

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université BLIDA 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master

Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Thème

*Étude du stress oxydatif chez des souris traitées avec
deux insecticides*

Présenté par :

M^{lle} AICHA Meriem

et

M^{lle} OUIDAH Safia

Soutenu le 18.09.2018

Devant le jury composé de :

<i>Mme CHAKHMA A.</i>	<i>Maitre Assistante A</i>	<i>UB1</i>	<i>Présidente</i>
<i>Mme ZEROUTI K.</i>	<i>Maitre Assistante A</i>	<i>UB1</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>Mme SAADI L.</i>	<i>Maitre de Conférences A.</i>	<i>UB1</i>	<i>Promotrice</i>
<i>Mme BOUAZZA M.</i>	<i>Assistante</i>	<i>UB1</i>	<i>Copromotrice</i>

Promotion : 2017-2018



Dédicaces

Je dédie ce mémoire :

À Ma grand mère

*Qui m'a accompagné par ses prières, sa douceur, puisse Dieu lui prêter longue
vie et beaucoup de santé et de bonheur dans les deux vies.*

Aux êtres les plus chers à mon coeur, ma mère et mon père

*Pour leur patience, leur amour, et leur encouragement. Puisse Dieu faire en
sorte que ce travail porte leur fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation
et le soutien permanent venu de vous.*

À mes sœurs habiba, khadidja, ma petite sœurs assil

et Mon cher frère ilyes

*À toute ma famille : mes oncles, mes tantes, mes cousins et cousines
surtout, amina, abd el kader et brahim, merci pour l'encouragement.*

À mes amis : sara ,mereim,ibtissem, wafa, amira et asma,

À tous mes enseignants.

safia

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

*A l'hommage de mon très cher père. Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir dans
sa sainte miséricorde.*

A ma très chère mère, que dieu la garde pour nous.

A ma très chère tante, pour son soutien.

A mes frères et ma sœur

et

A toute ma famille.

*A tous les enseignants et enseignantes qui ont contribué à ma
formation.*

*A toute mes amies de la promotion Biologie Cellulaire et Moléculaire
2017/2018 pour tous les moments que nous avons partagés ensemble.*

*A toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin à la
réalisation de ce travaille.*

Meriem

REMERCIEMENTS

*Nous tenons à remercier tout particulièrement **Dr. SAADI L.**, notre promotrice, maitre de conférences classe A, chef d'option et chef de département de Biologie et Physiologie Cellulaire à l'université de Blida 1, pour ses précieux conseils et encouragements ainsi que pour la généreuse confiance qu'elle nous a accordée.*

*Nous tenons à remercier **M^{elle} BOUAZZA M.**, notre co-promotrice, assistante à l'université Blida 1., pour tout l'aide et le soutien.*

*Nous tenons à remercier **M^{me} CHAKHMA A.**, maitre de conférences classe A à l'université Blida 1, pour avoir fait l'honneur de présider le jury et **M^{me} ZEROUTI K.**, maitre assistante classe A à l'université Blida 1, d'avoir accepté d'examiner notre travail.*

*Nos profond respect et remerciement s'adresse à **Pr. DJAZOULI Z. E.**, chef de département des Biotechnologies à l'université Blida 1 et à **M^r BEN MAALEM A.**, ingénieur de laboratoire de biotechnologie des productions végétales.*

*Nos profond respect et remerciement s'adresse à **M^{me} DAHNANE H.**, ingénieur de laboratoire à l'université de Blida 1, qui nous a beaucoup aidé dans la réalisation de ce travail, et un grand merci à **M^{me} SOUR S.**, maitre de conférences classe B à l'université Blida 1, pour son aide et ses précieux conseils. Nous tenons aussi à remercier **M^{me} KADRI F.**, maitre assistante classe A à l'université Blida 1, pour son aide et tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin à réaliser ce travail.*

RESUME

L'étude de la toxicité des insecticides synthétiques et naturels chez les espèces non cible a fait l'objet de plusieurs travaux scientifiques. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet de l'acétamipride, insecticide synthétique, et le spinosad, bio-insecticide sur le profil oxydatif, administrés pendant 18 jours par voie orale à raison de 9,2 mg/kg/j chez des souris femelle adultes. Le travail cible l'évolution pondérale, le taux plasmatiques de la vitamine C et du malondialdéhyde et le pouvoir antioxydant total du plasma.

Le suivi de l'évolution pondérale des souris témoins et traitées par l'acétamipride et le spinosad montre des changements non significatifs du poids corporel. L'exploration des marqueurs du stress oxydant montre une perturbation de la balance oxydante/antioxydante, représentée par une diminution non significative des taux plasmatiques de la vitamine C et une augmentation non significative du pouvoir antioxydant total du plasma chez les souris traitées. Par contre, une augmentation significative du taux plasmatique de malondialdéhyde est marquée chez les souris traitées par le spinosad.

A la lumière des résultats obtenu, nous concluons que l'exposition à l'acétamipride et au spinosad a perturbé la balance oxydante/antioxydante qui peut être considéré comme un signe de toxicité chez les souris femelles.

Mots clés : Acétamipride ; Spinosad ; Toxicité ; Stress oxydatif ; Souris femelles.

ABSTRACT

Toxicity's study of synthetic and natural insecticides in non-target species has been the subject of several scientific studies. The objective of this work was to evaluate the short-term effect of acetamiprid, a synthetic insecticide and spinosad which is a bio-insecticide on the oxidative profile, administered orally for 18 days at a rate of 9,2 mg/ kg in adult female mice. The work targets weight changes, plasma levels of vitamin C and malondialdehyde and the total antioxidant capacity of plasma.

Monitoring the weight's evolution of control and treated mice with acetamiprid and spinosad showed non-significant changes in body weight. The exploration of the oxidative stress biomarkers shows a disturbance of the oxidative / antioxidant balance, represented by a non-significant decrease in plasma vitamin C levels and a non-significant increase in the total antioxidant capacity of the plasma in treated mice. In the other hand, a significant increase in the plasma level of malondialdehydes was marked in mice treated with spinosad.

In light of these results, we conclude that the exposure to acetamiprid and spinosad disrupted the oxidative / antioxidant balance, which may be considered as a sign of toxicity.

Key words : Acetamiprid ; Spinosad ; Toxicity ; Oxidative stress; Female mice.

ملخص

تُعتبرُ دراسة سميّة المبيدات الحشرية الاصطناعية والطبيعية عند الأصناف غير المستهدفة، موضوعاً للعديد من البحوث العلمية. يهدفُ هذا البحث إلى اختبار السميّة قصيرة المدى للأسيتامبريد، مبيد حشري اصطناعي وللسبينوزاد، مبيد حشري طبيعي المقدمان عن طريق الفم بمعدل 9,2 مغ \ كغ عند إناث الفئران البالغة لمدة 18 يوم. إن هذا العمل يشمل متابعة تغيرات الوزن، نسبة الفيتامين س في البلازما، نسبة الناتج النهائي لبيركسدة الدهون و الاستطاعة العامة لمضادات الأكسدة على مستوى البلازما.

أظهرتُ متابعة تغيرات الوزن عند الفئران الشاهدة والمعالجة بالأسيتامبريد و السبينوزاد ، تغيراتاً إحصائياً غير معتبرة. كما كشفتُ بحوثنا حول علامات الإجهاد التأكسدي، إختلالات في نسبة توازن الأكسدة \ مضادات الأكسدة، معبراً عنه بإنخفاض غير احصائي في نسبة الفيتامين س في البلازما و ارتفاع غير احصائي في الاستطاعة العامة لمضادات الأكسدة على مستوى البلازما عند الفئران المعالجة. ومن ناحية أخرى، سجلنا ارتفاعاً إحصائياً معتبراً في نسبة الناتج النهائي لبيركسدة الدهون في البلازما عند الفئران المعالجة بسبينوزاد.

على ضوء ما تحصلنا عليه من نتائج، نستنتج أنّ التعرض للأسيتامبريد والسبينوزاد أدى إلى اختلال في نسبة توازن الأكسدة \ مضادات الأكسدة وهو ما يعتبر كإشارة محتملة إلى السميّة عند إناث الفئران.

الكلمات المفتاحية: الأسيتامبريد ؛ السبينوزاد؛ السميّة؛ الإجهاد التأكسدي؛ إناث الفئران.

LISTE DES ABREVIATIONS

ACE : acétamipride.

AGE : Advanced Glycation end Products.

AOPP : Advanced Oxidation Protein Products.

ddl : degré de liberté.

DL50 : Dose létale 50.

EDTA : ethylene diamine tetra-acétique.

E.F.S.A : European Food Safety Authority.

ERO : espèces réactives de l'oxygène/azoté.

ESR : Résonance de Spin Electronique

F_{obs} : Valeur de Fisher observée.

GABA : récepteur de l'acide gamma-amino butyrique.

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène.

HOCl : Acide hypochlorique.

I.P.P.U.A : Index des Produits Phytosanitaires à Usage Agricole.

L.D.H : Lactate Deshydrogénase.

M.A : Matière Active.

nAChR : récepteur nicotinique de l'acétylcholine.

N.M.R.I. : Naval Medical Research Institute.

NO₃⁻ : peroxydinitrite.

OH[•] : radical hydroxyle.

O.R.A.C. : pouvoir antioxydant total du plasma (Oxygen-Radical Absorbance Capacity).

O^{2•-} : anion superoxyde.

ROO[•] : radical peroxyde.

P.C.C. : Protein Carbonyl Content.

S.E.R.A. : Syracuse Environmental Research Associates.

SPD : spinosad.

S.P.S.S : Statistic Package for the Social Science.

TBA : thiobarbiturique.

TCA : trichloroacétique.

t_{obs} : Valeur de « t » observée.

t_{th} : Valeur de « t » théorique.

US-EPA: United States Environmental Protection Agency.

USEPA/OPP/HED : United States Environmental Protection Agency/Office of Pesticide Programs/Health Effects Division.

4-HNE : 4-hydroxy-nonéanal.

8-OHG : 8-hydroxyguanosine.

GLOSSAIRE

Anxiété : état émotionnel de tension nerveuse, de peur fort et souvent chronique (Jeuge-Maynard et *al.*, 2010).

Chromodacryorrhée : est la sécrétion de « larmes sanglantes » de la glande harderienne qui circonscrit presque l'œil dans l'orbite osseuse (Clement, 1994).

Coefficient de partition octanol-eau (K_{ow}) : Indicateur des propriétés hydrophobes des composées organiques et des pesticides en particulier (Calvet et *al.*, 2005).

Constante de Henry : rapport de la valeur de la concentration en solution aqueuse d'une matière sur la valeur de la pression partielle de son gaz au-dessus de cette solution (Mesplède, 2005).

Lixiviation : dissolution des matières solubles d'un mélange à l'aide de solvants appropriés (Jeuge-Maynard et *al.*, 2010).

Macrolide : Toute classe d'antibiotiques contenant un macrocycle lactone (dans *Oxford Dictionaries*).

Polycétide : composé organique dans lequel les groupes carbonyle alternent avec des atomes de carbone simples dans une chaîne, donc: -CO-C-CO-C-. (dans *Oxford Dictionaries*).

Résiduelle : Qui est de la nature des résidus ou qui constitue un résidu (I.P.P.U.A., 2015).

Ruissellement : le fait de ruisseler écoulement rapide des eaux pluviales sur les pentes des terrains (Jeuge-Maynard et *al.*, 2010).

Systémique : qualifie une substance capable, après pénétration dans la plante, de migrer à l'intérieur de celle-ci. On parle de systémie ascendante lorsque la substance migre dans la sève élaborée. Une substance qui cumule les deux systémies est qualifiée d'ambimobile (I.P.P.U.A., 2015).

Translaminaire : qualifie une substance capable de pénétrer dans la plante et de diffuser à travers plusieurs couches de cellules d'un même organe (I.P.P.U.A., 2015).

La LISTE DES TABLAUX

Tableaux	Titre	Page
Tableau I	Propriétés physicochimiques de l'acétamipride.	4
Tableau II	Métabolites de l'acétamipride.	Annexe I
Tableau III	Propriétés physicochimiques de spinosad.	10
Tableau IV	Composition des bouchons alimentaires.	Annexe I
Tableau V	Solutions de la gamme d'étalon pour le dosage de la vitamine C.	Annexe I
Tableau VI	Solution préparées pour le dosage de la vitamine C.	Annexe I
Tableau VII	Solution de la gamme d'étalon	Annexe II
Tableau VIII	Solutions primaires préparées pour la détermination du pouvoir antioxydant totale de plasma.	Annexe I
Tableau IX	Solutions préparées pour la détermination du pouvoir antioxydant totale de plasma.	22
Tableau X	Solutions préparées pour le dosage de malondialdéhyde.	Annexe I
Tableau XI	Table de Student.	Annexe I
Tableau XII	Table de Fisher.	Annexe I
Tableau XIII	Table des valeurs limites de Shapiro-Wilk à 1% et 5% d'erreur.	Annexe I
Tableau XIV	Valeurs pondérales moyennes des souris femelles témoins et traitées par spinosad et acétamipride.	Annexe II

Tableau XV	Poids corporel des souris femelles témoins.	Annexe II
Tableau XVI	Poids corporel des souris femelles traitées par spinosad.	Annexe II
Tableau XVII	Poids corporel des souris femelles traitées par l'acétamipride.	Annexe II
Tableau XVIII	Valeurs moyennes de la vitamine C chez les souris femelles témoins et traitées par spinosad et l'acétamipride.	Annexe II
Tableau XIX	Valeurs de la vitamine C ($\mu\text{g/ml}$) chez les souris femelles témoins et traitées par l'acétamipride.	Annexe II
Tableau XX	Valeurs de la vitamine C ($\mu\text{g/ml}$) chez les souris femelles traitées par spinosad.	Annexe II
Tableau XXI	Valeurs moyennes du pouvoir antioxydant total du plasma (ORAC) chez les souris femelles témoins et traitées par spinosad et l'acétamipride.	Annexe II
Tableau XXII	Valeurs du pouvoir antioxydant total du plasma (UI) chez les souris femelles témoins et traitées par l'acétamipride.	Annexe II
Tableau XXIII	Valeurs du pouvoir antioxydant total du plasma (UI) chez les souris traitées par spinosad.	Annexe II
Tableau XXIV	Valeurs moyennes du malondialdéhyde ($\mu\text{mol/L}$) chez les souris femelles témoins et traitées par spinosad et l'acétamipride.	Annexe II
Tableau XXV	Valeurs du malondialdéhyde ($\mu\text{mol/L}$) chez les souris femelles traitées par spinosad.	Annexe II
Tableau XXVI	Valeurs du malondialdéhyde ($\mu\text{mol/L}$) chez les souris femelles témoins et traitées par acétamipride.	Annexe II

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
Figure 1	Structure chimique de l'acétamipride.	3
Figure 2	Insectes cible d'acétamipride.	5
Figure 3	Structure chimique de spinosad.	9
Figure 4	Méthodes de détermination du stress oxydatif.	16
Figure 8	Evolution du poids corporel (g) des souris femelles témoins et traitées a raison de 9,2 mg/kg/j par acétamipride et spinosad.	25
Figure 9	Influence de spinosad et de l'acétamipride sur les taux plasmatiques de la vitamine C ($\mu\text{g/ml}$) chez des souris femelles adultes.	27
Figure 10	Influence de spinosad et de l'acétamipride sur les taux du pouvoir antioxydant total du plasma (UI) chez des souris femelles adultes.	28
Figure 11	Influence de spinosad et de l'acétamipride sur les taux plasmatiques de malondialdéhyde chez des souris femelles adultes.	29
Figure 7	Courbe d'étalonnage de la vitamine C.	Annexe II

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les produits phytosanitaires, qu'ils soient naturels ou de synthèse, sont utilisés pour augmenter le rendement agricole (Bodereau, 2011 ; Wu, 2017) et protéger les plantes et les humains de diverses maladies (Nicolopoulou et *al.*, 2016). Ces produits sont biologiquement actifs et donc intentionnellement toxiques pour les organismes cibles. Du fait de leur dangerosité intrinsèque, le contact inopiné de ces substances avec des cibles non désignées risque d'entraîner des troubles graves pour ces dernières. L'homme constitue l'une de ces cibles involontaires du fait qu'il est l'applicateur de ces substances mais aussi, consommateur de ressources alimentaires contaminées par des résidus (Multigner, 2005 ; Mondal et *al.*, 2012).

Les insecticides néonicotinoïdes représentent un groupe d'insecticides synthétiques qui s'est rapidement imposé comme un des plus insecticides utilisés à travers le monde (Thany, 2010). Ils activent sélectivement sur les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (nAChRs), cette activation des nAChRs se traduit souvent par une augmentation de Ca²⁺ intracellulaire, tandis que leur sur-activation génère un blocage engendrant une paralysie mortelle chez les insectes (Zoumenou et *al.*, 2015). L'acétamipride (ACE), insecticide néonicotinoïde le plus utilisés en Algérie, est actuellement mis sur le marché algérien sous plusieurs marques et majore les ventes des néonicotinoïdes dont le rapport cout / efficacité joue un rôle important pour le choix des agriculteurs.

Les bio-insecticides sont des organismes vivants ou produits naturels dérivés de ces organismes, qui sont utilisé pour contrôler les populations de ravageurs et diverses maladies liées aux plantes (Loudhaief, 2016). Le spinosad (SPD), un bio-insecticide nouvellement homologués en Algérie, est utilisé comme une alternative naturelle aux pesticides classiques, de fait de leur forte efficacité (Amaral et *al.*, 2012 ; Belhaouchet, 2014).

Cependant, Plusieurs études ont prouvé que ces produits, synthétique ou naturels, ont des effets nocifs sur les organismes non ciblés (Mondal et *al.*, 2012). Sachant que seule une petite partie des doses appliquées atteint la cible (<1%), tandis que la majeure partie (plus de 99%) est répartie dans l'environnement (Jayaraj et *al.*, 2016; Wilson, 2010).

Dans l'objectif de comparer les effets toxiques des insecticides naturels et synthétiques. Nous nous sommes intéressées à la recherche de la toxicité à court terme de l'ACE, insecticide synthétique, et de SPD, bio-insecticide, administré par voie orale à raison d'une faible dose chez des souris femelles adultes.

Notre travail comporte trois chapitres. Dans le premier, nous rapportons des rappels bibliographiques sur les deux insecticides et le stress oxydants. Dans la deuxième partie nous décrivons le matériel et les techniques utilisés. Les résultats obtenus sont rapportés et discutés dans la troisième partie et à la fin on terminera par une conclusion et des perspectives.

CHAPITRE I :
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

Tableau I : Propriétés physicochimiques de l'acétamipride.

Paramètres	Propriétés
État physique et couleur	Solide ou Poudre de couleur blanc cassé
Odeur	Inodore
Structure chimique	((E)-N 1 -[(6-chloro-3-pyridyl)methyl]- N 2 -cyano-N 1-methyl
Formule moléculaire	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄
masse molaire moléculaire (g/mol)	222,68 g/mol
Point d'ébullition (°C)	98.9 °C
Solubilité dans l'eau mg/L (distillé)	4,25 x 10 ³ mg/L à 25 °C
pH 5	3,48 x 10 ³ mg/L à 25 °C
pH 7	2,95 x 10 ³ mg/L à 25 °C
pH 9	3,96 x 10 ³ mg/L à 25 °C
Pression de vapeur (mm Hg)	1 x 10 ⁻⁸
Coefficient de partition octanol-eau	Kow = 6,27 Log Kow = 0,8 à 20 °C
pKa	0,7 à 25 °C
Constante d'Henry	5,3 x 10 ⁻⁸
Constante de dissociation	pKa: 0,7 at 25 °C
Stabilité Hydrolitique DT50	Stable à 22 °C, 35 °C et 45 °C
pH 4	à 22 °C, DT 50 =812 jours
pH 5 et pH 7	à 35 °C, DT 50 =52,9 jours
pH 9	à 45 °C, DT 50 =13,0 jours

(US-EPA, 2002 ; Zoumenou et *al.*, 2015)**I.1.2. Domaine d'application**

L'ACE est largement utilisé en floriculture, sur les légumes à feuilles, les culture de choux, les agrumes, les plantes ornementales et les légumes-fruits (Genersch et *al.*, 2010). Il est utilisé également sur les produits agricoles comme le tabac, la pomme de terre, le coton, la tomate et les noix dans de nombreux pays (Bass et *al.*, 2015).

Il agit sur une vaste gamme d'insectes nuisibles, par exemple les pucerons, les mouches blanches, les aleurodes et les cochenilles des hémiptères, les thrips des thysanoptères, la fausse-teigne des crucifères, les mineuses des feuilles et les mites des fruits chez les lépidoptères (figure 2) (Yamada et *al.*, 1999).

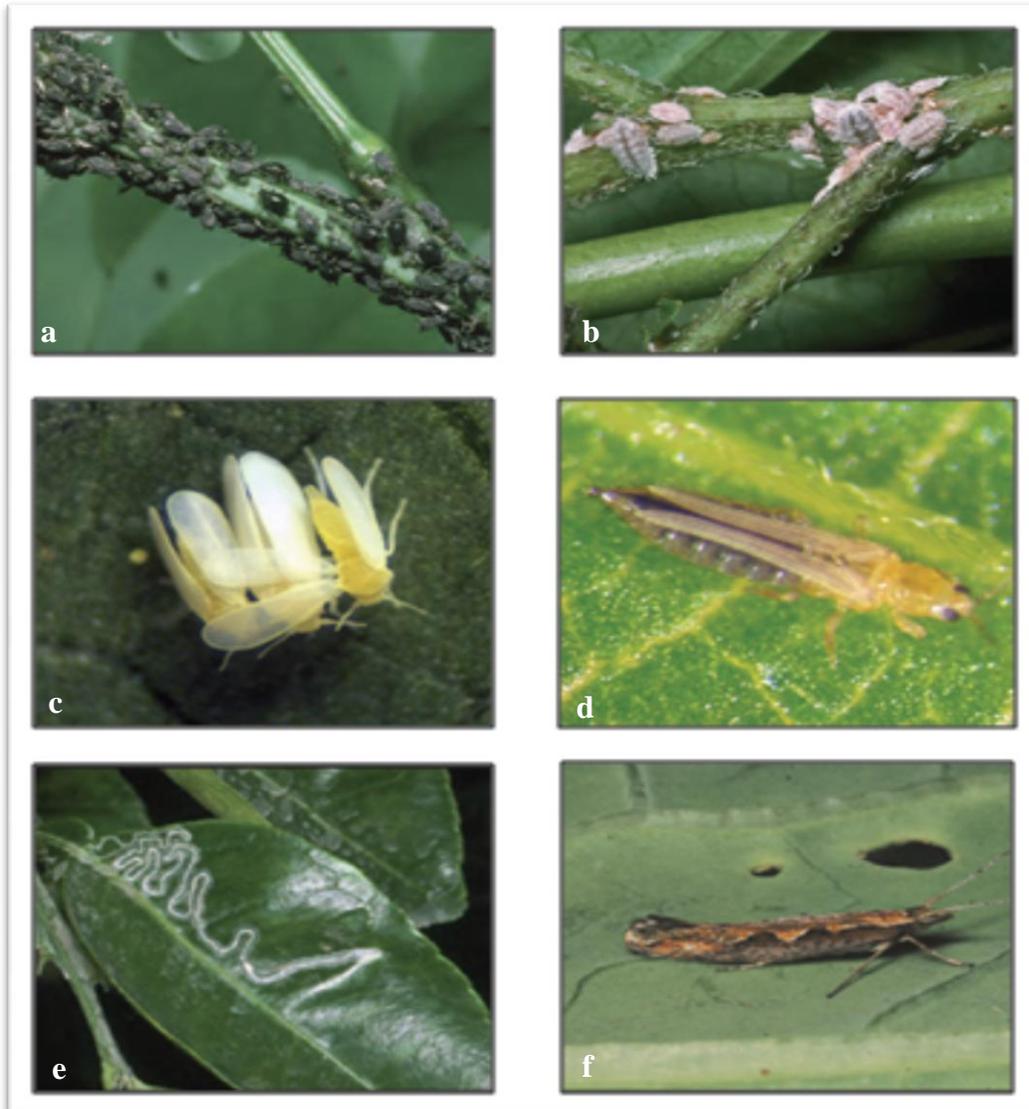


Figure 2 : Insectes cibles de l'acétamipride.

(a) : Colonie de pucerons du niébé (*Aphis craccivora*) sur Robinia, (b) : Cochenille des agrumes (*Planococcus citri*), (c) : Mouches blanches (*Bemisa tabaci*), (d) Thrips des fleurs de l'Ouest, (e) : papillon mineur des feuilles (*Phyllocnistis citrella*) sur les agrumes, (f) : la Teigne des choux (*Plutella xylostella*) (Loughlin, 2012).

I.1.3. Voies d'exposition

La pénétration digestive est la majeure voie de contamination par l'ACE. Aussi, la voie percutanée est prédominante en milieu professionnel agricole par ce pesticide (Testud, 2014 ; Terayama et *al.*, 2016).

Sur des modèles animaux, les études toxicologiques ont montré que la voie d'exposition dermique à l'ACE est extrêmement faible (Di Prisco, 2013) alors que la voie respiratoire reste négligeable (David et *al.*, 2007).

I.1.4. Toxicocinétique

L'acétamipride est rapidement et largement absorbé après l'administration orale, montrant les concentrations les plus élevées dans les glandes surrénales, la thyroïde, le foie et les reins avec absence du potentiel d'accumulation (EFSA, 2016). Avant d'être excrété dans les fèces et l'urine, l'ACE est métabolisé par les enzymes du cytochrome P450 du foie (Terayama et *al.*, 2016) dont la principale voie de métabolisation est la N-déméthylation (Simon-Delso et *al.*, 2015). Le métabolisme de l'acétamipride est similaire chez les plantes et les mammifères et est divisé en deux phases :

- Le métabolisme de la phase I qui est largement dépendant du cytochrome P450. Il comprend des réactions telles que la déméthylation, la réduction du groupement nitro et l'hydrolyse du groupement cyano (Dick et *al.*, 2005; Casida, 2011). Les métabolites de la phase I ont été trouvés chez les petits mammifères et les plantes (Chen et *al.*, 2005; Casida, 2011).
- Le métabolisme de phase II est principalement responsable de la formation de conjugués, qui diffèrent entre les plantes et les animaux (Ford et Casida, 2008; Casida, 2011).

Chez les insectes, l'acétamipride subit une biotransformation rapide, qui indique une activité métabolique élevée. Il est métabolisé en IM-2-1, IM-1-3, IM-1-4, IM-0, IC-0 et deux métabolites inconnus. Le métabolite principal dans le sol est IM-1-4 et les métabolites secondaires comprennent l'ACE-urea et le 6-CNA (Tableau II, annexe 1) (Simon-Delso et *al.*, 2015).

I.1.5. Toxicité

L'ACE comme les autres insecticides peuvent avoir des effets nocifs sur les organismes non ciblés (Çamlıca et *al.*, 2018).

I.1.5.1. Toxicité environnementale

L'acétamipride présente une très courte demi-vie dans le sol 31-450 jours (Goulson, 2013). Il est rapidement dégradé par le métabolisme aérobie (Wallace, 2014). De plus, l'ACE étant hautement soluble dans l'eau, il y a un risque élevé de lixiviation du composé dans le sol ou de ruissellement dans les eaux de surface (Sun et *al.*, 2017).

En raison de sa dégradation rapide l'ACE ne persiste pas dans l'environnement, par contre, ses métabolites présentent un plus grand risque pour l'environnement (Wallace, 2014).

I.1.5.2. Toxicité animale et humaine

a- La toxicité aiguë

Des études sur la toxicité aiguë de l'acétamipride ont montré qu'il est légèrement toxique par inhalation et faiblement toxique suivant une administration dermique. Il provoque peu ou pas d'irritation des yeux ou de la peau. Certains métabolites d'ACE présentent une plus grande toxicité que l'ACE lui-même (Wallace, 2014).

Chez l'humain, les principaux symptômes de l'empoisonnement par ingestion de l'ACE sont des nausées sévères, des vomissements, une faiblesse musculaire, une hypothermie et des convulsions (Todani et *al.*, 2008).

b- Toxicité subchronique et chronique

Plusieurs travaux ont montré que l'administration chronique de l'ACE engendre des effets destructifs (Pisa et *al.*, 2015). Le bureau des programmes de pesticides (US-EPA, 2002) classe l'ACE comme un "Peu probable" cancérigène pour l'Homme. Mais plusieurs travaux ont montré que l'administration chronique de cet insecticide engendre des effets destructifs (Pisa et *al.*, 2015):

- Hématotoxicité

Singh et *al.* (2012) ont montré chez des souris mâles exposées à l'ACE une diminution significative du profil hématologique global. Alors que chez les rats l'ACE diminue le taux des globules rouges, de l'hémoglobine, de l'Hématocrite (Chakroun et *al.*, 2016), de la glycémie, du cholestérol et des lipides de faible densité (Mondal et *al.*, 2014a). par contre l'ACE fait augmenter les concentrations de calcium, de phosphore, de sodium, de potassium, de chlorure, de zinc, de cuivre, de fer et de cobalt dans le plasma des rats intoxiqués (Mondal et *al.*, 2014b).

- Immunotoxicité

Les données étudiant l'immunotoxicité potentielle de l'ACE sont rares. Devan et *al.*, (2015) ont conclu que le traitement subchronique des rats Wistar par l'ACE réduisait significativement la prolifération lymphocytaire à l'égard des mitogènes des cellules B, ce qui pourrait contribuer à l'immunosuppression. Il est aussi prouvé que l'ACE induit une immunotoxicité chez les souris mâles, qui est présentée par des altérations dans la rate et révélatrices d'une destruction tissulaire, d'une lésion et une déplétion des lymphocytes de la rate dans la gaine lymphoïde péri-artériolaire et dans la zone marginale de la pulpe blanche (Marzouki et *al.*, 2017).

- Effets sur la fonction reproductrice

La toxicité de l'ACE sur la reproduction a été démontrée chez des souris mâles où elle a induit une altération du système reproducteur suite à un effet au niveau du poids des testicules, de l'épididyme, des vésicules séminales, de la prostate, de la quantité de sperme, du taux de testostérone, de la viabilité et de la motilité des spermatozoïdes avec la présence d'anomalies au niveau des mitochondries et du réticulum endoplasmique dans les cellules de Leydig (Zhang et *al.*, 2011).

- Neurotoxicité

Kimura-Kuroda et *al.* (2012) ont étudié l'effet de l'ACE sur les neurones cérébelleux de rats nouveau-nés et ont découvert que l'ACE avait des effets excitateurs sur les nAChR des mammifères. Sano et *al.* (2016) ont suggéré que l'exposition *in utero* et pendant la période de lactation peut provoquer une anxiété et influencer le comportement lié à la vie sociale chez les souris mâles.

I.2. GENERALITES SUR LE BIO-INSECTICIDE « SPINOSAD »

Le spinosad membre de la famille des spinosynes, est caractérisées par un macrolide tétracyclique dérivé de polycétide auquel sont ajoutés deux saccharides, est un mélange de spinosyne A et D (Kirst, 2010). Le SPD (figure 3) est composé majoritairement de spinosyne A (Aboul-Enein et *al.*, 2012). Il est issu de la fermentation aérobie d'une actinobactérié du sol, *Saccharopolyspora spinosa* (Dos Santos Dias et *al.*, 2017; De Amicis et *al.*, 2017).

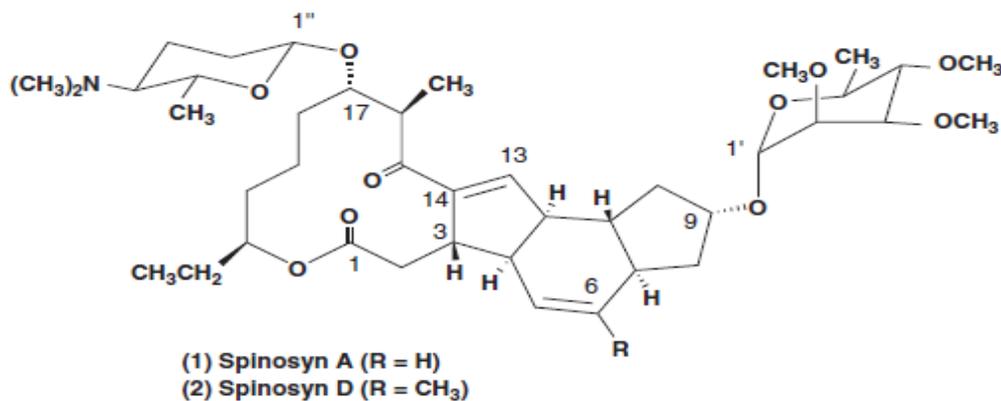


Figure 3 : Structure chimique de spinosad (Kirst, 2010).

I.2.1. Spectre d'activité

Le spinosad montre une activité insecticide puissante contre de nombreuses ravageurs qui causent des dommages importants aux cultures et autres plantes (Kirst, 2010). Il est utilisé principalement dans les cultures de coton, de pommes de terre, de plantes à fruits et de tabac et dans la culture de légumineuses. Il montre une efficacité significative contre les organismes cibles même à de faibles concentrations (Amaral et *al.*, 2012). En Algérie, le spinosad est utilisé contre des insectes prédateurs comme les noctuelles, les mineuses, les thrips des cultures maraîchères et cucurbitacées, la mouche méditerranéenne des agrumes et contre la mouche des oliviers (I.P.P.U.A., 2015).

Le spinosad est utilisé comme une alternative naturelle aux pesticides classiques, de fait de sa forte efficacité (Amaral et *al.*, 2012), la grande sélectivité vis-à-vis des insectes cibles et une faible toxicité pour la majorité des insectes non cibles, ainsi qu'aux mammifères, espèces aquatiques et pour les oiseaux. Ce bio-insecticide montre aussi une

activité contre les parasites externes importants du bétail, des animaux de compagnie et des humains (Kirst, 2010).

I.2.2. Propriétés physicochimiques

Le spinosad est un solide cristallin gris clair à blanc avec une odeur d'eau légèrement fade. Dans l'eau, il a un pH de 7,74 et est considéré non volatile avec une pression de vapeur $1,3 \times 10^{-10}$ Pa (Tableau III). La dégradation du spinosad dans l'environnement se produit principalement par la photodégradation et la dégradation microbienne. Il a une faible persistance dans l'environnement (Thompson et *al.*, 2000).

Tableau III : Propriétés physicochimiques de spinosad.

Paramètres	Spinosyne A	Spinosyne D
Formule moléculaire	C ₄₂ H ₆₇ NO ₁₆	C ₄₁ H ₆₅ NO ₁₆
Masse moléculaire (g/mol)	731.98	746.00
Point d'ébullition (°C)	84-99.5	161.5-170
Pression de vapeur (Pa)	$3,2 \times 10^{-10}$	$2,1 \times 10^{-10}$
Solubilité dans l'eau/ (mg litre ⁻¹)		
pH 5	290	29
PH 7	235	0.332
pH 9	16	0.053
Coefficient de partition octanol-eau (log P)		
pH 5	2.8	3.2
PH 7	4.0	4.5
pH 9	5.2	5.2
Constante de dissociation (pKa)	8,10	7,87

(Kuhr et Motoyama, 1998 ; Thompson et *al.*, 2000)

I.2.3. Mode d'action

Le spinosad active les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (nAChR) et inhibe les récepteurs de l'acide gamma-amino butyrique (GABA) dans le système nerveux central des insectes (Piner et Uner, 2012 ; Khan et *al.*, 2014). Ce qui provoque la surexcitation du système nerveux de l'insecte conduisant à des contractions musculaires involontaires, à la

prostration avec des tremblements, et enfin la paralysie et la mort de l'insecte (Salgado et *al.*, 1998 ; Aboul-Enein et *al.*, 2012).

I.2.4. Voies d'exposition

Les voies d'expositions au SPD sont trois, la voie orale est associée à la consommation de végétation traitée, de l'eau et de poissons contaminés, la voie cutané par contact avec les feuilles traitées ou au moment du traitement, la voie respiratoire par inhalation des aérosols lors de la pulvérisation (S.E.R.A, 2016).

I.2.5. Toxicocinétique

Chez les mammifères, après une administration orale de spinosad, 80% des spinosynes A et 66% des spinosynes D sont rapidement absorbés. Les résidus de spinosad sont largement distribués dans les graisses péri-rénales, le foie, les reins et les ganglions lymphatiques. Alors que des grandes concentrations de spinosad ont été retrouvées dans la thyroïde. Le spinosad est excrété principalement dans les fèces (Marrs, 2012). Chez le rat, le N et O-deméthyle spinosynes A sont les principales métabolites retrouvés dans la thyroïde (Domoradzki et *al.*, 1995).

I.2.6. Toxicité

En raison de son profil environnemental et toxicologique très favorable, le spinosad a été classé comme un insecticide à risque réduit. Cependant, au cours des dernières années, un nombre croissant de recherches a révélé que le spinosad peut avoir des effets toxiques variables sur les organismes non ciblés (Yang et *al.*, 2016).

I.2.6.1. Toxicité animal et humaine

a- Toxicité aigue

Le spinosad présente une faible toxicité aigüe après administration orale, dermique et cutanée. Le spinosad est modérément irritant pour les yeux, mais n'en pas pour la peau des lapins et ne sensibilise pas la peau des cobayes (Marrs, 2012). Les signes toxicologiques chez les rats et les souris gavés par 5000 mg/kg/j et 6000 mg/kg/j de SPD respectivement sont la larmimation, la salivation, la chromodacryorrhée, la respiration rapide et une diminution de l'activité avec une incoordination (U.S.EPA/OPP/HED, 1997). Chez l'homme, une intoxication a été signalée, après ingestion d'un mélange contenant

principalement spinosad et flonicamid, les manifestations cliniques étaient principalement neurologiques, la constipation, le choc, l'insuffisance respiratoire, la pneumonie et la rétention urinaire (Su et *al.*, 2011).

b- Toxicité sub-chronique

Aboul-Enein et *al.* (2012) a montrés que l'exposition des rats mâles au SPD à une dose de 1/20 DL50 pendant 4 semaines induit une perturbation de système antioxydant et provoque le stress oxydant. Selon Zidan (2015), le SPD cause une hépato et néphro-toxicité chez les rats males albinos après une exposition par voie orale pendant 90 jours. une diminution du poids corporel et de la consommation alimentaire, une augmentation de la rate, de la thyroïde et du foie ainsi qu'une altération hématologique et une diminution du poids des reins ont été également rapportées par d'autres auteurs (Mansour et *al.*, 2008 ; Marrs, 2012).

Dans une étude récente d'El-Naggar et *al.* (2017) signalent une diminution du poids corporel, une augmentation de poids des reins et de la rate et une toxicité des reins, du foie et du cervelet chez des souris males albinos recevant 350 mg/kg de spinosad.

c-Toxicité chronique

La carcinogénicité de spinosad a été évaluée *in vivo* sur des rats et des souris ; les résultats ont démontré que le SPD ne contribue pas à une augmentation de l'incidence néoplasique dans n'importe quel tissu. Le SPD est considéré aussi comme bio-insecticide qui ne présente pas d'activité mutagénèse. N'est pas tératogène chez les rats et les lapins et ne présente aucun signe neurotoxique spécifique chez des rats selon des études sur la toxicité aiguë, sub-chronique et chronique (Marrs, 2012).

1.2.6.2. Toxicité environnementale

Les spinosynes y compris le spinosad sont facilement sujets à un certain nombre de voies de dégradation et de mécanismes métaboliques divers qui réduisent leur persistance dans les plantes, les animaux et l'environnement (Kirst, 2010). L'hydrolyse de spinosad ne contribue pas significativement à la dégradation du produit. Ce dernier étant relativement stable dans l'eau avec un pH de 5 à 7 et dans un pH=9, la demi-vie du spinosad atteint 200 jours au minimum (Thompson et *al.*, 2000).

I.3. STRESS OXYDATIF

Le stress oxydant se définit comme un déséquilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène/azote (ERO) et la capacité antioxydante cellulaire (Migdal et Serres, 2011). Il se manifeste soit par une production excessive d'ERO, ou par une diminution des capacités antioxydantes (Favier, 2006).

I.3.1. Espèces réactives de l'oxygène

Les ERO sont des dérivés de l'oxygène, hautement réactives et instables (Dhalla et *al.*, 2000). Elles incluent des espèces oxydantes radicalaires, appelées aussi les radicaux libres, et des espèces oxydantes non radicalaires.

I.3.1.1. Espèces réactives de l'oxygène radicalaires

Un radical libre se définit comme tout atome, groupe d'atomes ou molécule possédant un électron non apparié sur l'orbitale externe. Cette caractéristique lui confère une réactivité importante vis-à-vis les biomolécules (Januel, 2003). Les radicaux libres proviennent essentiellement de la chaîne respiratoire mitochondriale (Cadenas et Davies, 2000) et des processus métaboliques, comme la transformation de certains xénobiotiques par les systèmes enzymatiques de type cytochrome P450 (Beaudeau et *al.*, 2006). Les principaux éléments oxydants radicalaires sont :

a- L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)

C'est l'espèce la plus couramment générée par la cellule. L'anion superoxyde peut provenir de plusieurs sources cellulaires comme la réduction d'une molécule d' O_2 et possède la plus faible réactivité vis-à-vis des substrats organiques. Cependant, elle est capable de produire d'autres radicaux libres (Cailloux, 2014).

b- Le radical hydroxyle (OH^{\cdot})

En raison de son potentiel d'oxydoréduction très élevé, le radical hydroxyle est l'espèce radicalaire de l'oxygène la plus délétère du stress oxydant. Il ne possède pas de cibles privilégiées et attaque la plupart des biomolécules. Cependant Il a une très faible durée de vie et ne réagit qu'avec des substrats sur son lieu de production (Migdal et Serres, 2011).

c- Le radical peroxyde (ROO^\bullet)

Le radical peroxyde, formé suite à une oxydation des acides gras polyinsaturés par des ERO formées préalablement, est très instable et peut attaquer d'autres acides gras polyinsaturés voisins (Gardès-Albert et *al.*, 2003 ; Djefal, 2014).

I.3.1.2. Espèces réactives de l'oxygène non radicalaires**a- Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)**

Le peroxyde d'hydrogène est une molécule relativement stable et possède une longue demi-vie. Il est capable de traverser les membranes des cellules et des organites et provoquer des dommages loin de son site de production (Ramirez et *al.*, 2008).

b- L'acide hypochlorique (HOCl)

Il est formé à partir du peroxyde d'hydrogène. Son pouvoir de diffusion à travers les membranes biologiques lui permet d'agir sur de nombreuses biomolécules (Ognjanovic et *al.*, 2008).

c- Le peroxyde nitrite (NO_3^-)

Le NO_3^- est une ERO qui apparaît très rapidement suite à une réaction entre le monoxyde d'azote et l'anion superoxyde. Il cause beaucoup de dommages aux composants cellulaires (Sears et Genuis, 2012).

I.3.2. Cibles biologique des espèces réactives de l'oxygène

Depuis plusieurs années, la production contrôlée des espèces réactives de l'oxygène apparaît comme un mécanisme essentiel de la signalisation cellulaire et participe au maintien de l'homéostasie (Migdal et Serres, 2011). Cependant, l'excès des ERO non neutralisées par les antioxydants, peut altérer les biomolécules et provoquer ainsi des dégâts cellulaires importants (Schieber et Navdeep, 2014). Les principales cibles biologiques des ERO sont :

I.3.2.1. Lipides

Selon Rahal et *al.* (2014), l'oxydation des acides gras polyinsaturés, en particulier l'acide arachidonique et l'acide docosahexaénoïque, conduisent à la génération de

malondialdéhyde (MDA) et au 4-hydroxy 2-nonéol (4-HNE). Ces derniers sont reconnus comme des marqueurs de la peroxydation lipidiques.

I.3.2.2. Bases azotées

Valko *et al.* (2007) ont montré que l'oxydation des bases azotées par le radical OH[•] peut provoquer des mutations dans l'ADN nucléaire et mitochondrial. Selon Rahal *et al.* (2014), la 8-hydroxy-2-désoxyguanosine est le produit prédominant de cette oxydation.

I.3.2.3. Protéines

Les ERO attaquent les protéines et provoquent plusieurs types de modifications comme : l'oxydation des chaînes latérales des acides aminés, la fragmentation des protéines et la formation de liaisons croisées entre deux protéines (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2001). Ces modifications conduisent à une perte de fonction catalytique ou structurale des protéines affectées (Levine, 2002).

I.3.3. Le système antioxydant

L'organisme est doté d'un ensemble de systèmes de défenses antioxydant, très efficaces contre la surproduction d'ERO. Ces substances retardent ou inhibent significativement l'oxydation des substrats oxydables (Halliwell, 1990). Les systèmes antioxydants peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine (Delattre *et al.*, 2005). Selon Sies (1991), les systèmes se composent de :

- Enzymes comme : la superoxyde dismutase, la catalase, le glutathion peroxydase, le couple thiorédoxine /thiorédoxine réductase et l'hème oxygénase.
- Protéines transporteuses du fer et du cuivre tel que la transferrine, la ferritine et la céruléoplasmine.
- Molécules antioxydantes de petite taille comme : la glutathion, l'acide urique, la bilirubine, le glucose, les vitamines A, C et E, l'ubiquinone, les caroténoïdes et les flavonoïdes.

- Oligoéléments composés de cuivre de zinc et de sélénium indispensables pour l'activité des enzymes antioxydantes.

Un système de défense secondaire, composé d'enzymes empêchent l'accumulation de protéines et de l'ADN oxydés dans la cellule, complète la panoplie des moyens de protection contre les ERO (Sies, 1991).

I.3.4. Détermination du statut oxydant/ antioxydant

Selon Poljsak et al. (2013), l'estimation du stress oxydatif se fait par la mesure de la formation des ERO ainsi que le potentiel de défense antioxydant (Figure 4).

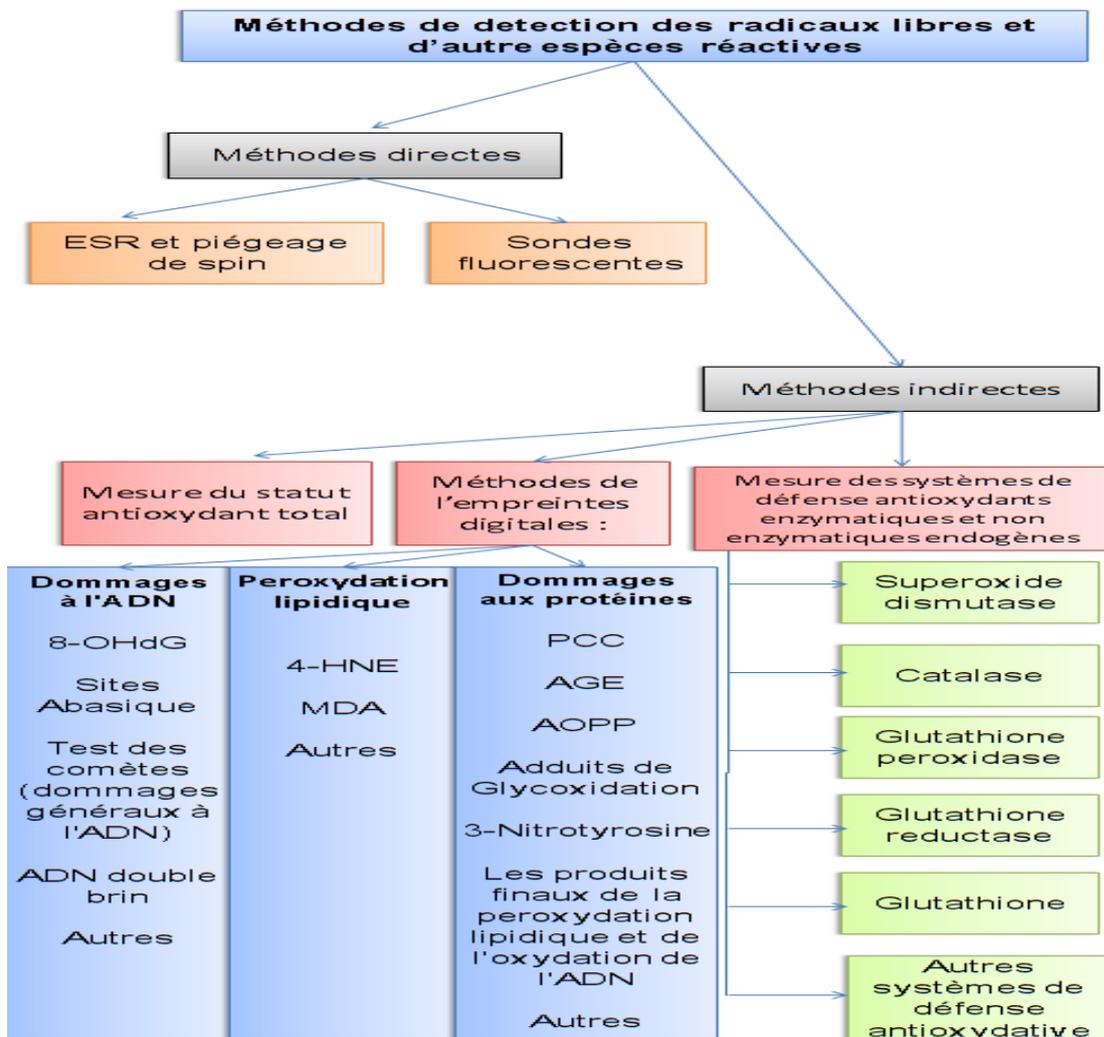


Figure 4: Méthodes de détermination du stress oxydatif (Poljsak et al., 2013, modifier).

CHAPITRE II :
MATERIEL ET METHODES

Notre présent travail porte sur la recherche des aspects de la toxicité à court terme de deux insecticides à savoir l'acétamipride et de spinosad à raison de 9,2 mg/kg/j administrés quotidiennement par voie orale chez des souris femelles. L'étude est basée sur l'évaluation du poids corporel et de certains paramètres de stress oxydant.

Le travail est réalisé au niveau de la station expérimentale de la faculté SNV à l'université Blida 1. Notre travail a duré quatre mois à partir du mois d'avril 2018.

II. 1. MATERIEL

II.1.1. Animaux

Notre étude a portée sur 30 souris femelles de la souche Naval Medical Research Institute (N.M.R.I.) provenant de l'institut Pasteur de Dely Ibrahim. Leur poids corporel varié de 19g à 23g et avec une moyenne de $21,71g \pm 2,56$.

Dès leur arrivée à l'animalerie, les souris sont soumises à une période d'acclimatation pendant 10 jours à température ambiante et à une photopériode alternée de 12 heures d'obscurité suivie de 12 heures de lumière. Les souris sont élevées dans des cages en polyéthylène qui sont tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois. Les cages sont nettoyées et la litière est changée tous les 2 jours jusqu'à la fin de l'expérimentation.

Tous les animaux reçoivent de l'eau et de la nourriture « *ad-libitum* ». La nourriture est composée d'un concentré équilibré en protéines, glucides, lipides, vitamines et sels minéraux (Tableau IV, Annexe I).

II.1.2. Insecticides

II.1.2.1. Acétamipride

L'acétamipride, insecticide commercialisé par MOPISTOP, est présenté dans un sachet en aluminium contenant 50g de poudre d'une pureté de 20% (Figure 5, annexe 1). La dose expérimentale testée durant l'expérimentation est de 1/20 de la DL50. Cette dose est la moins toxique parmi une gamme de doses testées chez les souris femelles. À partir de la DL50=184 mg/kg/j chez les souris femelles (Singh et *al.*, 2012), la dose 1/20 DL50 est calculée comme suit :

$$\begin{array}{l} \text{La dose (9,2 mg/kg/j)} \longrightarrow 1000 \text{ g de poids corporel} \\ X \longrightarrow \text{Poids corporel de la souris traitée (g)} \end{array}$$

$$X = \text{La quantité de matière active nécessaire} = (\text{Poids corporel} \times \text{dose}) / 1000$$

(M.A.)

La pureté du produit est de 20%, alors :

$$100 \text{ mg de produit} \xrightarrow{\text{Contient}} 20 \text{ mg de matière active}$$

$$Y = \text{Quantité à dissoudre (mg)} \longrightarrow \text{quantité de matière active (mg) (X)}$$

(À rechercher)

$Y = \text{La quantité à dissoudre} = (\text{Poids corporel} \times \text{dose}) / 200$

Exemple : pour une souris de 25g

$$\text{La quantité de M.A. nécessaire} = (25 \times 9,2) / 1000 = 0,23 \text{ mg}$$

$$\text{La quantité à dissoudre} = (25 \times 9,2) / 200 \approx 1,15 \text{ mg}$$

II.1.2.2. Spinosad

Le spinosad (SPD), bio-insecticide commercialisé sous le nom de SUCCESS* APPAT, est présenté dans une bouteille en plastique de 1L sous forme de solution d'une pureté de 0,24 g/L (Figure 6, annexe I). Sa LD50 est de 7100 mg/kg chez les souris mâles et 6100 mg/kg chez les souris femelles (Gilbert et Yano, 1996). La dose choisie est de 9,2mg/kg/j. elle est calculée comme suit :

La pureté du produit est de 0,24g/L, alors :

$$1000 \text{ ml de produit} \xrightarrow{\text{Contient}} 240 \text{ mg de M.A.}$$

Comme :

$$1 \text{ ml de spinosad} = 960,9 \text{ mg}$$

Donc :

1000 x 960,9 mg de produit $\xrightarrow{\text{Contient}}$ 240 mg de M.A.

Alors :

Y = Quantité à dissoudre (mg) \longrightarrow X = La quantité de M.A. nécessaire
(À rechercher)

$$Y = \text{La quantité à dissoudre} = (\text{M.A.} \times 1000 \times 960,9) / 240$$

(mg)

Comme :

$$X = \text{La quantité de matière active nécessaire} = (\text{Poids corporel} \times \text{dose}) / 1000$$

(M.A.)

Donc :

$\text{La quantité à dissoudre} = (\text{Poids corporel} \times \text{dose} \times 960,9) / 240$
--

Exemple : pour une souris de 25g,

$$\text{La quantité de M.A. nécessaire} = (25 \times 9,2) / 1000 = 0,23 \text{ mg}$$

$$\text{La quantité à dissoudre} = (0,23 \times 1000 \times 960,9) / 240 \approx 920,86 \text{ mg.}$$

II.1.3. Appareillage et réactifs

Une gamme de matériel non biologique est utilisée afin de réaliser notre expérimentation. L'ensemble de l'appareillage et des réactifs sont présentés dans l'annexe I.

II.2. METHODES

II.2.1. Expérimentation

Après la période d'adaptation aux conditions de laboratoire, les souris sont marquées et réparties en trois groupes :

- Le premier groupe comporte 9 souris femelles témoins qui sont gavées quotidiennement par 10 ml/Kg d'eau distillée.
- Le deuxième groupe comporte 10 souris femelles traitées quotidiennement par 9,2mg/kg/j) d'ACE dissoute dans 10 ml/Kg d'eau distillée.
- Le troisième groupe comporte 10 souris femelles traitées chaque jour par 9,2mg/kg/j de SPD dissoute dans 10 ml/Kg d'eau distillée.

Toutes les souris reçoivent l'eau et la nourriture à volonté durant 18 jours de l'expérimentation. La prise de poids corporel est réalisée trois fois : avant le gavage, après 9 jours de gavage et le jour de sacrifices. Les doses sont ajustées chaque 9 jour.

II.2.2. Sacrifice et Prélèvement des échantillons

Les sacrifices sont réalisés par décapitation rapide sans anesthésie. Ils sont effectués la matinée entre 9 h et 11 h afin d'éviter les variations hormonales pendant la journée. Le sang récupéré dans des tubes EDTA (éthylène diamine tétra-acétique) est destiné à la réalisation des dosages de différents paramètres de stress oxydant.

II.2.3. Dosage des paramètres de stress oxydant

II.2.3.1. Dosage de la vitamine C

a- But

L'acide L-ascorbique, ou vitamine C, est considéré comme le plus important antioxydant dans les fluides extracellulaires. Le but du dosage est de déterminer la capacité de défenses antioxydante.

b- Principe

Le dosage est réalisé par une méthode colorimétrique en utilisant le réactif de Folin et une gamme d'acide ascorbique. Les protéines plasmatiques sont précipitées par la solution de trichloracétique (TCA) à 10% puis centrifugées. Le réactif de Folin est ajouté au surnageant et la densité optique est déterminée par le spectrophotomètre à une longueur d'onde de 769 nm. Les concentrations de la vitamine C seront déduites à partir d'une courbe d'étalonnage en utilisant une gamme de concentrations d'acide ascorbique.

c- Mode opératoire

Pour réaliser le dosage de la vitamine C, nous avons suivi les étapes décrites par Jacota et Dani (1982) :

- Pour la gamme étalon :
 - Nous prenons 0,75 ml de Chaque'un des 3 solutions de la gamme (Tableau V, annexe I).
 - Pour chaque solution, nous ajoutons 0,75 ml d'eau distillée et 150 µl de Folin dilué (1/10) (Tableau VI, annexe I).
 - Après agitation, les solutions sont incubées pendant 15 min à température ambiante.

- Pour les échantillons :
 - Nous ajoutons à 1 ml de plasma 0,5 ml de la solution TCA à 10 % (Tableau VI, annexe I).
 - Les tubes sont mélangés puis placés dans un bain à glace pendant 30 min.
 - La centrifugation est faite à 3000 t/min pendant 10 min.
 - Nous ajoutons 0,75 ml d'eau distillée et 150 µl de Folin (1/10) au 0,75 ml de surnageant.
 - Le mélange est vortexé et incubé pendant 15 min à température ambiante.

d- Lecture

La Lecture de la densité optique est effectuée grâce au spectrophotomètre contre le blanc (eau distillée) à 769 nm. Les concentrations de la vitamine C (µg/ml) sont déterminées à partir de la courbe d'étalonnage (tableau VII et figure 7, annexe II).

II.2.3.2. Détermination du pouvoir antioxydant total du plasma

a- But

Le but du dosage est de fournir une indication sur la capacité de protection antioxydante globale.

b- Principe

Le pouvoir antioxydant totale du plasma (ORAC), est la capacité d'absorption des radicaux oxygénés. Ce dosage est effectué selon la méthode de Blache et Prost (1992). Le principe de cette méthode est basé sur le suivi de l'hémolyse des hématies, en fonction du temps, induite par un oxydant (peroxyde d'hydrogène H₂O₂).

c- Mode opératoire

Le traitement des globules rouges et la préparation des solutions pour ce dosage sont détaillés dans le tableau VIII de l'annexe I et le tableau VIX.

Tableau VIX : Solutions préparées pour la détermination du pouvoir antioxydant total du plasma.

Tube blanc	Tube étalon	Tube test
Nous ajoutons à 1 ml de GR, 20 µl de CuSO ₄ , 20 µl d'H ₂ O ₂ à 30% et 2 ml d'eau physiologique.	Nous ajoutons à 1 ml de GR, 20 µl de CuSO ₄ , 20 µl d'H ₂ O ₂ à 30%, 2 ml d'eau physiologique et 20 µl de la vitamine C.	Nous ajoutons à 1 ml de GR, 20 µl de CuSO ₄ , 20 µl d'H ₂ O ₂ à 30%, 2 ml d'eau physiologique et 20 µl de plasma à tester

Les solutions sont remuées délicatement puis incubées pendant 5 min à température ambiante. La centrifugation est effectuée pendant 5 min à 2000 t/min.

c- Lecture

Nous lisons la densité optique du surnageant à 450 nm puis nous le remettons dans le tube et nous le remuons délicatement. Nous répétons cette opération toutes les 10 min pendant 1 h (t₀, t₁₀, t₂₀, t₃₀, t₄₀, t₅₀, t₆₀). L'ORAC de chaque échantillon est calculé suivant la méthode détaillée dans l'annexe I.

II.2.3.3. Dosage du malondialdéhyde

a- But

Le malondialdéhyde (MDA) est l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés médités par les radicaux libres. Le but du dosage est de déterminer le niveau de la peroxydation lipidique en mesurant le taux de malondialdéhyde.

b- Principe

Après l'action de TCA pour la précipitation des protéines, les aldéhydes présents dans le plasma ou dans le lysat vont réagir avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un produit de condensation chromogénique consistant en deux molécules de TBA et une molécule de MDA (Nourooz-Zadeh *et al.*, 1996).

c- Mode opératoire

Nous préparons les solutions suivantes :

- 100 μ l de plasma.
- 100 μ l de TBA 0,67 % (tableau X, annexe I).
- 500 μ l TCA 20 % (tableau X, annexe 1).

Le mélange de ces trois solutions est vortexé puis incubé au bain-marie à 100°C pendant 20 min. Après refroidissement, la solution est centrifugée à 6000 t/min pendant 10 min.

c- Lecture

Nous lisons la densité optique du surnageant au spectrophotomètre contre le blanc (eau distillée) à $\lambda=532$ nm. Le calcul de la concentration du malondialdéhyde est effectué suivant l'équation présentée dans l'annexe I.

II.2.4. Calcul statistique

Les résultats sont présentés sous forme de Moyenne \pm écart type (annexe I). La normalité de la distribution des échantillons est vérifiée par un test de *Shapiro-Wilk* via le logiciel statistique *S.P.S.S.* (Statistic Package for the Social Science). Les comparaisons

intra et inter groupes sont effectuées par le test t (test de *student*) après l'application du test de *Fischer* (test de *Fischer*).

La différence est jugée statistiquement comme :

- Non significative lorsque $p > 0,05$
- Significative (*) lorsque $0,05 > p > 0,02$
- Très significative (**) lorsque $0,02 > p > 0,01$
- Hautement significative (***) lorsque $0,01 > p$

CHAPITRE III :
RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. RESULTATS

La recherche des aspects toxiques de l'acétamipride et de spinosad, à raison de 9,2 mg/kg/j pendant 18 jours a été basée sur l'étude de l'évolution pondérale et des variations de quelques paramètres du stress oxydant.

III.1.1. Comportement

Dans nos conditions expérimentales, nous avons constaté un changement de comportement chez les souris traitées par rapport aux souris témoins. Ce changement a été remarqué beaucoup plus chez les souris traitées par le spinosad. Les signes été présentent par une diminution de l'activité avec tendance de rester dans les coins des cages et des diarrhées.

III.1.2. Evolution pondérale

Les résultats de la variation du poids corporel des souris femelles témoins et traitées et leurs significations statistiques sont présentées dans la figure 8 et les tableaux XIV, XV, XVI et XVII de l'annexe II.

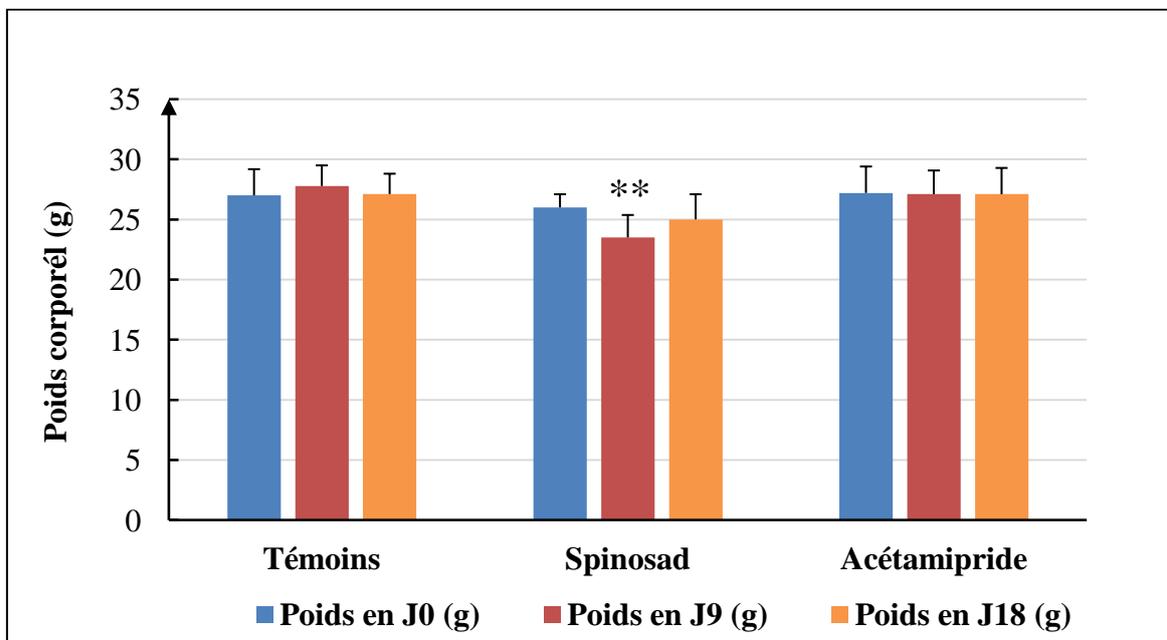


Figure 8 : Evolution du poids corporel (g) des souris femelles témoins et traitées par l'acétamipride et le spinosad à raison de 9,2 mg/kg/j.

- Avant l'expérimentation (en J0), le poids des souris témoins et traitées à raison de 9,2 mg/kg/j de SPD et de l'ACE est de 27,00g ± 2,18 ; 26,00g ± 1,10 et 27,20g ± 2,20 respectivement.
- Après neuf jours de gavage J9, une augmentation non significative du poids corporel est remarquée chez les souris témoins. Elle est de l'ordre de 2,47 % (27,78 ± 1,72) avec un P= 0,41. Chez les souris traitées par SPD, nous avons enregistré une diminution très significative du poids corporel qui est de l'ordre de 10,64 % (23,50 ± 1,97) avec un P= 0,018. Les souris traitées par l'ACE présentent une diminution non significative du poids corporel. La diminution est de 0,37 % (27,10 ± 1,97) avec un P= 0,91.
- Après dix-huit jours de gavage J18, une diminution non significative du poids des souris témoins, de l'ordre de 2,47 % (27,11 ± 1,69) avec un P= 0,41 et une augmentation de poids des souris traitées par SPD, de l'ordre de 6,38 % (25,00 ± 2,10) avec un P= 0,22 ont été observées. par contre, le poids des souris traitées par ACE ne présente aucun changement (27,10 ± 2,18) avec un P= 1,00.

L'analyse statistique des différences pondérales pendant neuf et dix-huit jours montre un changement statistiquement non significatif ($p < 0,05$) chez les différents groupes de souris sauf les souris traitées par SPD qui présentent une diminution très significative du poids corporel après neuf jours du premier gavage.

III.1.3. Dosage des paramètres de stress oxydant

III.1.3.1. vitamine C

Les résultats des variations de la vitamine C chez les souris femelles témoins et traitées par SPD et l'ACE et leurs significations statistiques sont rassemblés dans la figure 9 et les tableaux XVIII, XIX et XX de l'annexe II.

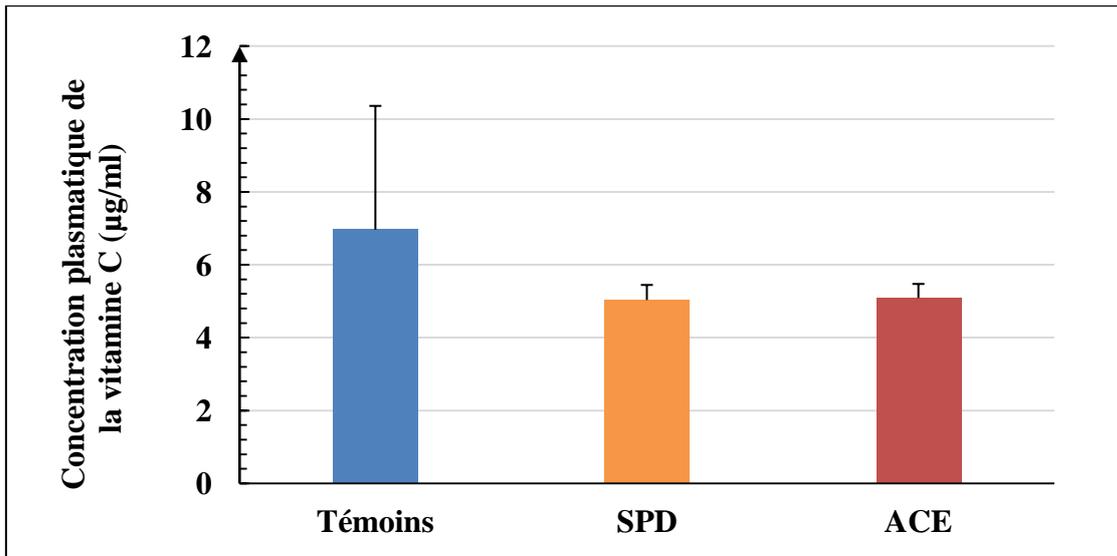


Figure 9 : Influence de spinosad et de l'acétamipride sur les taux plasmatiques de la vitamine C (µg/ml) chez des souris femelles adultes.

D'après nos résultats, les 2 groupes des souris traitées montrent une régression du taux plasmatique de la vitamine C. Chez les souris traitées par SPD, la régression est de l'ordre de $5,04 \mu\text{g/ml} \pm 0,41$ vs $6,97 \mu\text{g/ml} \pm 3,39$ chez les témoins ($P = 0,34$). Les souris traitées par l'ACE présentent un taux moyen de $5,09 \pm 0,39$ vs $6,97 \mu\text{g/ml} \pm 3,39$ chez les témoins ($P = 0,35$). La différence entre les valeurs enregistrées chez les témoins et les 2 groupes traités est statistiquement non significative.

III.1.3.2. Pouvoir antioxydant total du plasma

Les résultats des variations du pouvoir antioxydant total du plasma chez les souris femelles témoins et traitées par SPD et l'ACE et leurs significations statistiques sont rassemblés dans la figure 10 et les tableaux XXI, XXII et XXIII de l'annexe II.

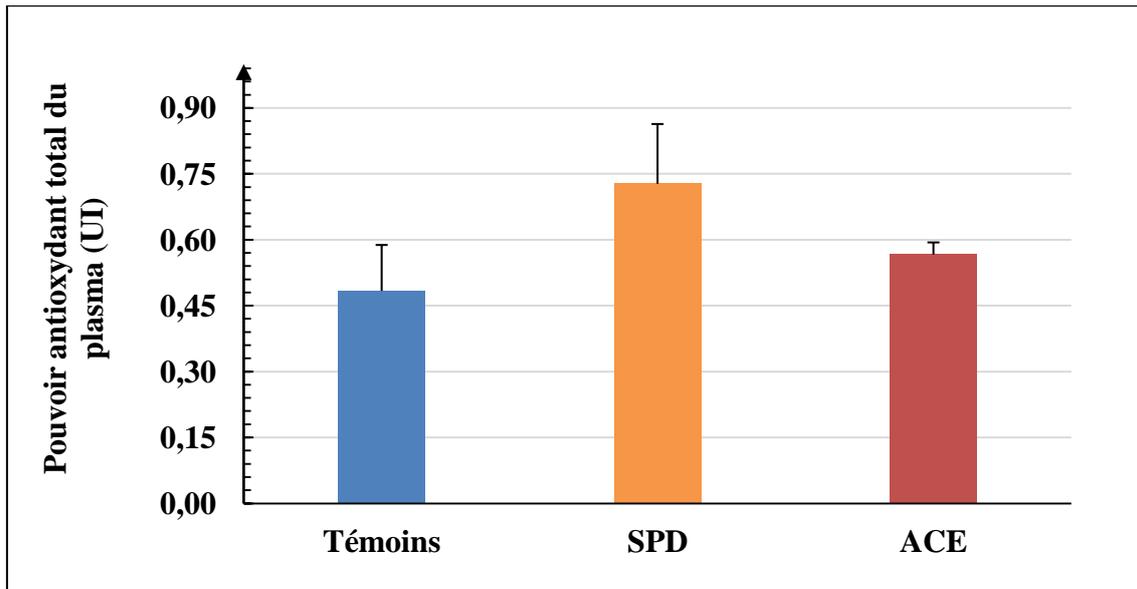


Figure 10 : Influence de spinosad et de l'acétamipride sur la valeur du pouvoir antioxydant total du plasma (UI) chez des souris femelles adultes.

Selon les résultats, les souris traitées par SPD montrent une forte augmentation du taux du pouvoir antioxydant total du plasma. ($0,73 \text{ UI} \pm 0,14$) par rapport aux témoins ($0,48 \text{ UI} \pm 0,10$). Cette augmentation reste statistiquement non significative ($P = 0,06$). Les souris traitées par l'ACE montrent une faible augmentation ($0,57 \text{ UI} \pm 0,03$ vs $0,48 \text{ UI} \pm 0,10$) qui est aussi statistiquement non significative ($P = 0,25$).

III.1.3.3. Dosage du malondialdéhyde

Les résultats des effets de SPD et de l'ACE sur le taux du MDA. Chez les souris femelles témoins et traitées et leurs significations statistiques sont rassemblés dans la figure 11 et les tableaux XXIV, XXV et XXVI de l'annexe II.

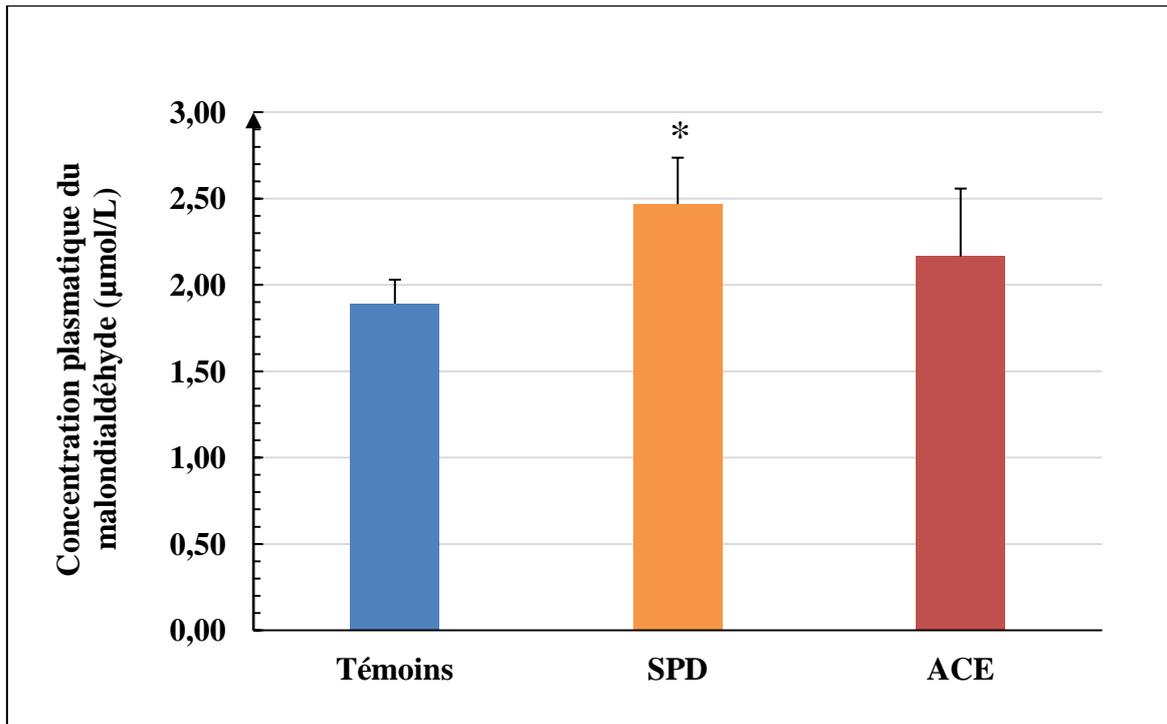


Figure 11 : Influence de spinosad et de l'acétamipride sur les taux plasmatiques de malondialdéhyde chez des souris femelles adultes.

Nos résultats montrent que chez les souris traitées par SPD l'augmentation du taux plasmatique du MDA est significative avec un $P=0,029$ ($2,47 \mu\text{mol/L} \pm 0,27 \mu\text{mol/L}$) par rapport aux témoins ($1,89 \mu\text{mol/L} \pm 0,14 \mu\text{mol/L}$). Les souris traitées par l'ACE montrent une faible augmentation de $2,17 \mu\text{mol/L} \pm 0,39 \mu\text{mol/L}$ vs $1,89 \mu\text{mol/L} \pm 0,14 \mu\text{mol/L}$ avec un $P = 0,31$. Ces résultats restent statistiquement non significatifs.

III.2. DISCUSSION

L'acétamipride et le spinosad sont deux insecticides reconnues pour leur efficacité contre plusieurs ravageurs des cultures (Bass et *al.*, 2015 ; Yamada et *al.*, 1999 ; Kirst, 2010). L'effet toxique de l'ACE pour les organismes non cibles et en particuliers les mammifères est démontré dans plusieurs études (Zhang et *al.*, 2011 ; Kimura-Kuroda et *al.*, 2012 ; Singh et *al.*, 2012 ; Mondal et *al.*, 2014; Chakroun et *al.*, 2016 ; Sano et *al.*, 2016 ; Marzouki et *al.*, 2017). Les bio-insecticides y compris le spinosad, sont considérées comme des produits moins dangereux que les insecticides synthétiques (Mansour et *al.*, 2008). Cependant, dans les dernières années plusieurs études toxicologiques ont prouvé

leur effet toxique contre les organismes non cibles et principalement les mammifères (Mansour *et al.*, 2008 ; Aboul-Enein *et al.*, 2012 ; Zidan, 2015 ; El-Naggar *et al.*, 2017 ; Lopes *et al.*, 2018).

Dans la présente étude qui porte sur la recherche de la toxicité à court terme de l'ACE et de SPD administrés par voie orale à raison de 9,2 mg/kg/j chez des souris femelles adultes de souche N.M.R.I., plusieurs effets toxiques sont relevés.

Les deux groupes des souris traitées par l'ACE et le SPD présentent une diarrhée et une diminution de l'activité avec aptitude d'occuper les coins des cages. Ces résultats sont observés beaucoup plus chez les souris traitées par SPD. Des résultats similaires sont trouvés chez des souris mâles traitées par 1/20 DL50 d'ACE pendant 28 jours (Singh *et al.* 2012). Stebbins *et al.* (2002) a enregistré une diminution de l'activité corporelle chez des souris mâles et femelles traités respectivement par 109,7 mg/kg/j et 141,1 mg/kg/j de SPD pendant six semaines.

Nos résultats montrent que les souris, ayant reçu 9,2 mg/kg/j l'ACE, présentent une diminution non significative du poids corporel après 9 jours et 18 jours de gavages. Ces résultats corroborent avec ceux retrouvés par Chakroun *et al.* (2016) chez des rats mâles de la souche Wistar traités par 1/10 et 1/20 LD50 d'ACE pendant 60 jours. Chez les souris traitées par SPD, nous avons remarqué une diminution très significative du poids corporel jusqu'aux 9^{ème} jours. Ce changement est possiblement dû à la nature du produit qui est une pâte de consistance très épaisse, difficilement dissoute dans l'eau et durement digérée par les souris. Pendant la 2^{ème} semaine, nous avons enregistré une augmentation non significative du poids corporel. Cette augmentation est probablement due à l'adaptation des souris traitées envers l'insecticide. Mais globalement, nous avons enregistré une diminution non significative du poids corporel chez les souris traitées par SPD après 18 jours de gavages. Ces résultats sont en accord avec ceux de trouvés par El-Naggar *et al.* (2017) qui a enregistré une diminution non significative du poids corporel chez des souris mâles recevant 35 mg/kg/j de SPD pendant 4 semaines consécutives. Par contre, dans la même étude une diminution significative du poids a été signalée chez des souris recevant 350 mg/kg/j pendant 4 semaines. Mansour *et al.* (2008) a trouvé une diminution significative du poids corporel chez des rats mâles albinos traités par 9 mg/kg/j et 37,38 mg/kg/j de SPD pendant 60 jours. Cela, nous laisse suggérer que les changements sont dose et/ou temps dépendants.

Le dosage des paramètres de stress oxydant indiquent une diminution non significative des taux plasmatiques de la vitamine C, molécule à pouvoir antioxydant, chez les souris traitées par SPD et ceux traitées par l'ACE. Ces résultats sont en accord avec une étude qui a mis en évidence une diminution du taux de l'acide ascorbique chez des souris adultes après traitement par le Manèbe, un fongicide de synthèse, appartenant à la famille des dithiocarbamates (Kurzatkowski et Trombetta, 2013), utilisé à raison de 1/6, 1/4 et 1/2 de la LD50 pendant 7 jours (Jaballi *et al.*, 2017).

Par contre, le test de pouvoir antioxydant total du plasma montre une augmentation non significative chez les souris traitées par SPD et l'ACE par rapport aux souris témoins. Ces résultats sont similaires à ceux enregistrés par Raina *et al.* (2009) qui ont trouvé que l'activité antioxydante a augmenté par l'augmentation de l'activité de la catalase, la superoxyde dismutase (SOD) et de la glutathion S-transférase (GST) chez des rats traités par le Cyperméthrine, insecticide de synthèse appartenant à la famille des pyréthrinoïdes (Angelo *et al.*, 2016). Les résultats de dosage de malondialdéhyde, le marqueur le plus puissant de la peroxydation lipidique, ont révélés une augmentation significative du taux de MDA plasmatique chez les souris traitées par SPD. Des résultats similaires ont été trouvés par Aboul-Enein *et al.* (2012) chez des rats mâles exposés aux SPD à raison de 367,5 mg/kg/j, équivalant de 1/20 de la DL50, pendant deux semaines. Chez les souris traitées par l'ACE, nous avons enregistré une augmentation non significative du taux plasmatiques de MDA. Ces résultats sont en accord avec ceux de Chakroun *et al.* (2016) qui ont trouvé un changement non significatif de MDA chez des rats traités par 1/20 LD50 d' ACE pendant 60 jours.

Au cours de notre expérimentation, nous n'avons pas eu de mortalité chez les souris témoins et les souris traitées par l'acétamipride. Par contre chez les souris traitées par spinosad, nous avons eu 4 mortalités à cause d'une mauvaise manipulation des souris au cours du gavage et 3 mortalités avant le jour du sacrifice.

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans la présente étude réalisée, nous avons exploré les effets toxiques de l'insecticide chimique « acétamipride » et de bio-insecticide « spinosad » administrés par voie orale à raison de 9,2 mg/kg/j pendant 18 jours, sur la balance oxydante/antioxydante chez des souris femelles adultes.

A partir des résultats trouvés nous pouvons conclure que ces deux insecticides provoquent un stress oxydatif par la perturbation des marqueurs de stress oxydant qui se manifestent sous :

- Des perturbations de système antioxydant par la diminution du taux de l'acide ascorbique et l'augmentation du pouvoir antioxydant total du plasma qui peut révéler une réponse d'adaptation au stress oxydatif entraîné par le l'acétamipride et spinosad.
- Des perturbations de système oxydant par l'augmentation de malondialdéhyde, témoin d'une peroxydation lipidique.

A l'issue des résultats que nous avons obtenus, nous concluons que l'acétamipride et le spinosad peuvent provoquer des effets toxiques à l'échelle moléculaire. Les deux insecticides, qu'ils soient bio ou synthétique sont toxiques chez les mammifères, dont le SPD est le plus toxique. Cependant, ces résultats ne sont qu'une expression partielle de la toxicité de ces deux insecticides à faibles doses. Il s'avère intéressant d'approfondir la recherche par :

- Elargir la batterie des paramètres de stress oxydatif en dosant les enzymes antioxydantes, les oligoéléments et les marqueurs de l'oxydation des protéines, des lipides et de l'ADN.
- Etudier les effets période et / ou dose dépendante chez les animaux afin de déterminer si ces deux insecticides peuvent induire des pathologies à long terme.

- Explorer l'effet protecteur des antioxydants naturels tels que les huiles essentielles contre la toxicité induite par l'acétamipride et le spinosad sur des modèles expérimentaux.
- Explorer à l'échelle moléculaires les interactions conduisant à la perturbation de la balance oxydante/antioxydante entre ces deux insecticides d'une part et les éléments cellulaires et moléculaires d'autre part.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aboul-Enein A.M. Aboul-Soud M.A.M. Said H.K. Ali H.F.M. Ali Z.Y. Mahdi A.M. Giesy J. P. 2012. Hepatoprotective effects of antioxidants against non-target toxicity of the bio-insecticide spinosad in rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 6., **8**. 550-559.

Amaral T.S. Carvalho T.F. Silva M.C. Barros M.S. Picanço M.C. Neves C.A. Freitas M.B. 2012. Short-term effects of a spinosyn's family insecticide on energy metabolism and liver morphology in frugivorous bats *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818). *Brazilian Journal of Biology*., **72** [2]. 299-304.

Angelo D.C. Antoine A. Elie D. Charlemagne A. 2016. Réduction de doses de cyperméthrine-triazophos et lutte raisonnée en culture cotonnière au Bénin. *Journal of Applied Biosciences*., **98** [0]. 9261-9269.

Bass C. Denholm I. Williamson M S. Nauen R. 2015. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*., **121**. 78-87.

Beaudeau J.L. Peynet J. Bonnefont-Rousselot D. Therond P. Delattre J. Legrand A. 2006. Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. Implication dans la transcription et la régulation des gènes. *Ann Pharm Fr.*, **64** [6]. 373-381.

Belhaouchet N. 2014. Evaluation de la toxicité du Spinosad « insecticide nouvellement introduit en Algérie » sur un modèle expérimental bioindicateur de la pollution « *Helix aspersa* ». *Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar – Annaba.*, 80p.

Blache D, Prost M. 1992. Free radical attack: Biological test for human resistance capability. *Proceeding of the college parek on chemical evolution. Chernical Analysis Laboratory. Nasa. Washington.*, **27**. 82-89.

Bodereau-dubois B. 2011. Récepteurs nicotiniqes neuronaux d'insectes et insecticides: caractérisation de facteurs cellulaires impliqués dans la modulation de l'efficacité des néonicotinoïdes. *Thèse de doctorat, Angers.*, 121p.

Bonnefont-Rousselot D. Therond P. Beaudeau J.L. Peynet J. Legrand A. Delattre J. 2001. Aging and oxidative stress. Which potential markers?. In *Annales de biologie clinique.*, **59** [4]. 453-459.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Cadenas E et Davies J.A. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radical Bio Med.*, **29**. 222-230.

Cailloux J. 2014. Rôle du système générateur d'espèces réactives de l'oxygène NOX4-p22phox dans la thyroïde humaine: implication dans la prolifération et la différenciation thyroïdienne. *Thèse de doctorat, université Paris –SUD.*, 135p.

Çamlıca Y. Bediz S.C. Çömelekoğlu Ü. Yılmaz Ş.N. 2018. Toxic effect of acetamiprid on *Rana ridibunda* sciatic nerve (electrophysiological and histopathological potential). *Drug and chemical toxicology.*, 1-6.

Casida J. E. 2011. Neonicotinoid metabolism: compounds, substituents, pathways, enzymes, organisms, and relevance. *Journal of agricultural and food chemistry.*, **59** [7]. 2923-2931.

Casida J.E. Durkin K.A. 2013. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annual review of entomology.*, **58**. 99-117.

Chakroun S. Ezzi L. Grissa I. Kerkeni E. Neffati F. Bhourri R. Najjar M.F. Hassine M. Mehdi, M. Haouas Z. Cheikh H.B. 2016. Hematological, biochemical, and toxicopathic effects of subchronic acetamiprid toxicity in Wistar rats. *Environmental Science and Pollution Research.*, **23** [24]. 25191-25199.

Clement J.G. 1994. Chromodacryorrhea in rats: Absence following soman poisoning. *Toxicology and applied pharmacology.*, **124** [1]. 52-58.

Chen M.F. Huang J.W. Wong S.W. Li G.C. 2005. Analysis of insecticide clothianidin and its metabolites in rice by liquid chromatography with a UV detector. *J Food Drug Anal.*, **13**. 279-283.

David D. George I.A. Peter J.V. 2007. Toxicology of the newer neonicotinoid insecticides: imidacloprid poisoning in a human., *Clin Toxicol.* **45**. 48-56.

De Amicis C. Yang Q. Bright C. Edwards N.A. Harris G.H. Kaur S. Wood P.L. Hewitson P. Ignatova S. 2017. Development of a Scalable and Sustainable High Performance CounterCurrent Chromatography (HPCCC) Purification for Spinosyn A and Spinosyn D from Spinosad. *Organic Process Research & Development.*, **21** [10]. 1638-1643.

Delattre J. Beaudeau J.L. Bonnefont-Rousselot D. 2005. Radicaux libres et stress oxydant :

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

aspects biologiques et pathologiques. *Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales, Paris.*, 405p.

Devan R.K. Prabu P.C. Panchapakesan S. 2015. Immunotoxicity assessment of sub-chronic oral administration of acetamiprid in Wistar rats. *Drug and chemical toxicology.*, **38** [3]. 328-336.

Dhalla N.S. Temsah R.M. Netticadan T. 2000. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens.*, **18**. 655-673.

Dick R.A. KanneD.B. Casida J.E. 2005. Identification of aldehyde oxidaseas the neonicotinoid nitroreductase. *Chem Res Toxicol.*, **18**. 317-323.

Di Prisco G. Cavaliere V. Annoscia D. Varricchio P. Caprio E. Nazzi F. Pennacchio F. 2013. Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*, **110** [46]. 18466-18471.

Djeffal A. 2014. Evaluation de la toxicité d'un insecticide carbamate «méthomyl» chez le rat Wistar: Stress oxydant et exploration des effets protecteurs de la supplémentation en sélénium et/ou en vitamine C. *Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar-Annaba.*, 170p.

Domoradzki J.Y. 1995. XDE-105: Comparison of the Metabolism and Tissue Distribution of ¹⁴C-Labelled XDE-105 (Factor A) and ¹⁴C-Labelled XDE-105 (Factor D) in Fischer 344 Rats. *Unpublished report NoT2.*, 2-187.

Dos Santos Dias L. Da Graça Macoris M.D.L. Andrighetti M.T.M. Otrera V.C.G. Dos Santos Dias A. Da Rocha Bauzer L.G.S. De Melo Rodovalho1 C. Martins A.J. Lima1 J.B.P. 2017. Toxicity of spinosad to temephos-resistant *Aedes aegypti* populations in Brazil. *PloS one.*, **12** [3]. 1-15.

El-Naggar S.A. Eltantawi H. Ibrahim M.A. Alm-Eldeen A. 2017. Assessment of the Toxicity of Sub-chronic Low and High Doses of the Bio-insecticide Spinosad on the Liver, Kidney and the Cerebellum in Male Albino Mice. *Brazilian Archives of Biology and Technology.*, **60**.

European Food Safety Authority. 2016. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance acetamiprid. *EFSA Journal.*, **14** [11]. e04610.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Favier A. 2006. Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann Pharm Fr.*, **64**. 390-396.
- Ford K.A. Casida J.E. 2008. Comparative metabolism and pharmacokinetics of seven neonicotinoid insecticides in spinach. *Journal of agricultural and food chemistry.*, **56** [21]. 10168-10175.
- Gardès-Albert M. Bonnefont-Rousselot D. Abedinzadeh Z. Jore D. 2003. Espèces réactives de l'oxygène. *L'actualité chimique.*, 91-96.
- Genersch E. Von Der Ohe W. Kaatz H. Schroeder A. Otten C. Büchler R. Meixner M. 2010. The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie.*, **41** [3]. 332-352.
- Gilbert K.S. Yano B.L. 1996. DE-105: Acute oral toxicity study in Fischer 344 rats and CD-1 mice. Dow Chemical Co., Midland, Michigan, USA, 6 March 1996, DR-0323-1194-031.
- Goulson D. 2013. Un aperçu des risques environnementaux posés par les insecticides néonicotinoïdes. *Journal of Applied Ecology.*, **50** [4]. 977-987.
- Halliwell B. 1990. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic. Res. Commun.*, **13**. 1-32.
- Herbert G.T. Chetan R. Jie F. Jorge L P. Chaouki T A. 2012. Finite abstractions for hybrid systems with stable continuous dynamics. *Discrete Event Dynamic Systems.*, **22** [1]. 83-99.
- Index des produits phytosanitaires à usage agricole. 2015. Ministère de l'agriculture du développement rurale et de la pêche., 216p.
- Jaballi I. Ben Saad H. Bkhairia I. Kammoun I. Droguet M. Magné C. Boudawara T. Kallel C. Nasri M. Hakim A. Ben Amara I. 2017. Increasing maneb doses induces reactive oxygen species overproduction and nephrotoxicity in adult mice. *Toxicology mechanisms and methods.*, **27** [5]. 382-393.
- Jagota S.K. Dani H.M. 1982. A new colorimetric technique for the estimation of vitamin C using Folin phenol reagent. *Analytical biochemistry.*, **127** [1]. 178-182.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Januel C. 2003. Stress oxydant au niveau des plaquettes sanguines humaines dans le contexte du diabète: étude du glutathion et de la glutathion peroxydase 4. *Thèse de Doctorat, Université Lyon I / INSA-Lyon.*, 174p.
- Jayaraj R. Megha P. Sreedev P. 2016. Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *Interdisciplinary toxicology.*, **9** [3-4]. 90-100.
- Jeuge-Maynard I. Karoubi L. Haboury F. Maire P. Houssemaine-Florent H. Ouvrard C. Klinkenberg J.M. Knecht P. Bédard J. Auger P. Boulanger J.C. Faye S. Durand B. Rein-Nikolaev N. Tamine M. Delacroix F. Charrier A. La Cotardière P. Margotin M. Giraud M. Girerd L. Baladier C. Bardintzeff J.M. Barthélemy G. Cheruette P. Collet J. Costaz G. Eudes M.T. Fortier D. Geoffroy E. Géré F. Grenié M. Laupies F. Lecomte N. Lemaire V. Margotin P. Mathivet E. Morvan P. Mougou P. Perrichet C. Poirier A. Saffar D. Sanfourche J.P. Watin-Augouard M. Zalkind S. Grosse F. Vaugeois D. Deschenes S. Charniot J.N. Chiesa P. Cuq M.L. Florent J. Grisat C. Olivaux T. Tamisier J.C. Jaspars W. Maljael S. Mouchot M. Pagès C. Biaujeaud M. Goldszal H. Meindl U. 2010. Le petit larousse illustré. *Ed., Larousse, Paris.*, 1782p.
- Khan H.A.A. Akram W. Shad S.A. 2014. Genetics, cross-resistance and mechanism of resistance to spinosad in a field strain of *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *Acta Tropica.*, **130** [0]. 148-154.
- Kimura-Kuroda J. Komuta Y. Kuroda Y. Hayashi M. Kawano H. 2012. Nicotine-like effects of the neonicotinoid insecticides acetamiprid and imidacloprid on cerebellar neurons from neonatal rats. *Plos One.*, **7**. 1-11.
- Kirst H.A. 2010. The spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural products research. *The journal of antibiotics.*, **63**. 101-111.
- Kuhr R.J. Motoyama N. 1998. Pesticides and the future: minimizing chronic exposure of humans and the environment. *Ed., illustrate.*, 332p.
- Kurzatkowski D.M. Trombetta L.D. 2013. Maneb causes pro-oxidant effects in the hippocampus of Nrf2 knockout mice. *Environ Toxicol Pharmacol.*, **36**. 427-36.
- Levine R.L. 2002. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease², *3. Free Radical Biology and Medicine.*, **32** [9]. 790-796.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Lopes M.P. Fernandes K.M. Tomé H.V.V. Gonçalves W.G. Miranda F.R. Serrão J.E. Martins G.F. 2018. Spinosad-mediated effects on the walking ability, midgut, and Malpighian tubules of Africanized honey bee workers. *Pest management science.*, **74** [6]. 1311-1318.

Loudhaief R. 2016. Effets des bioinsecticides à base de *Bacillus thuringiensis* sur la physiologie intestinale de la Drosophile. *Thèse de doctorat. Sciences agricoles. Université Côte d'Azur, France.*, 209p.

Loughlin D. 2012. Insects. In : Pests of Ornamental Trees, Shrubs and Flowers. *International Pest Control, Academic Press.*, **55** [4]. 20-404

Mansour S. Tarek H. Abdel-Tawab M. 2008. Biochemical and histopathological effects of formulations containing Malathion and Spinosad in rats. *Toxicology International.*, **15** [2]. 71.

Marrs T.C. 2012. Mammalian toxicology of insecticides. *Ed., Royal Society of Chemistry.*, 490p.

Marzouki S. Dhouib I.B. Benabdessalem C. Rekik R. Doghri R. Maroueni A. Ahmed M.B. 2017. Specific immune responses in mice following subchronic exposure to acetamiprid. *Life sciences.*, **188**. 10-16.

Migdal C et Serres M. 2011. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences.*, **27** [4]. 405-412.

Mondal S. Ghosh R.C. Mukhopadhyaya S.K. 2012. Studies on the electrolytes and microelements in Wistar rat following multiple exposures to acetamiprid. *Toxicology and industrial health.*, **28** [5]. 422-427.

Mondal S. Ghosh R.C. Karnam S.S. Purohit K. 2014a. Toxicopathological changes on Wistar rat after multiple exposures to acétamipride. *Veterinary World.*, **7** [12]. 1058-1065.

Mondal S. Ghosh R.C. Mukhopadhyaya S.K. Ganguly S. 2014b. Effects of electrolytes, microelements and multiple exposure of Acetamiprid on wistar rats. *Asian Pac J Health Sci.*, **1** [4]. 329-334.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Multigner L. 2005. Effets retardés des pesticides sur la santé humaine. *Environnement, Risques & Santé.*, **4** [3]. 187-194.
- Nicolopoulou-Stamati P. Maipas S. Kotampasi C. Panagiotis S. Luc H. Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. 2016. Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. *Frontiers in public health.*, **4**. 148.
- Nourooz-Zadeh J. Tajaddini-Sarmadi J. Linkle. Wolff S.P. 1996. Low density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxydes in plasma. *Biochem J.*, **313** [78]. 1-786.
- Ognjanovic B.I. Markovic S.D. Pavlovic S.Z. Zikic R.V. Stajn A.S. Saicic Z.S. 2008. Effect of chronic cadmium exposure on antioxidant defense system in some tissues of rats: protective effect of selenium. *Physiol Res.*, **57**. 403-411.
- Piner P. Uner N. 2012. Organic insecticide spinosad causes in vivo oxidative effects in the brain of *Oreochromis niloticus*. *Environ Toxicol.*, **29** [3]. 253-260.
- Pisa L.W. Amaral-Rogers V. Belzunces L.P. Bonmatin J.M. Downs C.A. Goulson D. Kreuzweiser D.P. Krupke C. Liess M. Mcfield M. Morrissey C.A. Noome D.A. Settele J. Simon-Delso N. Stark J.D. Van Der Sluijs J.P. Van Dyck H. Wiemers M. 2015. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ Sci. Pollut. Res.*, **22**. 68–102.
- Poljsak B. Šuput D. Milisav I. 2013. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxidative medicine and cellular longevity.*, **2013**. 1-11.
- Rahal A. Kumar A. Singh V. Yadav B. Tiwari R. Chakraborty S. Dhama K. 2014. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Hindawi Publishing Corporation.*, **2014**. 1-19.
- Raina R. Verma P.K. Pankaj N.K. Prawez S. 2009. Induction of oxidative stress and lipid peroxidation in rats chronically exposed to cypermethrin through dermal application. *Journal of veterinary science.*, **10** [3]. 257-259.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ramirez D.C. Gomez-Mejiba S.E. Corbett J.T. Deterding L.J. Tomer K.B. Mason R.P. 2008. Cu/Zn-Superoxide Dismutase-driven Free Radical Modifications: Copper-and Carbonate Radical Anion-initiated Protein Radical Chemistry. *Biochemical Society.*, **10**. 1-25.
- Salgado V.L. Sheets J.J. Watson G.B. Schmidt A.L. 1998. Studies on the mode of action of spinosad: the internal effective concentration and the concentration dependence of neural excitation. *Pest. Biochem. Physiol.*, **60**. 103–110.
- Sano K. Isobe T. Yang J. Win-Shwe T.T. Yoshikane M. Nakayama S.F. Tohyama C. 2016. In utero and lactational exposure to acetamiprid induces abnormalities in socio-sexual and anxiety-related behaviors of male mice. *Frontiers in neuroscience.*, **10**. 228.
- Schieber M et Navdeep S.C. 2014. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology.*, **24**. [10]. 453-462.
- Sears M.E et Genuis S.J. 2012. Environmental Determinants of Chronic Disease and Medical Approaches: Recognition, Avoidance, Supportive Therapy, and Detoxification. *Journal of Environmental and Public Health.*, **2012**. 1-15.
- Simon-Delso N. Amaral-Rogers V. Belzunces L.P. Bonmatin M.J. Chagnon M. Downs C. Furlan L. Gibbons D.W. Giorgio C. Girolami V. Goulson D. Kreutzweiser D.P. Krupke C.H. Liess M. Long E. Mcfield M. Mineau P. Mitchell E.A.D. Morrissey C.A. Noome D.A. Pisa L. Settele J. Stark J.D. Tapparo A. Van Dyck A. Van Praagh J. Van Der Sluijs J.P. Whitehorn P. R. Weimers M. 2015. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action metabolites. *Environmental Science and Pollution Research.*, **22**. 5-34.
- Sheets L.P. 2010. Imidacloprid: a neonicotinoid insecticide. In: Hayes handbook of pesticide toxicology. *Ed., Elsevier, Paris.*, **20**. 55-64.
- Sies H. 1991. Oxidative stress: introduction. In: Oxidative stress, oxidants and antioxidants. *Ed., London Academic Press.*, 25-222.
- Singh T.B. Mukhopadhyay S.K. Sar T.K. Ganguly S. 2012. Acetamiprid induces toxicity in mice under experimental conditions with prominent effect on the hematobiochemical parameters. *Journal of Drug and Metabolism Toxicology.*, **3** [6]. 134.
- Stebbins K.E. Bond D.M. Novilla M.N. Reasor M.J. 2002. Spinosad insecticide: subchronic

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

and chronic toxicity and lack of carcinogenicity in CD-1 mice. *Toxicological sciences.*, **65** [2]. 276-287.

Su T.Y. Lin J.L. Lin-Tan D.T. Tseng H.H. Yen T.H. 2011. Human poisoning with spinosad and flonicamid insecticides. *Human & experimental toxicology.*, **30** [11]. 1878-1881.

Sun S.L. Yang W.L. Guo J.J. Zhou Y.N. Rui X. Chen C. Dai Y.J. 2017. Biodegradation of the neonicotinoid insecticide acetamiprid in surface water by the bacterium *Variovorax boronicumulans* CGMCC 4969 and its enzymatic mechanism. *RSC Advances.*, **7** [41]. 25387-25397.

Syracuse Environmental Research Associates. 2016. Spinosad: Human Health and Ecological Risk Assessment., 260p.

Terayama H. Endo H. Tsukamoto H. Matsumoto K. Umezu M. Kanazawa T. Fujino Y. 2016. Acetamiprid Accumulates in Different Amounts in Murine Brain Regions. *International journal of environmental research and public health.*, **13** [10]. 937.

Testud F. 2014. Insecticides néonicotinoïdes. *EMC-Pathologie professionnelle et de l'environnement.EMC-Toxicologie-Pathologie.*, **10**. S1877-7856.

Thany S.H. 2010. "Neonicotinoid insecticides." *Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors. Springer, New York, NY.*, 75-83.

Thompson G.D. Dutton R. Sparks T.C. 2000. Spinosad—a case study: an example from a natural products discovery programme. *Pest Management Science.*, **56** [8]. 696-702.

Todani M. Kaneko H. Hayashida H. Tsuruta R. Kasaoka S. Maekawa T. 2008. Acute poisoning with neonicotinoid insecticide acetamiprid. *Chūdoku Kenkyū.*, **21** [4]. 387-390.

Tomizawa M. Casida J.E. 2011. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, **45**. 247–268.

United States Environmental Protection Agency/Office of Pesticide Programs/Health Effects Division. 1997. Spinosad – 110003. Health effects Division Risk Characterization Document for Use of Spinosad (Tracer®) on Cotton., 180p.

United States Environmental Protection Agency. 2002. Name of chemicals:

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

acetamiprid, conditional registration. *Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substance*. 14p.

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

Wallace D.R. 2014. Acetamiprid. *Elsevier Inc. Encyclopedia of Toxicology*, 30-32.

Wilson B. 2010. Cholinesterase : organophosphorous insecticides. *In: Handbook of pesticide toxicology. 3rd Edition. Robert Krieger*, 1457-1478

Yamada T. Takahashi H. Hatano R. 1999. A novel insecticide acetamiprid. *In Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor. Ed., Springer, Tokyo*, 149-176.

Yang M. Xiang G. Li D. Zhang Y. Xu W. Tao L. 2016. The insecticide spinosad induces DNA damage and apoptosis in HEK293 and HepG2 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **812**. 12-19.

Zhang J.J. Wang Y. Xiang H.Y. Li M.X. Li W.H. Ma K.G. Wang X.Z. Zhang J.H. 2011. Oxidative stress: role in acetamiprid-induced impairment of the male mice reproductive system. *Agricultural Sciences in China*, **10**. 786-796.

Zidan N.E.H.A. 2015. Hepato-and nephrotoxicity in male albino rats exposed to malathion and spinosad in stored wheat grains. *Acta Biologica Hungarica*, **66** [2]. 133-148.

Zoumenou B. Aïna M.P. Agbohessi P. Imorou Toko I. Scippo M.L. 2015. Effets toxicologiques et méthodes d'analyse de la lambda-cyhalothrine et de l'acétamipride utilisés dans la protection phytosanitaire du cotonnier au Bénin. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **4**. 2184-2199.

Polycétide. Dans *Oxford Dictionaries en ligne*. Repéré à <https://en.oxforddictionaries.com/definition/polyketide>.

Macrolide. Dans *Oxford Dictionaries en ligne*. Repéré à <http://oxforddictionaries.com/definition/english/macrolide>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

I. Matériel et réactifs

I.1. Réactifs

- L'acétamipride.
- Spinosad.
- L'eau distillée.
- L'héparine.
- L'acide trichloroacétique (TCA)
- Le Folin.
- L'acide ascorbique.
- L'eau physiologique.
- Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 30%.
- CuSO₄.
- L'acide thiobarbiturique (TBA).



Figure 5 : Acétamipride (Mopistope)



Figure 6 : Spinosad (Success* Appat)

I.2. Appareillage

- Appareil photos numérique.
- Balance électrique.
- Balance de précision.
- Bain Marie.
- Centrifugeuse.
- spectrophotomètre de type (UV- 1601).
- Réfrigérateur.



**Figure 12 : Appareil
Photos**



Figure 13 : balance électrique



**Figure 14 : Balance de
précision**



Figure 15 : Centrifugeuse



Figure 16 : Spectrophotomètre



Figure 17 : Micropipette

I.3. Autre matériel

- Cages en plastiques.
- Mangeoires et biberons.
- Sonde de gavage pour souris.
- Seringues et aiguilles.
- Portoir et des tubes secs.
- Bécher.
- Entonnoir.
- Eprouvette graduée.
- Erlenmeyer.
- Pissette d'eau distillée.



Figure 18 : Cages et biberons

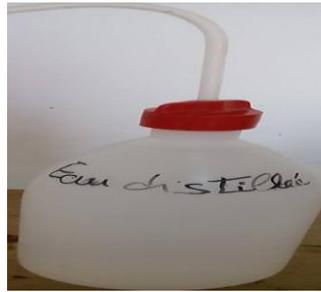


Figure 19 : Pissette d'eau Distillée



Figure 20 : Seringues et aiguilles



Figure 21 : Portoir et des tubes secs



Figure 22: Tubes EDTA



Figure 23 : Bécher



Figure 24 : Sonde de gavage



Figure 25 : Entonnoir



Figure 26 : Eprouvette graduée



Figure 27 : Erlenmeyer

Tableau II : Métabolites de l'acétamipride

Noms	Formules chimique
IM-1-2	<i>N</i> 2-carbamoyl- <i>N</i> 1- [(6-chloro-3-pyridyl)methyl]- <i>N</i> 1 methylacetamide
IM-1-3	<i>N</i> -[(6-chloro-3-pyridyl)methyl]- <i>N</i> -methylacetamide
IM-1-4	<i>N</i> -methyl(6-chloro-3-pyridyl)methylamine
IM-2-1	<i>N</i> 1-[(6-chloro-3-pyridyl)methyl]- <i>N</i> 2-cyanoacetamide
IM-2-2	<i>N</i> 2-carbamoyl- <i>N</i> 1- [(6-chloro-3-pyridyl)methyl]-acetamide
IM-2-3	<i>N</i> -[(6-chloro-3-pyridyl)methyl]acetamide
IM-2-4	(6-chloro-3-pyridyl)methylamine
IM-2-5	<i>N</i> 1-(6-Chloropyridin-3-ylmethyl)-acetamide
IM-0	(6-chloro-3-pyridyl)methanol
IC-0	6- chloronicotinic acid

Tableau IV : Composition des bouchons alimentaires

Composition des bouchons alimentaires	
Protéines (%)	20
Matières grasses brutes (%)	4
Cendre brutes	6,5
Cellulose brute (%)	5,5
Calcium(%)	1,1
Phosphore (%)	0,8
Vitamine A (UI/kg)	22000
Vitamine D3 (UI/kg)	2200
Vitamine E (mg/kg)	100
Sulfate de cuivre penta hydraté/ cuivre (mg/kg)	8

Tableau V : solutions de la gamme d'étalon pour le dosage de la vitamine C.

Solutions de la gamme d'étalon	Composition
Solution mère d'acide ascorbique (0.1g/l)	0.1 g d'acide ascorbique + 1 L d'eau distillée.
Solution 1 (10µg /ml)	1ml de la solution mère d'acide ascorbique + 9 ml d'eau distillée.
Solution 2 (5µg /ml)	2 ml de la solution 1 + 2 ml d'eau distillée.
Solution 3 (2.5µg /ml)	1ml de la solution 2 + 1 ml d'eau distillée.

Tableau VI : Solutions préparées pour le dosage de la vitamine C.

Solution préparées	Composition
Solution de TCA à 10%	10 g de TCA + 100 ml d'eau distillée.
Solution de Folin diluée (1/10)	1 ml de Folin + 9 ml d'eau distillée.

Tableau VIII : Solutions primaires pour la détermination du pouvoir antioxydant total du plasma

Solution préparées	Composition
CuSO₄ à 2 mM	0.32 g CuSO ₄ + 1l d'eau distillée.
Vitamine C à 400 µM	7.045 mg d'acide ascorbique + 100 ml d'eau distillée.

II. Traitement des globules rouges pour la détermination du pouvoir antioxydant total du plasma.

- Centrifuger le sang du donneur à 2000t/min pendant 10 min et éliminer le plasma ;
- Laver délicatement 1 volume du culot avec 2 volumes d'eau physiologique (sans lyser les GR), puis centrifuger à nouveau à 2000 t/min pendant 5 min.

III. Méthodes de calculs de l'ORAC

Exemple :

Pour la souris 4 traitée par l'acétamipride :

$$1 \text{ U ORAC} = \Sigma (\text{DO}_{\text{blanc}} - \text{DO}_{\text{étalon}}) \text{ à } t_0, t_{10}, t_{20}, t_{30}, t_{40}, t_{50}, t_{60} / 7$$

$$\text{DO}_{t_0 \text{ blanc}} - \text{DO}_{t_0 \text{ étalon}} = -0,102 - 3,311 = -3,413.$$

$$\text{DO}_{t_{10} \text{ blanc}} - \text{DO}_{t_{10} \text{ étalon}} = -0,102 - 3,311 = -3,413.$$

$$\text{DO}_{t_{20} \text{ blanc}} - \text{DO}_{t_{20} \text{ étalon}} = -0,102 - 2,872 = -2,974.$$

$$\text{DO}_{t_{30} \text{ blanc}} - \text{DO}_{t_{30} \text{ étalon}} = 1,01 - 3,21 = -2,2.$$

$$\text{DO}_{t_{40} \text{ blanc}} - \text{DO}_{t_{40} \text{ étalon}} = 0,153 - 3,311 = -3,158.$$

$$\text{DO}_{t_{50} \text{ blanc}} - \text{DO}_{t_{50} \text{ étalon}} = 0,155 - 1,331 = -1,176.$$

$$\text{DO}_{t_{60} \text{ blanc}} - \text{DO}_{t_{60} \text{ étalon}} = 0,154 - 3,311 = -3,157.$$

$$1 \text{ U ORAC} = -3,413 + (-3,413) + (-2,974) + (-2,2) + (-3,158) + (-1,176) + (-3,157) / 7$$

$$= |-19,491| / 7 = 2,784.$$

Donc :

$$1 \text{ U ORAC} = 2,784.$$

$$\Sigma (\text{DO}_{\text{blanc}} - \text{DO}_{\text{échantillon}}) \text{ à } t_0, t_{10}, t_{20}, t_{30}, t_{40}, t_{50}, t_{60} / 7$$

$$\text{DO}_{t_0 \text{ blanc}} - \text{DO}_{t_0 \text{ échantillon}} = -0,102 - 2,29 = -2,392.$$

$$\text{DO}_{t_{10} \text{ blanc}} - \text{DO}_{t_{10} \text{ échantillon}} = -0,102 - 1,743 = -1,845.$$

$$DO_{t_{20} \text{ blanc}} - DO_{t_{20} \text{ échantillon}} = -0,102 - 1,994 = -2,096.$$

$$DO_{t_{30} \text{ blanc}} - DO_{t_{30} \text{ échantillon}} = 1,01 - 0,602 = 0,408.$$

$$DO_{t_{40} \text{ blanc}} - DO_{t_{40} \text{ échantillon}} = 0,153 - 2,551 = -2,398.$$

$$DO_{t_{50} \text{ blanc}} - DO_{t_{50} \text{ échantillon}} = 0,155 - 1,047 = -0,892.$$

$$DO_{t_{60} \text{ blanc}} - DO_{t_{60} \text{ échantillon}} = 0,154 - 1,786 = -1,632.$$

$$\Sigma (DO_{\text{ blanc}} - DO_{\text{ échantillon}}) \text{ à } t_0, t_{10}, t_{20}, t_{30}, t_{40}, t_{50}, t_{60} / 7 = -2,392 + (-1,845) + (-2,096) + 0,408 + (-2,398) + (-0,892) + (-1,632) / 7 = |-10,847| / 7 = 1,549.$$

$$1 \text{ U ORAC} \longrightarrow 2,784$$

$$\text{ORAC échantillon} \longrightarrow 1,549$$

Donc :

$$\text{ORAC échantillon} = 1,549 * 1 \text{ U ORAC} / 2,784 = 0,556 \text{ UI.}$$

Tableau X : Solutions préparées pour le dosage de malondialdéhyde.

Solution préparées	Composition
Solution d'acide thiobarbiturique (TBA) à 0,67% TBA	0,67 g de + 100 ml d'H ₂ O distillée.
Solution d'acide trichloracétique (TCA) à 20%	20 de TCA + 100 ml d'H ₂ O distillée.

IV. Méthodes de calculs de malondialdéhyde

Les calculs du taux de malondialdéhyde sont effectués par l'équation ci-dessous :

$$[\text{Malondialdéhyde}] (\mu\text{mol/L}) = DO / \varepsilon.l.$$

DO: Densité optique

ε : coefficient d'extinction = $1,56 \cdot 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$

l : le trajet (longueur de la cuve) qu'est égale à 1cm.

Exemple :

La souris 3 traitée par le spinosad :

$$[\text{Malondialdéhyde}] (\mu\text{mol/L}) = 0,413 / 1,56 \cdot 10^5 \cdot 1 = 0,264 \cdot 10^{-5} \text{ mol /L} = 2,647 \mu\text{mol/L}.$$

V. Calcul statistique

Soit une série statistique $\{x_1, x_2, x_3, \dots, x_n\}$ dont n appartient à \mathbb{N}^* (entiers naturel non nul)

V.1. La moyenne arithmétique

$$m = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{n} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Dont :

m : la moyenne arithmétique.

n : l'effectif de la série.

x : le caractère étudié.

V.2. La variance

$$v = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - m)^2}{n}$$

Dont :

v : la variance.

m : la moyenne arithmétique.

n : l'effectif de la série.

x : le caractère étudié.

V.3. L'écart type

$$\delta = \sqrt{v}$$

Où :

δ : l'écart type.

v : La variance.

V.4. Test de normalité « Shapiro-wilk »

Le test de Shapiro-wilk est basé sur la statistique W . En comparaison des autres testes, il est particulièrement puissant pour les petits effectifs ($n \leq 50$). La statistique du test s'écrit :

$$W = \frac{\left[\sum_{i=1}^{\left[\frac{n}{2} \right]} a_i (x_{(n-i+1)} - x_{(i)}) \right]^2}{\sum_i (x_i - m)^2}$$

Où

$\left[\frac{n}{2} \right]$: la partie la partie entière du rapport $\frac{n}{2}$.

a_i : constantes correspondantes à une distribution normale.

m : la moyenne arithmétique.

Plus W est élevé, plus la compatibilité avec la loi normale est crédible. Les valeurs seuils W_{crit} sont lues dans la table de Shapiro-Wilk. La région critique, rejet de la normalité, s'écrit :

$$R.C. : W < W_{crit}$$

V.5. Test de Student (indépendant)

On étudie deux variables X et Y et on cherche à savoir si les deux observations de taille n_X et n_Y , de moyennes observées m_X et m_Y et de variances observées s^2_X et s^2_Y issues respectivement d'une population de moyenne μ_X et de variance δ^2_X et d'une

population de moyenne μY et de variance $\delta^2 Y$, proviennent de la même loi théorique de moyenne μ . Les hypothèses sont:

H0 : $\mu X = \mu Y$ et le traitement n'a pas d'effet.

H1 : $\mu X \neq \mu Y$ et le traitement a provoqué un changement.

Pour $nX < 30$ ou $nY < 30$, et $\delta^2 X = \delta^2 Y$, la statistique du test est :

La variance commune estimée :

$$S = \sqrt{\frac{n_X s_X^2 + n_Y s_Y^2}{n_X + n_Y - 2}}$$

Le test de Student :

$$t_{obs} = \frac{|m_X - m_Y|}{s \sqrt{\frac{1}{n_X} + \frac{1}{n_Y}}}$$

Dont :

m_X : la moyenne arithmétique de l'observation X.

m_Y : la moyenne arithmétique de l'observation Y.

s : la variance commune estimée.

n_X : l'effectif de l'observation X.

n_Y : l'effectif de l'observation Y.

$s^2 X$: la variance de l'observation X.

$s^2 Y$: la variance de l'observation Y.

On compare le t_{obs} avec t_{th} de la table de Student avec un pourcentage d'erreur $\alpha = 5\%$ et un degré de liberté $ddl = n_1 + n_2 - 2$:

- Si $t_{obs} < t_{th}$: H0 est retenue, la différence est non significative et le traitement n'a pas d'effet.

- Si $t_{obs} > t_{th}$: H1 est retenue, la différence est significative et le traitement a un effet.

V.6. Test de Fisher

Il sert à vérifier l'égalité de deux variances (homoscédasticité). Les hypothèses du test sont :

$$H_0 : \delta^2_X = \delta^2_Y$$

$$H_1 : \delta^2_X \neq \delta^2_Y$$

La statistique du test est :

$$F_{obs} = \frac{\frac{n_X s_X^2}{n_X - 1}}{\frac{n_Y s_Y^2}{n_Y - 1}}$$

Dont:

n_X : l'effectif de l'observation X.

n_Y : l'effectif de l'observation Y.

s^2_X : la variance de l'observation X.

s^2_Y : la variance de l'observation Y.

On compare le F_{obs} avec la valeur seuil dans la table de Fisher-Snédecour à $n_X - 1$ et $n_Y - 1$ degrés de liberté.

- Si $F_{obs} <$ valeur seuil: H_0 est retenue, la différence entre les variances des deux observations n'est pas significative.
- Si $F_{obs} >$ valeur seuil: H1 est retenue, la différence de variance des deux observations est significative.

Tableau XI : table de Student

Avec α est le pourcentage d'erreur et ν est le degré de liberté.

$\nu \backslash \alpha$	0,900	0,500	0,300	0,200	0,100	0,050	0,020	0,010	0,001
1	0,1584	1,0000	1,9626	3,0777	6,3138	12,7062	31,8205	63,6567	636,6193
2	0,1421	0,8165	1,3862	1,8856	2,9200	4,3027	6,9646	9,9248	31,5991
3	0,1366	0,7649	1,2498	1,6377	2,3534	3,1824	4,5407	5,8409	12,9240
4	0,1338	0,7407	1,1896	1,5332	2,1318	2,7764	3,7469	4,6041	8,6103
5	0,1322	0,7267	1,1558	1,4759	2,0150	2,5706	3,3649	4,0321	6,8688
6	0,1311	0,7176	1,1342	1,4398	1,9432	2,4469	3,1427	3,7074	5,9588
7	0,1303	0,7111	1,1192	1,4149	1,8946	2,3646	2,9980	3,4995	5,4079
8	0,1297	0,7064	1,1081	1,3968	1,8595	2,3060	2,8965	3,3554	5,0413
9	0,1293	0,7027	1,0997	1,3830	1,8331	2,2622	2,8214	3,2498	4,7809
10	0,1289	0,6998	1,0931	1,3722	1,8125	2,2281	2,7638	3,1693	4,5869
11	0,1286	0,6974	1,0877	1,3634	1,7959	2,2010	2,7181	3,1058	4,4370
12	0,1283	0,6955	1,0832	1,3562	1,7823	2,1788	2,6810	3,0545	4,3178
13	0,1281	0,6938	1,0795	1,3502	1,7709	2,1604	2,6503	3,0123	4,2208
14	0,1280	0,6924	1,0763	1,3450	1,7613	2,1448	2,6245	2,9768	4,1405
15	0,1278	0,6912	1,0735	1,3406	1,7531	2,1314	2,6025	2,9467	4,0728
16	0,1277	0,6901	1,0711	1,3368	1,7459	2,1199	2,5835	2,9208	4,0150
17	0,1276	0,6892	1,0690	1,3334	1,7396	2,1098	2,5669	2,8982	3,9651
18	0,1274	0,6884	1,0672	1,3304	1,7341	2,1009	2,5524	2,8784	3,9216
19	0,1274	0,6876	1,0655	1,3277	1,7291	2,0930	2,5395	2,8609	3,8834
20	0,1273	0,6870	1,0640	1,3253	1,7247	2,0860	2,5280	2,8453	3,8495
21	0,1272	0,6864	1,0627	1,3232	1,7207	2,0796	2,5176	2,8314	3,8193
22	0,1271	0,6858	1,0614	1,3212	1,7171	2,0739	2,5083	2,8188	3,7921
23	0,1271	0,6853	1,0603	1,3195	1,7139	2,0687	2,4999	2,8073	3,7676
24	0,1270	0,6848	1,0593	1,3178	1,7109	2,0639	2,4922	2,7969	3,7454
25	0,1269	0,6844	1,0584	1,3163	1,7081	2,0595	2,4851	2,7874	3,7251
26	0,1269	0,6840	1,0575	1,3150	1,7056	2,0555	2,4786	2,7787	3,7066
27	0,1268	0,6837	1,0567	1,3137	1,7033	2,0518	2,4727	2,7707	3,6896
28	0,1268	0,6834	1,0560	1,3125	1,7011	2,0484	2,4671	2,7633	3,6739
29	0,1268	0,6830	1,0553	1,3114	1,6991	2,0452	2,4620	2,7564	3,6594
30	0,1267	0,6828	1,0547	1,3104	1,6973	2,0423	2,4573	2,7500	3,6460
40	0,1265	0,6807	1,0500	1,3031	1,6839	2,0211	2,4233	2,7045	3,5510
60	0,1262	0,6786	1,0455	1,2958	1,6706	2,0003	2,3901	2,6603	3,4602
80	0,1261	0,6776	1,0432	1,2922	1,6641	1,9901	2,3739	2,6387	3,4163
120	0,1259	0,6765	1,0409	1,2886	1,6577	1,9799	2,3578	2,6174	3,3735
∞	0,1257	0,6745	1,0364	1,2816	1,6449	1,9600	2,3263	2,5758	3,2905

Tableau XII : table de Fisher

ν_1 est le nombre de ddl du numérateur avec $\alpha = 0,05$.

ν_2 est le nombre de ddl du dénominateur avec $\alpha = 0,05$.

$\nu_2 \backslash \nu_1$	1	2	3	4	5	6	8	10	15	20	30	∞
1	161	200	216	225	230	234	239	242	246	248	250	254
2	18,5	19,0	19,2	19,2	19,3	19,3	19,4	19,4	19,4	19,4	19,5	19,5
3	10,1	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,85	8,79	8,70	8,66	8,62	8,53
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,04	5,96	5,86	5,80	5,75	5,63
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,82	4,74	4,62	4,56	4,50	4,36
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,15	4,06	3,94	3,87	3,81	3,67
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,73	3,64	3,51	3,44	3,38	3,23
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,44	3,35	3,22	3,15	3,08	2,93
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,23	3,14	3,01	2,94	2,86	2,71
10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,07	2,98	2,85	2,77	2,70	2,54
11	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,09	2,95	2,85	2,72	2,65	2,57	2,40
12	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,85	2,75	2,62	2,54	2,47	2,30
13	4,67	3,81	3,41	3,18	3,03	2,92	2,77	2,67	2,53	2,46	2,38	2,21
14	4,60	3,74	3,34	3,11	2,96	2,85	2,70	2,60	2,46	2,39	2,31	2,13
15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,64	2,54	2,40	2,33	2,25	2,07
16	4,49	3,63	3,24	3,01	2,85	2,74	2,59	2,49	2,35	2,28	2,19	2,01
17	4,45	3,59	3,20	2,96	2,81	2,70	2,55	2,45	2,31	2,23	2,15	1,96
18	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,66	2,51	2,41	2,27	2,19	2,11	1,92
19	4,38	3,52	3,13	2,90	2,74	2,63	2,48	2,38	2,23	2,16	2,07	1,88
20	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,45	2,35	2,20	2,12	2,04	1,84
22	4,30	3,44	3,05	2,82	2,66	2,55	2,40	2,30	2,15	2,07	1,98	1,78
24	4,26	3,40	3,01	2,78	2,62	2,51	2,36	2,25	2,11	2,03	1,94	1,73
26	4,23	3,37	2,98	2,74	2,59	2,47	2,32	2,22	2,07	1,99	1,90	1,69
28	4,20	3,34	2,95	2,71	2,56	2,45	2,29	2,19	2,04	1,96	1,87	1,65
30	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,27	2,16	2,01	1,93	1,84	1,62
40	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45	2,34	2,18	2,08	1,92	1,84	1,74	1,51
50	4,03	3,18	2,79	2,56	2,40	2,29	2,13	2,03	1,87	1,78	1,69	1,44
60	4,00	3,15	2,76	2,53	2,37	2,25	2,10	1,99	1,84	1,75	1,65	1,39
80	3,96	3,11	2,72	2,49	2,33	2,21	2,06	1,95	1,79	1,70	1,60	1,32
100	3,94	3,09	2,70	2,46	2,31	2,19	2,03	1,93	1,77	1,68	1,57	1,28
∞	3,84	3,00	2,60	2,37	2,21	2,10	1,94	1,83	1,67	1,57	1,46	1,00

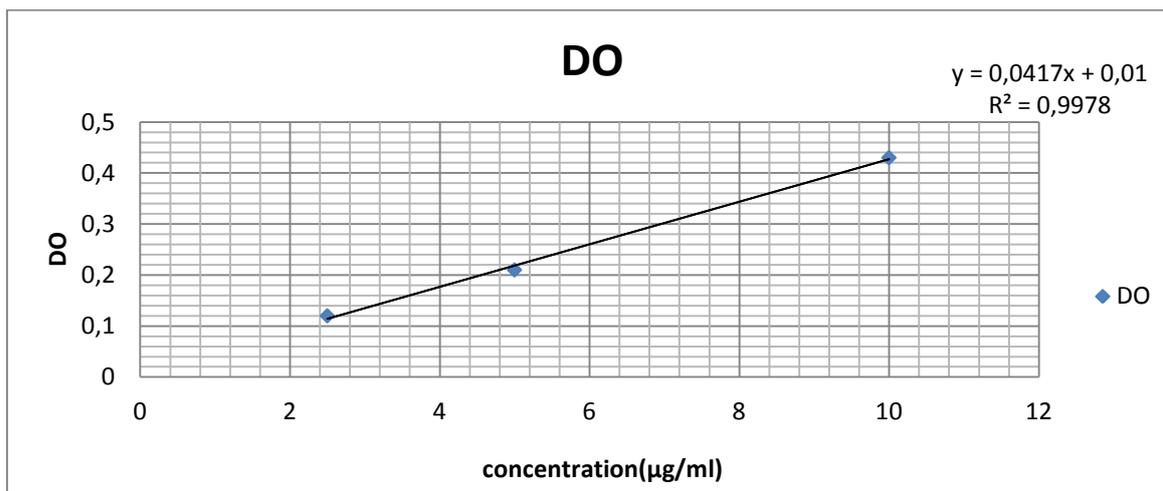
Tableau XIII : Table des valeurs limites de Shapiro-Wilk à 1% et 5% d'erreur

n = la taille de l'échantillon

<i>n</i>	5%	1%
3	0.767	0.753
4	0.748	0.687
5	0.762	0.686
6	0.788	0.713
7	0.803	0.730
8	0.818	0.749
9	0.829	0.764
10	0.842	0.781
11	0.850	0.792
12	0.859	0.805
13	0.856	0.814
14	0.874	0.825
15	0.881	0.835
16	0.887	0.844
17	0.892	0.851
18	0.897	0.858
19	0.901	0.863
20	0.905	0.868
21	0.908	0.873
22	0.911	0.878
23	0.914	0.881
24	0.916	0.884
25	0.918	0.888
26	0.920	0.891
27	0.923	0.894
28	0.924	0.896
29	0.926	0.898
30	0.927	0.900

Tableau VII : Résultats des solutions de la gamme d'étalon.

	Solution 1	Solution 2	Solution 3
concentration	10	5	2,5
DO	0,43	0,21	0,12

Figure 7 : Courbe d'étalonnage de la vitamine C.**Tableau XIV: Valeurs pondérales moyennes des souris femelles témoins et traitées par spinosad et l'acétamipride.**

Souris	Poids corporel à J0 (g)	Poids corporel à J9 (g)	Poids corporel à J18 (g)
Témoins	27,00 \pm 2,18	27,78 \pm 1,72	27,11 \pm 1,69
Traitées par SPD	26,00 \pm 1,10	23,50 \pm 1,87	25,00 \pm 2,10
Traitées par ACE	27,20 \pm 2,20	27,10 \pm 1,97	27,10 \pm 2,18

Tableau XV: Poids corporel des souris femelles témoins.

Souris	Poids corporel à J0 (g)	Poids corporel à J9 (g)	Poids corporel à J18 (g)
1	29	28	28
2	29	30	29
3	23	24	24
4	29	27	26
5	26	28	28
6	29	29	28
7	27	29	26
8	26	28	29
9	25	27	26
Moyenne	27,00	27,78	27,11
Ecart type	2,18	1,72	1,69

Tableau XVI: Poids corporel des souris femelles traitées par spinosad.

souris	Poids corporel à J ₀ (g)	Poids corporel à J ₉ (g)	Poids corporel à J ₁₈ (g)
1	27	25	25
3	26	20	21
4	26	25	26
6	24	23	25
7	26	24	26
9	27	24	27
Moyenne	26,00	23,50	25,00
Ecart type	1,10	1,87	2,10

Tableau XVII: Poids corporel des souris femelles traitées par l'acétamipride.

Souris	Poids corporel à J ₀ (g)	Poids corporel à J ₉ (g)	Poids corporel à J ₁₈ (g)
1	29	30	29
2	30	29	29
3	23	23	23
4	29	28	30
5	28	27	27
6	27	28	27
7	29	27	28
8	26	25	27
9	25	27	24
10	26	27	27
Moyenne	27,20	27,10	27,10
Ecart type	2,20	1,97	2,18

Tableau XVIII : Valeurs moyennes de la vitamine C chez les souris femelles témoins et traitées par spinosad et l'acétamipride.

Souris	Vit C plasmatiques (µg/ml)
Témoins	6,97 ± 3,39
Traitées SPD	5,04 ± 0,41
Traitées ACE	5,09 ± 0,39

Tableau XIX : Valeurs de la vitamine C (µg/ml) chez les souris femelles témoins et traitées par l'acétamipride.

Souris	témoins	Traitées ACE
1	4,63	4,77
2	11,77	4,99
3	4,51	5,52
Moyenne	6,97	5,09
Ecart type	3,39	0,39

Tableau XX : Valeurs de la vitamine C ($\mu\text{g/ml}$) chez les souris femelles traitées par spinosad.

souris	Traitées par SPD
3	4,92
7	5,59
9	4,60
Moyenne	5,04
Ecart type	0,41

Tableau XXI: Valeurs moyennes du pouvoir antioxydant total du plasma chez les souris femelles témoins et traitées par spinosad et l'acétamipride.

Souris	ORAC (UI)
Témoins	0,48 \pm 0,10
Traitées SPD	0,73 \pm 0,14
Traitées ACE	0,57 \pm 0,03

Tableau XXII: Valeurs du pouvoir antioxydant total du plasma (UI) chez les souris femelles témoins et traitées par l'acétamipride.

Souris	témoins	Traitées ACE
4	0,367	0,556

5	0,568	0,598
6	0,517	0,546
Moyenne	0,484	0,567
Ecart type	0,104	0,028

Tableau XXIII : Valeurs du pouvoir antioxydant total du plasma (UI) chez les souris traitées par SPD.

souris	Traitées par SPD
3	0,580
7	0,755
9	0,848
Moyenne	0,728
Ecart type	0,136

Tableau XXIV : Valeurs moyennes du malondialdéhyde ($\mu\text{mol/L}$) chez les souris femelles témoins et traitées par spinosad et l'acetamipride.

Souris	MDA ($\mu\text{mol/L}$)
Témoins	1,89 \pm 0,14
Traitées SPD	2,47 \pm 0,27
Traitées ACE	2,17 \pm 0,39

Tableau XXV : Valeurs du malondialdéhyde ($\mu\text{mol/L}$) chez les souris femelles traitées par spinosad.

souris	Traitées par SPD
3	2,65
7	2,16
9	2,60
Moyenne	2,47
Ecart type	0,27

Tableau XXVI : Valeurs du malondialdéhyde ($\mu\text{mol/L}$) chez les souris femelles témoins et traitées par l'acétamipride.

Souris	témoins	Traitées ACE
7	2,04	1,76
8	1,88	2,21
9	1,76	2,54
Moyenne	1,89	2,17
Ecart type	0,14	0,39