

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHESCIENTIFQUE

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*

*Recherche de l'effet d'un antioxydant naturel chez  
Des souris males intoxiquées par un insecticide  
néonicotinoïde*

*Soutenu le 09-07-2020*

*Présenté par :*

*M<sup>me</sup> DAHENANE Ghania*

*Devant le jury composé de :*

<i>M<sup>me</sup> KADRI F.</i>	<i>Maitre de Conférences B.</i>	<i>UB1</i>	<i>Présidente</i>
<i>M<sup>me</sup> ARKAME F.</i>	<i>Maitre Assistante B.</i>	<i>UB1</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>M<sup>me</sup> SAADI L.</i>	<i>Maitre de Conférences A.</i>	<i>UB1</i>	<i>Promotrice</i>
<i>M<sup>me</sup> NEGAB I.</i>	<i>Assistante.</i>	<i>CRD-Alger</i>	<i>Co-promotrice</i>

*2019-2020*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail*

*A l'âme de mes parents*

*Puisse Dieu, le tout puissant, les avoir en sa sainte miséricorde !*

*A mon mari et mon fils Zakaria*

*A tous mes enseignants, qui m'ont partagé leur savoir et qui m'ont encouragé pour terminer mes études. Je suis très reconnaissante.*

*A toute ma famille : mes frères et surtout mes chères sœurs*

*Nina, Bouchra, Rahma et Sabrina*

*Merci pour l'encouragement et le soutien.*

*A toute personne passionnante au savoir, je dédie ce travail.*

*Ghania (Hania)*

## *Remerciements*

*Je tiens, avant tout, à remercier le miséricordieux car sans son aide et sa bienveillance, rien de cela n'aura pu être possible.*

*J'exprime ma gratitude à mon enseignante et promotrice M<sup>me</sup> SAADI L., Maître de Conférences A. au département de BPC de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un tel sujet, pour sa confiance, ses précieux conseils et son soutien tout le long de mon travail.*

*Mes vifs remerciements vont*

*A Mme KADRI F., Maître de Conférences B. au département de BPC de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de soutenance.*

*Et à notre enseignante Mme ARKAME F., Maître Assistante B au département de BPC d'avoir accepté de faire partie du jury en examinant mon travail.*

*Mes remerciements vont aussi*

*A M<sup>me</sup> NAGAB I., et son équipe de CRD, Alger, pour leur accueil, leur compassion et leur aide*

*A tous mes enseignants,*

*A toutes personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.*

## RESUME

La toxicité par l'acétamipride est impliquée dans plusieurs maladies humaines liées au stress oxydant. La présente étude a pour objectif de tester la capacité de la chlorophylle en supplémentation à moduler le stress oxydant induit par l'acétamipride.

Vingt-quatre souris mâles de race albinos ont été réparties en quatre groupes et ont subi quotidiennement différents traitements par voie orale pendant 15 jours. Le lot témoin a été administré de l'eau distillée. Les autres lots ont été gavés respectivement par 7,2 mg/Kg/j d'acétamipride, d'une solution aqueuse de 0,01g/ml de la chlorophylle et de 7,2 mg/kg/j d'acétamipride suivi par une supplémentation de 0,01g/ml de la chlorophylle avec un intervalle de 4 heures.

Chez les souris traitées par l'acétamipride, l'examen histologique du foie et des reins a révélé la présence d'une toxicité liée à un effet pro-oxydant exprimé par une augmentation significative de l'activité enzymatique de la catalase et de malondialdhyde. En parallèle, la supplémentation de 0,01g/ml de la chlorophylle a entraîné la réduction de cette toxicité en améliorant le taux des deux paramètres étudiés.

Ces résultats nous laissent suggérer que la chlorophylle peut avoir une puissance activité antioxydante chez les souris et peut avoir un effet inhibiteur dose dépendant sur le stress oxydant induit par l'acétamipride. Cependant, la dose 0,01g/ml de la chlorophylle reste insuffisante pour donner des résultats significatifs.

**Mots clés:** Acétamipride, Chlorophylle, Effet pro-oxydant, Souris, Stress oxydant, Toxicité.



## ABSTRACT

Acetamiprid toxicity is implicated in several human diseases related to oxidative stress. This study was designed to test the ability of supplemented chlorophyll to modulate acetamiprid induced oxidative stress.

Twenty-four male albino mice were divided into four groups and received orally different treatments for 15 days. The control lot was administered with distilled water. While other lots were gavaged respectively by 7.2 mg / Kg / day acetamiprid, an aqueous solution of 0.01 g/ml of chlorophyll and 7.2 mg / kg / j d'acétamipride followed by supplementation of 0.01g / ml of chlorophyll with an 4 hours interval.

In mice treated with acetamiprid, histological examination of the liver and kidney revealed the presence of toxicity linked to a pro-oxidant effect expressed by a significant increase in the enzymatic activity of catalase and malondialdehyde. In parallel, supplementation of 0.01g / ml of chlorophyll led to the reduction of this toxicity by enhancing the concentration of the two parameters studied.

These results allow us to suggest that chlorophyll can have a potent antioxidant activity in mice and may have a dose-dependent inhibitory effect on acetamiprid induced oxidative stress. However, 0.01g/ml of chlorophyll is insufficient to give significant results.

**Key words:** Acetamiprid, Chlorophyll, Pro-oxidative effect, Mouse, Oxidative stress, Toxicity.

## الملخص

إن سمية الأسيتاميبيريد متورطة في العديد من الأمراض البشرية المرتبطة بالإجهاد التأكسدي. الهدف من هذه الدراسة الحالية هو اختبار قدرة الكلوروفيل المضافة على تعديل الإجهاد التأكسدي الناجم عن الأسيتاميبيريد .

تم تقسيم أربعة وعشرون فأراً بيض إلى أربع مجموعات خضعت يومياً لعلاجات مختلفة عن طريق الفم لمدة 15 يوماً. تمت معالجة مجموعة الشاهد بالماء المقطر، أما المجموعات الأخرى فعولجت على التوالي بـ 7.2 ملغم/كغم/يوم من الأسيتاميبيريد، بمحلول مائي مقداره 0.01 جم/مل من الكلوروفيل و بـ 7.2 ملغم/كغم/يوم من أسيتاميبيريد يتبعه محلول الكلوروفيل بمقدار 0.01 جم/مل بفاصل زمني يقدر بأربعة ساعات. كشف الفحص النسيجي للكبد والكليتين عند الفئران المعالجة بالأسيتاميبيريد وجود سمية مرتبطة بتأثير مؤكسد يعبر عنه زيادة معنوية في النشاط الإنزيمي للكاتالاز والمالديالديهيد. بالموازاة أدت إضافة الكلوروفيل المقدر بـ 0.01 غ/مل الى التقليل من السمية من خلال تحسين معدل التحليلين المدروسين. ير هذه النتائج إلى أن الكلوروفيل قد يكون له نشاط قوي مضاد للأكسدة في الفئران وقد يكون له تأثير مثبط يعتمد على الجرعة على الإجهاد التأكسدي الناجم عن الأسيتاميبيريد. ومع ذلك، لا تزال الجرعة 0.01 جم/مل من الكلوروفيل غير كافية لإعطاء نتائج معتبرة.

**الكلمات المفتاحية:** الأسيتاميبيريد، الكلوروفيل، تأثير مؤكسد، الفئران، الإجهاد التأكسدي، السمية.

## *LISTE DES ABREVIATIONS*

<b>ACE :</b>	Acétamipride.
<b>ADN :</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>DL50 :</b>	Dose létale.
<b>CAT :</b>	Catalase.
<b>Cu/Zn-SOD :</b>	Superoxyde dismutase
<b>EFSA :</b>	Autorité européenne de sécurité alimentaire
<b>ERO :</b>	Espèce réactive de l'oxygène
<b>GSH :</b>	Glutathion réduit
<b>GSH-Px :</b>	Glutathion peroxydase
<b>GSH-R :</b>	Glutathion réductase
<b>GSSG :</b>	Glutathion oxydé
<b>HO° :</b>	Radical hydroxyle
<b>H2O2 :</b>	Peroxyde d'hydrogène
<b>MDA :</b>	Malondialdéhyde
<b>Mn-SOD :</b>	Superoxyde dismutase
<b>NOAEL :</b>	Dose sans effet néfaste observé
<b>NADPH :</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
<b>RL :</b>	Radical libre
<b>1O2 :</b>	Oxygène singulet
<b>ROH :</b>	Alcool
<b>ROOH :</b>	Hydroperoxyde lipidique
<b>ROS :</b>	Espèce réactive de l'oxygène
<b>SOD :</b>	Superoxyde dismutase
<b>TBA :</b>	Acide thiobarbéturique
<b>CYP450 :</b>	Cytochrome P450
<b>TBARS :</b>	Thiobarbituricacidreacting substances

## *Liste des Tableaux*

<b><u>Tableau I</u></b> : Principales caractéristiques de l'acétamipride.....	5
<b><u>Tableau II</u></b> : Gamme d'étalonnage standard utilisée pour déterminer la protéine dans l'homogénat tissulaire à partir de la solution d'albumine sérique Bovine .....	21

## *Liste des Tableaux en Annexe*

<b><u>Tableau III</u></b> : Le poids corporel des souris témoin administrés l'eau distillée.....	1
<b><u>Tableau IV</u></b> : Le poids corporel des souris traités par l'acétamipride 7,2 mg/kg/j.....	1
<b><u>Tableau V</u></b> : le poids corporel des souris traités par 0,01 g/ml de la chlorophylle .....	1
<b><u>Tableau VI</u></b> : le poids corporel des souris traités par 7,2 mg/Kg/j de l'ACE et 0,01 g/ml et CHL.	1
<b><u>Tableau VII</u></b> : Poids absolue et poids relatifs de Foie.....	1
<b><u>Tableau VIII</u></b> : Poids absolue et poids relatifs de Rein.....	1
<b><u>Tableau IX</u></b> : Les valeurs de Malondialdéhyde du rein.....	1
<b><u>Tableau X</u></b> : Les valeurs de Malondialdéhyde du Foie.....	1
<b><u>Tableau XI</u></b> : Les valeurs obtenue de l'activité de catalase du rein de lots témoin et traités....	1
<b><u>Tableau XII</u></b> : Les valeurs obtenue de l'activité de catalase du Foie de lots témoin et traités..	1

# Liste des Figures

<b>Figure 1</b> : Structures chimiques de certains insecticides néonicotinoïdes les plus importants	3
<b>Figure 2</b> : Représentation schématique d'une synapse cholinergique avec les cibles	
Principales des néonicotinoïdes .....	4
<b>Figure 3</b> : Voie de métabolisme de l'acétamipride dans l'organisme .....	6
<b>Figure 4</b> : Effet du stress oxydatif sur la cellule .....	8
<b>Figure 5</b> : Mode d'action induit par le stress oxydatif proposé pour les néonicotinoïdes .....	9
<b>Figure 6</b> : Marqueurs biologique de stress oxydant.....	10
<b>Figure 7</b> : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques.....	11
<b>Figure 8</b> : Structure de la chlorophylle et de l'hémoglobine.....	15
<b>Figure 9</b> : l'acétamipride en poudre .....	annexe 1
<b>Figure 10</b> : Confection des lots expérimentales et méthode de gavage des souris.....	20
<b>Figure 11</b> : Broyage tissulaire à l'aide d'un homogénéisateur SS2.....	21
<b>Figure 12</b> : Préparation des cassettes histologiques .....	23
<b>Figure 13</b> : Appareil de déshydratation .....	annexe 1
<b>Figure 14</b> : Bloc de paraffine dans des moles en métallique .....	24
<b>Figure 15</b> : Décès d'une souris intoxiquée par l'acétamépride.....	26
<b>Figure 16</b> : Evolution des poids corporels en gramme chez les souris témoins et traitées par l'acétamipride et de la chlorophylle.....	27
<b>Figure 17</b> : Effet des différents traitements sur le poids relatif (%) des reins (a) et du foie (b) des souris males.....	29
<b>Figure 18</b> : Variation du taux de malondialdéhyde rénal (nmoles/mg protéine) chez les souris témoins et traitées pendant deux semaines.....	30

<b>Figure 19 :</b> Variation du taux de malondialdéhyde hépatique (nmoles/mg protéine) chez les souris témoins et traitées pendant deux semaines.....	31
<b>Figure 20 :</b> Mesure de l'activité enzymatique de la catalase (U/min/mg de protéine) dans le rein chez les souris témoins et traitées pendant deux semaines .....	33
<b>Figure 21:</b> Mesure de l'activité enzymatique de la catalase (U/min/mg de protéine) dans le foie chez les souris témoins et traitées pendant deux semaines.....	33
<b>Figure 22_:</b> Structure du parenchyme rénal des souris mâles témoins .....	36
<b>Figure 23 :</b> Structure du parenchyme rénal des souris mâles administrées de la chlorophylle	37
<b>Figure 24 :</b> Structure du cortex rénal des souris males exposées à l'acétamipride à raison de 7,2mg /kg /j pendant deux semaines.....	38
<b>Figure 25 :</b> Structure du cortex rénal des souris males exposées à l'acétamipride et à la chlorophylle pendant deux semaines .....	39
<b>Figure 26 :</b> Structure du parenchyme hépatique des souris males témoins et administrées par la chlorophylle.....	41
<b>Figure 27 :</b> Structure du parenchyme hépatique des souris males exposées à l'acétamipride à raison de 7,2mg /kg /j pendant deux semaines.....	42
<b>Figure 28 :</b> Structure du parenchyme hépatique des souris males exposées à l'acétamipride et à la chlorophylle pendant deux semaines.....	43



# SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	Er
<b>ror! Bookmark not defined.</b>	
<b>CHAPITRE :</b>	<b>RAPPELS</b>
<b>BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
I.1 GENERALITES SUR LES INSECTICIDES NEONICOTINOIDES	
I.1.1. Toxicité des néonicotinoïdes.....	3
I.1.2. Toxicité de l'acétamipride.....	4
I.2. GENERALITE SUR LES ANTIOXYDANTS .....	10
I.2.1. Antioxydants enzymatiques .....	11
I.2.2. Antioxydants non enzymatiques .....	13
I.2.2.3. Chlorophylle source d'antioxydants .....	15
<b>CHAPITRE II : Matériel et méthodes .....</b>	<b>17</b>
II.1. MATERIEL .....	17
II.1.1. Matériel animal.....	17
II.1.2. Matériel technique .....	17
II.2. METHODES .....	18
II.2.1. Elevage des animaux .....	18
II.2.2. Expérimentation.....	19
II.2.3. Sacrifice des animaux et prélèvement des échantillons.....	20
II.2.4. Détermination des paramètres du statut oxydant/antioxydant.....	20
II.2.5. Etude histologique .....	23
II.2.6. Etude statistique .....	23
<b>CHAPITRE III : RESULTAT ET DISCUSSION .....</b>	<b>24</b>
III.1. Comportement.....	24



III.2. Evolution du poids corporel .....	24
III.3. Evolution des poids relatifs moyens des organes .....	24
III.4. Etude histologique .....	25
III.5.1. structure du parenchyme rénal .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
III.5.2. Structure de parenchyme hépatique .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
CONCLUSION ET ET PERSPECTIVES .....	45
REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUES .....	47
ANNEXES	

# *INTRODUCTION*

## INTRODUCTION

L'utilisation généralisée des pesticides en milieu agricole, santé publique et commercial à travers le monde est une indication de leur importance (Alavanja et *al.*, 2004) malgré qu'ils entraînent des intoxications et des problèmes de santé humaine et animale les plus graves (Gamet et Lukowicz, 2017; Girard et *al.*, 2020). En effet, la gravité de l'intoxication dépend de la toxicité du produit en cause, du mode de pénétration, de la dose absorbée, de la physiologie et de l'âge du sujet (De Miguel-Bouzas et *al.*, 2012). Malheureusement, le grand public est très peu informé des risques de ces produits autorisés pour l'utilisation domestique, pour la santé et pour l'environnement.

L'acétamipride (ACE), un membre de la famille des insecticides néonicotinoïdes (Gibbons et *al.*, 2015; Chakroun et *al.* 2016) est utilisé régulièrement pour la protection des cultures contre une grande variété d'insectes nuisibles (Sanyal et *al.*, 2008; Kushwaha et *al.*, 2018; Zoumenou et *al.*, 2019). Il agit comme agoniste du neurotransmetteur d'acétylcholine dans le système nerveux des insectes cibles (Chakroun et *al.* 2016 ; Paquet et *al.*, 2019). Nombreuses études épidémiologiques ont montré les effets toxiques l'ACE chez l'Homme et les animaux tels que la neurotoxicité, l'immuno-toxicité, l'hépatotoxicité et la néphrotoxicité (Son et *al.*, 2017) ainsi que des effets cytotoxiques reproductifs (Bal et *al.*, 2012). En effet, l'ACE est connu pour son action d'affecter directement le système de défense cellulaire par une production massive des espèces réactives de l'oxygène (ROS) particulièrement toxiques pour l'intégrité cellulaire (Shadnia et *al.*, 2005 ; Chakroun et *al.* 2016).

Les travaux de Yan et *al.* (2020) viennent confirmer l'implication du stress oxydatif dans le mode d'action des néonicotinoïdes sur le métabolisme des acides aminés à travers la libération des ROS, le déséquilibre de la balance antioxydants /radicaux libres provoquant ainsi une peroxydation des lipides cellulaires et une perturbation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et par conséquent, l'apparition des dégâts souvent irréversibles pour la cellule (Chen et Wong, 2009 ; Annabi et *al.*, 2019).

Face à ces composants toxiques, le corps développe des systèmes de défense par la libération des antioxydants qui empêchent les radicaux libres d'atteindre leurs cibles et de les endommager (Desmier, 2016). Cependant, chaque individu ne possède pas le même potentiel antioxydant. Celui-ci est en fonction du mode de vie, des caractéristiques génétiques mais également de l'environnement.

Une bonne hygiène de vie ainsi que de bonnes habitudes alimentaires jouent également un rôle primordial dans le maintien d'un potentiel antioxydant optimal. Des facteurs nutritionnels bioactifs, tels que ceux contenus dans les plantes vertes, peuvent être impliqués dans la protection des individus contre le développement des inflammations et des dommages cellulaires. La chlorophylle et d'autres composés tétrapyrroliques, qui sont structurellement apparentés à la bilirubine (le puissant pigment biliaire antioxydant) (Vitek et Ostrow, 2009) sont parmi les molécules candidates importantes qui sont considérées comme responsables de cet effet protecteur (Ferruzzi et Blakeslee, 2007). Cette biomolécule, une porphyrine de magnésium estérifiée au phytol, est intrinsèquement incorporée dans la chaîne alimentaire humaine et représente des composés naturels dotés d'une puissance biologique (Kräutler, 2008; Suparmi et *al.*, 2016; Vankova et *al.*, 2018). Son activité antioxydante est l'un des effets bénéfiques pour prévenir à la fois les dommages oxydatifs de l'ADN et de la peroxydation lipidique en réduisant les ROS (Vankova et *al.*, 2018).

Vu l'absence des données publiées décrivant l'effet direct de la chlorophylle sur la toxicité des insecticides médiée par le stress oxydant, la présente étude a été conçue dans le but de chercher cet effet chez des souris mâles intoxiquées par l'acétamipride à court terme. Nous avons choisi pour cette étude les sites de détoxification des substances toxiques à savoir le foie et les reins.

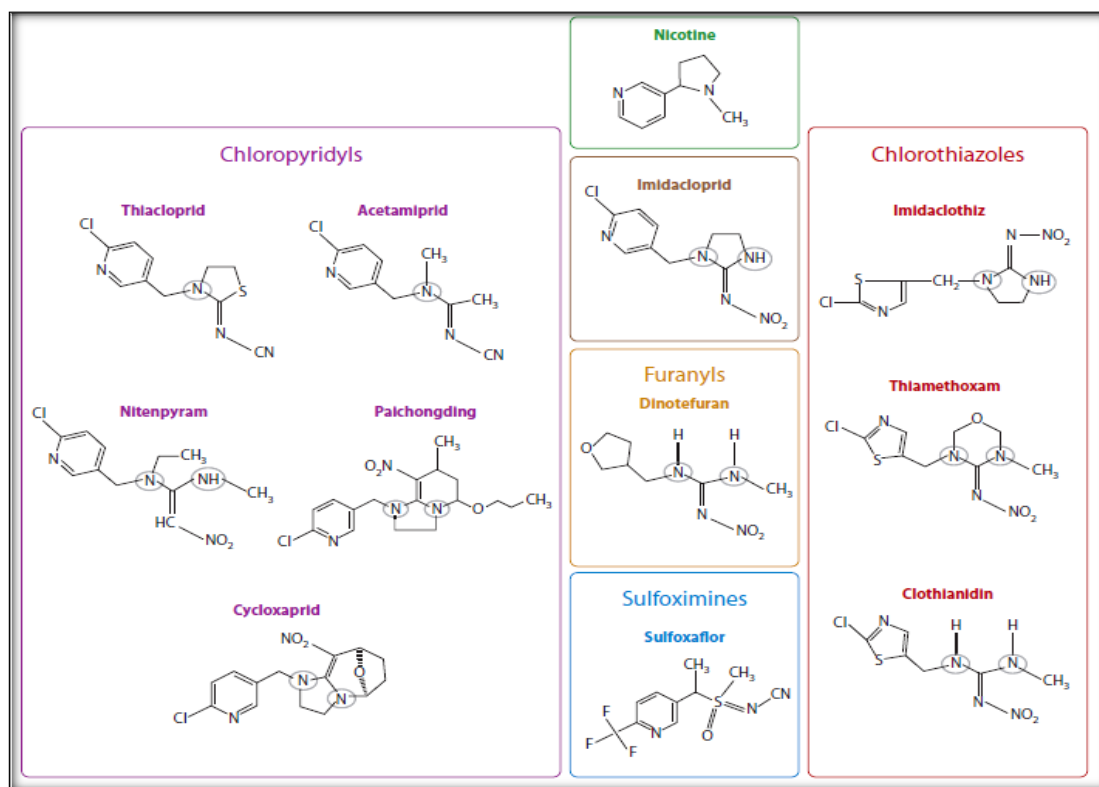
# *CHAPITRE I*

## *Rappels BIBLIOGRAPHIQUES*

## I.1. GENERALITES SUR LES INSECTICIDES NEONICOTINOIDES

Les insecticides de type néonicotinoïdes sont des analogues synthétiques de la nicotine qui est un alcaloïde naturel extrait des feuilles de tabac et utilisé depuis des siècles comme insecticide (Jeschke et *al.*, 2011). Des milliers de tonnes de néonicotinoïdes sont largement utilisés dans le monde comme insecticides systémiques à large spectre et médicaments vétérinaires (Wang et *al.*, 2018). Ces insecticides sont des neurotoxiques dont leur cible est le récepteur post-synaptique à l'acétylcholine (AChE) dont le blocage induit la paralysie et la mort de l'insecte (Seifert et *al.*, 2005).

Sept substances néonicotinoïdes ont été exploitées depuis leur introduction sur le marché : la clothianidine, le dinotéfurane, l'imidaclopride, le nitenpyrame, le thiaclopride, le thiaméthoxame e l'acetamipride (Figure 1) (Wang et *al.*, 2018).

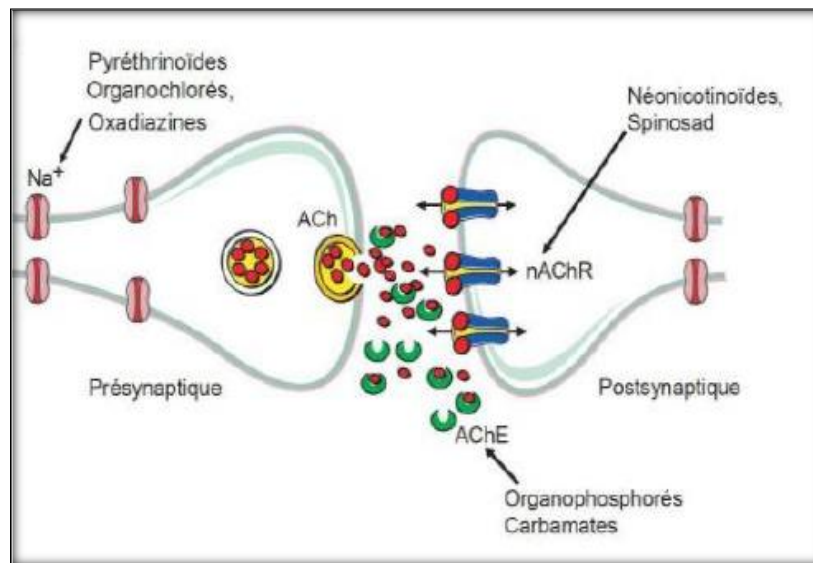


**Figure 1** : Structures chimiques de certains insecticides néonicotinoïdes les plus importants (Wang et *al.*, 2018).

### I.1.1 Toxicité des néonicotinoïdes

Les néonicotinoïdes ont des effets négatifs sur la physiologie et la survie pour un large éventail d'invertébrés terrestres, aquatiques et marins non-cibles (Pisa et *al.*, 2015). L'intoxication par néonicotinoïdes a des effets toxiques sur la reproduction, le développement, le système immunitaire et endocrinien et sur la cancérogénèse chez l'Homme et l'animal

(Samuel, 2001). Les effets sur la reproduction ont été prouvés chez plusieurs animaux y compris les lapins, les rats et les souris. L'étude de Robitaille (2014) a rapporté une augmentation statistiquement significative de la testostérone chez des sujets exposés aux néonicotinoïdes dans un milieu agricole. Cette augmentation a été remarquée chez les rats males intoxiqués par l'imidaclopride (Nabiuni *et al.*, 2015). Au niveau du sang, les données sur la toxicité des néonicotinoïdes sont élémentaires. Les travaux de Mondal *et al.* (2009) ont montré que l'acétamipride est toxique chez les rats wistar en provoquant une augmentation significative du nombre total des neutrophiles et une diminution significative des lymphocytes après 28 jours de traitement à différentes doses, 25, 100 et 200 mg/kg/jour. Alors que 20mg/kg/j d'imidaclopride était capable d'induire une hépatotoxicité et une neurotoxicité chez les rats par l'augmentation de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline et des transaminases et l'inhibition de l'activité acétylcholinestérase (Bhardwaj *et al.*, 2010). Banerjee *et al.* (2014) ont obtenu les mêmes effets sur l'acétylcholinestérase chez des rats traités par le pendimethaline, un herbicide. Ces insecticides interfèrent principalement les canaux ioniques, les neurotransmetteurs et l'AChE en empêchant la transmission de l'influx nerveux (Kanthasamy *et al.*, 2012) (Figure 2).



**Figure 2** : Représentation schématique d'une synapse cholinergique avec les cibles principales des néonicotinoïdes.

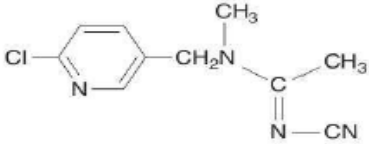
ACh : acétylcholine ; AChE : acétylcholinestérase ; nAChR : récepteur cholinergique de type nicotinique ; Na : canal sodium

(Modifié d'après Raymond-Delpech *et al.*, 2005).

### I.1.2. Toxicité de l'acétamipride

Les pesticides peuvent présenter un risque de toxicité soit en raison de leurs propriétés physico-chimiques soit en raison de leur réactivité chimique. Les propriétés physico-chimiques de l'acétamipride (tableau I) le rend peu persistant dans l'environnement (Sheets, 2010 ; Testud, 2014; Terayama et *al.*, 2016). Cet insecticide joue un rôle d'inhibiteur irréversible sur l'acétylcholinestérase laissant une concentration élevée de l'acétylcholine dans la fente synaptique favorisant une sensibilisation continue des récepteurs à l'acétylcholine (nAChR).

**Tableau I : Principales caractéristiques de l'acétamipride (Testud, 2014).**

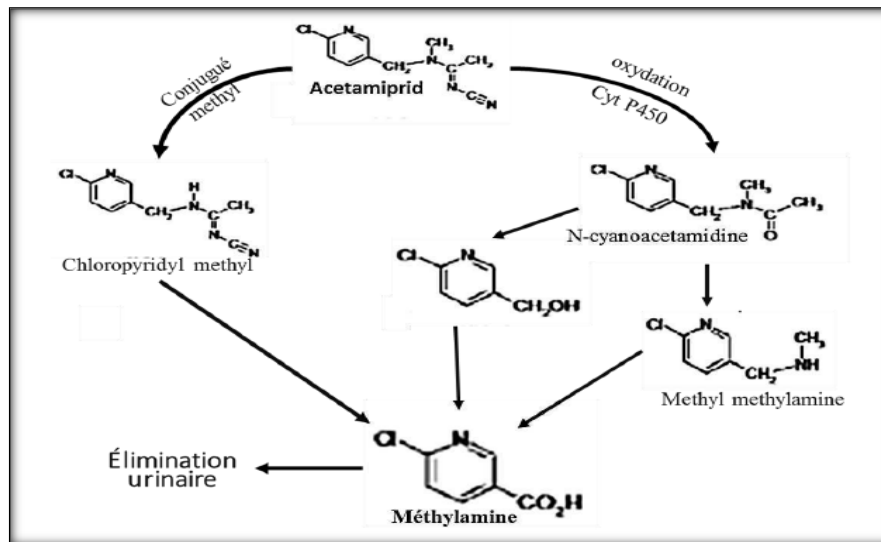
<b>Formule chimique</b>	$C_{10}H_{11}ClN_4$
<b>Structure</b>	
<b>Nom chimique</b>	(E)-N-[(6-Chloro-3-pyridinyl)méthyl]-N'-cyano-N-méthyléthanimid
<b>Propriétés physicochimiques</b>	Poudre blanche peu hydrosoluble (3 à 4 g/L selon pH) et non volatile (tension de vapeur < 1 µPa à 25°C)
<b>Persistance d'action</b>	Demi-vie sur le sol comprise entre 1 et 8 jours.
<b>Teneurs max en résidus dans les denrées</b>	0,01 à 5mg/kg selon le type de culture
<b>DJA</b>	70 µg/kg/jour pour l'homme
<b>DL<sub>50</sub></b>	195 mg/kg par voie orale. >2000 mg/kg par voie dermale chez le rat
<b>Organes cibles</b>	SNC : ataxie et trémulations. Foie : hypertrophie Centrolobulaire
<b>NOAEL</b>	7 mg/kg/jour
<b>Génotoxicité</b>	Résultats équivoques sur tests in vitro, négatifs sur tests in vivo
<b>Reprotoxicité</b>	Pas d'effet tératogène ni fœtotoxique (rat, lapin)

Les études sur la toxicité expérimentale de l'acétamipride par voie dermique indiquent qu'elle est vraisemblablement extrêmement faible (Di Prisco, 2013). Alors que la voie respiratoire est négligeable compte tenu de l'absence de volatilité des molécules d'ACE. Il peut néanmoins exister une déglutition secondaire de microgouttelettes d'aérosols inhalées (David et *al.*, 2007 ; Terayama et *al.*, 2016).

La nature lipophile de l'acétamipride facilite son passage par toutes les barrières biologiques. Sa distribution digestive est rapide et complète et le pic plasmatique est obtenu à la deuxième heure (Terayama et *al.*, 2016). Dans l'organisme, l'acétamipride est converti par plusieurs étapes en méthylamine, produit plus actif que la molécule mère (Dively et *al.*, 2015)



(figure 3). Une fraction de l'ordre de 10% de l'ACE est éliminée sous forme inchangée. Il n'y a pas d'accumulation d'ACE dans l'organisme, plus de 90% d'une dose orale sont éliminés en moins de 72 heures par deux voies, urinaire principalement et fécale (Sheets, 2010 ; Chen et al., 2014).



**Figure 3:** Voie de métabolisme de l'acétamipride dans l'organisme (Tian et al., 2016).

#### I.1.2.1. Toxicité environnementale

L'utilisation extensive de l'acétamipride a conduit à la contamination de l'environnement, y compris le sol, l'eau et les produits alimentaires (Goulson, 2013; Sun et al., 2017; Annabi et al., 2019). 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.1.2.2. Toxicité sur la santé humaine et animale

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

L'acétamipride possède une toxicité aigüe par voie orale. Il est actuellement classé nocif en cas d'ingestion. Cependant, l'autorité européenne de sécurité alimentaire (EFSA), dans les dernières conclusions publiées en novembre 2016, propose de le classer comme Toxique en cas

d'ingestion. L'acétamipride n'induit pas d'irritation cutanée, ni oculaire et ne présente pas de propriétés de sensibilisation cutanée.

La toxicité de l'ACE sur l'hématologie des souris et des rats intoxiqués a été confirmée par plusieurs chercheurs. Singh *et al.* (2012) ont enregistré une diminution significative du profil sanguin chez les souris alors que les rats ont subi une diminution du taux de l'hémoglobine et l'hématocrite (Chakroun *et al.*, 2016). Les rats ont présenté aussi une régression du taux de glycémie, du cholestérol et des lipides de faible densité (Mondal *et al.*, 2014a) et en parallèle une augmentation des concentrations de calcium, de phosphore, de sodium, de potassium, de chlorure, de zinc, de cuivre, de fer et de cobalt dans le plasma (Mondal *et al.*, 2014b).

Au niveau de la rate des souris mâles intoxiqués, l'ACE cause des lésions, une déplétion des lymphocytes dans la gaine lymphoïde péri artériolaire et dans la zone marginale de la pulpe blanche (Marzouki *et al.*, 2017).

La toxicité de l'ACE sur la reproduction a été démontrée chez des souris mâles qui ont présentés des changements 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 mobilité des spermatozoïdes avec la présence d'anomalies au niveau des mitochondries et du réticulum endoplasmique dans les cellules de leydig (Zhang *et al.*, 2011).

Kimura *et al.* (2012) ont étudié l'effet de l'acétamipride sur les neurones cérébraux des rats nouveau nés. Ces chercheurs ont constaté que l'ACE a des effets excitateurs sur les nAChR. Sano *et al.* (2016) ont suggéré que l'exposition à l'ACE, *in vitro*, et pendant la période de lactation peut provoquer une anxiété et influence le comportement liée à la vie de groupe chez les souris mâles.

Les effets toxiques subchroniques de l'acétamipride ont été évalués dans des études par administration orale répétée (90 jours) chez le rat, la souris et le chien ainsi que dans une étude pendant 1 an chez le chien. Le principal effet observé chez toutes les espèces testées est la diminution significative du poids corporel comparativement aux animaux. Chez le rat et la souris, il est également observé des effets sur le foie (hypertrophie centrolobulaire) indiquant un hyperfonctionnement hépatique considéré traitement-dépendant (Zhang *et al.*, 2011). Sur la base des effets hépatiques, la dose sans effet néfaste observé (NOAEL) orale a été fixée à 200 ppm chez le rat (soit 12,4 mg/kg pc/j chez les rats mâles et 14,6 mg/kg pc/j chez les rats femelles) et à 800 ppm chez la souris (soit 106,1 mg/kg pc/j) (Singh, 2012).

Concernant la génotoxicité, des effets clastogènes ont été observés *in vitro*. Cependant, l'ensemble des essais *in vivo* n'ont pas montré pas d'effet clastogène. Les effets rapportés dans les études de génotoxicité ne conduisent pas à proposer de classement « génotoxique » (Kocaman et Topaktaş, 2007).

#### I.1.2.3. Induction du stress oxydatif par acétamipride

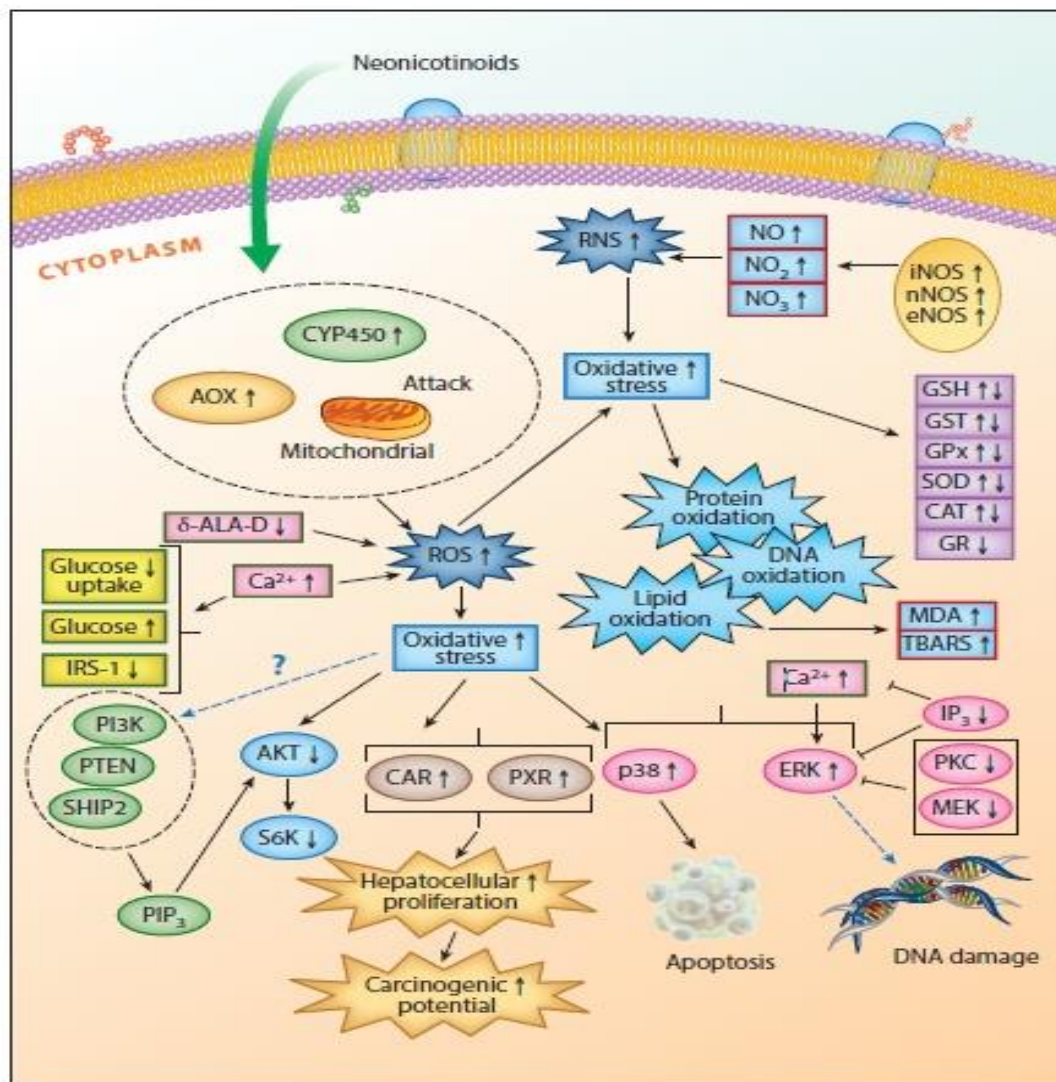
a- Stress oxydatif : il est défini comme une agression biologique complexe des cellules due à une insuffisance en apport d'antioxydants suite à un excès des radicaux libres (Favier, 2006) (figure 4) ou bien un déséquilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène/azote (ERO) et la capacité antioxydante cellulaire (Migdal et Serres, 2011).



**Figure 4 : Effet du stress oxydatif sur la cellule (Benjamin, 2014).**

L'environnement est une des deux origines d'une augmentation de la production des radicaux libres dans l'organisme. Plusieurs facteurs environnementaux sont incriminés dans la production excessive de ces radicaux et la génération du stress oxydatif. Parmi ces facteurs, l'exposition aux rayons UV, aux micro-ondes et à des champs magnétiques, aux métaux lourds, aux pesticides, le tabagisme et l'alcool, la prise de médicaments et autres (Richard, 2013).

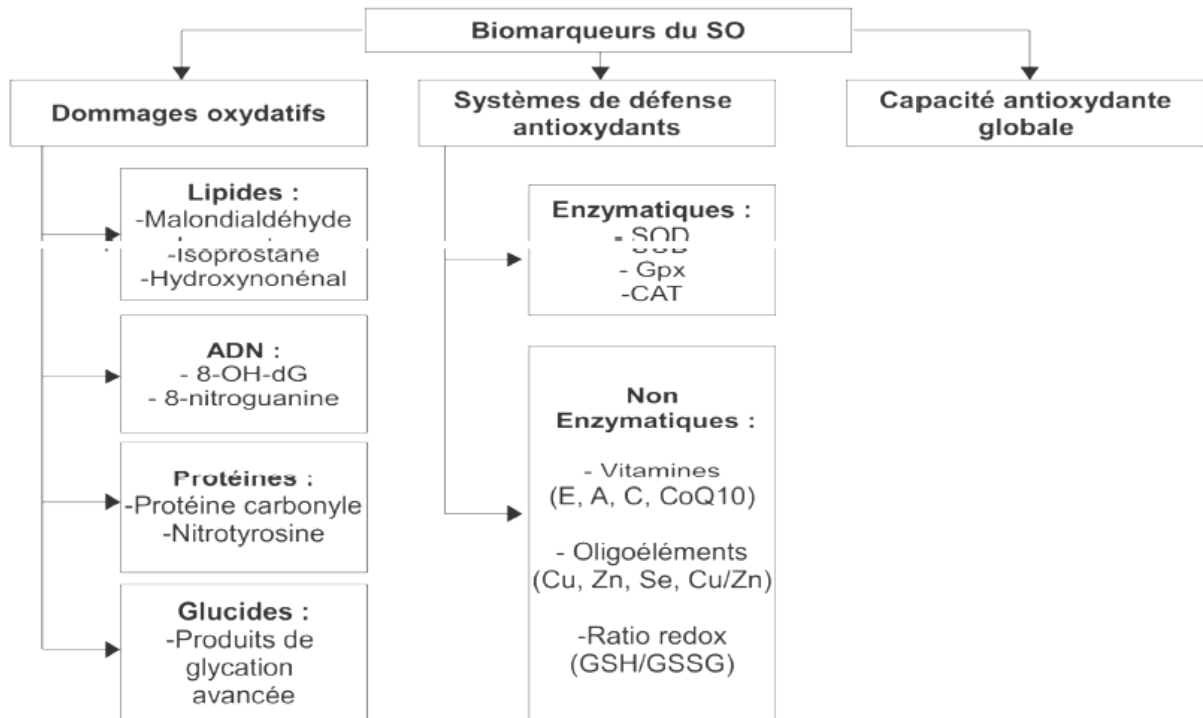
b- Mécanisme d'action (figure 5): le stress oxydatif induit par les néonicotinoïdes a un rôle important dans la stimulation de l'apoptose et les voies de signalisation cellulaire (Kusuyama *et al.*, 2015 ; Wang *et al.*, 2018).



**Figure 5: Mode d'action induit par le stress oxydatif proposé pour les néonicotinoïdes (Wang et al., 2018).**

Etant donné que l'acétamipride est un membre de la famille des néonicotinoïdes, il peut induire un stress oxydatif conduisant à la génération des espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou des espèces réactives oxygénées et azotées (RNS) et aux effets toxiques associés (Duzguner et Erdogan, 2012 ; El-Gendy et al., 2010 ; Yan et al., 2015 ; Nemmiche, 2017). Une génération accrue de ROS et de RNS ainsi qu'une altération du statut antioxydant, peuvent induire une oxydation des lipides, des protéines, des glucides et de l'acide désoxyribonucléique (ADN), entraînant diverses toxicités et apoptose via les voies ERK, p38, AKT, Ca<sup>2+</sup> et CAR/PXR (Wang et al., 2018). La protéine kinase activée par les mitogènes p38 (MAPK) est phosphorylée en réponse au stress oxydatif, qui pourrait bloquer la prolifération ou favoriser l'apoptose (Ballard et al., 2008 ; Watanabe et al., 2015).

La peroxydation de lipides fournit ainsi une grande variété de produits, dont certains peuvent réagir avec les protéines et l'ADN. Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (4-HNE) ont été étudiés comme marqueur de la peroxydation lipidique (Favier, 2003). La lipoperoxydation des membranes va altérer leur fonctionnalité (modification de leur perméabilité, de leur fluidité, perte d'activité d'enzymes, de récepteurs...) (Cillard *et al.*, 2006).



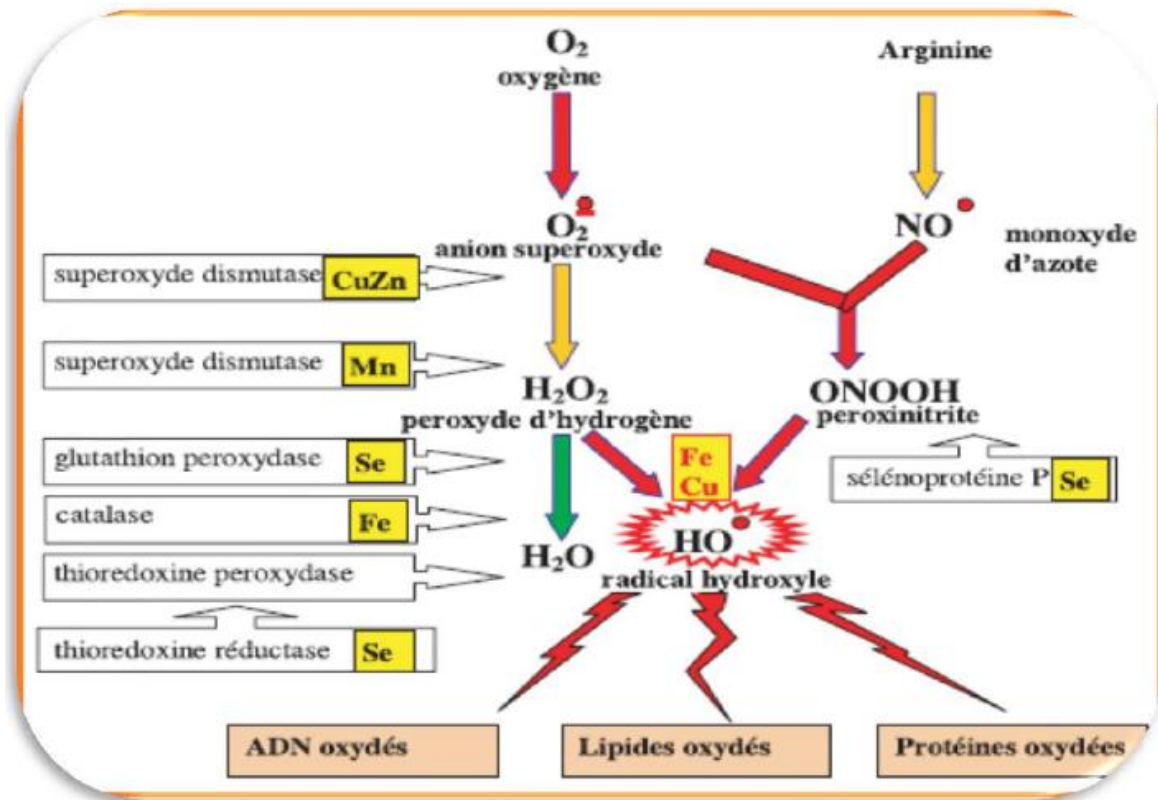
**Figure 6 : Marqueurs biologique de stress oxydant.**  
(Kamat *et al.*, 2000)

## I.2. GENERALITE SUR LES ANTIOXYDANTS

Le terme d'antioxydant désigne toute substance qui, présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat (Pastre et Priymenko, 2007). Les antioxydants peuvent empêcher ou retarder les processus d'oxydation causés par les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Heo *et al.*, 2007).

### I.2.1. Antioxydants enzymatiques

Les principaux systèmes enzymatiques comprennent les superoxydes dismutases (SOD), la catalase (CAT) et plusieurs formes de glutathion peroxydases (GSH-PX) (Jacob et *al.*, 2006 ; Garrel et *al.*, 2007; Rochat, 2014) (Figure 7).



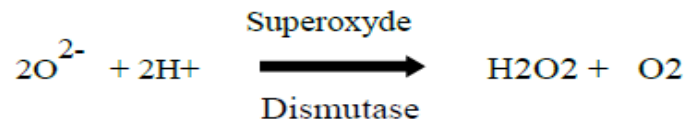
**Figure 7 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (Lamamra, 2016).**

#### I.2.1.1. Superoxyde dismutase

Le superoxyde dismutase (SOD) est l'un des antioxydants enzymatiques intracellulaires les plus efficaces (Rahman, 2007), ce sont des métallo-enzymes retrouvées dans toutes les cellules animales ou végétales. Leur structure forme un puits hydrophobe au centre de la protéine, puits dans lequel se glisse l'anion superoxyde.

Le SOD convertit le superoxyde en peroxyde d'hydrogène et oxygène moléculaire selon la réaction suivante (Matès, 2000).

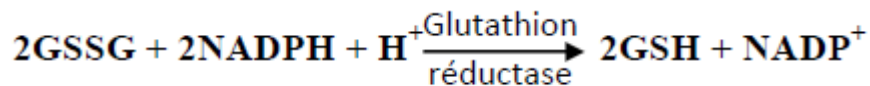




Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au cœur de l'enzyme dont la nature permettra de distinguer les superoxydes dismutases à manganèse (MnSOD) protégeant la mitochondrie. Les superoxydes dismutases à cuivre-zinc protègent le cytosol (cCu-ZnSOD), la face externe de la membrane des cellules endothéliales (ecCu-ZnSOD) ou le plasma sanguin (pCu-ZnSOD) (Favier, 2003).

#### I.2.1.2. Glutathion peroxydases

La glutathion peroxydase (GPx) est une enzyme dépendante du sélénium (Akbas et *al.*, 2005). Elle contient un seul résidu séléno-cystéine (SeCys) dans chacune de ces quatre sous-unités identiques, ce qui est essentiel pour l'activité enzymatique. La GPx agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O et O<sub>2</sub>. Lors de cette réaction deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion-disulfure (GSSG) (Cardin, 2008). Le maintien de l'activité de la GPx nécessite la régénération du glutathion (GSH) assurée par la glutathion réductase selon la réaction (Démrarchez, 2012).



#### I.2.1.3. Catalase

La catalase (CAT) est une enzyme héminique capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire (Bonfont Rousselot et *al.*, 2003). Elle est essentiellement présente dans les peroxysomes, mais aussi dans les mitochondries et dans les érythrocytes (Deaton et Marlin, 2003). La catalase est aussi responsable de l'élimination de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par une transformation en H<sub>2</sub>O et O<sub>2</sub>. Contrairement à la GPx, l'affinité de la catalase pour l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est élevée seulement lorsque les teneurs en peroxyde d'hydrogène sont accrues (Zerargui, 2015).

## I.2.2. Antioxydants non enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydants, la plupart des antioxydants non enzymatiques ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie :

### I.2.2.1. Antioxydants non-enzymatiques d'origine endogène

Ils existent de nombreux réducteurs endogènes participant à la protection de l'organisme contre les ERO, les plus importants étant le glutathion réduit, la bilirubine et l'acide urique.

Le glutathion réduit (GSH) : est un antioxydant peptidique abondant dans l'organisme où il joue un important rôle de protection des tissus et des protéines transporteuses d'ions redox actifs comme l'hémoglobine, la transferrine, la ferritine, l'albumine. Le GSH est capable de régénérer les vitamines E et C oxydées. Il est détoxifiant au niveau hépatique et peut se lier aux métaux toxiques (mercure, arsenic, ect.) (Hargreaves et *al.*, 2002; Lyn Patrick, 2006).

L'acide urique : est comme produit final du métabolisme des purines, augmente dans le plasma lors d'efforts physiques intenses, ou lors d'une exposition à l'hypoxie (altitude, apnée, ischémie-reperfusion) (Baillie et *al.*, 2007). Il a été proposé comme un des meilleurs antioxydants du plasma *in vivo*, où il pourrait contribuer à 35-60 % de la capacité antioxydante totale (Johnson et *al.*, 2009).

La bilirubine : est un produit terminal de la dégradation de l'hème et résulte essentiellement du catabolisme de l'hémoglobine par les cellules réticuloendothéliales. Ce composé liposoluble est capable de piéger les radicaux peroxy, l'oxygène singulet et le radical hydroxyle, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (Algeciras-Schimmich et *al.*, 2007).

### I.2.2.1. Antioxydants non-enzymatiques d'origine exogène

La vitamine E : La vitamine E ou  $\alpha$ -tocophérol est le principal antioxydant de la famille des tocophérols. Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au sein des acides gras de la membrane cellulaire et des lipoprotéines où elle joue un rôle protecteur en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par les radicaux libres. Elle pourrait augmenter l'activité des SOD et des CAT (Margaritis et *al.*, 2003; Lyn Patrick, 2006).



La vitamine C : ou acide L-ascorbique est hydrosoluble. Elle joue un rôle de prévention de l'oxydation dans le plasma et les fluides extracellulaires, dont elle est considérée comme le plus important antioxydant (Delattre et *al.*, 2005). La vitamine C inhibe également la peroxydation lipidique. Ses fonctions sont nombreuses : contribution au bon fonctionnement du système immunitaire, implication dans la synthèse du collagène et des globules rouges ainsi que dans les mécanismes de métabolisation du fer (Haleng et *al.*, 2007).

Les caroténoïdes : ce sont des pigments végétaux, présents en abondance dans les légumes verts et orangés, les fruits fortement pigmentés et certaines espèces de poissons. Ils jouent le rôle d'antioxydants en inhibant les radicaux hydroxyl, les anions peroxyde et le peroxyde d'hydrogène (Tissier, 2011).

Les polyphénols : ils constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Les polyphénols sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance, ou la production (Yusuf, 2006). La famille la plus abondante de polyphénols présents dans l'alimentation humaine, est les flavonoïdes. Ces derniers sont des piègeurs efficaces des radicaux libres les plus pro-oxydants, particulièrement impliqués dans la peroxydation lipidique (Dunlap et *al.*, 2006 ; Halliwell et Gutteridge, 2007 ; Tissier, 2011).

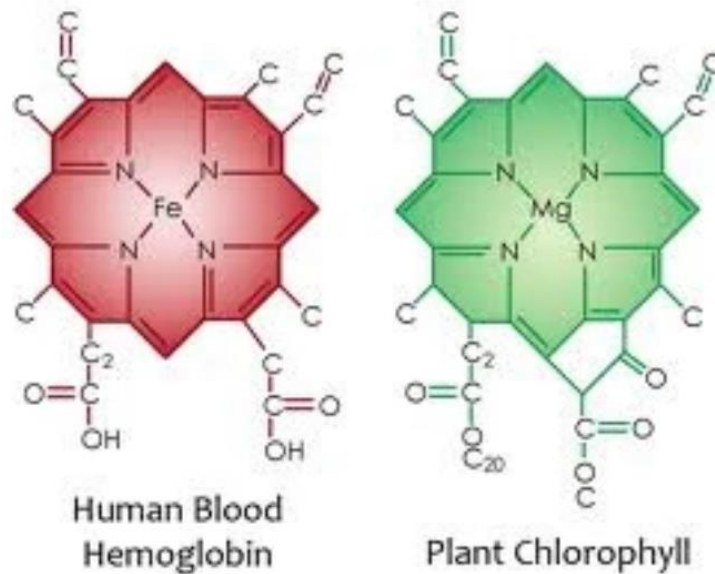
Vitamine A : elle est un nom générique pour les rétinoïdes et les provitamines A ou les caroténoïdes (Wolinsky, 1998). Les rétinoïdes sont présents dans les aliments d'origine animale, alors que les provitamines A (béta-carotène, lutéines, lycopènes, etc.) se rencontrent dans de nombreux fruits et légumes. Le béta-carotène est le principal précurseur de la vitamine A. La vitamine A est responsable de la neutralisation de singulet d'oxygène, d'anion super oxyde, de peroxy-nitrites, de radicaux lipidiques et son action se fait dans les milieux lipidiques (Fisher-Wellman et Bloomer, 2009).

- Le sélénium : est un oligo-élément de numéro atomique 34 et de masse atomique 78,96 (Reilly, 2006). Il joue un rôle clé dans la protection des cellules et de leurs constituants contre l'attaque radicalaire. Cette fonction est due à sa présence dans le site actif des glutathions peroxydases séléno-dépendantes, et à l'activité biologique anti radicalaire des séléno-protéines (Burk, 2002).

- Le zinc : est un oligo-élément de numéro atomique 30 et de masse atomique 66,39 (Mader, 2010). Le zinc joue un rôle antioxydant indirect en assurant la stabilisation de la Cu-Zn SOD (Powell, 2000).

## I.2.2.3. Chlorophylle source d'antioxydants

La chlorophylle, une porphyrine de magnésium estérifiée au phytol, est l'une des biomolécules les plus abondantes sur Terre (Krautler, 2008). C'est un pigment vert photosynthétique présent dans les matières alimentaires d'origine végétale ainsi que dans les compléments nutritionnels tels que la spiruline et les extraits de *Chlorella vulgaris* (Zhang et al., 2018). La structure de la chlorophylle est proche de l'hémoglobine humaine. La différence majeure est que la chlorophylle transporte des atomes de magnésium, alors que chez l'humain, il s'agit de fer (Caroline, 2019) (figure 8).



**Figure 8 : Structure de la chlorophylle et de l'hémoglobine.**

En raison de ces multiples effets biologiques (Vaňková et al., 2018), notamment l'anti-génotoxicité, le piégeage des mutagènes l'immun modulation et activités antioxydantes et apoptotiques, les chlorophylles ont été proposées comme agents chimio-préventifs alimentaires importants (Donaldson, 2004 ; Ferruzzi et al., 2007).

La chlorophylle est une arme intéressante pour stimuler la production d'hémoglobine et de globules rouges chez les personnes anémiées ou encore les sujets ayant subi des accidents cardiovasculaires. Des chercheurs ont ainsi suggéré que le jus d'agropyre (graine de blé germée) contenant 70 % de chlorophylle, pouvait être une aide intéressante pour traiter les

pathologies liées à la déficience d'hémoglobine comme l'anémie ou les thalassémies (Chauhan, 2014).

Le pouvoir oxygénant de la chlorophylle débouche sur une meilleure régénération et cicatrisation des tissus (Caroline, 2014). Un article émanant d'un lieutenant du corps médical de l'armée américaine révèle ainsi l'utilisation de dérivés solubles de la chlorophylle dans le traitement de blessures de guerre (Robert, 2008). La chlorophylle était ainsi utilisée pour son pouvoir cicatrisant mais aussi antibactérien. Elle permettait de surcroît d'éliminer les odeurs liées aux infections (Caicai et *al.*, 2020).

Les antioxydants contenant dans la chlorophylle s'opposent aux radicaux libres ce qui permet de ralentir le vieillissement cutané (Caroline, 2014 ; John et *al.*, 2016).

## *CHAPITRE II*

### *MATÉRIEL ET MÉTHODES*

Notre étude a pour but la recherche de la toxicité expérimentale à court terme d'une faible dose d'acétamipride (7,2 mg/kg/j correspondent à 1/1000 DL50) à l'échelle tissulaire et l'activité antioxydante d'une faible dose de la chlorophylle chez les souris mâles adultes de souche MNRI et son effet sur le stress oxydant induit par l'insecticide.

Le rein et le foie font l'objet d'une étude histologique afin de chercher les altérations au niveau des parenchymes. La recherche du stress oxydant est basée sur le dosage du taux de deux paramètres à savoir le malondialdéhyde et l'activité catalase.

Notre étude a été réalisée sur une période de 4 mois, étalant de mois de mars au mois de juillet 2019.

- L'expérimentation animale a été réalisée au laboratoire de pharmacotoxicologie du Centre de Recherche et de Développement (Saidal-Gué de Constantine, Alger).
- Les différents dosages du stress oxydant ont été effectués au laboratoire des projets de fin d'études de la Faculté SNV à l'Université Blida-1.
- La technique histologique a été faite au laboratoire d'histologie au service de Cytologie à l'Hôpital Nafissa Hamoud d'Alger.

Les étapes de cette étude ont été menées conformément aux normes établies par l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques, Guideline-407, adopté le 03 octobre 2008. Les essais de la toxicité expérimentale permettent d'évaluer les effets toxiques qui apparaissent dans un temps court de deux semaines après l'administration d'une substance.

## **II.1.MATERIEL**

### **II.1.1.Matériel animal**

Notre étude a été menée sur un échantillon de 24 souris albinos mâles adultes de souche NMRI, âgés de deux mois, provenant de l'animalerie de l'unité de production SAIDAL de Gué de Constantine, Alger. Le poids moyen des souris est  $35,53g \pm 0,14$ . Chaque animal a fait l'objet des prélèvements de deux organes, foie et rein.

### **II.1.2.Matériel technique**

L'ensemble d'appareillage, verrerie, solutions et des réactifs utiles pour les dosages et l'histologie sont présentés dans l'annexe 1.

Deux molécules synthétiques ont fait l'objet de notre étude, l'acétamipride (ACE) qui et la chlorophylle, un complément alimentaire commercialisé sous le nom de SUPER CHLOROPHYLL par le fabricant Unicity aux États-Unis.

### II.1.2.1. Insecticide

L'acétamipride, sous forme de poudre blanche, est emballé dans des sachets en aluminium de 50g chacun (Figure 9 dans l'annexe 1). La dose utilisée dans cette étude est 7,2 mg/kg qui correspondent à 1/1 000DL<sub>50</sub>. Elle fait partie d'une grande gamme de doses expérimentales testées par notre équipe de recherche. Compte tenu de la pureté de produit qui est de 0,24 g/L, le calcul de la dose administrée aux souris est comme suit :

$$\begin{array}{ccc} \text{La dose (7,2 mg/kg/j)} & \longrightarrow & 1000 \text{ g du poids corporel} \\ X & \longrightarrow & \text{Poids corporel de la souris traitée (g)} \end{array}$$

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

Si nous prenons en compte la pureté du produit qui est de 20%, les 100mg de produit contient 20mg de matière active. Alors, la quantité à dissoudre (Y) égale à la quantité de la matière active nécessaire  $\times 100/20$ .

A titre d'exemple : pour un poids corporel 35g, la quantité de M.A. nécessaire égale à  $35 \times 7,2 / 1000 = 0,522 \text{mg}$ . La quantité à dissoudre =  $0,522 \times 100 / 20 = 2,61 \text{mg}$ .

La chlorophylle (CHL) est présentée sous forme d'une poudre verte dans une boîte en plastique de 92g avec une pureté de 2g/L. La dose choisie est de 0,01g. Elle est calculée comme suit :

Selon la notice du fabricant, l'Homme peut prendre une dose journalière de 3 Cuillères à soupe, équivalent de 45g dilués dans 1500ml d'eau. Pour une 1 Cuillère à soupe (15g), le volume d'eau est de 500 ml. Dans 1 ml, la dose est de 0,03 g/j. Vu la taille des souris, nous avons choisi une dose expérimentale inférieure à celle prescrite chez l'Homme, 0,01g/j.

## II.2. METHODES

### II.2.1. Elevage des animaux

L'élevage a été réalisé dans une pièce éclairée 12 heures par jour, et dont la température est maintenue constante (22 à 25°C). Les souris ont été placées dans des cages en polypropylène comportant une litière de copeaux de bois. Les cages ont été nettoyées une fois sur deux jours

tout au long de l'expérimentation. La nourriture et l'eau ont été fournies *ad libitum*. L'aliment, sous forme de granulés, est composé d'un concentré équilibrée glucides, protéines, lipides, vitamines et minéraux (49,80%, 34,50%, 10% et 5,70% respectivement). La durée d'adaptation est de 7 jours.

Les manipulations effectuées sur les souris ont été effectuées dans le respect de leur bien-être, excluant tout type de stress susceptible d'interférer avec les résultats. Ces manipulations expérimentales ont été menées conformément au Comité d'Éthique de l'Université de Blida 1 et à la législation Algérienne de la protection des animaux d'expérimentation utilisées à des fins scientifiques [loi n°12-235 /2012 ; Décret exécutif n° 10-90].

### II.2.2. Expérimentation

Après la période d'adaptation, les souris ont été marquées et réparties en quatre lots de 6 chacun (figure ....a).

- ✚ **Lot 1** : Les souris ont reçu 1ml /j de l'eau distillée par voie orale. Elles constituent le lot des témoins.
- ✚ **Lot2** : Les souris ont été administrées quotidiennement par voie orale de 7,2mg/kg/j d'ACE dissoute dans 1ml/Kg d'eau distillée.
- ✚ **Lot3** : Les souris ont été gavées quotidiennement de 0,01g de chlorophylle dissoute dans 1ml d'eau distillée.
- ✚ **Lot 4** : les souris ont été gavées quotidiennement par 7,2mg/kg/j d'ACE suivi, 4 heures d'intervalle, de 0,01g de chlorophylle dissoute dans 1ml d'eau distillée (figure ....b).

La prise de poids corporel a été renouvelée quatre fois : avant le gavage (J0), après cinq jours (J5), après dix jours (J10) et à la fin de l'expérimentation (J15). Les doses ont été ajustées chaque cinq jour en cas de changement du poids corporel de la souris traitée par l'acétamipride. Cependant, la dose de la chlorophylle n'a pas été modifiée durant l'expérimentation pendant 15 jours d'expérimentation, les cages de souris ont été approvisionnées de l'eau et la nourriture à volonté.



**Figure 10** : Confection des lots expérimentales et méthode de gavage des souris  
(Photo originale).

### II.2.3. Sacrifice des animaux et prélèvement des échantillons

Les foies et les reins ont été séparément nettoyés du sang avec un papier absorbant et débarrassés du tissu adipeux puis pesés.

Leurs poids relatifs ont été calculés par la formule suivante :

$$\text{Poids relatif} = \frac{\text{poids du foie (g)}}{\text{poids des souris (g)}} \times 100$$

### II.2.4. Détermination des paramètres du statut oxydant/antioxydant.

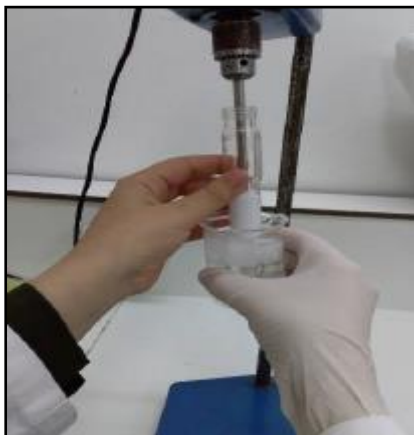
Les méthodes de dosage des paramètres du stress oxydant varient selon le paramètre choisi. Dans notre étude, les dosages vont consister à déterminer les concentrations du malondialdéhyde (MDA), marqueur de la peroxydation lipidique, et l'activité de la catalase (CAT), enzyme du système antioxydant cellulaire, dans les homogénats rénaux et hépatiques.

#### II.2.4.1. Préparation de l'homogénat tissulaire

100 mg de chaque organe (rein et foie), de tous les lots de souris, ont été plongés dans un mélange de 10 ml de tampon phosphate (0,2 mM et pH 7,4) et 1% de triton X-100 puis homogénéisés à froid (4°C), à 800 rpm à l'aide d'un broyeur homogénéisateur de Potter Thomas (SS2) pendant 30 à 40 secondes. Le broiement a été fait avec un pilon en Téflon dans pour d'échantillon et (Figure 11). Après trois cycles de congélation-décongélation qui servent à détruire les membranes plasmiques des cellules, les homogénats ont été procédé à une



centrifugation à 10000g à température 4°C pendant 20 minutes. Les surnageant ont été ensuite récupérés dans des tubes eppendorfs puis conservés à -40°C afin d'effectuer différents dosages.



**Figure 11** : Broyage tissulaire à l'aide d'un homogénéisateur SS2 (Photo originale).

#### II.2.4.2. Dosage des protéines tissulaires

Principe : La concentration des protéines foie et rein est mesurée par la méthode colorimétrique de Bradford(1976) qui est basée sur le changement de la couleur du bleu de Coomassie après liaison avec les acides aminés aromatiques et les résidus hydrophobes présents dans les protéines. Sa longueur d'onde maximale d'absorption augmente de 465 nm (couleur rouge) à 595 nm (bleu).

Mode opératoire : La concentration protéique est proportionnelle à la densité optique qui est calculée à partir d'une courbe d'étalonnage tracée. Elle est déterminée en comparaison avec les gammes d'étalon d'albumine sérique bovine (1 mg/ml) réalisée dans les mêmes conditions (Tableau II).

**Tableau II** : Gamme d'étalonnage standard utilisée pour déterminer la protéine dans l'homogénat tissulaire à partir de la solution d'albumine sérique Bovine

	B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
[C]mg/ml	0(bleu)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1
VBSA 0,1%(ml)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
VPBS(ml)	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	0

C : Concentration ; VBSA : volume d'albumine sérique Bovine ; VPBS : Tampon phosphate salin.

## II.2.4.3. Dosage du taux de malondialdéhyde

Principe : Le malondialdéhyde est un index direct de la peroxydation lipidique. Il est l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés médiés par les radicaux libres. Les taux du MDA hépatique et rénal ont été évalués selon la méthode d'Ohkawa et *al.* (1979). Le dosage repose sur la formation en milieu acide et chaud entre le MDA et l'acide thiobarbiturique (TBA) d'un pigment coloré en rose absorbant à 532nm (Lefèvre et *al.*, 1998). La concentration de l'MDA est calculée en utilisant le coefficient d'extinction du complexe MDA-TBA.

Mode opération :

-pour mesurer les TBAS (Thiols Barbituric Acid Specis) les réactifs ont été préparés dans de l'acide acétique à 20%. La solution de TBA a été fraîchement préparée. Les tubes ont été couverts contre la lumière.

-100µl d'homogénat ont été plongés dans un mélange réactionnel contenant 375 µl d'acide acétique à 20%, pH 3,5, 375 µl d'acide Thiobarbiturique à 0,8%, 50 µl de sodium dodecylsulfate à 8,1%. Le volume réactionnel a été complété à 1,0 ml avec l'eau distillée et incubé ensuite à 95°C-100°C pendant 1 heure.

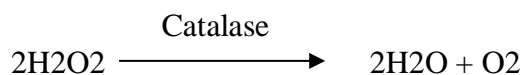
-La réaction a été arrêtée par un refroidissement rapide à 0°C. Le mélange a subi ensuite une centrifugation à 3000g pendant 10 minutes et à 4°C.

-La densité optique (DO) a été mesurée à 532 nm et les résultats ont été exprimés en nmoles/mg de protéines.

$$[\text{MDA}] = \frac{\text{DO} \times 22}{[\text{Protéines}]} \quad [\text{n moles/mg de protéines}]$$

## II.2.4.4. Dosage de l'activité catalase

Principe : la catalase (CAT) est une enzyme ubiquitaire localisée dans les peroxysomes et dans le cytosol. Elle est capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire. La disparition du peroxyde d'hydrogène peut être mesurée en spectrophotométrie à 240 nm (Aebi, 1984 ; Bonnefont-Rousselot et *al.*, 2003).



Mode opération : Le dosage passe par plusieurs étapes :

-50 µl d'homogénat tissulaire a été mélangé avec 950 µl de Tampon phosphate (50 Mm, pH=7). La réaction a été déclenchée par l'addition de 500 µl d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30Mm. La cinétique de la réaction a été suivie pendant 2 minutes à 25°C (point chaque 30 secondes).

-l'activité de la catalase a été mesurée par une diminution de l'absorbance à 240 nm. Elle est exprimée en µmol/min/mg de protéines. Le zéro de l'appareil a été réalisé par le tampon de phosphate.

Expression des résultats : L'activité enzymatique de la catalase a été calculée par la formule suivante :

$$\text{Activité CAT } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min/mg protéine}) = (2,3/\Delta t) (\log A_1/A_2) / \alpha$$

$\Delta t$  : temps de décomposition du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par minutes ; A<sub>1</sub> : Absorbance à temps zéro ;

A<sub>2</sub> : Absorbance à 2 minutes ;  $\alpha$  : Quantité des protéines mg/ml.

## II.2.5. Etude histologique

Afin d'obtenir des coupes histologiques colorées à l'hématoxyline-éosine prêtes à l'observation microscopique, des fragments de foie et de rein de chaque souris ont été imprégné dans plusieurs solutions suivant la technique adoptée par Martoja et Martoja (1967).

### II.2.5.1. Fixation et rinçage des tissus

La fixation a pour but d'immobiliser les cellules tout en conservant leurs morphologies. Les fragments tissulaires ont été plongés dans le formol commercialisé dilué à 10% pendant 48 heures, puis rincés à l'eau courante écoulee pendant 24 heures. Les fragments ont été mis dans des cassettes afin de permettre le passage des liquides au cours de la manipulation (figure 12).



**Figure 12** : Préparation des cassettes histologiques (photos originale)

### II.2.5.2. Déshydratation, éclaircissement et inclusion

Les cassettes ont été ensuite placées dans un automate à l'histologie (figure 13 dans l'annexe 1) qui sert à assurer la déshydratation, l'éclaircissement des tissus et l'inclusion à la paraffine. Chaque cassette passe dans plusieurs bains d'éthanol de concentration croissante (70°, 90°, et 100°) pendant 1 heure chacun afin d'éliminer l'eau des tissus. Ensuite, les cassettes ont été plongées dans deux bains successifs de xylène pendant 1 heure puis dans un bain de mélange xylène-paraffine 50% de chaque et ensuite dans un bain de paraffine pure. Les blocs de paraffine ont été confectionnés dans des moules en métallique puis réfrigérés (Figure 14).



**Figure 14 : Bloc de paraffine dans des moles en métallique (photos originale).**

#### II.2.5.3. Confection des coupes

Les coupes ont été effectuées au microtome de type «Leica » à 4 à 5 $\mu$ m d'épaisseur (figure 15 dans l'annexe 1).

#### II.2.5.4. Collage des rubans et séchage

Les rubans sont étalés dans un bain marie (37°C) puis récupérer et coller sur des lames propres, puis séchés dans une étuve réglée à 25 °C pendant 24 heures.

#### II.2.5.5. Déparaffinage, réhydratation et coloration

Cette étape sert à retirer la paraffine du tissu et la remplacer par l'eau pour permettre la pénétration des colorants. Le déparaffinage a été réalisé dans un bain de xylène pendant 30 minutes et suivi par une réhydratation en immergeant les lames dans des bains d'alcool de degrés décroissant puis dans l'eau distillée. Les coupes ont été ensuite colorées à l'hématoxyline-éosine (figure 16 dans l'annexe 1). Cette coloration topographique permet de

visualiser la morphologie des cellules, le noyau en bleu et cytoplasme en rose violacé afin de déterminer leur répartition, architecteur et structure.

#### II.2.5.6. Montage et observation

Après la coloration, les lames ont été mises dans un bain de xylène pour l'éclaircissement. Le montage a été effectué avec une lamelle fixée par l'Eukitt. Les lames ont été ensuite nettoyées au xylène puis séchées et observées au microscope optique aux différents grossissements ( $\times 100$ ,  $\times 400$  et  $\times 1000$ ). La prise des photos a été effectuée à l'aide d'un l'appareil photos Samsung prime 5.

#### II.2.6. Etude statistique

Les résultats ont été représentés sous forme de moyennes avec leur écart-type (Moyenne  $\pm$  SEM). L'analyse des données a été effectuée par le test *t* de Student, qui est basé sur la comparaison des moyens inters et intra groupes. Le test ANOVA unidirectionnel avec le test *posthoc* de *Tukey* ont été appliqués pour comparer les différences entre les groupes expérimentaux. Le logiciel Graph Pad Prism v 8.2.1 a été utilisé pour analyser les données.

Les différences sont considérées comme :

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

## *CHAPITRE III*

### *RESULTATS ET DISCUSSION*

### III.RESULTATS ET DISCUSSION

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la recherche de l'effet modulateur possible de la chlorophylle, produit riche en antioxydants, chez les souris mâles de souche NMRI intoxiqués par l'acétamipride à faible dose pendant 15 jours.

Nos résultats s'articulent autour de plusieurs paramètres. Ils seront présentés, comparés et discutés selon les données de la littérature.

#### III.1. Comportement

Dans nos conditions expérimentales, nous avons remarqué un changement de comportement et la mort de deux souris dans le lot traité par l'acétamipride (figure 15).

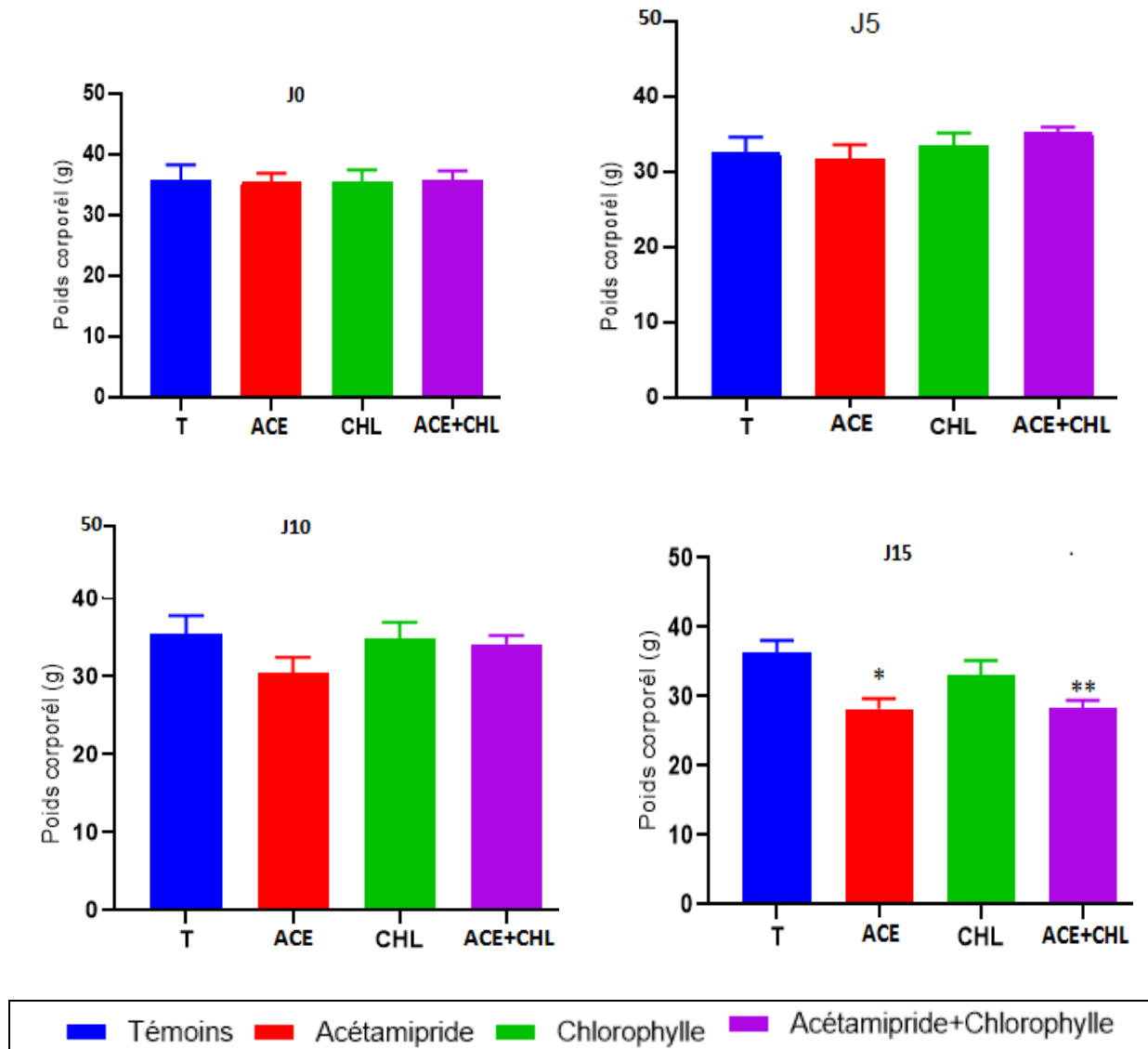


**Figure 15 : Perte des souris intoxiquées par l'acétamépride.**

Par rapport aux souris témoins et traitées par la chlorophylle et par l'acétamipride-chlorophylle, les souris du deuxième lot ont présenté une perte d'appétit et une tendance de rester dans les coins des cages et l'anxiété. Des résultats similaires ont été noté chez les souris mâles traités par 1/5, 1/10, 1/20 DL50 d'ACE pendant 28 jours (Singh et *al.*, 2012). D'autres études ont démontré l'influence négative des insecticides néonicotinoïdes sur la prise de l'alimentation, la croissance et le comportement neurologique (Breslin et *al.*, 2000 ; Callahan et Mineau, 2008 ; Gibbons et *al.* 2014 ; Gibbons et Mineau, 2015).

III. 2.Evolution du poids corporel

Les résultats de l'évolution pondérale des souris mâles témoins et traitées et leurs significations statistiques ont été présentés dans la figure 16 et les tableaux III ; IV ; V et VI de l'annexe 2.



**Figure 16 : Evolution des poids corporels en gramme chez les souris témoins et traitées par l'acétamipride et de la chlorophylle. \* : Significative ; \*\* : Très significative.**

ACE : Acétamipride ; CHL : Chlorophylle.

Le poids corporel des souris a été mesuré tous les 5 jours. Les mesures de poids ont montré des variations plus ou moins significatives ( $p < 0,05$ ). Après 15 jours d'expérimentation, les changements du poids corporel chez les souris témoins ( $36,33g \pm 4,36$  vs  $35,66g \pm 6,21$ ) et administrées quotidiennement de 0,01g/ml de la chlorophylle ( $33g \pm 7,07$  vs  $35,50g \pm 4,50$ ) restent statistiquement non significatifs ( $P=0,834$  et  $P=0,408$  respectivement). Cependant, les



souris traitées par l'acétamipride ont perdu significativement du poids par rapport aux témoins ( $27,83\text{g} \pm 4,16$  vs  $35,33\text{g} \pm 3,50$  ;  $P=0,044$ ). De même chez les souris traitées par l'acétamipride et la chlorophylle ( $29,33\text{g} \pm 2,06$  vs  $35,66\text{g} \pm 3,82$ ) par rapport au lot de la chlorophylle. Les différences étaient statistiquement très significatives ( $P=0,0065$ ).

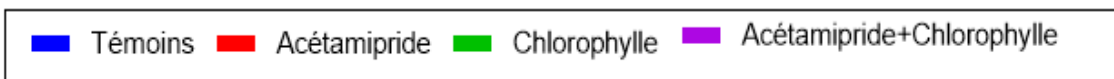
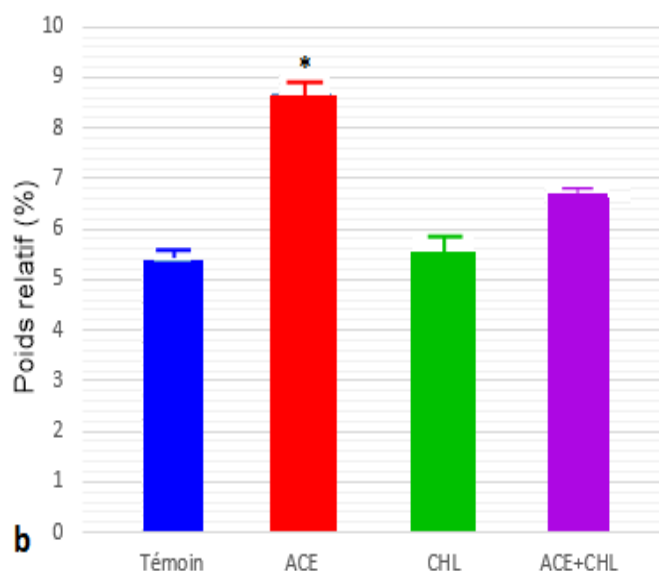
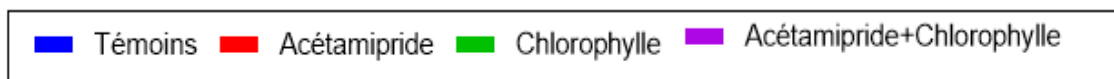
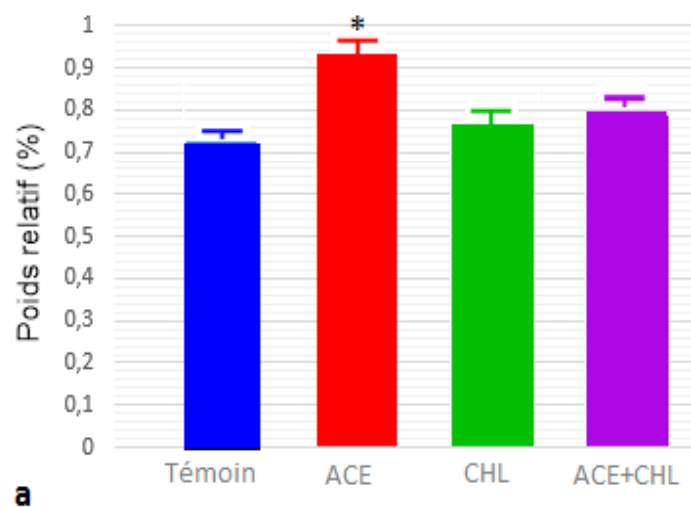
L'effet de l'acétamiprid sur le poids corporel a été déjà étudié par Singh *et al.* (2012). Ces auteurs ont montré que cet effet est dose dépendant chez les rats intoxiqués par deux doses différentes pendant 28 jours et que la dose  $10\text{mg/kg/j}$  n'a pas d'effet significatif sur le poids corporel. Chez les souris de souche Swiss, le poids a subi une régression après 60 jours d'exposition à deux doses différentes d'acétamipride à savoir 5 et  $10\text{ mg/kg/j}$  (Chakroun *et al.*, 2016 ; Marzouki *et al.*, 2017). Selon ces variations de la réponse reviennent probablement à la différence entre les espèces dans la tolérance à la toxicité.

Les effets de la supplémentation en chlorophylle ou ses composants ont été rapporté par Stenkula *et al.*, (2017) d'où une perte statistiquement significative du poids corporel observée chez des souris administrées par voie orale de  $1,3\text{mg}$  de thylakoïde pendant 3 semaines. Selon ces auteurs, la perte est due à la réduction de la graisse corporelle et de la taille des cellules adipeuses suite au traitement. Des résultats similaires ont été obtenus aussi chez des souris soumises à un régime riche en thylakoïdes pendant 100 jours (Richard kohnke *et al.*, 2009).

### III.3.Variations des poids relatifs moyens des organes

Les variations des poids relatifs moyens des reins et de foie des souris témoins et traitées ont été présentés dans la figure 17 et les tableaux VII et VII (annexe 2).

Les poids relatifs des reins et du foie prélevés à la fin des différents traitements n'ont pas varié par rapport à ceux des témoins sauf ceux des souris traitées avec l'ACE seul qui ont subi une augmentation statistiquement significative ( $0,93\% \pm 0,24$  Vs  $0,72\% \pm 0,19$  avec  $P=0,016$ ) et ( $8,67\% \pm 2,81$  Vs  $5,39\% \pm 1,15$  avec  $P=0,04$ ). Des résultats similaires ont été déjà rapporté chez des rats traités par différents pesticides (Mahdeb, 2002 ; Benouadah, 2009). L'augmentation des poids relatifs revient, selon plusieurs recherches, à la congestion sanguine des veines centro-lobulaires au niveau hépatique (Kara, 2008) et par la présence des œdèmes (Dominique *et al.*, 2005).



**Figure 17:** Effet des différents traitements sur le poids relatif (%) des reins (a) et du foie (b) des souris males ( $P^* < 0.05$ ).

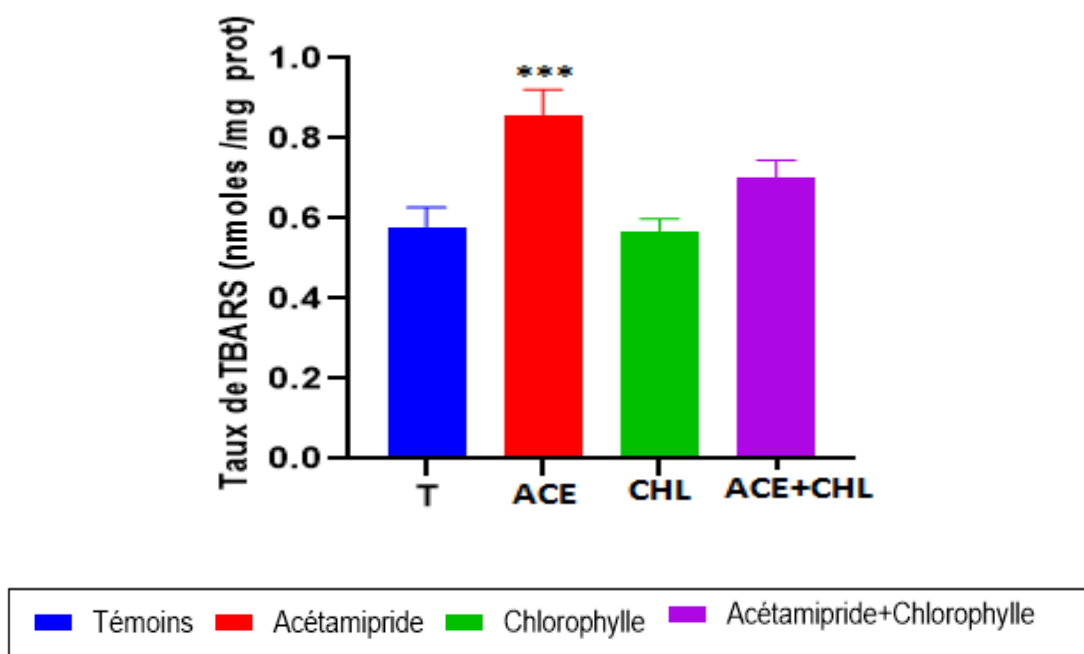
ACE : Acétamipride ; CHL : Chlorophylle

### III.4. Détermination des taux de certains paramètres du stress oxydant

Selon la disponibilité des produits chimiques, nous avons dosé trois paramètres de la batterie du stress oxydatif à savoir les protéines totales, le MDA et l'activité enzymatique de la catalase.

#### III.4.1. Malondialdéhyde tissulaire

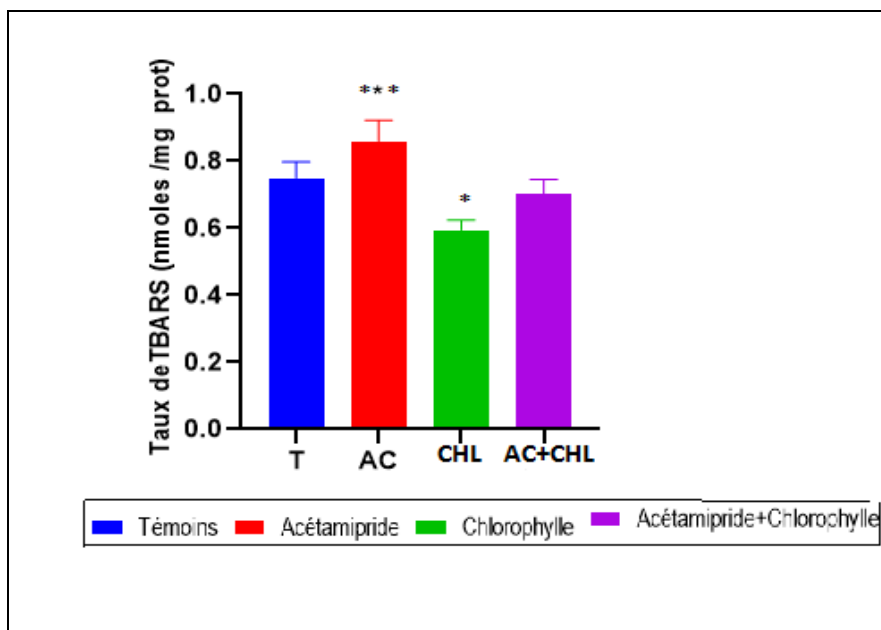
Les résultats des variations des taux de malondialdéhyde rénal chez les souris témoins et traitées et leurs significations statistiques ont été rassemblés dans la figure 18 et le tableau IX de l'annexe 2.



**Figure 18: Variation du taux de malondialdéhyde rénal (nmol/mg protéine) chez les souris témoins et traitées pendant deux semaines. \*\*\* : P < 0,0019. \* : P < 0,05 ACE : Acétamipride ; CHL : Chlorophylle**

Par rapport aux témoins, les souris traitées par 7,2 mg/kg/j d'acétamipride ont montré un taux élevé de malondialdéhyde rénal (0,88 nmol/mg  $\pm$  0,20) par rapport aux témoins (0,59 nmol/mg  $\pm$  0,19). La différence était statistiquement hautement significative (P= 0,001). Par contre, le taux de MDA était inférieur chez les souris traitées par l'acétamipride-chlorophylle (0,72 nmol/mg  $\pm$  0,17) par rapport aux souris gavées d'une solution aqueuse de la chlorophylle (0,47 nmol/mg  $\pm$  0,18) et les souris traitées par l'ACE. Les différences étaient statistiquement non significatives (P= 0,10 ; P=0,98 respectivement).

Au niveau du foie, les dosages de MDA chez toutes les souris ont donné des résultats comparables à ceux retrouvés dans les reins (la figure 19 et le tableau X de l'annexe 2).



**Figure 19:** Variation du taux de malondialdéhyde hépatique (nmol/mg protéine) chez les souris témoins et traitées pendant deux semaines.

\*\*\* P < 0,001 entre témoins et traités, \* P < 0,05 entre les lots traités.

ACE : Acétamipride ; CHL : Chlorophylle

En comparaison avec celui des témoins (0,72 nmol/mg ± 0,16), le taux MDA hépatique est élevé chez les souris traitées par l'ACE (0,83 nmol/mg ± 0,21). La différence était statistiquement hautement significative (P=0,0007). Cependant, chez les souris gavées d'une solution aqueuse de la chlorophylle, le taux de MDA était faible (0,57 nmol/mg ± 0,1) nmol/mg de protéines. La différence était statistiquement significative (P=0,029). La différence du taux entre les souris traitées par l'acétamipride et la chlorophylle et les autres lots de souris ont été statistiquement non significative (P=0,641).

Des résultats similaires ont été retrouvés dans l'étude de Chakroun et *al.* (20016), qui ont travaillé sur la dose 1/20 DL50 d'ACE. Le taux de MDA a changé après le traitement des rats par voie orale pendant 60 jours.

Le taux élevé de MDA reflète probablement la présence d'un stress oxydatif généré par le traitement ACE. L'étude de Saadi et *al.* (2019) a montré que le taux de MDA peut être influencé par le traitement d'un autre insecticide, spinosad, pendant 18 jours chez les souris.

Plusieurs recherches ont confirmé l'implication du stress oxydatif dans la toxicité des insecticides néonicotinoïdes par la génération des ROS et l'inhibition des enzymes antioxydantes (Geret *et al.*, 2002 ; Zhang *et al.*, 2009, 2011 ; Cavas *et al.*, 2012 ; Zhang *et al.*, 2012).

Le MDA est un aldéhyde de faible poids moléculaire résultant d'attaques de radicaux libres sur des acides gras polyinsaturés lors de la dégradation de phospholipides membranaires cellulaires (Draper et Hadley, 1990). Il est considéré comme un biomarqueur de stress oxydatif et un marqueur de la peroxydation lipidique (LPO) (Geret *et al.*, 2002). Cette dernière est une des manifestations principales des dommages oxydatifs au niveau des membranes biologiques. La LPO s'est avérée avoir un rôle important dans la toxicité et la cancérogénicité de plusieurs xénobiotiques en provoquant la diminution de la fluidité des membranes et l'inactivation de leurs enzymes (Gutteridge et Halliwell, 2000 ; Xu Wang *et al.*, 2017).

La chlorophylle n'a pas d'influence sur la peroxydation lipidique et ne génère pas des ROS. Au contraire, elle protège les organes de la peroxydation lipidique (Serpeloni *et al.*, 2011). Ce qui explique peut être les résultats obtenus chez les souris traitées par la l'ACE-chlorophylle.

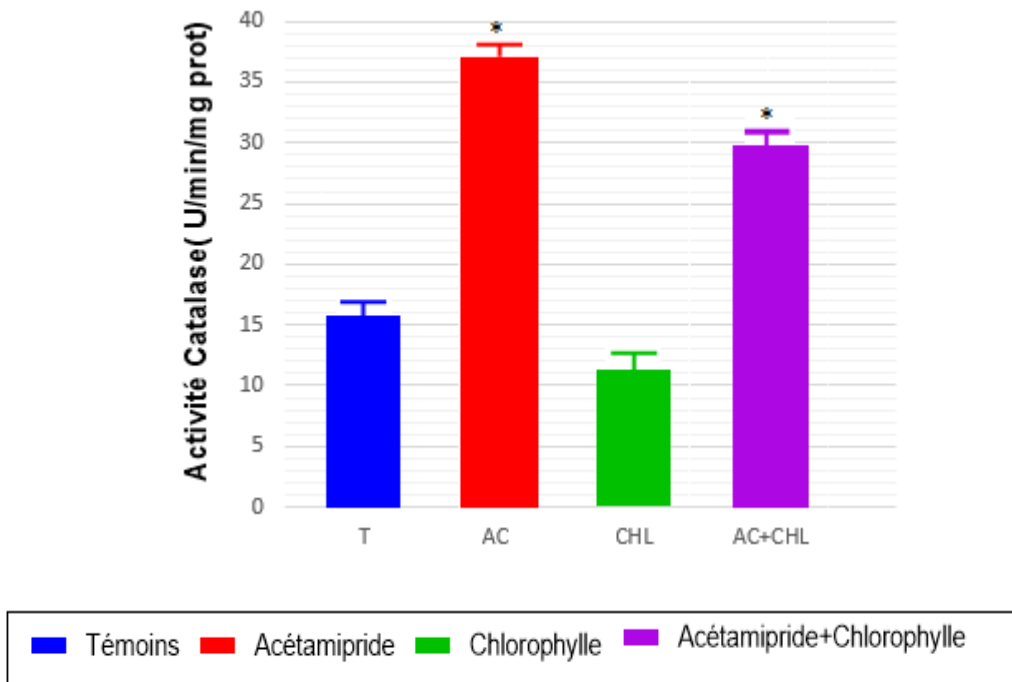
#### III.4.2. Activité de la catalase

Les résultats relatifs au dosage de la catalase (CAT) tissulaire ont été déterminés en mesurant le taux de décomposition du peroxyde d'hydrogène exprimée en U/min/mg de protéines (Aebi, 1984). Les résultats ont été illustrés dans les figures 20 et 21 et les tableaux XI et XII de l'annexe 2.

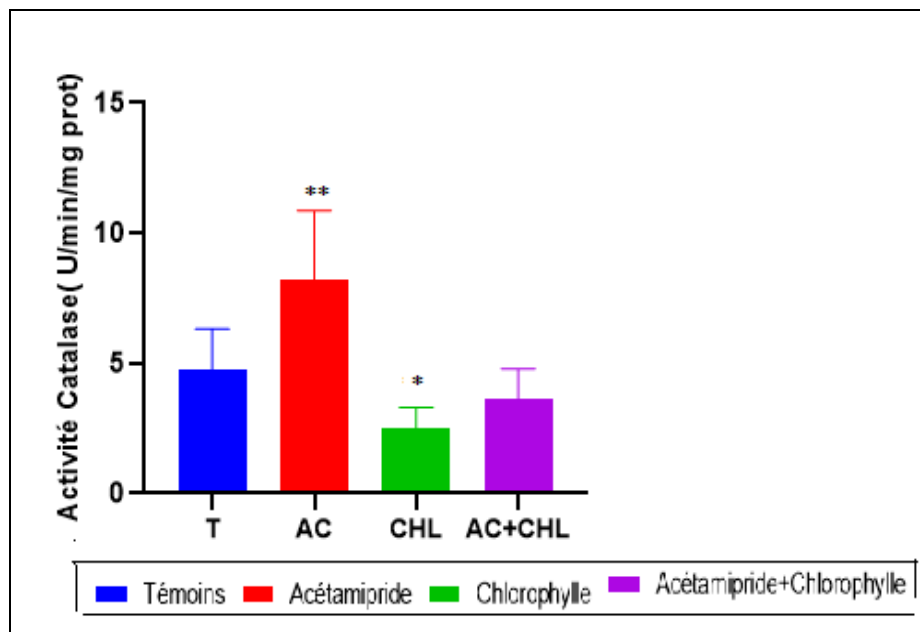
Par rapport aux souris témoins (37,09 U/min/mg  $\pm$ 24,11), l'activité enzymatique de la CAT rénale était supérieure chez les souris traitées par l'acétamipride (15,64 U/min/mg  $\pm$ 16,23) et par l'acétamipride-chlorophylle (29,56 U/min/mg  $\pm$ 19,16). Les mêmes résultats ont été enregistrés en mesurant la CAT hépatique. Les comparaisons en taux par rapport à ceux des témoins (8,21 U/min/mg  $\pm$ 1,61 vs 4,78 U/min/mg  $\pm$ 3,08 respectivement) ont montré des différences statistiquement très significatives ( $P=0,003$ ). Cela nous laisse suggérer que l'acétamipride a incité l'activité enzymatique de la CAT.

Le taux élevé de la CAT pourrait être expliqué aussi par l'implication du stress oxydatif et par conséquence l'augmentation des espèces réactives d'oxygènes (ROS). Ces

derniers ont la capacité d'induire le facteur de transcription Nrf2 qui influence l'expression des enzymes antioxydantes dont la catalase, le superoxyde dismutase (SOD) et le glutathion peroxydase (GPx).



**Figure 20 :** Mesure de l'activité enzymatique de la catalase (U/min/mg de protéine) dans le rein chez les souris témoins et traitées pendant deux semaines.  
\* p <0,05.



**Figure 21 :** Mesure de l'activité enzymatique de la catalase (U/min/mg de protéine) dans le foie chez les souris témoins et traitées pendant deux semaines.  
\*\* P< 0,001 entre les témoins et lots traités ; \*P< 0,05 entre les lots traités.

La catalase est une enzyme antioxydante impliquée dans la défense de la cellule contre les effets toxiques du peroxyde d'hydrogène en catalysant sa décomposition en eau et oxygène. Elle est un biomarqueur de stress oxydatif et est sensible à certains contaminants inducteurs de stress oxydatif comme les métaux toxiques (Almeida et *al.*, 2007 ; Cavas et *al.*, 2012).

Selon nos résultats, la chlorophylle a provoqué une faible diminution de l'activité de la catalase rénale et hépatique chez les souris par rapport aux témoins (11,04 U/min/mg  $\pm$  7,13 vs 15,64 U/min/mg  $\pm$ 16,23) et (2,5 U/min/mg  $\pm$ 1,63 vs 4,78 U/min/mg  $\pm$ 3,08) respectivement. Les souris traitées par l'acétamipride plus la chlorophylle ont montré aussi une faible activité de CAT par rapport aux souris gavées d'une solution aqueuse de chlorophylle : (3,62 U/min/mg  $\pm$ 2,35 vs 4,78 U/min/mg  $\pm$ 3,08) pour la CAT hépatique et (15,64 U/min/mg  $\pm$ 16,23 vs 29,56 U/min/mg  $\pm$ 19,16) pour la CAT rénale.

Des effets protecteurs la chlorophylle ont été décrits par plusieurs auteurs contre différents inducteurs de dommages de l'ADN. Cho et *al.* (2000) ont rapporté que la chlorophylline diminue les dommages de l'ADN induits par le benzopyrène *in vitro*. Madrigal et *al.* (1997) ont montré que 4 mg/kg p.c. la chlorophylline peuvent protéger les érythrocytes polychromatiques micronucléés des souris de toxicité nitrique. Selon Vaňková et *al.* (2018), toutes les chlorophylles testées ont montré la capacité de piéger les radicaux pyroxydes d'une manière dépendante de la dose, la chlorophylline étant la plus puissante. Yan-lin zhang et *al.* (2012), ont montré que la chlorophylline présente une protection cellulaire contre les dommages oxydatifs en neutralisant les radicaux libres excessifs, la régulation à la hausse de l'expression de HO-1.

### III.5. Etude histologique

#### III.5.1. Structure du parenchyme rénal

L'observation microscopique des coupes histologiques rénales des souris révèle une structure normale du parenchyme des souris gavées par la chlorophylle similaire à celle des témoins (figure 22).

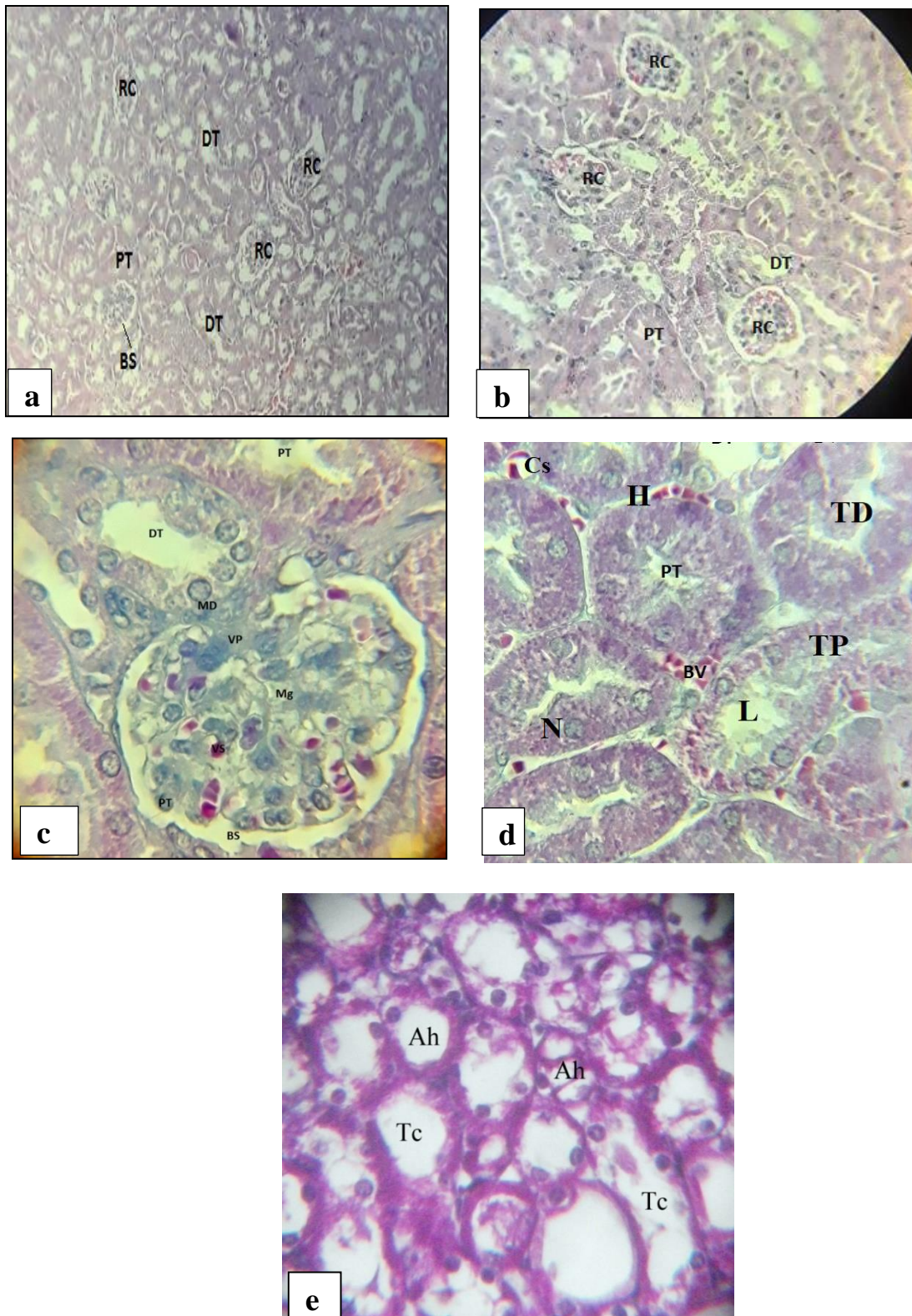
Le cortex rénal (figures 22 et 23 a) présente des structures denses arrondies dites les glomérules rénaux. Ces structures sont entourées d'un grand nombre de tubes, contournés proximaux et distaux. Chaque glomérule est composé d'un espace étroit clair, la chambre glomérulaire ou espace de Bowman. La chambre est tapissée d'une fine membrane basale dotée d'un épithélium pavimenteux fin (figures 22b et c et 23c). Les tubes proximaux sont formés d'un épithélium prismatique avec des noyaux arrondis, centraux et volumineux. Les lumières tubulaires sont bien évidents. Les tubes distaux sont bordés par un épithélium cubique simple haut avec des noyaux bien arrondis et volumineux. Leurs lumières de différents diamètres sont plus ou moins évidentes (figures 22 et 23 d).

La médulla rénale est formée des tubes collecteurs et de l'anse de Henlé disposés d'une manière radiaire (figure 22e et 23b). Les tubes de l'anse de Henlé ont un diamètre réduit et possèdent un épithélium pavimenteux. L'épithélium des tubes collecteurs est cubique haut avec un cytoplasme moins dense (figures 22e).

En revanche, le tissu rénal des souris exposées à l'acétamipride, a montré une atteinte glomérulaire au niveau du cortex présentée par un rétrécissement de quelques glomérules (figure 24a). Les infiltrations leucocytaires sont importantes à proximité des veines et des dilations vasculaires (figure 24b et c). Les cellules épithéliales des tubules proximaux montrent une vacuolisation dans leurs cytoplasmes (figure 24d).

Au niveau de la médulla, les tubes rénaux ont montré un aspect normal sans altérations (figure 24 e).



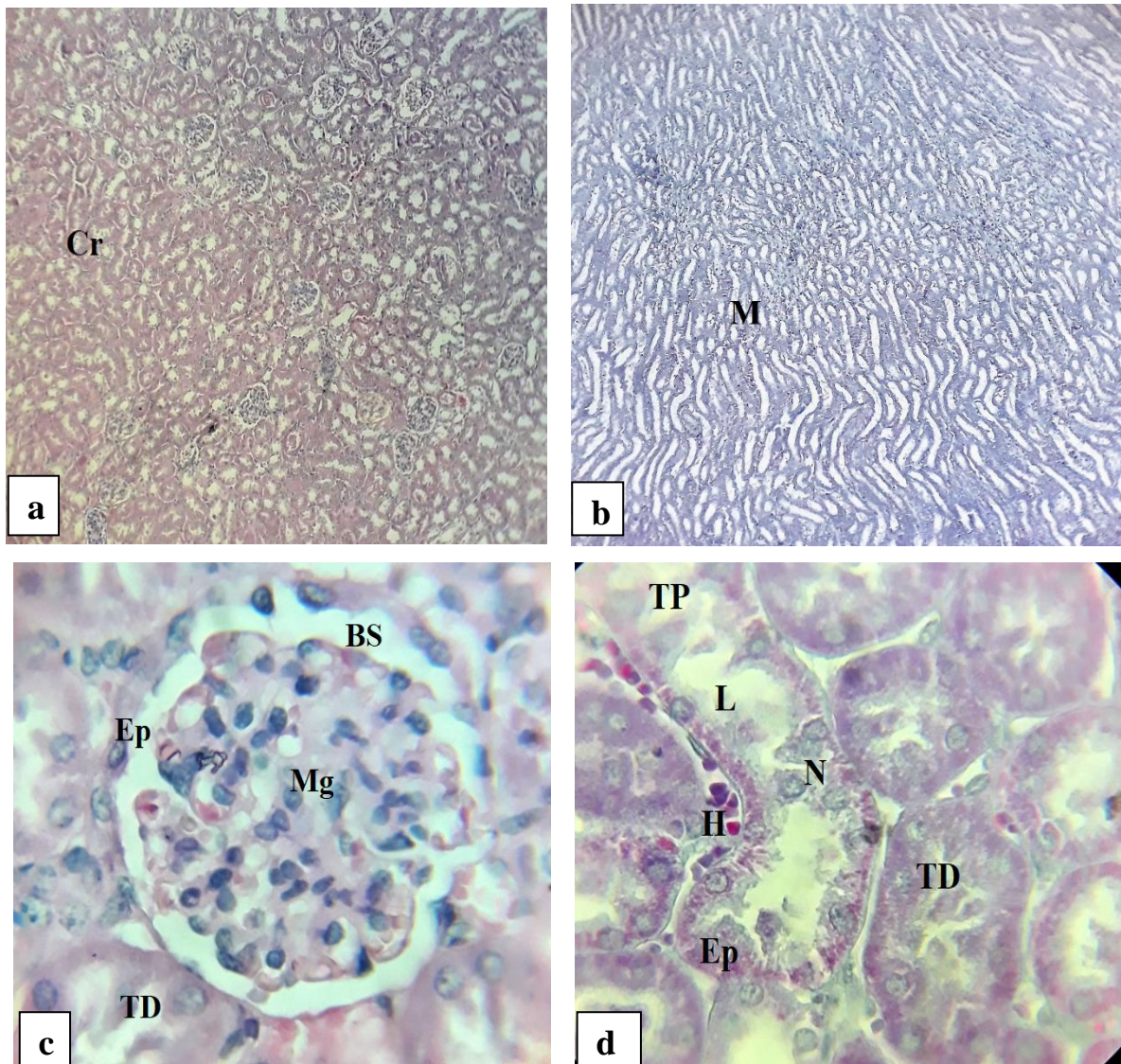


**Figure 22 : Structure du parenchyme rénal des souris mâles témoins.**

**Coloration : HE (a, b et e); Trichrome de Masson: c et d. Grossissements : a : x100 ; b : x400 ; c, d et f : x1000.**

RC : Corpuscule rénal ; BS : chambre glomérulaire ; TD : Tube contourné distal ; TP : Tube contourné proximal ; VP : pôle vasculaire ; MD : macula densa ; Mg : cellule mésangiale ; H : Hématies ; BV(Cs) : vaisseau sanguin ; N : Noyau ; L : Lumière ; Tc : Tube collecteur ; Ah : Anse de Henlé.



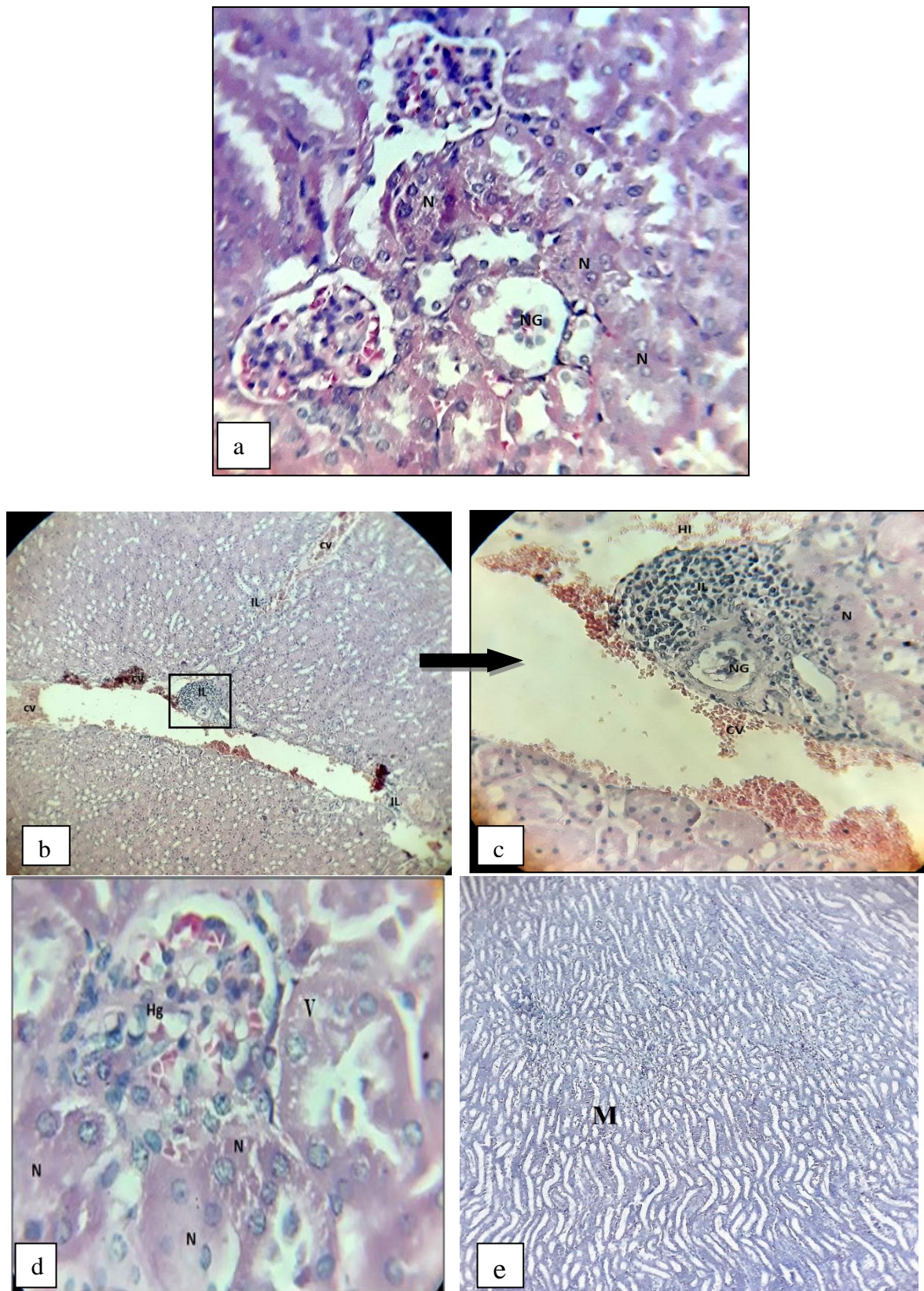


**Figure 23:** Structure du parenchyme rénal des souris mâles administrées de la chlorophylle. Coloration : HE (a et c) et Trichrome de Masson (b et d).

**Grossissements : a et b: x100 ; c et d: x100.**

Cr : Cortex rénal ; M : Medulla ; BS : Chambre glomérulaire ; Ep : Epithélium ; Mg : Cellule mésangiale ; H : Hématies ; TD : Tube contourné distal ; TP : Tube contourné proximal ; N : Noyau.



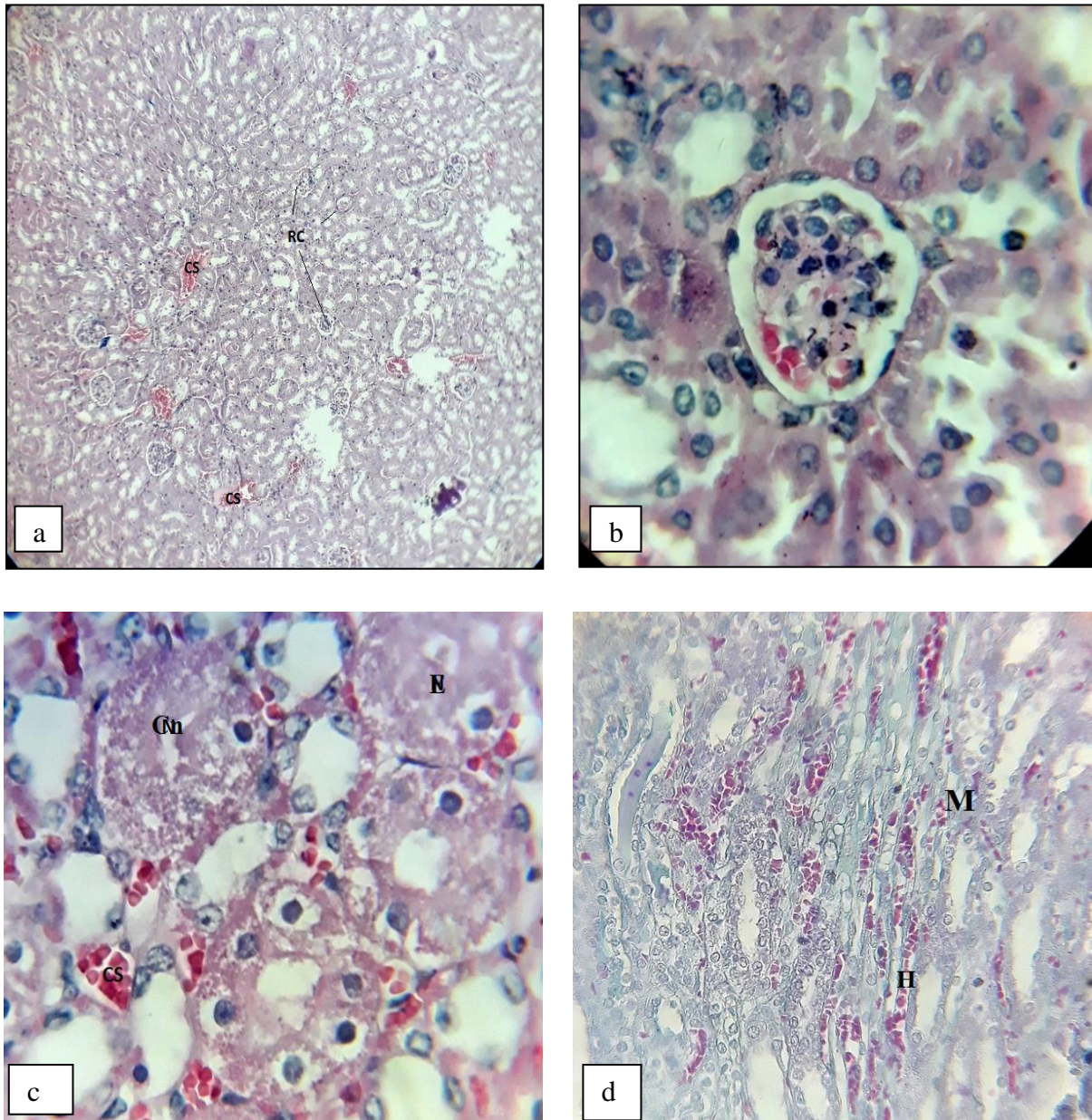


**Figure 24 : Structure du cortex rénal des souris males exposées à l'acétamidipride à raison de 7,2mg /kg /j pendant deux semaines. Coloration : HE (a, b, c et d) ; Trichrome de Masson (e). Grossissements : b : x40 ; a, c et e : x100 ; d : x1000.**

**HI** : Hémorragie interstitielles, **N** : nécrose l'épithélium des TCP, TCD, **NG** : nécrose glomérulaire, **H** : hypertrophie des glomérules rénaux, **CV** : congestion vasculaire, **Dg** : Dégénérescence tubulaire ; **IL** : infiltration leucocytaire, **V** : Aspect vésiculaire.



Les dommages ont diminué lorsque la chlorophylle a été additionnée (figure 25). La dégénérescence des glomérules était absente dans le cortex rénal (figure 25a et b) alors que quelques tubes contournés avaient un aspect vésiculeux des cellules surtout péri nucléaire. Le parenchyme est devenu plus vascularisé (figure 25 c). Aucun changement n'a été décelé au niveau de la médulla (figure 25 d).



**Figure 25:** Structure du cortex rénal des souris males exposées à l'acétamipride et à la chlorophylle pendant deux semaines. Coloration : HE (a, b et c) ; Trichrome de Masson (d). Grossissements : x40 (a) ; x100 (d) ; x 400 (b et c).

HI : Hémorragie interstitielles, Cs : Présence des hématies ; M : Médulla.

Il est à noter que les études sur les effets histologiques de ACE sur différents tissus et organes dans les différents organismes sont minoritaires (Rasgele et *al.*, 2015).

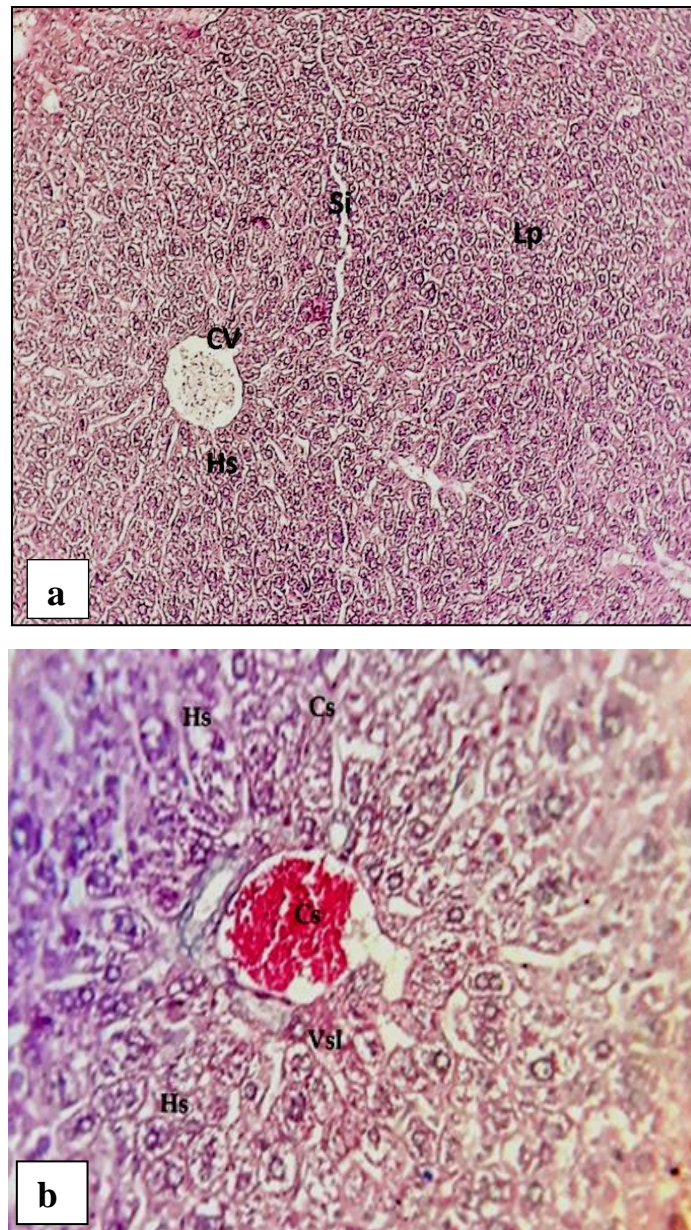
Le rein est l'organe est un organe excréteur qui partage avec le foie le rôle principal de désintoxication des produits chimiques toxiques. Nos résultats se rapprochent de ceux retrouvés par Zhang et *al.* (2012). Ces auteurs ont rapporté que l'ACE endommage les corpuscules et les tubules rénaux dans le rein des souris. Alors que Mondal et *al.* (2014) ont enregistré la présence de dégénérescence et de nécrose dans les tubes contournés proximaux et distaux chez les rats traités par 25 mg / kg/j d'ACE avec des hémorragies rénales. Ces altérations deviennent plus sévères chez les rats traités par 100mg/kg/j. Noaishi et *al.* (2016) ont trouvé une dysplasie avec des structures histologiques irrégulières et des congestions sèvres au niveau du cortex et une nécrose coagulative dans la doublure de la plupart des tubules chez les souris traitées par une dose forte d'ACE (1/10 DL50).

### III.5.2. Structure du parenchyme hépatique

L'observation des coupes histologiques du parenchyme hépatique des souris témoins et exposées à la chlorophylle a permis de mettre en évidence une architecture lobulaire normale qui est centrée par une veine centrolobulaire limitée en périphérie par les espaces portes. Dans les lobules, les hépatocytes s'organisent en travées composées d'une rangée cellulaire séparée par des sinusoides (Figure 26 a et b).

la présence d'une dégénérescence et une nécrose des hépatocytes avec hyperplasie associée à une infiltration de cellules inflammatoires (figure 27b et c).



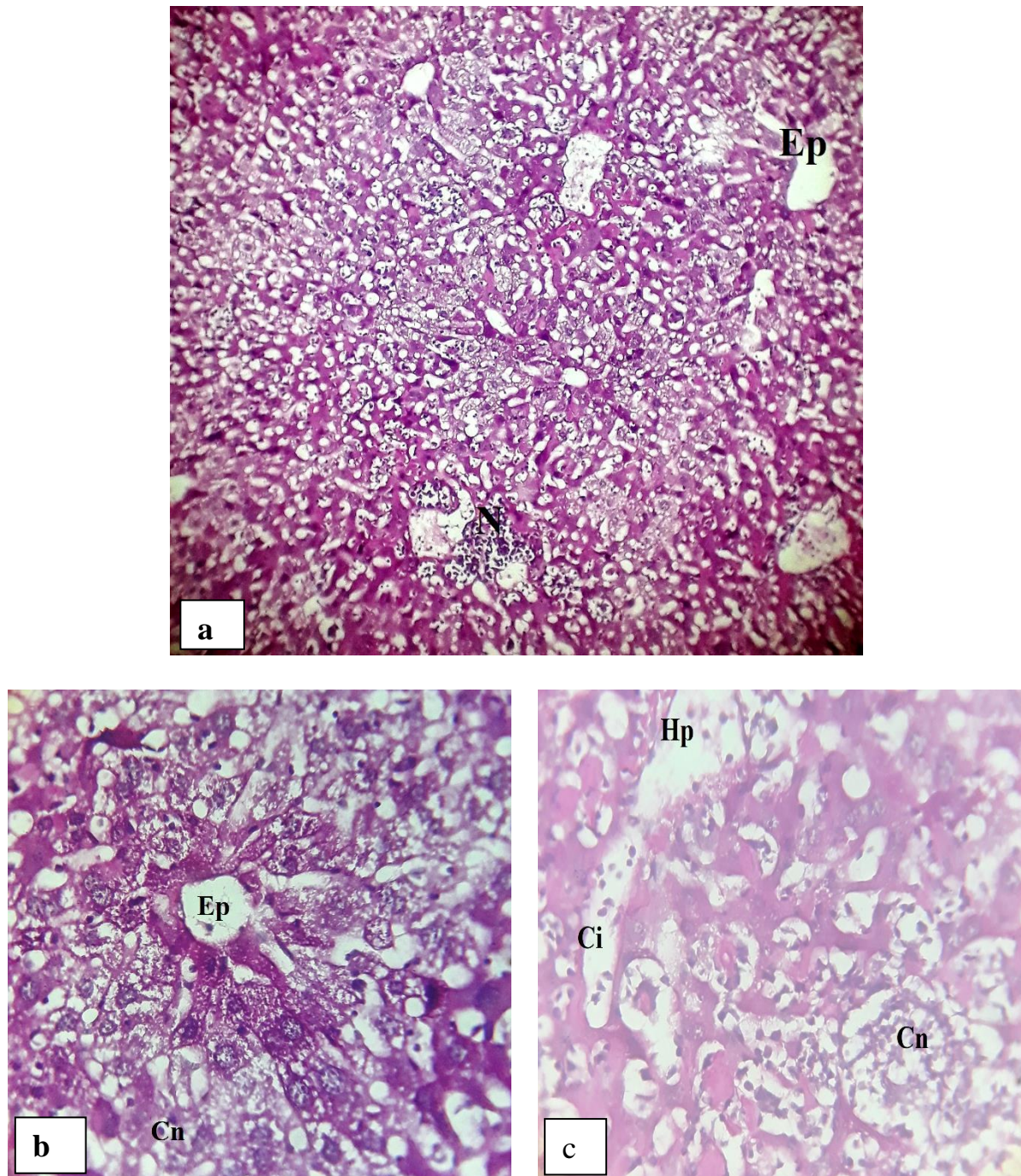


**Figure 26:** Structure du parenchyme hépatique des souris males témoins (a).

et administrées par la chlorophylle (b). Coloration (HE). Grossissement : x100.

Cv : Veine centrolobulaire ; Hs : hépatocytes ; Lp : lame hépatocyte, Cs : Capillaire sinusoïde  
L'examen histopathologique du groupe de souris à faible dose (7,2 mg/kg/j) a indiqué



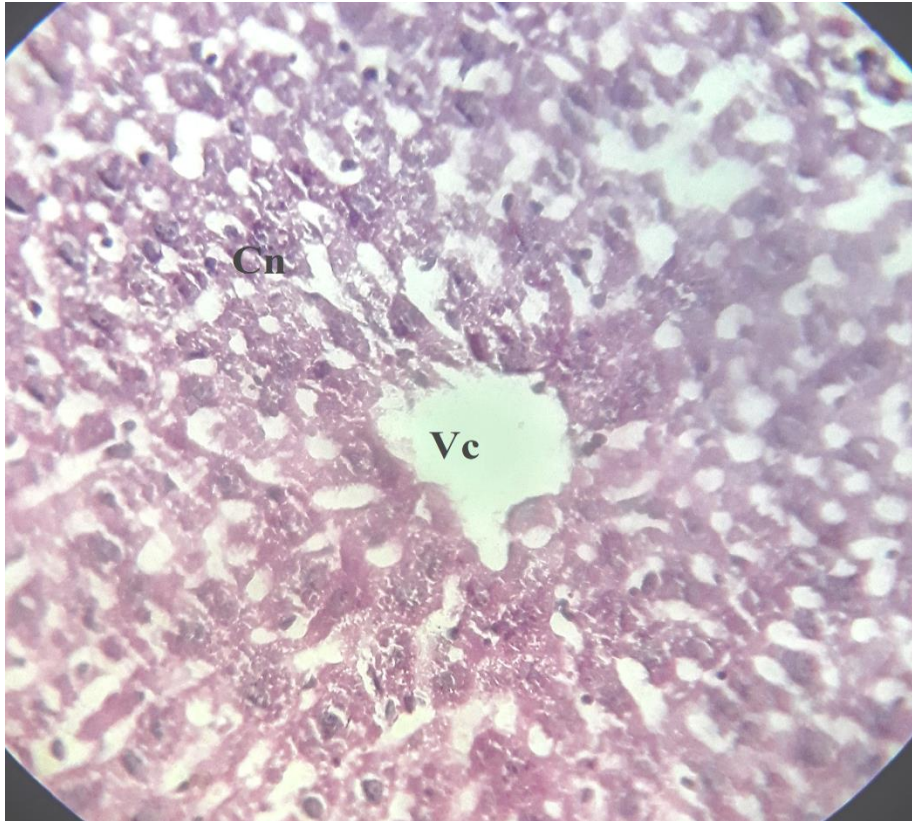


**Figure 27:** Structure du parenchyme hépatique des souris males exposées à l'acétamipride à raison de 7,2mg /kg /j pendant deux semaines. Coloration (HE).

Grossissements : a : x100 ; b et c : x400

Ep : Espace porte ; Hp : Hyperplasie ; Ci : Cellules inflammatoires ; Cn : Cellules nécrosées.

Au niveau des foies des souris exposées à l'acétamipride et à la chlorophylle, les altérations structurales semblent être plus ou moins sévères. La microscopie optique a mis en évidence la présence des cellules avec un aspect de nécrose (figure 28).



**Figure 28** : Structure du parenchyme hépatique des souris mâles exposées à l'acétamipride et à la chlorophylle pendant deux semaines. Coloration (HE).  
Grossissements : x400

Vc : Veine centrolobulaire ; Cn : Cellules nécrosées.

Le foie est un organe cible pour la détoxification et est sujet à divers troubles en raison de l'exposition aux polluants environnementaux. Les altérations histopathologiques des tissus peuvent être utilisées comme méthode rapide pour évaluer les effets toxiques des produits chimiques dans différents tissus et organes (Bernet et *al.*, 1999). La présente étude est complémentaire de (Mondal et *al.*, 2014) qui ont signalé que des changements dégénératifs légers ont été observés dans le foie de rats ayant reçu 25 mg / kg d'ACP, mais que le groupe de rats ayant reçu respectivement 100 et 200 mg / kg a présenté une sévère modifications graisseuses du foie et nécrose. D'autre part, plusieurs mécanismes ont été identifiés sur les lésions des cellules hépatiques (Grattagliano et *al.*, 2002; Lee, 2003). L'un d'eux est le dysfonctionnement mitochondrial qui peut se produire de trois manières différentes : inhibition de la bêta-oxydation des acides gras, inhibition des enzymes respiratoires ou par effet direct sur



l'ADN mitochondrial. Certains produits chimiques comme les pesticides inhibent à la fois la bêta-oxydation et les fonctions des enzymes respiratoires et par conséquence, les acides gras libres ne sont pas métabolisés et entraînent une accumulation des ROS. Après, ces radicaux endommageront l'ADN mitochondrial.

De plus, certains produits chimiques peuvent provoquer une nécrose hépatocellulaire, une désorganisation de l'architecture hépatique, rupture des structures sinusoïdales et mise en commun du sang dans le foie par ces mécanismes (Rasgele et *al.*, 2015).

*CONCLUSION*  
*ET*  
*PERSPECTIVES*

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre étude vise à chercher d'une part le potentiel toxique d'un contaminant à usage agricole, l'acétamipride et d'autre part l'effet bénéfique de la supplémentation en chlorophylle sur la balance oxydant/antioxydant et sur la structure du foie et des reins chez des souris males de souche NMRI pendant 15 jours.

Les résultats obtenus nous ont permis de tirer les conclusions suivantes :

A court terme, la dose 7,2mg/kg/j d'acétamipride est toxique chez les souris males. Son profil toxicologique est remarquable.

- ✓ Régression du poids corporel.
- ✓ Augmentation du poids absolus et relatifs des deux organes : rein et foie.

L'exposition répétée à l'ACE génère un état de stress oxydant traduit par des perturbations au niveau de certains paramètres biomarqueurs de stress:

- ✓ Une peroxydation lipidique hépatique et rénale reflétée par une forte teneur de malondialdéhyde.
- ✓ Une perturbation de l'activité antioxydante enzymatique de la catalase.

7,2mg/kg/j d'acétamipride a des effets délétères sur les tissus rénal et hépatique.

La supplémentation en chlorophylle chez des souris traitées à l'ACE a montré:

- ✓ Poids corporel plus ou moins stable.
- ✓ Une baisse de la peroxydation lipidique hépatique et rénale
- ✓ Des lésions tissulaires moins graves.
- ✓ Une amélioration du statut enzymatique antioxydant de la catalase.

Les niveaux acceptables d'exposition à l'acétamipride sans effet dangereux pour la santé sont inférieurs au 7,2mg/kg/j.

En perspective, il serait intéressant d'approfondir l'étude en touchant les points suivants:

- ✓ Etudier les effets sur toute la batterie du stress oxydatif,
- ✓ Impliquer d'autres biomarqueurs (Le rapport GSH/GSSG, GST, MDA, vitamines C et E, ....) ;

- ✓ Déterminer la teneur de l'ACE et ses métabolites dans les tissus et le sang et les autres liquides biologiques ;
- ✓ Déterminer les composés actifs de la chlorophylle utilisée ;
- ✓ Etudier l'effet dose et temps dépendants de la chlorophylle et de l'ACE ;
- ✓ Chercher effet chronique de l'ACE ;
- ✓ Comparer les effets selon le sexe.
- ✓ Etablir se enquêtes sur les modalités d'utilisation des insecticides chez les agriculteurs et les inciter pour utiliser les pesticides d'une manière restreinte et prudente pour protéger les mammifères.

*REFERENCES*  
*BIBLIOGRAPHIQUES*

- Aebi, Hugo. 1984. « [13] Catalase in Vitro ». In *Methods in Enzymology*, 105:121-26. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).
- Akbas SH, Yegin A, Ozben T. *Effect of pentylenetetrazol-induced epileptic seizure on the antioxidant enzyme activities, glutathione and lipid peroxidation levels in rat erythrocytes and liver tissues*. Clin Biochem. 2005; 38(11): 1009-14.
- Algeciras-Schimmich A, Cook WJ, Milz TC, Saenger AK, Karon BS. *Evaluation of hemoglobin interference in capillary heel-Stick samples collected for determination of neonatal bilirubin*. Clinical Biochemistry. 2007; 40: 1311 – 1316.
- Almeida E.A., DiasBainy A.C., MeloLoureiro A.P., MartinezRegina R., MiyamotoS., Onuki J., FujitaBarbosa L., et al. 2007, *Oxidative stress in Perna perna and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage*. Comp. Biochem. Physiol., A. 146: 588–600.
- Alavanja MC., Hoppin JA. Et Kamel F. (2004). *Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity*. Annuel.Revue.Public.Health; 25:155-197.
- Annabi, Emna, Intidhar Ben Salem, et Salwa Abid-Essefi. 2019. « Acetamiprid, a Neonicotinoid Insecticide, Induced Cytotoxicity and Genotoxicity in PC12 Cells ». *Toxicology Mechanisms and Methods* 29 (8): 580-86. <https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1624907>.
- Antonio M.T., Corredor L., Leret M.L. *Study of the activity of several brain enzymes like markers of the neurotoxicity induced by perinatal exposure to lead and/or cadmium*. 2003, Toxicol. Lett. 143: 331-340.
- Aouacheri, O., et Saka, S. 2020. « Cytoprotective Effects of Zingiber officinale Against the Oxidative Stress Induced by Lead Acetate Toxicity in Rats ». *Phytothérapie*. <https://doi.org/10.3166/phyto-2020-0221>.
- Banerjee BD, Seth V, Bhattacharya A, Pasha ST, Chakraborty AK. *Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free radical scavengers*. Toxicol Lett 1999 ; 107 : 33-47.
- Bal, Ramazan, Gaffari Türk, Mehmet Tuzcu, Okkes Yilmaz, Tuncay Kuloglu, Ramazan Gundogdu, Seyfettin Gür, et al. 2012. « Assessment of Imidacloprid Toxicity on Reproductive Organ System of Adult Male Rats ». *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 47 (5): 434-44. <https://doi.org/10.1080/03601234.2012.663311>.
- Ballard-Croft C, Locklar AC, Keith BJ, Mentzer RM Jr., Lasley RD. 2008. *Oxidative stress and adenosine A1 receptor activation differentially modulate subcellular cardiomyocyte MAPKs*. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 294:H263–7.

- Bonnefont-Rousselot D, Therond P, Delattre J. *Radicaux libres et antioxydants*. In : *Delattre J, Durand G, Jardillier JC. Ed. Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires*. Paris : Médecine-sciences Flammarion . 2003: 59-81.
- Banerjee BD, Seth V, 2001. Ahmed RS. *Pesticide induced oxidative stress: perspective and trends*. *Rev Environ Health* ; 16 : 1-40.
- Baillie JK, Bates MGD, Thompson AAR, Waring WS, Partridge RW, Schnopp MF, Simpson A, Gulliver-Sloan F, Maxwell SRJ and Webb DJ. *Lowland subjects exposed to high altitude plasma antioxidant capacity in healthy endogenous urate production augments*. *Chest*. 2007; 131: 1473-1478.
- Bonnefont-Rousselot D, Théron P, Beaudoux JL, Peynet J, Legrand A, Delattre J. 2003. *Vieillesse et stress oxydant. Quels marqueurs potentiels*. *Ann Biol Clin*. 2001; 59(4): 453-459.
- Burk RF. *Selenium, an antioxidant nutrient*. *Nutr Clin Care* . 2002; 5: 47-49.
- Bradford, Marion M. s. d. « *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding* », 1976
- Bouchemal, Karima, Ryma Bouldjadj, Mohamed Belbekri, Nadia Ykhlef, et Abdelhamid Djekoun. 2018. « *Pigments photosynthétiques, enzymes antioxydantes et potentiel osmotique foliaire de dix génotypes de blé dur (Triticum durum) : effet du stress hydrique* ». *Phytoprotection* 98 (1): 13-24. <https://doi.org/10.7202/1055352ar>.
- Caicai Lua,, Zhen Xiea,, Jianbo Guoa,, Yuanyuan Songa, Yajuan Xingb, Yi Hana, Haibo Lia, Yanan Houa,, 2020 Chlorophyll as natural redox mediators for the denitrification process <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.104895>
- 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.
- Cavas T, Cinkilic N, Vatan O, Yilmaz D, Coskun M, *In vitro genotoxicity evaluation of acetamiprid in CaCo-2 cells using the micronucleus, comet and gamma H2AX foci assays*. 2012, *Pestic Biochem Physiol* 104:212–217.
- Caroline Gayet, phytothérapeute et nutritionniste, février 2019.
- Carpenter E. B, “Clinical experiences with chlorophyll preparations with particular reference to chronic osteomyelitis and chronic ulcers,” *The American Journal of Surgery*, vol. 77, no. 2, pp. 167–171, 1949.
- Cascade via the nicotinic receptor and intracellular calcium mobilization in N1E-115 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 184:180–86.
- Curtin J.F., Donovan M., Cotter T.G. : *Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis*. *J. Immunom methods*., 2002, 265, 49-70.
- Consulté le: mai 21, 2020 « 179 M.BCMI.pdf ».. [En ligne]. Disponible sur: <http://di.univ-blida.dz:8080/jspui/bitstream/123456789/2342/1/179%20M.BCMI.pdf>.

- Chauhan. M., A pilot study *on wheat grass juice for its phytochemical, nutritional and therapeutic potential on chronic diseases* , *International Journal of Chemical Studies* 2014. décembre
- Chakroun, Sana, Lobna Ezzi, Intissar Grissa, Emna Kerkeni, Fadoua Neffati, Rakia Bhourri, Amira sallem, et al. 2016. « Hematological, Biochemical, and Toxicopathic Effects of Subchronic Acetamiprid Toxicity in Wistar Rats ». *Environmental Science and Pollution Research* 23 (24): 25191-99. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7650-9>.
- Chen M1, Tao L, McLean J, et al. *Quantitative analysis of neonicotinoid insecticide residues in foods: implication for dietary exposures*. *J Agric Food Chem*. 2014;2:62(26):6082-90.
- Cho Y.S., S.T. Hong, K.H. Choi, Y.H. Chang, A.S. Chung, Chemopreventive activity of porphyrin derivatives against 6-sulfooxymethylbenzo[a]pyrene mutagenicity, *Asian Pac. J. Cancer Prev*. 1 (2000) 311–317
- Cho, Young-sik, Sun-taek Hong, Kyung Hee Choi, et Young-hwan Chang An-sik. s. d. *Chemopreventive Activity of Porphyrin Derivatives RESEARCH COMMUNICATION Asian Pacific J Cancer Prev, 1, 311-317 Chemopreventive Activity of Porphyrin Derivatives Against 6-*.
- « Clubic - La meilleure source d'information Tech ». s. d. Clubic.com. Consulté le 27 juin 2020. <https://www.clubic.com/>.
- Delattre J, Beaudoux JL, Bonnefont-Rousselot. *Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques*. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales Paris. 2005; 1 - 405.
- Deaton CHM, Marlin DJ. *Exercise-associated oxidative stress*. *Clin Tech Equine Pract*. 2003; 2(3) : 278-291.
- Donaldson M. S., "Nutrition and cancer: a review of the evidence for an anti-cancer diet," *Nutrition Journal*, vol. 3, no. 1, p. 19, 2004.
- Desmier T. *Les antioxydants de nos jours : définition et applications*. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Limoges, France. 2016. P88.
- Dively, Galen P., Michael S. Embrey, Alaa Kamel, David J. Hawthorne, et Jeffery S. Pettis. 2015. « Assessment of Chronic Sublethal Effects of Imidacloprid on Honey Bee Colony Health ». Édité par Nicolas Desneux. *PLOS ONE* 10 (3): e0118748. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118748>.
- Duzguner, Vesile, et Suat Erdogan. 2010. « Acute Oxidant and Inflammatory Effects of Imidacloprid on the Mammalian Central Nervous System and Liver in Rats ». *Pesticide Biochemistry and Physiology* 97 (1): 13-18. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.11.008>.



- Favier A. Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. Mécanismes biochimiques. L'actualité Chimique. 2003: 108-115.
- Fisher-Wellman K, Bloomer RJ. *Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history*. Dynamic Medicine. 2009; 8: 1-25.
- Ferruzzi M. G., and J. Blakeslee, "Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives," *Nutrition Research*, vol. 27, no. 1, pp. 1–12, 2007.
- Ford, K.A. and J.E. Casida, 2006. Unique and common metabolites of thiamethoxam, clothianidin and di notefuran in mice. *Chem. Res. Toxicol.*,19: 1549-1556.
- Garrel C, Ceballos-Picot I, Germain G, Al-Gubory KH. Oxidative stress inducible antioxidant adaptive response during prostaglandin F<sub>2</sub>α-induced luteal cell death in vivo. *Free radical research*. 2007; 41: 251-259.
- Gamet-Payrastré, Laurence, et Céline Lukowicz. 2017. « Les effets des mélanges de pesticides ». *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 52 (5): 234-38. <https://doi.org/10.1016/j.cnd.2017.03.002>.
- Gibbons, David, Christy Morrissey, et Pierre Mineau. 2015. « A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife ». *Environmental Science and Pollution Research* 22 (1): 103-18. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3180-5>.
- Girard, L., N. Reix, et C. Mathelin. 2020. « Impact des pesticides perturbateurs endocriniens sur le cancer du sein ». *Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie* 48 (2): 187-95. <https://doi.org/10.1016/j.gofs.2019.10.008>.
- Geret, F., Jouan, A. , Turpin, V., Bebianno, M.J. , Cosson, R.P. , *Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: the oyster (Crassostrea gigas) and the mussel (Mytilus edulis)*. *Aquat. Living Resour.* 15, 61-66.
- Giergiel.M. M. Jamiol, J. Wawrzykowski, et M. Kankofer, « Age-related Changes in Activity of Catalase in Selected Bovine Muscles », . *Age*, p. 7.
- Gauthier, Maxime. 2016. « Effets Des Contaminants Agricoles Sur l'abeille Domestique et Tests de Toxicité Sur La Lignée Cellulaire P19 ». <https://core.ac.uk/display/77619127?recSetID=>.
- Ghafouri-Fard, Soudeh, Hamed Shoorei, et Mohammad Taheri. 2020. « Non-Coding RNAs Are Involved in the Response to Oxidative Stress ». *Biomedicine & Pharmacotherapy* 127 (juillet): 110228. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110228>.

- Hargreaves BJ, Kronfeld DS, Waldron JN, Lopes MA, Gay LS, Saker KE, Cooper WL, Sklan DJ, Harris PA. *Antioxidant status and muscle cell leakage during endurance exercise. Equine Vet J Suppl.*2002; 34: 116-121.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in biology and medicine. Fourth Edition* New York, Oxford University Press. 2007: 851.
- Heo HJ, Kim YJ, Chung D, Kim DO. *Antioxidant Capacities of Individual and Combined Phenolics in a Model System. Food Chem.* 2007; 104(1): 87-92.
- « INDEX\_PRODUIITS\_PHYTO\_2015.pdf ». s. d. Consulté le 20 juin 2020.  
[http://www.inpv.edu.dz/institut/wpcontent/uploads/2016/03/INDEX\\_PRODUIITS\\_PHYTO\\_2015.pdf](http://www.inpv.edu.dz/institut/wpcontent/uploads/2016/03/INDEX_PRODUIITS_PHYTO_2015.pdf).
- Jabri, Mohamed-Amine, Dalanda Wannes, Najla Hajji, Mohsen Sakly, Lamjed Marzouki, et Hichem Sebai. 2017. « Role of Laxative and Antioxidant Properties of Malva Sylvestris Leaves in Constipation Treatment ». *Biomedicine & Pharmacotherapy* 89 (mai): 29-35. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.02.020>.
- Jacob C, Knight I, Winyard PG. *Aspects of the biological redox chemistry of cysteine: from simple redox responses to sophisticated signalling pathways.* Biol Chem. 2006; 387: 1385- 1397.
- Jeschke P, Nauen R, Schindler M, Elbert A (2011) *Overview of the status and global strategy for neonicotinoids.* Journal of Agric Food Chem 59(2): 897-908.  
John P McCook et al., 2016. *Ability of sodium copper chlorophyllin complex to repair photoaged skin by stimulation of biomarkers in human extracellular matrix - - Clin Cosmet Investig Dermatol.* 9: 167–174.
- Johnson RJ, Sautin YY, Oliver WJ, Roncal C, Mu W, Gabriela Sanchez-Lozada L, Rodriguez-Iturbe B, Nakagawa T, Benner SA. *Lessons from comparative physiology: could uric acid represent a physiologic alarm signal gone awry in western society?*J Comp Physiol B. 2009; 179(1): 67-76.
- Kamat, Jayashree P, Krutin K Bloor, et Thomas P.A Devasagayam. 2000. « Chlorophyllin as an Effective Antioxidant against Membrane Damage in Vitro and Ex Vivo ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1487 (2-3): 113-27. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00088-3](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00088-3).
- Kocaman AY1, Topaktaş M. In vitro evaluation of the genotoxicity of acetamiprid in human peripheral blood lymphocytes. *Environ Mol Mutagen.* 2007 Jul;48(6):483-90
- Kusuyama J, Bandow K, Shamoto M, KakimotoK,OhnishiT,MatsuguchiT. 2014. *Low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) influences the multilineage differentiation ofmesenchymal stem and progenitor cell lines through ROCK-Cot/Tpl2-MEK-ERK signaling pathway.* J. Biol. Chem. 289:10330–44.
- Kushwaha, N., A. Mohan, et A. U. Bhikane. 2018. « Accidental Acetamiprid Poisoning in a Buffalo ». *Iranian Journal of Veterinary Research* 19 (4): 318-20.

- Kräutler, Bernhard. 2008. « Chlorophyll Breakdown and Chlorophyll Catabolites in Leaves and Fruit ». *Photochemical & Photobiological Sciences* 7 (10): 1114-20.  
<https://doi.org/10.1039/B802356P>.
- « La chlorophylle comme médiateurs redox naturels pour le processus de dénitrification ScienceDirect ». s. d. Consulté le 6 juillet 2020.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0964830519305906>.
- « la découverte de l'acétamipride - Recherche Google ». s. d. Consulté le 2 juin 2020.  
<https://www.google.com/search?safe=active&client=firefox-b-d&q=la+d%C3%A9couvert+de+l%27ac%C3%A9tamipride>.
- Lefèvre, G., M. Beljean-Leymarie, F. Beyerle, D. Bonnefont-Rousselot, J.-P. Cristol, P. Théron, et J. Torreilles. 1998. « Evaluation of lipid peroxidation by assaying the thiobarbituric acid-reactive substances ». *Annales de Biologie Clinique* 56 (3): 305-19.
- « L'imidaclopride, l'insecticide le plus largement utilisé dans le monde. Formule structurelle ». s. d. 123RF. Consulté le 28 juin 2020.  
[https://fr.123rf.com/photo\\_13338678\\_l-imidaclopride-l-insecticide-le-plus-largement-utilis%C3%A9-dans-le-monde-formule-structurelle.html](https://fr.123rf.com/photo_13338678_l-imidaclopride-l-insecticide-le-plus-largement-utilis%C3%A9-dans-le-monde-formule-structurelle.html).
- Madrigal-Bujaidar, E, N Velazquez-Guadarrama, et S Diaz-Barriga. 1997. « Inhibitory Effect of Chlorophyllin on the Frequency of Sister Chromatid Exchanges Produced by Benzow Axyrene in Vivo », 5.
- Mates JM. *Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology*. Toxicol. 2000 ; 153(1-3) : 83-104.
- Mondal S., Ghosh R.C., Karnam S.S., Purohit K., 2014. Toxicopathological changes on Wistar rat after multiple exposures to acetamiprid, *Veterinary World* 7(12): 1058-1065
- Mohamed A. Noaishi, et H. H. Abd alhafez.2026. Hepatotoxicity and Nephrotoxicity Evaluation after Repeated Dose of Acetamiprid in Albino Rats. *Egypt. J. Chem. Environ. Health*, 2 (2):439 -452.
- Migdal C et Serres M.2011. *Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. médecine/sciences.*, 27 [4].405-412.
- Minguez-Mosquera, M.I D. Pérez-Gálvez, A. Pérez-Gálvez, *Carotenoid and provitamin A in functional foods*, in: W.J. Hurst (Ed.), *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals*, CRC Press, Boca Raton, 2002, pp. 159–218.
- Miguel-Bouzas JC., Castro-Tubio E., Bermejo-Barrera AM., FernandezGomez P., Estevez-Nunez JC. Et Tabernero-Duque MJ. (2012).*Epidemiological study of acute poisoning cases treated at a Galician hospitalbetween 2005 and 2008*. *Adicciones*; 24(3):239-46.

- Pan, Qi. s. d. « Three Indicators of Oxidative Stress in the Evaluation of Hyperthyroidism » 8 (268): 7.
- Paquet-Walsh, Angela, Andrea Bertolo, Catherine Landry, Lucas Deschamps, et Monique Boily. 2019. « Interactive Effects of Neonicotinoids and Natural Ultraviolet Radiation on Yellow Perch (*Perca Flavescens*) Larvae ». *Science of The Total Environment* 685 (octobre): 690-701. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.113>.
- « PUB 1285.pdf ». s. d. Consulté le 22 mai 2020.  
<http://www.ufrgs.br/actavet/43/PUB%201285.pdf>.
- Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018 (juillet): 1-11.  
<https://doi.org/10.1155/2018/4069167>.
- Pastre J, Priymenko N. *Intérêt des anti-oxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques*. *Revue Méd Vét.* 2007; 158 (4): 180-189.
- Paquet-Walsh, Angela, Andrea Bertolo, Catherine Landry, Lucas Deschamps, et Monique Boily. 2019. « *Interactive Effects of Neonicotinoids and Natural Ultraviolet Radiation on Yellow Perch (Perca Flavescens) Larvae* ». *Science of The Total Environment* 685 (octobre): 690-701. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.113>.
- Rahman K. Studies on free radicals, *antioxidants*, and *co-factors*. *Clin Interv Aging.* 2007; 2(2): 219– 236.
- Rasgele P.G., Oktay M., Kekecoglu M., and Muranli F.D.G., 2015. The histopathological investigation of liver in experimental animals after short-term exposures to pesticides. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 21 (No 2), 446–453.
- Ross JH, Driver JH, Lunchick C, Wible C, Selman F. *Pesticide exposure monitoring databases in applied risk analysis. Rev Environ Contam Toxicol* 2006 ; 186 : 107-32.
- Robert G.smith., *Enzymatique Debriding Agents: An Evaluation of the Medical Literature – Wound management and prevention - Volume 54, issue 8 – august 2008.*
- Residues in Water Reservoirs in the Cotton Basin of Northern Benin ». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 102 (1): 7-12.  
<https://doi.org/10.1007/s00128-018-2476-4>.
- Smirnoff N. (1998) *Plant resistance to environmental stress. Current Opinion in Biotechnology* 9(2), 214-215.
- Sheets LP (2010) *Imidacloprid: a neonicotinoid insecticide. In: Hayes handbook of pesticide toxicology. Paris: Elsevier. 20: 55-64.*
- Seifert J (2005) *Neonicotinoids. In: Wexler P, editor. Encyclopedia of toxicology. Elsevier* 196-200

- Sanyal, D., D. Chakma, et S. Alam. 2008. « Persistence of a Neonicotinoid Insecticide, Acetamiprid on Chili (*Capsicum Annum L.*) ». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 81 (4): 365-68. <https://doi.org/10.1007/s00128-008-9479-5>.
- Son, Diakalia, Irénée Somda, Anne Legrève, et Bruno Schiffers. 2017. « Pratiques phytosanitaires des producteurs de tomates du Burkina Faso et risques pour la santé et l'environnement ». *Cahiers Agricultures* 26 (2). <https://doi.org/10.1051/cagri/2017010>.
- 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 hemato-biochemical parameters. *J Drug Metab Toxicol*, 3(6):134
- Suparmi, Suparmi, Minidian Fasitasari, Martanto Martosupono, et Jubhar Christian Mangimbulude. 2016. « Comparisons of Curative Effects of Chlorophyll from *Sauropus Androgynus (L) Merr Leaf Extract* and *Cu-Chlorophyllin* on Sodium Nitrate-Induced Oxidative Stress in Rats ». *Journal of Toxicology* 2016: 1-7. <https://doi.org/10.1155/2016/8515089>.
- Serpeloni, J. M., Grotto, D., Aissa, A. F., Mercadante, A. Z., Bianchi, M. de L. P., & Antunes, L. M. G. *An evaluation, using the comet assay and the micronucleus test, of the antigenotoxic effects of chlorophyll b in mice*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2011, 725(1-2), 50–56.
- S. d. Consulté le 28 juin 2020. [https://sci-hub.tw/https://doi.org/10.1016/S1877-7856\(13\)62786-5](https://sci-hub.tw/https://doi.org/10.1016/S1877-7856(13)62786-5).
- Sajid, Muhammad, Muhammad Razzaq, Zeeshan Ali, Dilshad Hussain, Ajaz Hussain, Ahmad Yar, et Muhammad Hayat. s. d. « Determination of Neonicotinoid (Nitenpyram, Imidacloprid and Acetamiprid) Pesticides Residues in Five Dried Vegetables by High Performance Liquid Chromatography », n° 431: 7.
- Serpeloni, Juliana Mara, Denise Grotto, Alexandre Ferro Aissa, Adriana Zerlotti Mercadante, Maria de Lourdes Pires Bianchi, et Lusânia Maria Greggi Antunes. 2011. « An Evaluation, Using the Comet Assay and the Micronucleus Test, of the Antigenotoxic Effects of Chlorophyll b in Mice ». *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 725 (1-2): 50-56. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.06.009>.
- Son, Diakalia, Irénée Somda, Anne Legrève, et Bruno Schiffers. 2017. « Pratiques phytosanitaires des producteurs de tomates du Burkina Faso et risques pour la santé et l'environnement ». *Cahiers Agricultures* 26 (2). <https://doi.org/10.1051/cagri/2017010>.

- Speck-Planche, Alejandro, Valeria V. Kleandrova, Feng Luan, et M. Natália D.S. Cordeiro. 2012. « Predicting Multiple Ecotoxicological Profiles in Agrochemical Fungicides: A Multi-Species Chemoinformatic Approach ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80 (juin): 308-13. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.03.018>.
- Stenkula, Karin G., Eva-Lena Stenblom, Caroline Montelius, Emil Egecioglu, et Charlotte Erlanson-Albertsson. 2017. « Thylakoids Reduce Body Fat and Fat Cell Size by Binding to Dietary Fat Making It Less Available for Absorption in High-Fat Fed Mice ». *Nutrition & Metabolism* 14 (1): 4. <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0160-4>.
- Suparmi, Suparmi, Minidian Fasitasari, Martanto Martosupono, et Jubhar Christian Mangimbulude. 2016. « Comparisons of Curative Effects of Chlorophyll from *Sauropus Androgynus* (L) Merr Leaf Extract and Cu-Chlorophyllin on Sodium Nitrate-Induced Oxidative Stress in Rats ». *Journal of Toxicology* 2016: 1-7. <https://doi.org/10.1155/2016/8515089>.
- Taibi, N., K. Kahloula, D. E. H. Adli, W. Arabi, M. Brahimi, et M. Slimani. 2020. « Effet thérapeutique de l'extrait aqueux de *Pimpinella anisum* L. chez les rats Wistar exposés de manière subchronique à l'imidaclopride. Étude neurocomportementale ». *Phytothérapie*. <https://doi.org/10.3166/phyto-2020-0227>.
- Terayama, Hayato, Hitoshi Endo, Hideo Tsukamoto, Koichi Matsumoto, Mai Umezu, Teruhisa Kanazawa, Masatoshi Ito, et al. 2016. « Acetamiprid Accumulates in Different Amounts in Murine Brain Regions ». *International Journal of Environmental Research and Public Health* 13 (10): 937. <https://doi.org/10.3390/ijerph13100937>.
- Testud, F. 2014. « Insecticides néonicotinoïdes ». *EMC-Pathologie professionnelle et de l'environnement. EMC Toxicol Pathol.* doi 10: S1877-7856.
- Testud, F., et J.-P. Grillet. 2007. « Insecticides organophosphorés, carbamates, pyréthrinoïdes de synthèse et divers ». *EMC - Pathologie professionnelle et de l'environnement* 2 (2): 1-24. [https://doi.org/10.1016/S1155-1925\(07\)71836-0](https://doi.org/10.1016/S1155-1925(07)71836-0).
- « These-Kehili-Nardjess.pdf ». s. d. Consulté le 16 mai 2020. <http://biblio.univ-annaba.dz/wp-content/uploads/2019/02/These-Kehili-Nardjess.pdf>.
- Tian, Yu, Yuan Wang, Zhi Sheng, Tingting Li, et Xu Li. 2016. « A Colorimetric Detection Method of Pesticide Acetamiprid by Fine-Tuning Aptamer Length ». *Analytical Biochemistry* 513 (novembre): 87-92. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.09.004>.
- « TX68241\_03.pdf ». s. d. Consulté le 22 mai 2020. [http://foodclinic.ir/wp-content/uploads/2016/05/TX68241\\_03.pdf](http://foodclinic.ir/wp-content/uploads/2016/05/TX68241_03.pdf).



- Valvassori SS, Resende WR, Lopes-Borges J, Mariot E, Dal-Pont GC, et al. 2015. Effects of mood stabilizers on oxidative stress-induced cell death signaling pathways in the brains of rats subjected to Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2018;58:471-507.
- Vaňková, Kateřina, Ivana Marková, Jana Jašprová, Aleš Dvořák, Iva Subhanová, Jaroslav Zelenka, Iva Novosádová, et al. 2018a. « Chlorophyll-Mediated Changes in the Redox Status of Pancreatic Cancer Cells Are Associated with Its Anticancer Effects ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018 (juillet): 1-11. <https://doi.org/10.1155/2018/4069167>.
- Vitek.L and J. D. Ostrow, «Bilirubin chemistry and metabo-lism; harmful and protective aspects,» *Current Pharmaceutical Design*, vol. 15, no. 25, pp. 2869–2883, 2009.
- V———. 2018b. « Chlorophyll-Mediated Changes in the Redox Status of Pancreatic Cancer Cells Are Associated with Its Anticancer Effects ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018 (juillet): 1-11. <https://doi.org/10.1155/2018/4069167>.
- « Visual Search ». s. d. Consulté le 28 juin 2020. <https://fr.123rf.com/visual/search/13338678>.
- Watanabe T, Sekine S, Naguro I, Sekine Y, Ichijo H. 2015. *Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)- p38 pathway-dependent cytoplasmic translocation of the orphan nuclear receptor NR4A2 is required for oxidative stress-induced necrosis. J. Biol. Chem.* 290:10791–803
- Wang W.; Vinocur B. and Altman A., 2003- *Plant response to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance.Planta* 218.p14
- Wang, Xu, Arturo Anadón, Qinghua Wu, Fang Qiao, Irma Ares, María-Rosa Martínez-Larrañaga, Zonghui Yuan, et María-Aránzazu Martínez. 2018. « Mechanism of Neonicotinoid Toxicity: Impact on Oxidative Stress and Metabolism ». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 58 (1): 471-507. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010617-052429>.
- Wolinsky I. *Nutrition in exercise and sport*. 3th Edition. CRC Press, New York. 1998.
- Yan, Sen, Zhiyuan Meng, Sinuo Tian, Miaomiao Teng, Jin Yan, Ming Jia, Ruisheng Li, Zhiqiang Zhou, et Wentao Zhu. 2020. « Neonicotinoid Insecticides Exposure Cause Amino Acid Metabolism Disorders, Lipid Accumulation and Oxidative Stress in ICR Mice ». *Chemosphere* 246 (mai): 125661. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125661>.
- Yan, Sen, Zhiyuan Meng, Sinuo Tian, Miaomiao Teng, Jin Yan, Ming Jia, Ruisheng Li, Zhiqiang Zhou, et Wentao Zhu. 2020. « Neonicotinoid Insecticides Exposure Cause Amino Acid Metabolism Disorders, Lipid Accumulation and Oxidative Stress in ICR Mice ». *Chemosphere* 246 (mai): 125661.
- Yarsan E, Tanyuksel M, Celik S, Aydin A, 1999. Effect of aldicarb and malathion on lipid peroxidation. *Bull Environ Contam Toxicol* ; 63 : 575-81.

- Yusuf Y. Novel uses of catechins in foods. *Trends Food Sci. Tech.* 2006; 17: 64-71.
- Zhang S.P., Liu X.Z., Lu H., Mei L., and Liu Z.P. Lipid Peroxidation and Ultrastructural Modifications in Brain after Perinatal Exposure to Lead and/or Cadmium in Rat. *Biomedical and Environmental Science.* 2009, 22: 423-429.
- Zhang JJ, Wang Y, Xiang HY, Li MX, Li WH, Ma K, Wang XZ, Zhang JH, Oxidative stress: role in acetaminophen-induced impairment of the male mice reproductive system. 2011, *Agric Sci China* 10:786–796.
- Zhang JJ, Wang Y, Xiang HY, Jia HZ, Wang XZ. Nephrotoxicity of acetaminophen on male mice and the rescue role of vitamin E. *J Anim Vet Adv*, 2012, 11:2721–2726.
- Zhang M, W. Xin, Z. Yi et al., 2018 “*Human biliverdin reductase regulates the molecular mechanism underlying cancer development,*” *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 119, no 2, pp. 1337–1345.
- Zoumenou, Berny's G. Y. M., Martin P. Aïna, Ibrahim Imorou Toko, Ahmed Igout, Caroline Douny, François Brose, Bruno Schiffers, et al. 2019. « Occurrence of Acetaminophen.



# *ANNEXES*

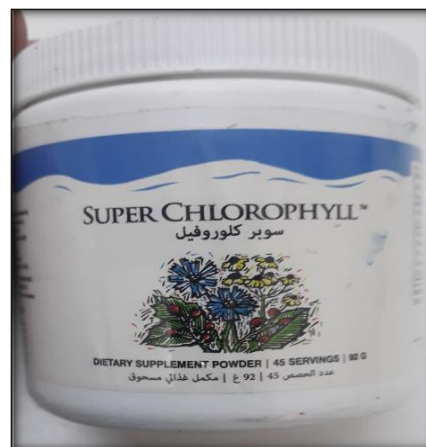
## I. Matériels et réactifs

### I.1 Réactif

- L'acétamipride.
- Chlorophylle.
- Formol36°.
- Paraffine « Leica».
- Colorants.
- L'Eukitt.



**Figure 1 :** Acétamipride (MOPISTOP)



**Figure 2 :** Chlorophylle (Super CHLOROPYLL)



**Figure 3 :** Formol36°.



**Figure 4 :** Paraffine «Leica».



**Figure 5 :** L'Eukitt



**Figure 16** :colorants de H&E et Trichrome de Masson

### Appareillage

- Ultracentrifugeuse.
- Bain marie.
- Microtome.
- Appareil de déshydratation.
- Agitateur vortex.
- Etuve.
- Balance de précision.
- Spectrophotomètre UV Schiamatzu 1600.
- Microscope OPTIKA.



**Figure 7** : Centrifugeuse



**Figure 8** : Etuve



**Figure 15** : microtome leica



**Figure 13** : Appareil de déshydratation.



**Figure 11** : Agitateur vortex.



**Figure 12** : Etuve



**Figure 13** : Balance de précision



**Figure 14** : Spectrophotomètre UV Schimatzu 1600



**Figure 15 : Microscope OPTIKA.**

### **I.3. Autre matériel**

- l'une des cages hébergeant les souris.
- Gavage des souris.
- Paillasse de la dissection.
- Porte micropipette.
- seringue de gavage.
- Trousse dissection.
- Portoir d'analyse.
- Lames et porte-objet et lamelles.



**Figure 16 : l'une des cages hébergeant les souris Figure 17: gavage de souris**





**Figure 18** : Paillasse de la dissection.



**Figure 19** : Porte Micropipette.



**Figure 20** : seringue de gavage



**Figure 21**: trousse de la dissection



**Figure 22** : Portoir d'analyse



**Figure 23** : Lames porte-objet et lamelle

## I.2. Réactifs

- Préparation Tampon Phosphate 50 mM (1V<sub>A</sub>/1,55V<sub>B</sub>) p H 7,2-7,4

Tampon Phosphate 50 mM (1V <sub>A</sub> /1,55V <sub>B</sub> ) pH7.2-7.4				
	Pour 1000ml	Pour 500ml	Pour 200ml	Pour 100ml
Solution A: <b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	6.8 g	3.4 g	1.36 g	0.68 g
Solution B: <b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	8.7 g	4.35 g	1.74 g	0.87 g

- Préparation Réactif de Bradford

Réactif de Bradford				
	Pour 1000ml	Pour 500ml	Pour 200ml	Pour 100ml
<b>Bleu de Coomassie G250</b>	100mg	50mg	20mg	10mg
<b>Ethanol 95°</b>	50 ml	25 ml	10 ml	5 ml
<b>Acide Orthophosphorique 85%</b>	100 ml	50 ml	20 ml	10 ml
<b>H<sub>2</sub>Od</b>	850 ml	425 ml	170 ml	85 ml

- SDS 8,1%  
pH3.5**

Pour 50 échantillons : ~5ml

8,1g ..... 100 ml

~5ml

X g ..... 5 ml

~25ml

X= 0,4 g dans 5 ml d'acide acétique 20%

Préparer 100ml

- TBA 0,8%**

Pour 50 échantillons : ~25ml  $C_i V_i = C_f V_f$

0,8g ..... 100 ml

X g ..... 25 ml

100%

X= 0,2 g dans 25 ml d'acide acétique 20%

### Solution d'acide acétique 20%

Pour 50 échantillons : ~20ml

Volume pour le SDS :

Volume pour le TBA :

On a :

$C_i =$

$C_f = 20\%$

$V_f = 100\text{ml}$

Donc :

$$V_i = \frac{C_f V_f}{C_i} = \frac{20\% * 100 \text{ ml}}{100\%} =$$

- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Pour 50 échantillons : ~25ml.

20 ml

0.340ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10V~3%) qsp 10 ml (9.66ml) H<sub>2</sub>Od.

100% +

80 ml H<sub>2</sub>Od

0.850ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10V~3%) qsp 25 ml (24.15ml) H<sub>2</sub>Od.

20ml d'acide acétique

## II. Fiche technique : Coloration

Les protocoles de coloration :

### II.1. Coloration à l'hématoxyline-éosine

- Un bain d'hématoxyline. 10secondes.
- Rinçage à l'eau courante. 5minutes.
- Un bain d'éosine. 30secondes.
- Rinçage rapide à l'eau courante.

## III. 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).

### III.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

### III.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.

### III.3. Ecart type :

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



Où :  $\delta$  : l'écart type.

$v$  : la variance.

### III.4. Test de normalité « Shapiro-wilk »

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

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

où

$x_{(i)}$ : la série des données triées

$k$  : la partie entière du rapport

$a_i$ : 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 :

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

On étudie deux variables  $X$  et  $Y$  et on cherche à savoir si les deux observations détaillées  $n_X$  et  $n_Y$ , de moyennes observées  $m_X$  et  $m_Y$  et de variances observées  $s_X^2$  et  $s_Y^2$  issues respectivement d'une population de moyenne  $\mu_X$  et de variance  $\delta_X^2$  et d'une population de moyenne  $\mu_Y$  et de variance  $\delta_Y^2$ , proviennent de la même loi théorique de moyenne  $\mu$ . Les hypothèses sont :

$Y$

$H_0$  :  $\mu_X = \mu_Y$  et le traitement n'a pas d'effet.

$H_1$  :  $\mu_X \neq \mu_Y$  et le traitement a provoqué un changement

Pour  $n_X < 30$  ou  $n_Y < 30$ , et  $\delta_X^2 = \delta_Y^2$ , la statistique du test est :

La variance commune estimée :

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

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.

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

$s_Y^2$ : 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  $t_{obs} < t_{th}$  :  $H_0$  est retenue, la différence est non significative et le traitement n'a pas d'effet.
- Si  $t_{obs} > t_{th}$  :  $H_1$  est retenue, la différence est significative et le traitement a un effet.

### III.6. Test de Fisher

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

$$H_0: \delta^2 = \delta^2_{X \quad Y}$$

$$H_1: \delta^2 \neq \delta^2_{X \quad Y}$$

La statistique du test est :

$$F_{obs} = \frac{\frac{n_X s^2_X}{n_X - 1}}{\frac{n_Y s^2_Y}{n_Y - 1}}$$

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-Snédecor à  $n_X - 1$  et  $n_Y - 1$  degrés de liberté

- Si  $F_{obs} < \text{valeur seuil}$  :  $H_0$  est retenue, la différence entre les variances des deux observations n'est pas significative.
- Si  $F_{obs} > \text{valeur seuil}$  :  $H_1$  est retenue, la différence de variance des deux observations est significative.
-

**Tableau VII:** table de Student

Avec  $\alpha$  est le pourcentage d'erreur et  $\nu$  est le deegree de liberte

$\nu \backslash \alpha$	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
$\infty$	0,1257	0,6745	1,0364	1,2816	1,6449	1,9600	2,3263	2,5758	3,2905

**Tableau VIII:** table de Fisher

$\nu_1$  est le nombre de ddl du numérateur avec  $\alpha=0,05$ .

$\nu_2$  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	$\infty$
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
$\infty$	3,84	3,00	2,60	2,37	2,21	2,10	1,94	1,83	1,67	1,57	1,46	1,00

## Les Tableau des paramètres

**Tableau III** : le poids corporel des souris témoin administrés l'eau distillée.

Témoins (g)	J 0	J 5	J 10	J 15
Souris 1	44	38	42	41
Souris 2	40	35	37	37
Souris 3	37	33	37	38
Souris 4	33	33	37	37
Souris 5	26	23	25	28
Souris 6	34	33	35	37
moyenne	35,6666667	32,5	35,5	36,3333333
Ecart type	6,2182527	5,04975247	5,6480085	4,36653944

**Tableau IV** : le poids corporel des souris traités par 7, 2 mg/kg/j. de l'acétamipride

Acétamépride (g)	J 0	J 5	J 10	J 15
Souris 7	40	39	37	24
Souris 8	37	34	36	33
Souris 9	37	28	29	27
Souris 10	35	26	25	24
Souris 11	33	33	29	26
Souris 12	30	30	27	33
Moyenne	35,3333333	31,6666667	30,5	27,8333333
Ecart type	3,50238014	4,67618078	4,88876262	4,16733328

**Tableau V** : le poids corporel des souris traités par 0,01 g/ml de la chlorophylle

Chlorophylle (g)	J 0	J 5	J 10	J 15
Souris 13	41	38	40	40
Souris 14	38	35	37	34
Souris 15	37	35	37	36
Souris 16	36	34	34	34
Souris 17	33	33	36	30
Souris 18	28	25	25	24
Moyenne	35,5	33,3333333	34,8333333	33
Ecart type	4,50555213	4,41210456	5,19294393	4,24264069

**Tableau V : le poids corporel des souris traités par 7,2 mg/Kg/J de l'ACE et 0,01 g/ml de CHL**

AC+CHL (g)	J 0	J5	J10	J15
Souris 19	40	36	33	27
Souris 20	38	37	35	33
Souris 21	37	35	33	30
Souris 22	32	30	29	29
Souris 23	30	33	30	28
Souris 24	37	34	31	29
Moyenne	35,6666667	34,1666667	31,83333333	29,33333333
Ecart type	3,82970843	2,4832774	2,22860195	2,06559112

**Tableau VII : Poids absolue et poids relatifs de Foie.**

Tableau des poids de Rein (g) et poids relatif des souris traités								
Rein (g)	témoin		ACE		CHL		ACE+CHL	
	Rein Gauche	Rein Droit	Rein Gauche	Rein Droit	Rein Gauche	Rein Droit	Rein Gauche	Rein Droit
S2	0,35	0,40	0,297	0,419	0,38	0,285	0,295	2,067
S3	0,299	0,29	0,311	0,432	0,387	0,356	0,342	2,938
S4	0,18	0,17	-	-	0,29	0,31	0,29	2,176
S5	0,28	0,27	-	-	0,28	0,27	0,28	1,735
Poids relatif	Témoin		ACE		CHL		ACE+CHL	
S1	0,914		0,758		0,541		0,869	
S2	0,795		1,104		1,092		0,782	
S3	0,46		-		0,647		0,762	
S4	0,728		-		-		0,765	
Moyenne	0,721		0,93		0,76		0,791	
Ecart type	0,19		0,241		0,29		0,05	



**Tableau VII : Poids absolue et poids relatifs de Rein.**

Tableau des poids de foie (g) et poids relatif des souris traités				
Foie (g)	témoin	ACE	CHL	ACE+CHL
S1	2,041	2,207	1,861	2,176
S2	1,756	3,52	1,02	1,735
S3	1,75		2,319	2,19
S4	1,968			2,067
S5	2,057			
Poids relatif	Témoin	ACE	CHL	ACE+CHL
S1	7,28	6,68	5,16	7,25
S2	4,74	10,66	2,55	5,98
S3	4,26		8,7	7,82
S4	5,15		5,79	6,26
S5	5,55			
Moyenne	5,396	8,67	5,55	6,827
Ecart type	1,15	2,81	2,52	0,85

**Tableau IX : les valeurs de Malondialdéhyde du rein.**

[C] mg/ml	Témoin (nmoles/mg protéine)	Acétamipride (nmoles/mg de protéine)	Chlorophylle (nmoles/mg protéine)	AC+CHL (nmoles/mg protéine)
0	0,032	1,02	0,03	1
0,1	0,58	1,09	0,69	0,68
0,2	0,63	0,94	0,48	0,76
0,3	0,69	0,89	0,71	0,73
0,4	0,59	1,23	0,48	0,63
0,5	0,56	0,69	0,43	0,5
0,6	0,73	0,88	0,39	0,46
0,7	0,63	0,91	0,61	0,68
0,8	0,64	0,79	0,38	0,71
0,9	0,65	0,52	0,41	0,78
1	0,73	0,7	0,51	1,01
Moyenne	0,59	0,88*	0,47	0,72
Ecart type	0,19	0,20	0,18	0,17
Variance	0,04	0,040	0,03	0,030



**Tableau X : les valeurs de Malondialdéhyde du Foie.**

[C] mg/ml	Témoin (nmoles/mg protéine)	Acétamipride (nmoles/mg de protéine)	Chlorophylle (nmoles/mg protéine)	AC+CHL (nmoles/mg protéine)
0	0,49	0,5	0,42	0,48
0,1	0,52	0,53	0,45	0,56
0,2	0,58	0,71	0,49	0,51
0,3	0,63	0,75	0,52	0,52
0,4	0,7	0,77	0,54	0,63
0,5	0,72	0,78	0,59	0,65
0,6	0,73	0,89	0,62	0,75
0,7	0,83	0,96	0,57	0,79
0,8	0,84	1,04	0,68	0,81
0,9	0,95	1,07	0,69	0,86
1	0,96	1,11	0,69	0,86
Moyenne	0,72	0,83	0,57	0,67
Ecart type	0,16	0,21	0,1	0,15
Variance	0,026	0,04	0,01	0,02

**Tableau XI : les valeurs obtenue de l'activité de catalase du rein de lots témoin et traités.**

REIN Catalase	T U/min/mg de protéine	ACE U/min/mg de protéine	CHL U/min/mg de protéine	ACE+CHL U/min/mg de protéine
	39,76	71,52	21,21	57
	10,6	35,46	10,6	28
	6,91	23,64	7,05	18,99
	5,3	17,73	5,3	14,24
Moyenne	15,64	37,09	11,04	29,56
Ecart type	16,23	24,11	7,13	19,16
Variance	263,43	581,26	50,83	367,27

**Tableau XII: Les valeurs obtenue de l'activité de catalase du Foie de lots témoin et traités.**

Foie Catalase	T U/min/mg de protéine	ACE U/min/mg de protéine	CHL U/min/mg de protéine	ACE+CHL U/min/mg de protéine
	9,18	15,80	4,8	6,97
	4,58	7,90	2,4	3,48
	3,07	5,19	1,6	2,29
	2,30	3,94	1,2	1,74
Moyenne	4,78	8,21	2,5	3,62
Ecart type	3,08	5,32	1,61	2,35
Variance	9,49	28,35	2,6	5,51

