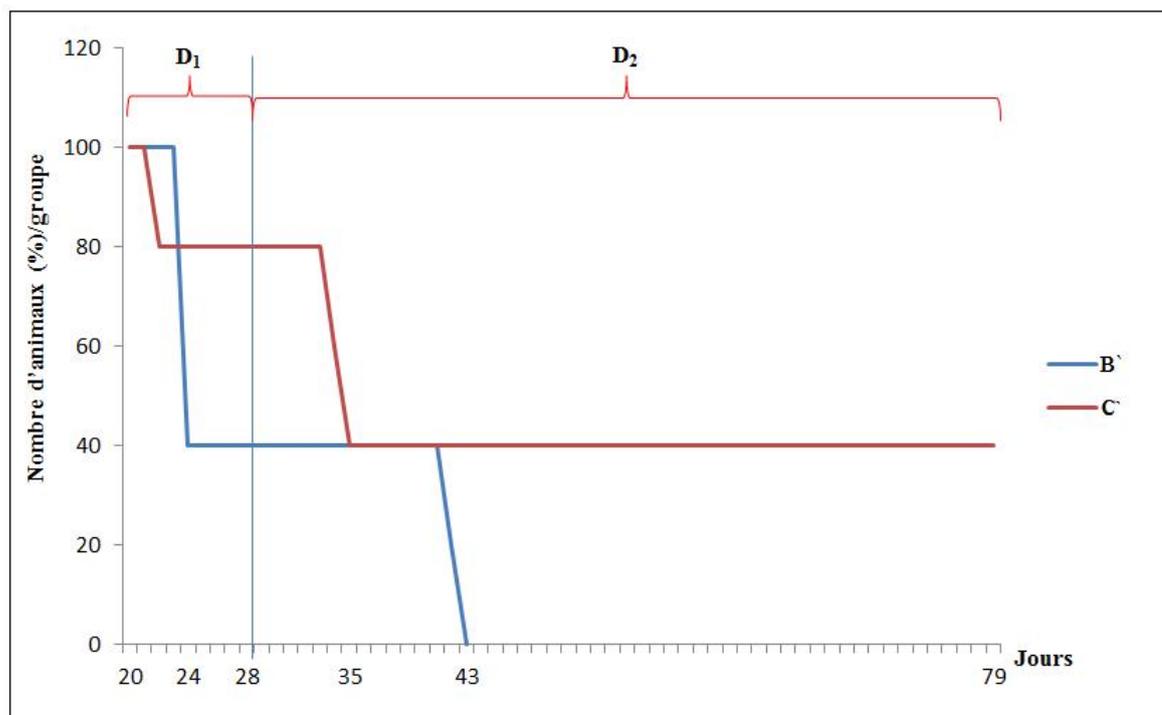


Figure 4.17: Effet d'une dose de pesticide seul ou combinés avec la spiruline dans la ration animale sur la longévité des rats

B : Lot expérimental (alimenté avec du concentré pour rat +une dose d'insecticide)

C : Lot expérimental (alimenté avec du concentré pour rat Enrichie avec 1% de spiruline + une dose d'insecticide)

D1= 5 mL d'insecticide/750mLd'eau

D2= 8,2 mL d'insecticide/750mLd'eau

- ✓ le graphe du groupe C` (ayant consommé la micro algue) indique une longévité supérieure à celle du groupe B` (n'ayant pas consommé la spiruline).
- ✓ Une concentration d'insecticide de 5mL (/750mL d'eau) a causé la mort de 60% des rats du groupe B` qu'elle n'a causé que 20 % de mortalité chez le groupe C`.
- ✓ Après augmentation de la concentration de l'insecticide à 8,2 mL(/750mL d'eau), nous remarquons la mortalité de la totalité des rats du groupe B` et cela en seulement 15 jours alors que durant cette même période le l'insecticide n'a causé que 40 % de mortalité chez le groupe C`le reste du groupe reste en vie au-delà d'un mois plus tard.

L'étude statistique (figure 4.18) montre que le facteur dose d'insecticide agit d'une manière hautement significative sur la longévité des rats (F-ratio=58,41, P=0,000, P<0,01%), il en est de même pour le facteur aliment dont l'effet est hautement significatif apparent sur la longévité des cobayes (F-ratio=7,50, P=0,000, P>0,01%) (Figure 4.19).

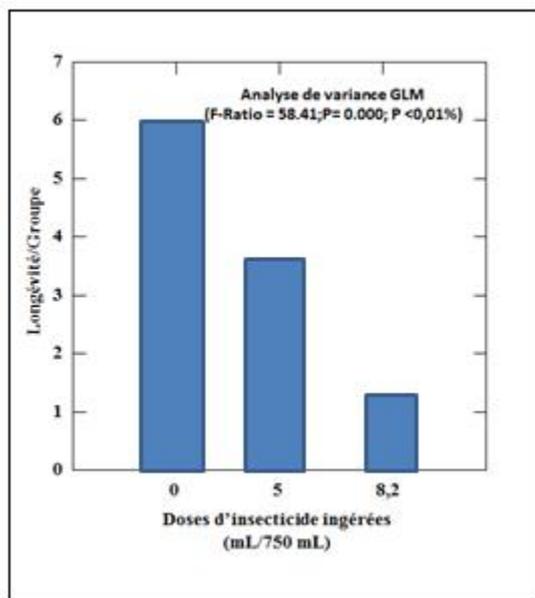


Figure 4.18 : Etude de l'influence De l'insecticide sur la longévité Des rats

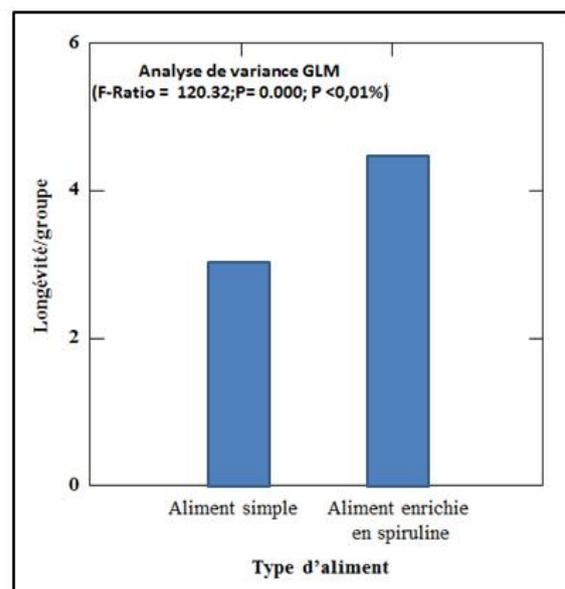


Figure 4.19 : Etude de l'influence De la spiruline sur la longévité Des rats

L'analyse de la variance confirme la présence d'un effet abaissant la longévité des rates et qui est causé par l'insecticide (figure 4.18), la même analyse confirme aussi la présence d'un autre effet opposé à celui de l'insecticide sur la longévité des rats causé par la consommation d'aliment enrichie avec 1% de spiruline (la figure 4.19), ceci peut être expliquer par le fait que la spiruline est capable de dégrader les herbicides de type « RoundUp » (glyphosate) qui agissent sur la synthèse de la chlorophylle : elle les minéralise totalement et en utilise le phosphore ainsi libéré [114].

Aussi d'après Vonshak (1997), la fraction protéique pourrait contenir jusqu'à 20 % de phycocyanine. La phycocyanine aurait une activité antitumorale, elle induirait un mécanisme d'apoptose (autodestruction) des cellules cancéreuses [115]. Elle aurait aussi une activité antioxydante [97;116]. Elle aurait également un rôle d'hépatoprotection (voir revue de Wu Li-chen and Ho Ja-an 2007).

Ainsi, la spiruline peut inhiber des effets que pourrait avoir le pesticide sur la longévité des rats.

4- Dissection des rats

Des dissections ont été effectuées sur les rats des différents groupes afin de détecter d'éventuelles anomalies pouvant être causées par l'insecticide. Les résultats se résument dans ce qui suit.

4- 1. Effet du pesticide à dose unique combiné à la spiruline sur le développement de pathologies du système digestif des rats

Après la dissection des rats du groupe D et du groupe E nous avons remarqué des anomalies sur le tube digestif des rats du groupe D (ayant consommé une dose de 2,5 mL d'insecticide / 750 mL d'eau) se traduisant par des inflammations intestinales comme c'est illustré sur les figures 4.20 et 4.22 suivantes.

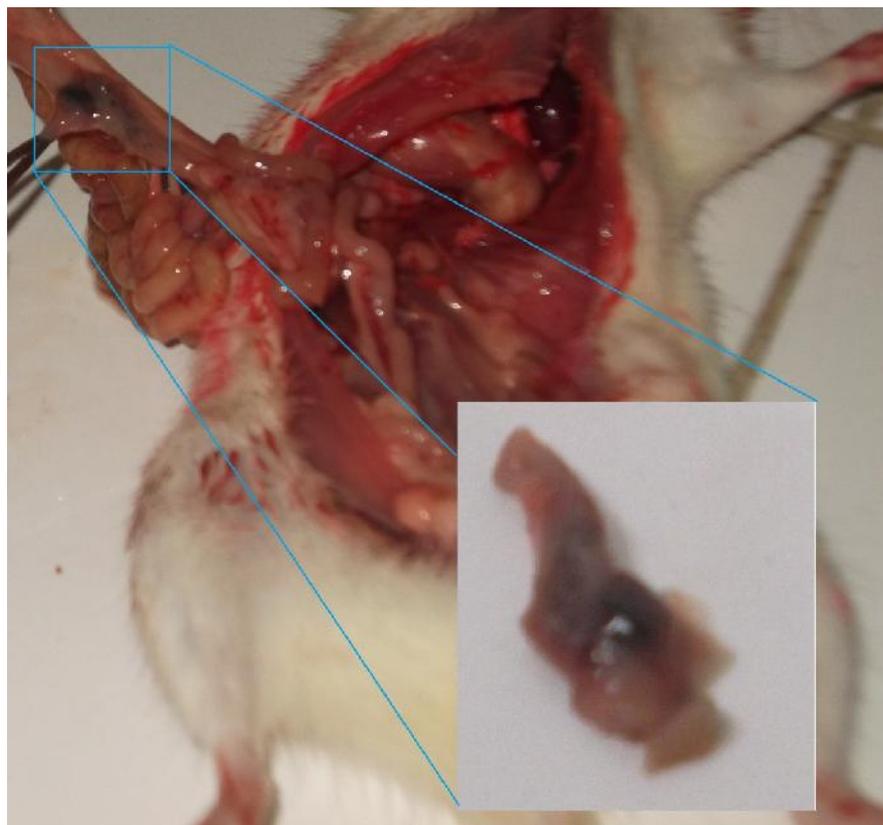
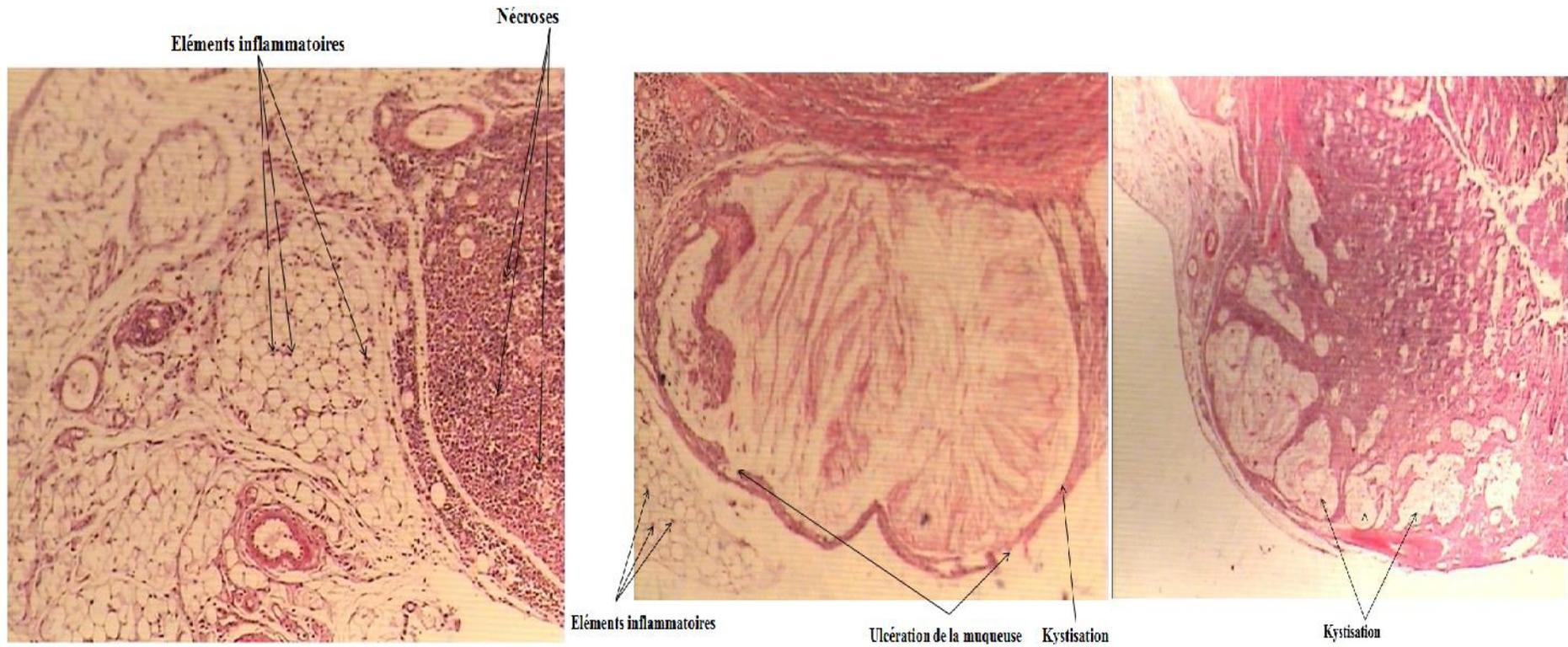


Figure 4.20: Photographie du duodénum atteint d'un rat

Après prélèvement des fragments de tissus atteints, à partir desquels nous avons effectué des coupes histologiques afin d'observer les différentes anomalies à l'échelle tissulaire apparues après un empoisonnement par l'insecticide, nous avons obtenu les différentes lames exposées dans les figures 4.21 et 4.23 qui suivent.



Coupe : A (Gr : 100 × 1,25 × 10 × 0,25). Coupe : B (Gr : 40 × 1,25 × 10 × 0,25). Coupe : C (Gr : 40 × 1,25 × 10 × 0,25).

Figure 4.21: Trois coupes histologique prélevées d'un duodénum

La paroi intestinale est remaniée par la présence d'un **abondant inflammatoire trans pariétal** qui détruit une grande partie des glandes, **ulcérant la muqueuse** en surface (figure 4.21 C).

L'infiltrat est polymorphe riche en plasmocytes et en macrophages.

Les glandes sont nombreuses et rapprochées, d'aspect différencié par endroits, kystiques ailleurs réalisant un aspect de **mucocele**, aussi la paroi intestinale présente plusieurs segments **nécrosés** atténuant la graisse périphérique (figure 4.21 A). Les invaginations épithéliales sont profondes remplies de polynucléaires, réalisant des abcès critiques. **L'infiltrat inflammatoire est diffus**, polymorphe ; il renferme des cellules géantes à corps étrangers.

Les glandes montrent une **kystisation** comme c'est illustrer à la figure 4.21 A et B.

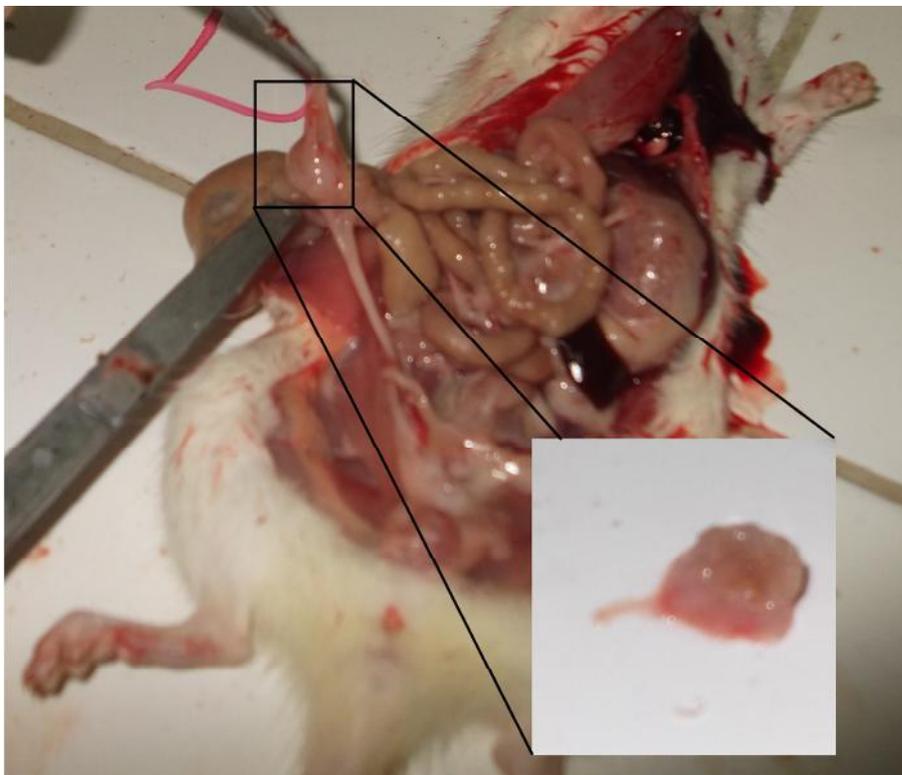


Figure 4.22: Photographie d'un ganglion sur l'appareil digestif d'un rat

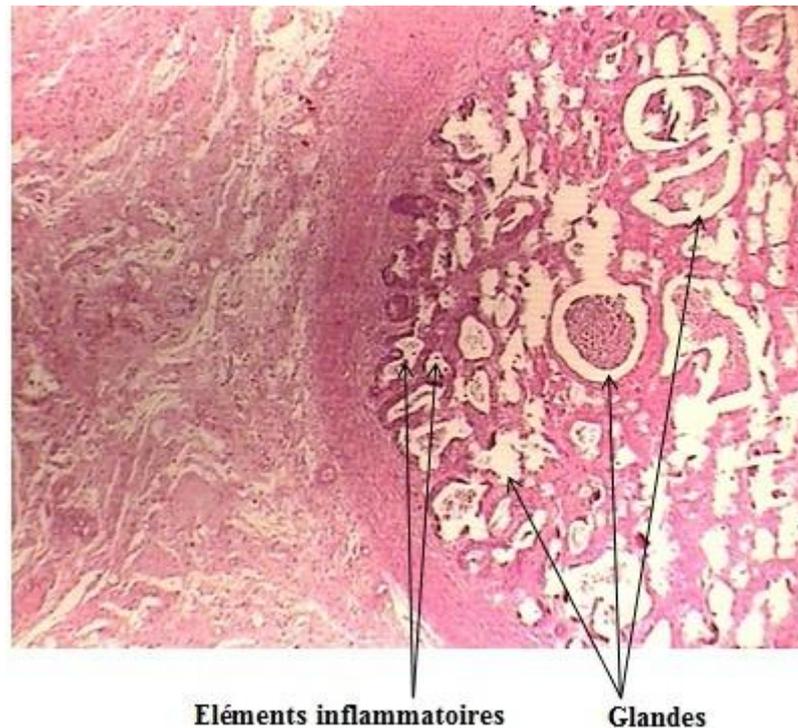


Figure 4.23 : Tissu conjonctif intestinal à Gr : 100 × 1,25 × 10 × 0,25

Dans un tissu conjonctivo-vasculaire, une structure tubulaire de 0,6 cm est retrouvée.

Sa paroi est musculaire, remaniée par l'inflammation.

Sa lumière est occupée par de nombreuses glandes de tailles variables, rapprochées, tapissées d'un revêtement cylindrique pseudo stratifié cilié par endroits, **dédifférencié ailleurs, dysplasiques (stade précoce du cancer)**.

Ces glandes renferment des éléments inflammatoires polymorphes qui réalisent de véritables abcès cryptiques.

Ainsi les effets (cas d'intoxication aigue) apparus dans le tube digestif du premier rat (figure 4.20) peuvent engendrer des perforations du tube digestif et par conséquent la mort de l'animal, alors que les effets apparus dans l'appareil digestif du deuxième rat témoignent d'une intoxication chronique moins dangereuse comparée à celle du premier cas.

En ce qui concerne les principales connaissances sur les effets aigus des pesticides chez l'homme c'est-à-dire se manifestant rapidement après exposition - sont issues d'observations rapportées en milieu professionnel et des cas d'intoxications documentés par les centres antipoison, ainsi les pesticides peuvent pénétrer dans l'organisme par contact cutané, par ingestion et par inhalation. Les manifestations peuvent se limiter à des signes locaux : irritations de la peau, des muqueuses, réactions allergiques cutanées ou oculaires, vomissements, toux, gêne respiratoire ou bien traduire l'atteinte d'un ou plusieurs organes ou systèmes : foie, rein, système nerveux central... On parle alors d'effets systémiques.

L'intoxication massive peut avoir des conséquences graves, parfois mortelles [117].

Les effets retardés des pesticides sur la santé restent mal connus malgré des travaux scientifiques toujours plus nombreux sur le sujet, car depuis près de trente ans, les maladies potentiellement liées aux expositions à long terme aux pesticides sont essentiellement étudiées dans les populations professionnellement exposées, la détermination des impacts des pesticides sur la santé repose sur la mise en évidence d'effets chez les personnes exposées par rapport à des personnes non exposées. Cette approche épidémiologique permet d'étudier l'impact des différents facteurs (comportements, habitudes de vie, environnement ...) sur la survenue d'une maladie. la plupart des connaissances épidémiologiques sont issues de comparaisons entre les agriculteurs et les autres catégories socioprofessionnelles. Les effets chroniques les plus étudiés sont les cancers et notamment les leucémies et les lymphomes, les effets sur la reproduction, les effets neurotoxiques et les effets perturbateurs endocriniens [117].

Ainsi les études menées jusqu'à lors présentent de nombreuses lacunes soit à cause des orientations de ces dernières, comme le cas des pathologies en milieu agricole, le cancer a sans doute été le plus étudié. Ce n'est que plus récemment que l'on s'est intéressé aux troubles de la reproduction et aux maladies neurologiques [117]. Aussi le manque d'information concernant les dangers des pesticides pourrait être intentionnel à cause des lobbies commerciaux comme nous laisse penser le fabricant de l'insecticide étudié dans ce travail, comme il est expliqué en ce qui suit :

Pour les informations toxicologiques des effets aigus de l'insecticide le fabricant à donner les informations suivantes :

Toxicité aiguë par voie orale : Dose létale médiane femelle rat, 1.098 mg/kg.

Mais pour étudier les éventuelles pathologies qui peuvent survenir lors d'une exposition prolongé à travers le temps il (le fabricant) a mener ses recherches en dissociant l'insecticides en étudiant chaque matière active individuellement et non pas combiner comme elles sont présentées dans l'insecticide et cela ne donne aucun résultat significatif sur les éventuels effets que peut avoir l'insecticide sur la santé mais expose seulement des informations sur les effets que pourrais induire chaque matière actives, comme c'est illustré en ce qui suit :

Mutagénicité sur les cellules germinales

lambda-cyhalothrine : N'a pas montré d'effets mutagènes lors des expérimentations animales.

pirimicarbe : N'a pas montré d'effets mutagènes lors des expérimentations animales.

Cancérogénicité

lambda-cyhalothrine : N'a pas montré d'effets cancérigènes lors des expérimentations animales.

pirimicarbe : N'a pas montré d'effets cancérigènes lors des expérimentations animales.

Tératogénicité

pirimicarbe : N'a pas montré d'effets tératogènes lors des expérimentations animales.

Toxicité pour la reproduction

lambda-cyhalothrine : Ne montre pas d'effets toxiques pour la reproduction lors d'expérimentations animales.

pirimicarbe : Ne montre pas d'effets toxiques pour la reproduction lors d'expérimentations animales.

Toxicité spécifique pour certains organes cibles - exposition répétée

lambda-cyhalothrine : Aucun effet indésirable n'a été observé dans les tests de toxicité chronique.

pirimicarbe : Aucun effet indésirable n'a été observé dans les tests de toxicité chronique.

Toxicité par aspiration : Danger d'aspiration en cas d'ingestion - peut pénétrer dans les poumons et provoquer des lésions.

Les résultats discutés en haut nous laisse supposé que la spiruline à faible dose pourrait avoir un effet antitoxique important, inhibant multiples influences que peut avoir l'insecticide sur l'organisme.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'étude porte sur l'influence de l'ingestion à différentes doses d'insecticides (**lambda-cyhalothrine**, qui appartient à la famille des **pyréthrinoïdes + primicarbe**, qui appartient à la famille chimique des **carbamates**) seules ou combinées à la spiruline (*Athrospira platensis*) par sept lots de Rats (*Rattus norvegicus*) dans le but d'observer son effet sur différents aspects physiologiques et anatomiques.

Nous avons introduit les différentes doses d'insecticides dans l'eau d'abreuvement des rats, chaque dose d'insecticide a été testée sur deux groupes de rat, le premier groupe recevant l'insecticide seul dans son alimentation le second recevant la même dose d'insecticides combiné avec la spiruline (introduite en raison de 1% dans l'aliment pur rat) dans la ration animale.

Les effets des doses d'insecticides ayant été introduits seuls dans l'alimentation des rats ont eu des répercussions négatives et agressives sur le taux de fécondité (diminution du taux de fécondité jusqu'à 80 %), le taux de tératogénèse (augmentation du taux de tératogénèse jusqu'à 66 %), le poids des portées (une baisse de la moyenne des poids des portées de 1,7g), et la longévité des rats. Plus la dose est élevée plus les taux des paramètres physiologiques cités diminuent sauf pour le taux de tératogénèse qui augmente avec l'augmentation des doses de l'insecticide.

Des lésions sur le tube digestif des rats comme l'inflammation du tube digestif peuvent se traduire par des inflammations, kystisations, dysplasies, ulcérations...etc n'ont été observées que chez les rats ayant ingéré une dose de pesticide de concentration de 2,5 mL / 750 mL d'eau et dont l'alimentation était exempte de spiruline.

Les rats ayant reçu les mêmes doses d'insecticides combinés à la spiruline ont vu leur taux de différents paramètres physiologiques étudiés moins perturbés que ceux des rats ayant consommé des doses d'insecticides seules.

La spiruline même à très faible dose (introduite à raison de 1% dans l'alimentation) peut avoir un effet inhibiteur important sur les effets générés par l'insecticide étudié, ceci peut être expliqué par le fait que l'algue a un puissant effet antioxydant.

Ainsi les résultats obtenus au cours de cette recherche nous permettent d'être optimiste en ce qui concerne les nombreuses utilisations de cette algue comme complément alimentaire en quantité appropriée en vue d'optimiser son impact sur le comportement nutritionnel des consommateurs, et de couvrir les carences d'une éventuelle malnutrition ou prévenir contre des intoxications qui pourraient survenir à travers d'éventuelles contaminations par différents polluants qui nous entourent.

Nos perspectives et recommandations actuelles sont d'effectuer des recherches plus approfondies sur cette algue qui contient une multitude de vertus mais qui demeure encore mystérieuse sur plusieurs plans, ainsi son utilisation nous procure plusieurs avantages dont nous allons citer quelques-uns :

- Utilisation d'un produit biologique.
- Minimisation de l'utilisation des produits de synthèses.
- Prévention au lieu de la guérison.
- Apport des nutriments naturels à moindre coût.
- L'équilibre alimentaire.

Des études ultérieures pourraient évaluer la quantité adéquate de spiruline qui doit être ajoutée à l'alimentation des consommateurs afin d'optimiser ses bienfaits sur la santé en général et afin d'optimiser ses effet antitoxiques.

Ces mêmes études pourraient évaluer l'aptitude de cette micro-algue à se combiner à différents aliments notamment ceux qui jouent un rôle curatif ou préventif contre certains dérèglements physiologiques comme par exemple le yaourt.

Il serait intéressant aussi d'utiliser la spiruline dans la lutte thérapeutique ou préventive des maladies d'origine alimentaire et autres.

APPENDICES

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribo Nucleique.

AHS: Agricultural health study

°C: Degré Celsius

CAREX : carcinogen exposure

CE : Communauté Européenne

CIRC : Centre international de recherche sur le cancer

CL₅₀ : Concentration Létale 50

CT : Cas-témoins

DDT: DichloroDiphenyl Trichloroethane

DL₅₀: Dose Létale 50

FAO: Food and agricultural organization

INERIS : Institut national de l'environnement industriel et des risques

InVS : Institut de veille sanitaire

LMR : Limite maximale de résidus

LNH: Lymphome non hodgkinien

LOAEL: Lowest observed adverse effect level

NOAEL: No observed adverse effect level

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAN : Pesticide action network

PH: Potentiel d'Hydrogène

POPs : Polluants Organiques Persistants

PPP : produits phytopharmaceutiques

RR : Risque relatif

SGH : Système général harmonisé

SIRIS : système d'integration des risques par interaction des scores pour les pesticides

SNC: Système nerveux central

USA: united States of America

US EPA: United States Environmental Protection Agency

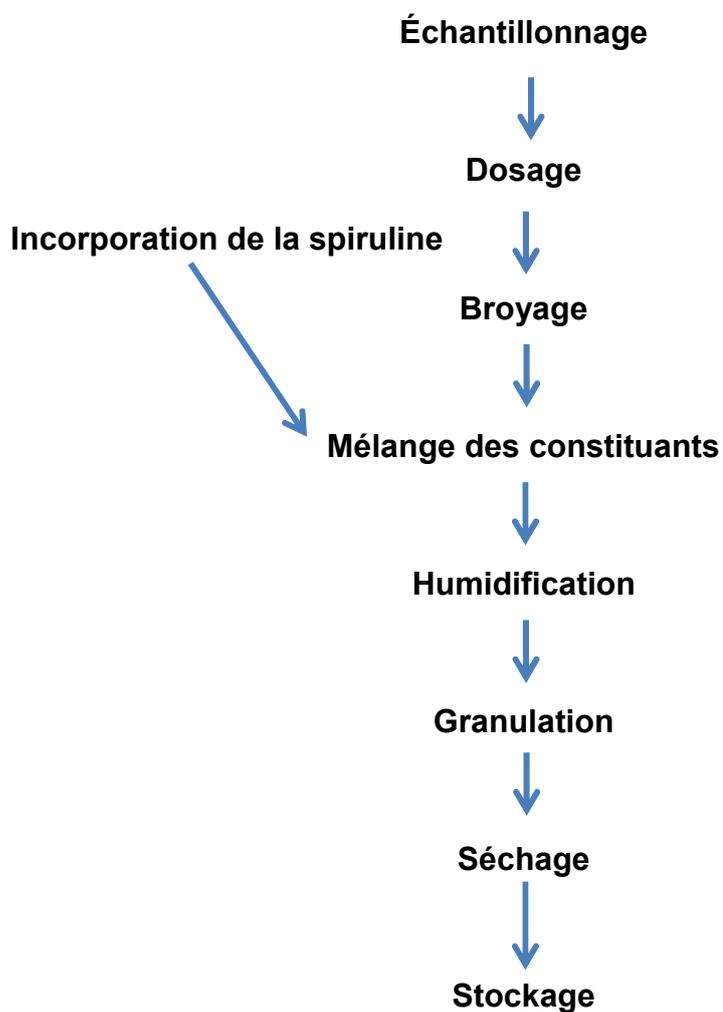
SOD: superoxyde dismutase

COMPOSITION NURTITIONNELLE ET SCHÉMA DE FABRICATION D'ALIMENT POUR RAT ET DE SON ENRICHISSEMENT EN SPIRULINE

Composition de l'aliment pour rat :

Mais, Son, Remoulage, Soja, CMV

Schéma de fabrication de l'aliment pour rat et de son enrichissement en spiruline



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Oerke, E., et Dehne, H., "Global crop production and the efficacy of crop production-current situation and futures trends", *European Journal of Plant Pathology*, (1997), 103(203-215) In MERHI, M., "Etude de l'impact de l'exposition à des mélanges de pesticides à faibles doses : caractérisation des effets sur des lignées cellulaires humaines et sur le système hématopoïétique murin", Institut National Polytechnique de Toulouse, (7 Novembre 2008), 140 p.
2. International Workshop on Crop Protection Chemistry, 2005 In MERHI, M., "Etude de l'impact de l'exposition à des mélanges de pesticides à faibles doses : caractérisation des effets sur des lignées cellulaires humaines et sur le système hématopoïétique murin", Institut National Polytechnique de Toulouse, (7 Novembre 2008), 140 p.
3. Von Der Weid, D., "La spiruline fait des miracles", *PROSI Magazine* 2000 381 Site internet <http://www.prosi.net/mag2000/381oct/spiru381.htm> (2000).
4. Dupire, J., "Objectif : malnutrition", Paris: Similia, (1998), 224 p.
5. Azabji Kenfack, M., Edie Dikosso, S., Loni, G., Onana, A., Sobngwi, E., Gbaguidi, E., Nguéfack, T., Von der Weid, D., Njoya, O. and Ngogang, J., "Efficacy of *Spirulina platensis* as a nutritional supplement in malnourished HIV-infected adults: A randomised, single-blind study", (Soumis en juin 2010 pour publication.) In Hug, C. et von der Weid, D., "La spiruline dans la lutte contre la malnutrition : Bilan et perspectives", *ANTENNA, research for progress*, (Février 2011), 30 p.
6. Selmi C, Leung PS, Fischer L, German B, Yang CY, Kenny TP, Cysewski GR, Gershwin ME (2011) The effects of *Spirulina* on anemia and immune function in senior citizens. *Cellular & Molecular Immunology*, advance online publication 31 January 2011 In Hug, C. et von der Weid, D., "La spiruline dans la lutte contre la malnutrition : Bilan et perspectives", *ANTENNA, research for progress*, (Février 2011), 30 p.
7. M'Hamed., "Richesse marine de Tipaza : La spiruline, une algue en quête d'une mise en valeur", *Journal El watan* ([www. El watan -algérie.com.](http://www.Elwatan-algerie.com)), (2008).
8. INRA., Cemagref. (2006) In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
9. Viala, A. et Botta, A., "Les pesticides", Chapitre 71 In *Toxicologie*. Lavoisier. Tec & Doc. EMI. 2ème édition. (2005). 1094 p In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.

10. Hamdallaye ACI “Programme Africain relatif aux Stocks de Pesticides obsolètes (PASP-MALI)”, (2000) ,7p.
11. Alix, M., Athyeh, A. et Bonnin A., “Atelier santé- environnement : les insecticides à usage domestique dans l’habitat”, Ecole nationale de la santé publique de Rennes, (2006).
12. Union française des consommateurs., “60 million des consommateurs antiparasite des poisons”, (Juillet- aout 2005) In Alix, M., Athyeh, A. et Bonnin A., “Atelier santé- environnement : les insecticides à usage domestique dans l’habitat”, Ecole nationale de la santé publique de Rennes, (2006).
13. Peeters, J., “ Pesticides à usages domestique : Risques pour la santé”, Pesticides action Network (PAN) Belgium, (1999) In Alix, M., Athyeh, A. et Bonnin A., “Atelier santé- environnement : les insecticides à usage domestique dans l’habitat”, Ecole nationale de la santé publique de Rennes, (2006).
14. Séverin, F. et Delemotte, B., “L’utilisation des produits phytosanitaires” In testud, F., Garnier, R. et Delemotte, B., “eds. Toxicologie humaine des produits phytosanitaire”, Paris, Eska- Laquassagne, (2001), 17-24 In Alix, M., Athyeh, A. et Bonnin A., “Atelier santé- environnement : les insecticides à usage domestique dans l’habitat”, Ecole nationale de la santé publique de Rennes, (2006).
15. Cox, C. et Surgan M., “Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health”, Environmental Health Perspectives, 114(12):1803-6. (2006) In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., “Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007”, ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
16. WHO., “The WHO recommended classification of pesticides by hazard. And guidelines to classification 2009”. IPCS. IOMC. WHO,(2010), 78 p In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., “Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007”, ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
17. CIRC., “Liste des composés évalués et classés au 30 août 2010”, Disponible sur : <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsAlphaOrder.pdf>, (septembre 2010) In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., “Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007”, ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.

18. INERIS., "Données toxicologiques" Disponibles sur : <http://www.ineris.fr/substances/fr/>, (octobre 2010) In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
19. US EPA., "Classification des pesticides", Disponible sur : <http://www.epa.gov/oppfead1/international/globalharmon.htm>, (octobre 2010) In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
20. InVS., "Pesticides : questions réponses", Disponible sur : http://www.invs.sante.fr/surveillance/pesticides/questions_reponses.htm, (octobre 2010) In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
21. Ames, B.N. and Gold L.S., "Environmental pollution, pesticides, and the prevention of cancer : misconceptions", Federation of American Societies for Experimental Biology Journal,11,(1997)1041-1052 In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
22. Lampi, P., Hakulinen, T., Luostarinen, T., Pukkala, E. and Teppo, L., "Cancer incidence following chlorophenol exposure" In a community in southern Finland, Archives of Environmental Health, 47(3), (1992)167-175 In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
23. WHO., FAO., "Note commune à l'intention des médias. Les enfants sont exposés à des risques élevés d'intoxication par les pesticides", <http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2004/np19/fr/print.html>, Consulté en décembre 2010, (2004) In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
24. Shalat, S.L., Donnelly, K.C., Freeman, N.C., Calvin, J.A., Ramesh, S., Jimenez, M., Black, K., Coutinho, C., Needham, L.L., Barr, D.B. and Ramirez, J., "Nondietary ingestion of pesticides by children in an agricultural community on the US/Mexico border: preliminary results", Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology, 13, (2003), 42-50 In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.

25. Lu, C., Barr, D.B., Pearson, M., Bartell, S. and Bravo, R., "A longitudinal approach to assessing urban and suburban children's exposure to pyrethroid pesticides", *Environmental Health Perspectives*, 114(9), (2006), 1419-23 In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
26. Baldi, I., Lebailly, P., Jean S., Rougetet, L., Dulaurent, S. and Marquet, P., "Pesticide contamination of workers in vineyards in France", *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, 16, (2006) ,115-124 In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
27. Kauppinen, T., Toikkanen, J., Pedersen, D., Young, R., Ahrens, W., Boffetta, P., Hansen, J., Kromhout, H., Maqueda Blasco, J., Mirabelli, D., de la Orsen-Rivera, V., Pannett, B., Plato, N., savela, A., Vincent, R. and Kogevinas, M., "Occupational exposure to carcinogens in the European Union", *Occupational and Environmental Medicine*,57, (2000),10-18 In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
28. Gatignol, C. et Etienne, J.C., "Pesticides et santé. Rapport parlementaire", Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques, Rapport n° 2463 de l'Assemblée nationale et n° 421 du Sénat, (enregistré le 29 avril 2010), 257 p In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
29. IFEN., "Chapitres L'agriculture et la sylviculture. L'eau. L'air. Le sol et le sous-sol. Environnement et santé" In *L'environnement en France, Les synthèses*, (2006), 500 p In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
30. Coignard, C. et Lorente C., "Exposition aérienne aux pesticides des populations à proximité de zones agricoles. Bilan et perspectives du programme régional intercircire" In *VS*, (2006), 64 p In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.

31. Ricoux, C., "Evaluation de l'exposition aérienne aux pesticides de la population générale. Etude en air extérieur dans quatre sites de l'Hérault en 2006" In VS, (2009), 55 p In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraud J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
32. INERIS., " Détermination des pesticides à surveiller dans le compartiment aérien :approche par hiérarchisation", Institut national de l'environnement industriel et des risques,http://www.ineris.fr/index.php?module=doc&action=getDoc&id_doc_object=2548, (2005) In MERHI, M., "Etude de l'impact de l'exposition à des mélanges de pesticides à faibles doses : caractérisation des effets sur des lignées cellulaires humaines et sur le système hématopoïétique murin", Institut National Polytechnique de Toulouse, (7 Novembre 2008), 140 p
33. Règlement 396/2005/CEE., Disponible sur : http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/plant_health_checks/l21289_fr.htm, (Consulté en mai 2011) In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraud J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
34. Commission de la santé et de la sécurité du travail du Québec., "NOTIONS TOXICOLOGIE", Deuxième édition revue et augmentée Dépôt légal – Bibliothèque nationale du Québec, (2004).
35. Fournier, J., Chimie des pesticides, Paris, (1988) In Alix, M., Athyeh, A. et Bonnin A., "Atelier santé- environnement : les insecticides à usage domestique dans l'habitat", Ecole nationale de la santé publique de Rennes, (2006).
36. Bonvallot, N. et Dor, F., Insecticides aux organochlorés aux Antilles : identification des dangers et valeurs toxicologiques de référence (VTR) In Alix, M., Athyeh, A. et Bonnin A., "Atelier santé- environnement : les insecticides à usage domestique dans l'habitat", Ecole nationale de la santé publique de Rennes, (2006).
37. Institut National espagnol Sécurité et Hygiène dans le Travail In Alix, M., Athyeh, A. et Bonnin A., "Atelier santé- environnement : les insecticides à usage domestique dans l'habitat", Ecole nationale de la santé publique de Rennes, (2006).
38. Bouvier, G., Thèse : "Contribution à l'exposition de la population francilienne aux pesticides", Université René Descartes-Paris V, (Décembre 2005) In Alix, M., Athyeh, A. et Bonnin A., "Atelier santé- environnement : les insecticides à usage domestique dans l'habitat", Ecole nationale de la santé publique de Rennes, (2006).

39. Arnich, N., Cervantese, P., Gallotti, S., Loulergue, M-H. et Solal, C., "Evaluation des risques pour la santé humaine liés à une exposition au Fipronil", Groupe de travail AFSSA/AFSSE, (Mars 2005) In Alix, M., Athyeh, A. et Bonnin A., "Atelier santé- environnement : les insecticides à usage domestique dans l'habitat", Ecole nationale de la santé publique de Rennes, (2006).
40. Fiche technologique n °81 Lindane Services techniques et médicaux de l'INRS In Alix, M., Athyeh, A. et Bonnin A., "Atelier santé- environnement : les insecticides à usage domestique dans l'habitat", Ecole nationale de la santé publique de Rennes, (2006).
41. Fiche technologique INRS n °116 Dichlorvos Services techniques et médicaux de l'INRS In Alix, M., Athyeh, A. et Bonnin A., "Atelier santé- environnement : les insecticides à usage domestique dans l'habitat", Ecole nationale de la santé publique de Rennes, (2006).
42. Baldi, I., Mohammed-Brahim, B., Brochard, P., Dartigues, J.-F. et Salamon R., "Effets retardés des pesticides sur la santé : état des connaissances épidémiologiques", Revue d'épidémiologie et santé publique, 46, (1998) ,134-142 p In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
43. Multigner, L., "Effets retardés des pesticides sur la santé humaine", Environnement, risques et santé, 4(3), (2005), 187-194 In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
44. INCa., "Risques de cancers et pesticides", Fiche repère. INCa, (2009), 6 p In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
45. Ferragu, C., Tron, I. et Bompays, S., "Pesticides et santé : état des connaissances sur les effets chronique en 2009", ORS Bretagne, (2010), 120 p In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
46. Passinet, JC., Dewailly, E. et Doucet-Leduc, H., "Chapitre 14 : Contamination alimentaire" in Environnement et santé publique, Fondements et pratiques, Tec & Doc, Edisem, (2003), 1023 p In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.

47. Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
48. Blair, A., Zahm. and H.S., "Agricultural exposures and cancer", *Environmental Health Perspectives*,103(Suppl 8), (1995), 205-208 In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
49. Dich, J., Zahm, HS., hanberg, A. and Adami, H.-O., "Pesticides and cancer",*Cancer Causes and Control*, (1997), 8:420-443 In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
50. Alavanja, M.C.R., Hoppin, J.A. and Kamel, F., "Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity", *Annual Review of Public Health*, 25, (2004), 155-197 In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
51. Hoard Zahm, S., Ward, M.H. and Blair A., "Pesticides and cancer" *Occupational Medicine*, ,12(2), (1997), 269-289 In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
52. Doherty, J.D., "Screening pesticides for neuropathogenicity", *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 3, (2006), 704-714 In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
53. Baldi, I. and Lebailly, P., "Cancers et pesticides", *La Revue du Praticien*, 57, (2007), 40-44 In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
54. Daniels, J.L., Olshan, A.F. and Savitz, D.A., "Pesticides and childhood cancers", *Environmental Health Perspectives*, 105(10), (1997), 1068-1077 In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.

55. Sanborn, M., Cole, D., Kerr, K., Vakil, C., Sanin, L.H. and Bassil, L., "Ontaria college of family physicians", *Pesticides literature review*, (2004), 186 p In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
56. Nasterlack, M., "Do pesticides causes childhood cancer? ", *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 79, (2006), 536-544 In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
57. Turner, M.C., Wigle, D.T. and Krewski, D., "Residential pesticides and childhood leukemia: a systematic review and meta-analysis", *Environmental Health Perspectives*, 118(1), (2010), 33-41 In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
58. Metayer, C. and Buffler, P.A., "Residential exposures to pesticides and childhood leukaemia", *Radiation Protection Dosimetry*, 132(2), (2008), 212-219 In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
59. Meinert, R., Schüz, J., Kaletsch, U., Kaatsch, P. and Michaelis, J., "Leukemia and non-Hodgkin's lymphoma in childhood and exposure to pesticides: results of a register-based cas-control study in Germany", *American Journal of Epidemiology*, 151(7), (2000), 639-646 In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
60. Shim, Y.K., Mlynarek, S.P. and van Wijngaarden, E., "Parental exposure to pesticides and childhood brain cancer: US Atlantic Coast Childhood Brain Cancer Study", *Environmental Health Perspectives*, 117(6), (2009), 1002-1006 In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
61. Rull, R.P., Gunier, R., von Behren, J., Hertz, A., Crouse, V., Buffler, P.A. and Reynolds, P., "Residential proximity to agricultural pesticide applications and childhood acute lymphoblastic leukemia", *Environmental Research*, 109(7), (2009), 891-9 In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.

62. Ma, X., Buffler, P.A., Gunier, R.B., Dahl, G., Smith, M.T., Reinier, K. and Reynolds, P., "Critical windows of exposure to household pesticides and risk of childhood leukemia", *Environmental Health Perspectives*, 110(9), (2002), 955-60 In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
63. Buckley, J.D., Robison, L.L., Swotinsky, R., Garabrant, D.H., LeBeau, M., Manchester, P., Nesbit, M.E., Odom, L., Peters, J.M., Woods, W.G. and Denman Hammond, G., "Occupational exposures of parents of children with acute nonlymphocytic leukemia: a report from the Childrens Cancer Study Group", *Cancer Research*, 49(14), (1989), 4030-7 In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
64. Buckley, J.D., Meadows, A.T., Kadin, M.E., Le Beau, M.M., Siegel, S. and Robison, L.L., "Pesticide exposures in children with non-Hodgkin lymphoma", *Cancer*, 89(11), (2000), 2315-21 In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
65. Carozza, S.E., Li, B., Wang, Q., Horel, S. and Cooper, S., "Agricultural pesticides and risk of childhood cancers", *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 212(2), (2009), 186–195 In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
66. Chen, Z., Stewart, P.A., Davies, S., Giller, R., Krailo, M., Davis, M., Robinson, L., Shu, X.-O., "Parental occupational exposure to pesticides and childhood germ-cell tumors", *American Journal of Epidemiology*, 162, (2005), 858-867 In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.
67. Rubin, C.S., Holmes, A.K., Belson, M.G., Jones, R.L., Flanders, W.D., Kieszak, S.M., Osterloh, J., Lubber, G.E., Blount, B.C., Barr, D.B., Steinberg, K.K., Satten, G.A., McGeehin, M.A. and Todd, R.L., "Investigating childhood leukemia in Churchill County, Nevada", *Environmental Health Perspectives*, 115(1), (2007), 151-7 In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", ORS Poitou-Charentes, n °136, (Juin 2011) ,199.

68. Teixeira de Siqueira, M., Braga, C., Cabral-Filho, J.E., Giraldo da Silva Auguysto, L., Natal Figueiroa, J. and Impieri Souza, A., "Correlation between pesticide use in agricultural and adverse birth outcomes in Brazil: an ecological study", *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 84, (2010), 647-651 In Chubilleau, C., Pubert, M., Comte J. et Giraudj J., "Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", *ORS Poitou-Charentes*, n °136, (Juin 2011), 199.
69. König, C., "Les algues : première lignée végétale", Disponible sur : http://www.futura-sciences.com/fr/comprendre/dossiers/doc/t/botanique/d/lesalgues-premiere-lignee-vegetale_523/c3/221/p2/, (2006).
70. Perez, R., "Ces algues qui nous entourent : conception actuelle, rôle dans la biosphère, utilisations, culture", Editions IFREMER, (1997).
71. Fox, D.R., "Spiruline : technique, pratique et promesse", Aix en Provence : Edisud , (1999).
72. Antenna Technologies., "Malnutrition. Spiruline : quelques bases scientifiques", in <http://www.antenna.ch/documents/biologie.pdf>, (2007).
73. Vidalo, J.L., "Spiruline l'algue bleue de santé et de prévention", ED. Dauphin, (2008), 1-318.
74. Cruchot, H., "La spiruline bilan et perspectives", thèse, (2008).
75. Lindblad, P., Oxelfelt, F., Tamagnini, P. and Troshina, O., "Cyanobacterial Biotechnology Nostoc PCC 73102 and H2: Knowledge, Research and Biotechnological Challenges", *Cyanobacterial biotechnology: proceedings of the International Symposium, september 18-21 1996*, Oxford & IBH Publishing CO.PVT.LTD, (1998), P 11 - 13.
76. Gershwin, M.E. and Belay, A., "Spirulina in Human Nutrition and Health", CRC Press edts, (2008), 328p.
77. Elyah, A., "Quel avenir pour la spiruline ? ", Disponible sur : http://elyah-partenariat.quebec.com/autres/26_biblio_spiruline.pdf, (2003).
78. Merceron, M., "Les bactéries photosynthétiques productrices d'oxygène", Disponible sur : [http://membres.lyco.fr/neb5000/BacteriologieI/Groupes Bactériens/ Bactéries photosynthétiques productrices d oxygene.html](http://membres.lyco.fr/neb5000/BacteriologieI/Groupes_Bactériens/Bactéries_photosynthétiques_productrices_d_oxygene.html), (2006).
79. Ciferri., "Spirulina, the Edible Microorganism", *Microbiol. Rev.* 47, (1983), 551-578.
80. Falquet, J., Hurni, J.P., "Spiruline, Aspects Nutritionnels", Antenna Technologies, (2006), 41 p, In : [http : //www.antenna.ch/malnutrition/aspects-nutritionnels.html](http://www.antenna.ch/malnutrition/aspects-nutritionnels.html).

81. Clément, G., "Production et constituants caractéristiques des algues *Spirulina platensis* et *Spirulina maxima*", *Ann.Nutr.Aliment*, n°29, (1975), 477-87.
82. Bujard, E., U. Braco, U., Mauron, J., Mottu, F., Nabholz, A., Wuhmann, J.J. et Clément, G., "Composition and Nutritive Value of Blue Green Algae (*Spirulina*) and their Possible Use in Food Formulations", 3rd.international Congress of Food Science and Technology, Washington, (1970).
83. Costa, J.A.V., Colla, L.M., Duarte, P., Kabke, K. and Weber A., "Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, (2002), 603-607.
84. Chamorro-cevallos., "Toxicologic Research on the Alga *Spirulina*", United Nations Organisation for Industrial Development, (24 October 1980).
85. Hudson, B.J.F. and Karis I.G., "The lipids of the alga *Spirulina*", *J. Sci. Food Agric* 25, (1974), 759-763.
86. Falquet, J., "Spiruline : aspects nutritionnels", Genève : Antenna Technologies, Disponible sur <http://www.technapspiruline.org/datas/Aspectsnutritionnels.doc>, (1996).
87. Quillet, M., "Recherches sur les substances glucidiques élaborées par les Spirulines", *Ann. Nutr. Alim.* 29, (1975), 553-561.
88. Challem, J.J., Passwater, R.A. and Mindell, E.M., "*Spirulina*", Keats Publishing, Inc. New Canaan, Connecticut, (1981).
89. Boudène, C., Collas, E. et Jenkins, C., "Recherche et dosage de divers toxiques minéraux dans les algues spirulines de différentes origines, et évaluation de la toxicité à long terme chez le rat d'un lot d'algues spirulines de provenance mexicaine", *Ann.Nutr.Aliment*, 29, (1975), 577-87.
90. Santillan, C., "Cultivation of the *Spirulina* for Human Consumption and for Animal Feed", International Congress of Food Science and Technology, (1974).
91. AFAA (Association française pour l'algologie appliquée)., "Actes du premier symposium sur la spiruline *Spirulina Platensis* (Gom.) ", Geitler de l'AFAA, (1982).
92. Bories, G. et Tulliez, J., "Détermination du 3,4-benzopyrène dans les algues spirulines produites et traitées suivant différents procédés", *Ann. Nutr. Aliment*, 29, (1975), 573-575.
93. Pierlovisi, C., "L'Homme et la Spiruline: Un avenir commun? Composition chimique, intérêts alimentaires et activités biologiques", Paris V- René Descartes, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris, (2007), 162 p.

94. Belay, A., "Mass culture of *Spirulina platensis* - The Earthrise farms Experience In "*Spirulina platensis* (*Arthrospira*)"", Ed. Avigad Vonshak, Taylor & Francis, Londre, (1997), 131-158.
95. Li, B., Gao, M.H., Zhang, X.C. and Chu, X.M., "Molecular immune mechanism of C-phycoyanin from *Spirulina platensis* induces apoptosis in HeLa cells in vitro", *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 43(3), (2006), 155-164.
96. Chopra. and Bishnoi, M., "Antioxydant Profile of *Spirulina*: A Blue-Green Microalga in *Spirulina*", In Gershwin & Belay (ed.) *Spirulina in Human Nutrition and Health*, (2007), 101-118.
97. Wu, L.c. and Ho, J-a .A., "Antioxydative and Hepatoprotective Effects of *Spirulina*", In Gershwin & Belay (ed.) *Spirulina in Human Nutrition and Health*, (2007), 119-151.
98. Laboratoire NATESIS., "Les phytonutriments majeurs de la Spiruline", Disponible sur http://www.natesis.com/boutique/page_actus_page.fr, (2007).
99. Puyfoulhoux, G., Rouanet, J.M., Besançon, P., Baroux, B., Baccou, J.C. and Caporiccio, B., "Iron availability from iron-fortified spirulina by an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model", *J Agric Food Chem*, 49, (2001), 1625-9.
100. Kato, T. and Takemoto, K., "Effects of spirulina on hypercholesterolemia and fatty liver in rats", *Saitama Medical College, Pub. in Japan Nutr. Foods Assoc. Journal*, (1984), 37:323.
101. Fukino. et al., "Effect of spirulina on the renal toxicity induced by inorganic mercury and cisplatin *Eisei Kagaku*", (1990), 36:5.
102. Tsuchihashi, N., Watanabe, T. and Takai, Y., "Effect of *Spirulina platensis* on caecum content in rats", *Bull Chiba Hygiene College*, 5, (1987), 27-30.
103. Schwartz, J. and Shklar, G., "Regression of experimental hamster cancer by beta carotene and algae extracts", *J-Oral-Maxillofac-Surg*, 45(6), (Jun 1987), 510-5.
104. Norme algérienne., 1291, (1994).
105. Norme algérienne., 650, (1994).
106. Norme algérienne., 657, (1994).
107. Norme algérienne., 653, (1994).
108. Norme algérienne., 652, (1994).
109. Norme algérienne., 6138, (1994).
110. Norme algérienne., 654, (1994).

111. Skufca, P., Brandsch, C., Hirche, F. and Eder, K., "Effects of a dietary thermally oxidized fat on thyroid morphology and mRNA concentrations of thyroïdal iodide transported and thyroid peroxidase in rats", *Ann, Nutr, Met*, n° 47, (2003), 207-213.
112. ORSB., "Effets chroniques des pesticides sur la santé. Etat actuel des connaissances", (janvier 2001) In *Maison de consommation et de l'environnement. "les pesticides règlementation : et effets sur la santé et sur l'environnement"*, (février 2003), 30p.
113. Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques., "les effets des pesticides sur la santé humaine", *Audition publique, ouverte à la presse*, (Jeudi 9 avril 2009), 46p.
114. Trzebiatowska, J., Lipok, J., Zastawniak, K., Mlynarz, P. and Kafarski, P., "Glyphosate degradation by *Spirulina* sp", In www.rhodia.com/icpc2004/Abstracts/Thursday/PS%202-031.pdf, (2004) In Falquet, J et Hurni, J-P., "Spiruline Aspects Nutritionnels", *Antenna Technologies*, (Novembre 2006), 41p.
115. Li, B., Gao, M.H., Zhang, X.C. and Chu, X.M., "Molecular immune mechanism of C-phycoïanin from *Spirulina platensis* induces apoptosis in HeLa cells in vitro", *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 43(3), (2006), 155-164.
116. Chopra, and Bishnoi M., "Antioxydant Profile of *Spirulina*: A Blue-Green Microalga in *Spirulina*", In Gershwin & Belay (ed.) *Spirulina in Human Nutrition and Health*, (2007), 101-118.
117. Gatignol, C. et Etienne, J.C., "Pesticides et santé. Rapport parlementaire", Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques, *Rapport n° 2463 de l'Assemblée nationale et n° 421 du Sénat*, (enregistré le 29 avril 2010), 257 p.
118. Gersende-Morgane et Stéphanie Doumerc., "Elevage et reproduction des rongeurs myomorphes domestiques en France", *Thèse de doctorat, Ecole Nationale Vétérinaire D'ALFORT*, (2004), 276 p.