



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHESCIENTIFIQUE

جامعة عبد الحميد ابن باديس مستغانم

UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS DE MOSTAGANEM

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

THESE PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE
DOCTORAT LMD

Présentée par

MEDJEDDED Housna

Thème

**Physiopathologie moléculaire et cellulaire liée à l'exposition aux
métaux et pesticides : Etude mécanistique de leurs effets.**

Soutenue publiquement le 06/03/2024

Devant le jury :

Pr. BENKHELIFA Mohammed	Président	Université de Mostaganem
Pr. AIT HAMADOUCHE Nadia	Examinatrice	Université d'Oran 1
Dr. REBAI Ouafa	Examinatrice	Université de Mostaganem
Pr. NEMMICHE Saïd	Directeur de thèse	Université de Mostaganem

Année Universitaire : 2023-2024

Remerciements

« Tout est possible à qui rêve, ose, travaille et n'abandonne jamais »

Xavier Dolan

C'est avec tristesse mais aussi beaucoup de fierté que je rédige ces quelques lignes qui marquent la fin de ce voyage qui a duré presque 4 ans et le début d'un autre.

Tout d'abord, je voudrais exprimer ma profonde gratitude à mon directeur de thèse, le **Pr. Saïd Nemmiche**, pour son soutien continu à mon doctorat, pour les conseils patients, les encouragements enthousiastes et les précieux critiques de ce travail de recherche et la rédaction de cette thèse et surtout pour tout le bagage qui m'a acquis. Sans ses conseils et son aide, ce travail n'aurait pas pu être réalisé.

Je souhaite exprimer ma profonde reconnaissance aux différents membres du jury, le **Pr. Benkhelifa Mohammed** de l'Université de Mostaganem d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse, **Pr. Ait Hamadouche Nadia** de l'université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella de m'avoir fait honneur en acceptant de juger ce travail au tant qu'examinatrice, je vous dois l'expression de ma profonde gratitude. Mes vifs remerciements vont aussi au **Dr. Rebai Ouafa** de l'Université de Mostaganem, je vous remercie d'avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce travail.

Mes sincères remerciements vont aussi au **Pr. Larid Mohamed** de m'avoir ouvert la porte de son laboratoire pour y travailler. Je vous remercie pour votre confiance.

Je voudrais accorder une attention particulière aux techniciens des laboratoires de recherches de l'INES : **Amina, Djahira, Fatima**...qui étaient là à tout moment prêts pour nous accorder leurs aides.

Je voudrais remercier ma famille : **mes parents** je vous remercie du fond du cœur pour tous les sacrifices que vous avez fait. Vous m'avez soutenue pendant tout au long de mes études. **Ma sœur et ses enfants**, surtout ma nièce qui a en quelque sorte contribué à la réalisation de ce travail de recherche. Et finalement, à la personne la plus chère à mon cœur, à **mon mari** qui a su m'encourager et me pousser sans cesse de l'avant. Je ne saurai t'exprimer toute ma gratitude.

الملخص

إن الاستخدام المتزايد للمبيدات الحشرية (إيميداكلوبريد) والمعادن الثقيلة (الكادميوم والرصاص) يشكل مصدر قلق للصحة العامة. هذه المواد الغريبة الحيوية السامة موجودة في كل مكان وتنتشر في جميع أنحاء نظامنا البيئي بسرعة متزايدة. تم إجراء العديد من الدراسات لتقييم سمية كل معدن ثقيل بمفرده، ولكن عدد قليل جدًا من الدراسات لتقييم سمية خليط المبيدات والمعادن الثقيلة. التعرض المشترك هو الطريقة الأكثر شيوعًا التي تستجيب بها الكائنات الحية للمواد السامة الموجودة في البيئة. ويساهم هذا العمل في دراسة آليات عملها عبر نموذج دراسة على الجسم الحي. عولجت فئران ويستار بطرق التعرض المختلفة (I/II و I/III) لمدة 15 يومًا. تمت معالجة الدفعات التجريبية باستخدام الكادميوم والرصاص والإيميداكلوبريد. تكشف النتائج التي تم الحصول عليها عن انخفاض كبير في مؤشرات الدم، مع زيادة في خلايا الدم البيضاء وتثبيط مستوى δ -ALAD. وقد ظهر الضرر الخلوي في الكبد والكلى بوضوح من خلال الارتفاع الكبير في العلامات البيوكيميائية للإجهاد. تسببت هذه المواد السامة في حدوث إجهاد تأكسدي وكان لها آثار صحية ضارة عند مستويات تعرض أقل مما كان يعتقد سابقًا.

الكلمات الرئيسية: إيميداكلوبريد؛ الكادميوم؛ الرصاص؛ إجهاد تأكسدي؛ الفئران

Résumé

L'utilisation accrue des pesticides (tels que imidaclopride) et des métaux lourds (cadmium et plomb) est un sujet de préoccupation pour la santé publique. Ces xénobiotiques toxiques sont omniprésents et se propagent dans notre écosystème à une vitesse croissante. De nombreuses études ont été menées pour évaluer la toxicité seul de chacun métal lourd, mais très peu d'études pour évaluer la toxicité du mélange des pesticides et des métaux lourds. La co-exposition est la façon la plus courante chez les organismes réagissant aux substances toxiques présentes dans l'environnement. Ce travail contribue à étudier leurs mécanismes d'action via un modèle d'étude *in vivo*. Des rats Wistar ont été traités par diverses voies d'exposition (*IV* et *IP*) pendant 15 jours. Des lots expérimentaux sont traités au Cd, Pb et imidaclopride. Les résultats obtenus révèlent une diminution significative des paramètres hématologiques, avec une augmentation du nombre des globules blancs et une inhibition du taux de δ -ALAD. Les lésions cellulaires dans le foie et les reins ont été clairement démontrées par l'élévation significative des marqueurs biochimiques du stress. Ces substances toxiques ont induit un stress oxydatif et ont eu des effets néfastes sur la santé à des niveaux d'exposition plus faibles que ce que l'on pensait auparavant.

Mots clés : imidaclopride ; cadmium ; plomb ; stress oxydatif ; rats.

Abstract

The increasing use of pesticides (imidacloprid) and heavy metals (cadmium and lead) is a matter of public health concern. These toxic xenobiotics are ubiquitous and are spreading through our ecosystem at an increasing rate. Many studies have been carried out to assess the toxicity of individual heavy metals, but very few to assess the toxicity of the mixture of pesticides and heavy metals. Co-exposure is the most common way in which organisms react to toxic substances in the environment. This work contributes to studying their mechanisms of action via an *in vivo* study model. Wistar rats were treated with various routes of exposure (*IV* and *IP*) for 15 days. Experimental lots were treated with Cd, Pb and imidacloprid. Results reveal a significant decrease in hematological parameters, with an increase in white blood cells number and inhibition of δ -ALAD levels. Cellular damage in the liver and kidneys was clearly demonstrated by the significant elevation of biochemical stress markers. These toxic substances induced oxidative stress and had adverse health effects at lower levels of exposure than previously thought.

Keywords: imidacloprid; cadmium; lead; oxidative stress; rats.

Table des matières

<i>Remerciements</i>	i
المخلص	ii
Résumé	iii
Abstract	iv
Liste des abréviations	v
Introduction	1
<i>Synthèse bibliographique</i>	6
<i>Chapitre I : Les pesticides</i>	7
1 Classification des pesticides	7
1.1 En fonction du ravageur ciblé	7
1.2 En fonction de la composition chimique	9
1.2.1 Les organochlorés	9
1.2.2 Les organophosphorés	10
1.2.3 Les carbamates	10
1.2.4 Les pyréthroïdes	11
1.2.5 Les néonicotinoïdes	11
1.3 Classification selon le mode d'entrée	12
1.3.1 Les pesticides systémiques	12
1.3.2 Les pesticides de contact	12
1.3.3 Les fumigants	13
1.3.4 Poisons de l'estomac	13
1.3.5 Les répulsifs	13
2 Dégradation des pesticides	13
2.1 Dégradation chimique	14
2.1.1 Hydrolyse	15
2.1.2 Réactions d'oxydo-réduction	15
2.2 Photo-dégradation	16
3 Impacts des pesticides	16
3.1 Impact des pesticides sur l'écosystème du sol	16
3.2 Impacts des pesticides sur l'écosystème aquatique	17
3.3 Impacts des pesticides sur la santé humaine	18
3.3.1 Effets aigus sur la santé humaine	19
3.3.2 Effets chroniques sur la santé	19

4	Pesticide d'intérêt: Imidaclopride	20
4.1	Description et propriétés physicochimiques.....	20
4.2	Activité nicotinique	20
4.2.1	Chez les insectes.....	20
4.2.2	Chez les mammifères	21
4.3	Métabolisme et toxicocinétique.....	21
	<i>Chapitre II : Les métaux lourds</i>	23
1.	Introduction	24
2	Sources des métaux lourds	24
3	Métal d'intérêt 01: Cadmium	25
3.1	Généralités	25
3.2	Toxicocinétique	26
3.3	Mécanismes d'action	27
3.3.1	Stress oxydatif.....	27
3.4	Toxicité.....	28
3.4.1	Effets sur le système reproductif masculin	28
3.4.2	Effets sur le système reproductif féminin	29
3.4.3	Toxicité sur le développement	30
4	Métal d'intérêt 02 : Plomb	31
4.1	Généralités	31
4.2	Toxicocinétique	32
4.3	Mécanismes d'action	33
4.3.1	Mimer un métal essentiel : Ca ²⁺	33
4.3.2	Stress oxydatif.....	33
4.4	Toxicité.....	34
4.4.1	Système reproductif masculin	34
4.4.2	Système reproductif féminin	35
4.4.3	Toxicité sur le développement	36
	<i>Chapitre III : Physiopathologie cellulaire - exemple : Mécanismes du stress oxydatif</i>	38
1	Introduction	39
1.1	Espèces réactives de l'oxygène (ERO)	39
1.2	Espèces réactives de l'azote (RNS).....	40
2	Propriétés de certains radicaux libres.....	42
2.1	Ion superoxyde (O ₂ ⁻).....	42
2.2	Radical hydroxyle (OH [•]).....	43

2.3	Peroxyde d'hydrogène H ₂ O ₂	43
2.4	Oxygène singulet (¹ O ₂).....	44
2.5	Peroxynitrite (OONO ⁻) et autres espèces réactives de l'azote	44
3	Sources de radicaux libres.....	45
3.1	Mitochondries.....	45
3.2	Peroxisomes.....	46
3.3	Reticulum endoplasmique	46
4	Cibles moléculaires des radicaux libres	47
4.1	Acide désoxyribonucléique (ADN).....	47
4.2	Acide ribonucléique.....	48
4.3	Lipides	49
4.4	Protéines	50
5	Les antioxydants (AOX)	50
5.1	Les antioxydants enzymatiques	51
5.1.1	Superoxyde dismutase (SOD)	51
5.1.2	Catalase	51
5.1.3	Glutathion réductase (GR)	52
5.1.4	Glutathion S-transférase.....	52
5.2	Les antioxydants non-enzymatiques.....	52
5.2.1	Acide ascorbique	52
5.2.2	Glutathion (GSH).....	53
5.2.3	Proline	53
5.2.4	Tocophérol	54
5.2.5	Caroténoïdes.....	54
	<i>Matériels et méthodes</i>	55
1	Objectif de l'expérimentation.....	56
2	Choix des animaux et conditions d'expérimentation	56
3	Dispositif expérimental	56
3.1	Première Expérimentation	56
3.2	Deuxième Expérimentation	56
4	Prélèvement des organes et préparation de l'homogénat	57
5	Techniques analytiques	57
5.1	Dosage des paramètres biochimiques et hématologiques.....	57
5.1.1	Dosage des paramètres hématologiques.....	57
5.1.2	Dosage des oligoéléments (Fe ²⁺ , Ca ²⁺ et Mg ²⁺).....	58

5.2	Dosage des activités des transaminases sériques (ALAT, ASAT).....	58
5.3	Marqueurs des lésions rénales	58
5.3.1	Dosage de l'acide urique	59
5.3.2	Dosage de la créatinine	59
5.4	Détermination de l'activité de la δ -aminolévulinate déshydratase (δ -ALAD)	59
5.5	Evaluation de l'activité des enzymes antioxydants	60
5.5.1	Dosage des protéines totales au niveau tissulaire.....	60
5.5.2	Dosage de l'activité de la catalase.....	60
5.5.3	Activité de la superoxyde dismutase (SOD)	60
5.6	Paramètres de stress oxydatif	61
5.6.1	Détermination de la teneur en glutathion réduit (GSH)	61
5.6.2	Dosage du glutathion réductase (GR)	61
5.6.3	Dosage du malondialdéhyde (MDA)	61
5.6.4	Dosage du glutathion peroxydase (GPx).....	61
5.6.5	Dosage des carbonyles protéiques.....	62
6	Analyse statistique.....	62
	<i>Résultats et discussion</i>	63
	Expérimentation 01 : Effets du Cadmium (Cd) et du Plomb (Pb) séparément ou en combinaison sur le rat <i>Wistar</i>	64
1.1	Effets du Cd et du Pb séparément ou en combinaison sur les paramètres hématologiques, biochimique et les activités enzymatiques antioxydantes.....	64
1.2	Effets du Cd et du Pb séparément ou en combinaison sur les paramètres biochimiques du sérum et des organes	66
1.3	Effets du Cd et du Pb séparément ou en combinaison sur l'activité des enzymes antioxydants (CAT et SOD).....	66
1.4	Teneur en Cd et Pb dans les organes	67
2	Discussion	67
	Expérimentation 02 : Effets de l'imidaclopride (IMI) et du Cadmium séparément ou en combinaison sur le foie du rat <i>Wistar</i>	73
2.1	Effets de l'IMI et du Cd séparément ou en combinaison sur la teneur en malondialdéhyde (MDA)	73
2.2	Effets de l'IMI et du Cd séparément ou en combinaison sur l'activité enzymatique antioxydante (SOD, CAT, GPx et GR)	73
2.2.1	Effets de l'IMI et du Cd séparément ou en combinaison sur l'activité de la catalase (CAT) et la superoxyde dismutase (SOD).....	73
2.2.2	Effets de l'IMI et du Cd séparément ou en combinaison sur l'activité de la glutathion peroxydase (GPx).....	74

2.2.3	Effets de l'IMI et du Cd séparément ou en combinaison sur le taux d'activité du glutathion réductase (GR)	75
2.2.4	Effets de l'IMI et du Cd séparément ou en combinaison sur l'activité des thiols totaux (T-SH) et glutathion réduit (GSH)	75
2.2.5	Effets de l'IMI et du Cd séparément ou en combinaison sur la teneur en carbonyles protéiques	76
2.3	Discussion.....	76
	<i>Conclusion & Perspectives</i>	83
	<i>Références bibliographiques</i>	85

Liste des abréviations

•OH	Radical hydroxyle
¹O₂	Oxygène singulet
2,4-D	Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
ACh	Acétylcholine
AOX	Les antioxydants
As	Arsenic
Ca	Calcium
CAT	Catalase
Cd	Cadmium
ChE	Cholinestérase
CIRC	Centre international de recherche sur le cancer
Co	Cobalt
Cu	Cuivre
DMT1	Transporteur de métaux divalents 1
DTT	Dichlorodiphényltrichloro-éthane
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
GB	Globule blanc
GPx	Glutathion peroxydase
GR	Globule rouge
GSH	Glutathion réduit
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
Hb	Hémoglobine
Hg	Mercure
HOCl	Acide hypochloreux
Ht	Hématocrites
IMI	Imidaclopride
LOOH	Hydroperoxyde lipidique
MDA	Malondialdéhyde
MT	Métallothionéine

nAChRs	Récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine
Ni	Nickel
NO	Azote
NO	Monoxyde d'azote
NO⁺	Cation nitrosonium
O₂^{•-}	Superoxyde
O₃	Ozone
ONOO⁻	Peroxynitrite
Pb	Plomb
Q	Ubiquinone
RNS	Espèces azotées réactives
RO[•]	Radical alkoxyde
ROO[•]	Radical peroxyde
ROS	Espèces réactives d'oxygène
RSNO	S-nitrosothiols
SNC	Système nerveux central
SOD	Superoxyde dismutase
UE	Union Européenne
Zn	Zinc
δ-ALAD	Acide delta aminolévulinique déshydratase

***Introduction
générale***

Introduction

Les pesticides et les métaux lourds sont un sujet de préoccupation pour la santé publique. Ces xénobiotiques toxiques sont omniprésents dans l'environnement et se propagent à une vitesse croissante à cause des eaux usées jetées dans l'environnement, de l'industrie et de l'agriculture. Ils sont très persistants et non biodégradables (Zuščíková et al., 2023). De nombreuses études ont été menées pour évaluer leur toxicité de façon seule. Donc, nous en savons beaucoup sur chaque élément pris séparément, mais très peu d'études ont été menées pour évaluer la toxicité du mélange des pesticides et des métaux lourds ensemble. La co-exposition est la façon la plus courante dont les organismes réagissent aux substances toxiques présentes dans l'environnement, ce qui rend cette étude très importante pour comprendre leurs mécanismes d'action car ces éléments toxiques le plus souvent coexistent ensemble dans l'environnement.

Les pesticides sont reconnus comme des agents utilisés pour protéger les cultures contre les nuisibles ainsi que les maladies chez l'homme. Les effets bénéfiques des pesticides en font un outil important pour maintenir et améliorer les rendements des cultures et par conséquent le niveau de vie de la population mondiale. En moyenne 2 millions de tonnes de pesticides sont utilisées chaque année dans le monde pour lutter contre les mauvaises herbes, les insectes et les parasites (Syafudin et al., 2021). La révolution de la lutte contre les parasites a commencé depuis les années 1970 avec le développement de pesticides à base de métaux lourds toxiques tels que le cuivre, le plomb, le mercure et l'arsenic. Elle a été suivie par la découverte du dichloro-diphényl-trichloro-éthane (DDT) pendant la seconde guerre mondiale (De et al., 2014). L'utilisation du DDT a énormément augmenté en raison de son efficacité contre presque toutes les espèces de ravageurs même à faible dose. Cette utilisation massive a provoqué des effets néfastes sur l'environnement et l'homme, il est donc devenu évident d'interdire son utilisation. Après l'interdiction du DDT pour l'usage agricole et domestique, une grande variété de pesticides synthétiques a été produite, tels que les organophosphates et les pyréthroïdes, qui restent toxiques pour l'environnement (Mahmood et al., 2016). Les principaux pays consommateurs de pesticides sont : la Chine, les États-Unis, l'Argentine, l'Inde, le Japon, le Canada, le Brésil, la France, l'Italie et la Thaïlande (Sharma et al., 2019).

Depuis l'introduction de l'imidaclopride (IMI) dans les années 1990, les néonicotinoïdes, une famille d'insecticides synthétiques relativement sélectifs, ont rapidement

accru leur part de marché dans le monde (Zhang *et al.*, 2022). L'imidaclopride est l'insecticide néonicotinoïde le plus utilisé, il est utilisé dans l'agriculture afin de prévenir les cultures des attaques de ravageurs, il est également utilisé à des fins vétérinaires et domestiques. Sur les insectes cibles, il affecte le système nerveux central en perturbant les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (nAChRs) (Chen *et al.*, 2023). En fait, il agonise la membrane post-synaptique des nAChRs en imitant l'acétylcholine, le neurotransmetteur actuel, en s'y fixant fortement (Naiel *et al.*, 2020). Bien que les néonicotinoïdes soient considérés comme écologiques (Wintermantel *et al.*, 2020), l'Union Européenne (UE) a interdit l'utilisation de certains pesticides néonicotinoïdes en raison du danger qu'ils représentent pour les organismes non ciblés, en particulier les pollinisateurs (EFSA, 2018). Toutefois, dans certains pays, l'utilisation des néonicotinoïdes est toujours d'actualité en raison de leur faible coût et de leurs effets puissants (Gong *et al.*, 2021). En raison de sa longue durée de vie et de l'importance des doses, l'IMI produit des résidus importants dans l'eau, le sol et les aliments. Ces résidus pourraient pénétrer dans le corps humain par la chaîne alimentaire et représenter un risque énorme pour la santé publique (Sriapha *et al.*, 2020 ; Wan *et al.*, 2020).

Certaines études ont établi un lien entre l'utilisation des néonicotinoïdes et le stress oxydatif, les troubles neurologiques, les altérations métaboliques et le cancer du foie (Li *et al.*, 2020 ; Vuong *et al.*, 2022 ; Zhang *et al.*, 2022). Il a été démontré que les femmes exposées à l'IMI présentaient des niveaux plus élevés de production d'oxyde nitrique et de transcription des synthases d'oxyde nitrique dans le cerveau et le foie (Thompson *et al.*, 2020). L'IMI est également lié à la toxicité pour la reproduction. D'autres recherches menées par Zhao *et al.* (2021) ont montré que l'exposition à l'IMI modifiait la mobilité des spermatozoïdes, diminuait leur concentration et provoquait des malformations physiologiques.

Le Cadmium (Cd) et le plomb (Pb) coexistent généralement dans l'environnement et n'ont aucun rôle biologique dans les organismes vivants (Genchi *et al.*, 2020). Ils sont connus pour être la cause d'une multitude de conséquences délétères sur la santé des humains et des animaux ; ils peuvent imiter les propriétés des métaux essentiels en perturbant les processus cellulaires et enzymatiques (Rahman *et al.*, 2019). L'inflammation et le stress oxydatif ont été identifiés comme deux mécanismes délétères prévalent pour le Cd et le Pb (Huang *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2023 ; Cui *et al.*, 2023). Ces deux métaux dangereux ont une affinité plus forte pour les ligands contenant du soufre que le Zn, car le rayon ionique et l'électronégativité du Cd et du Pb sont identiques à ceux du Ca et du Zn (Carpenter *et al.*, 2016). Ils rentrent en compétition pour le même site de fixation des protéines enzymatiques (Zhai *et al.*, 2015). Le

Zn et le Ca sont deux métaux essentiels ; par conséquent, un déséquilibre de leur homéostasie crée des problèmes vitaux tels que la perturbation de l'activité enzymatique de l'acide delta aminolévulinique déshydratase (δ -ALAD) de la voie de biosynthèse de l'hème.

Le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) a classé le Cd parmi les substances cancérigènes de classe I (CIRC, 1993). La néphrotoxicité et la cancérigénité du Cd sont dues à son interférence avec un certain nombre de voies de transduction des signaux cellulaires qui contrôlent la prolifération et la différenciation des cellules (Thévenod, 2009). Le Cd étant largement utilisé à des fins commerciales, il se propage dans l'environnement par la voie de l'agriculture, l'industrie et les eaux usées (Satarug, 2018). On le trouve fréquemment dans le sol, les aliments, l'air et l'eau potable. Le Cd est absorbé principalement par les voies respiratoires et en moindre quantité par le tractus gastro-intestinal, tandis que l'absorption cutanée est peu fréquente. Ce métal non essentiel est lentement éliminé de l'organisme par les reins, l'urine, la salive et enfin par le lait pendant l'allaitement (Satarug, 2018). Son accumulation entraîne un stress oxydatif, un dysfonctionnement immunologique (Ebrahimi et al. 2020), un dysfonctionnement neurologique (Cai et al., 2020) et la mort (Zhang et al., 2020). Sa capacité à induire un stress oxydatif altère les enzymes antioxydantes et augmente la peroxydation des lipides. Outre ses actions cytotoxiques susceptibles de provoquer des événements apoptotiques ou nécrotiques, il est prouvé que le Cd est cancérigène (Tinkov et al., 2018). En outre, une diminution de l'activité antioxydante de la superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase (CAT) dans les globules rouges est liée à l'anémie, qui est associée à l'hypoxie, l'inflammation et le stress oxydatif et par voie de conséquence peuvent contribuer au développement d'une maladie rénale chronique (Gwozdziński et al., 2021). En outre, des études ont montré que le Cd induisait l'autophagie et la pyroptose (Zheng et al., 2021).

D'autre part, le Pb est un contaminant utilisé dans différents domaines, tels que la fabrication de batteries au plomb, ainsi que dans les peintures et l'impression de journaux (Zhang et al., 2020). On rapporte qu'il affecte l'homéostasie de différents systèmes corporels (Zare et al., 2020). Sa cible principale est le système neurologique (Neuwirth et al., 2019); il affecte l'hippocampe en diminuant les cellules neuronales, ce qui entraîne différents symptômes tels que des troubles de la mémoire et des capacités motrices, des problèmes de comportement et des capacités d'apprentissage (Rajendran et al., 2021). Des études antérieures ont également montré que la toxicité du Pb affecte le fœtus pendant la période de gestation. Il affecte également la reproduction féminine en perturbant les menstruations (en

diminuant le potentiel reproductif ; en retardant le moment de la conception ; en modifiant la synthèse et la circulation des hormones) et la fertilité masculine (Massányi et al., 2020). Un autre effet délétère du Pb est de perturber l'expression du système immunitaire en altérant les niveaux d'immunoglobulines, en changeant la quantité de lymphocytes, de macrophages et de cellules mononucléaires du sang périphérique, et en altérant également les fonctions des neutrophiles (Cuomo et al., 2022).

Il est crucial de déterminer si un mélange de produits chimiques a un effet plus important qu'un produit chimique individuel, étant donné que les êtres humains sont plus susceptibles d'être exposés à un mélange de produits chimiques qu'à un seul produit. La co-exposition au Cd, Pb et IMI pourrait avoir des effets additifs, antagonistes ou synergiques qui ne sont pas observés avec l'exposition à un seul produit.

L'objectif de la présente étude était de déterminer si une exposition séparément ou combinée, pouvait avoir un effet oxydatif additif, synergique ou antagoniste.

Pour ce faire, une synthèse bibliographique du sujet constituera la première partie, suivie par un chapitre résumant les méthodes et techniques utilisés en partie expérimentale, et enfin un chapitre discutant les résultats des deux études menées au cours de ce projet de doctorat.

*Synthèse
bibliographique*

Chapitre I :
Les pesticides

1 Classification des pesticides

Le terme pesticide est un terme commun utilisé pour identifier différentes classes de produits chimiques comme les insecticides, les rodenticides, les herbicides, les fongicides, les désinfectants ménagers, etc., qui sont utilisés à la fois pour décimer et protéger contre les nuisibles (Dar et al., 2019 ; Kumar et al., 2018).

Divers critères sont pris en considération afin d'établir une classification des pesticides, par exemple leur degré de toxicité, les organismes nuisibles qu'ils attaquent, leur composition chimique, leur voie de pénétration, le mode d'action qu'ils utilisent ainsi que leurs sources d'origine. Il existe actuellement trois méthodes de classification des pesticides couramment utilisées suggérées par Drum (1980). Ces trois méthodes de classification des pesticides couramment utilisées dépendent de :

- a- la structure chimique du pesticide ;
- b- le mode d'entrée du pesticide ;
- c- le mécanisme d'action du pesticide ;
- d- les organismes nuisibles qu'ils attaquent.

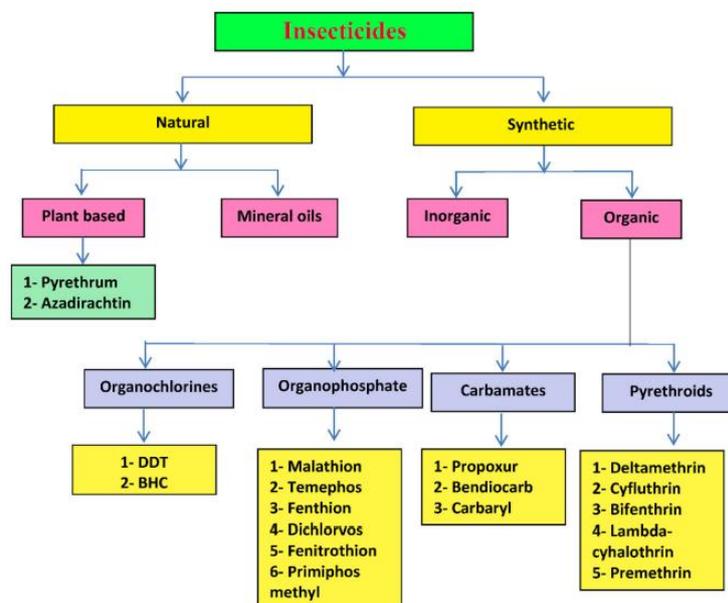


Figure 1: Classification des insecticides (Yadav and Devis, 2017).

1.1 En fonction du ravageur ciblé

Dans cette classification, les pesticides sont classés en fonction de l'organisme nuisible ciblé et des noms spécifiques sont donnés aux pesticides pour indiquer leur activité. Le nom de ces catégories de pesticides provient du terme latin "cide" (qui signifie tuer), il est utilisé comme suffixe après le nom correspondant de l'organisme nuisible qu'ils tuent (Hassan and

El Nemr, 2020). Cependant, ce n'est pas nécessaire que tous les pesticides se terminent par le mot "cide". Certains pesticides sont également classés selon leur fonction (Tableau 1). Par exemple : les régulateurs de croissance, qui stimulent ou retardent la croissance des ravageurs; les défoliants, qui font tomber les feuilles des plantes ; les dessiccants, qui accélèrent le séchage des plantes pour la récolte mécanique ou provoquent le dessèchement et la mort des insectes ; les répulsifs, qui repoussent les ravageurs ; les attractifs, qui attirent les ravageurs, généralement dans un piège ; et les chimio-stérilisants, qui stérilisent les ravageurs (Yadav and Devis, 2017).

Tableau 1: Classification des pesticides en fonction des organismes nuisibles ciblés (Fishel and Ferrell, 2013).

Nom de pesticides	Organismes nuisibles/fonction	Exemple
Insecticides	Tue les insectes et autres arthropodes	Aldicarbe
Fongicides	Tue les champignons (y compris le mildiou, la moisissure et la rouille)	Azoxystrobine
Bactéricides	Tuer les bactéries ou agit contre les bactéries	Complexes Cu ²⁺
Herbicides	Tuer les mauvaises herbes et autres plantes qui poussent là où elles ne sont pas désirées	Atrazine
Acaricides	Tuer les acariens qui se nourrissent de plantes et d'animaux	Bifenazate
Rodenticides	Lutte contre les souris et autres rongeurs	Warfarine
Algicides	Contrôlent ou tuent la croissance des algues	Sulfate de cuivre
Larvicides	Inhibe la croissance des larves	Méthoprène
Répulsifs	Repousse les parasites par son goût ou son odeur	Méthiocarbe
Déshydratants	Agissent sur les plantes en asséchant leurs tissus	Acide borique
Ovicides	Inhibe la croissance des œufs d'insectes et d'acariens	Benzoxazin
Virucides	Agit contre les virus	Scytovirine
Molluscicides	Inhibent ou tuent les mollusques, notamment les escargots	Métaldéhyde
Nématocides	Tue les nématodes qui agissent comme des parasites des plantes	Aldicarb
Avicides	Tue les oiseaux	Avitrol
Boules antimites	Arrêtent les dégâts causés aux tissus par les larves de mites ou les moisissures	Dichlorobenzène
Piscicides	Agit contre les poissons	Roténone
Silvicides	Agit contre la végétation ligneuse	Tebuthiuron
Termiticides	Tue les termites	Fipronil

1.2 En fonction de la composition chimique

La technique la plus reconnue et la plus utilisée pour classer les pesticides dépend de leur structure chimique et de la nature de leurs ingrédients actifs. Ce type de classification donne une indication de l'efficacité et des caractéristiques physicochimiques d'un pesticide particulier, ce qui est exceptionnellement utile pour décider du mode d'application et des précautions à prendre lors de l'application (Kaur et al., 2019). Les pesticides sont regroupés en six grandes classes sur la base de leur composition chimique, à savoir : les organochlorés, les organo-phosphates, les carbamates et les pyréthrines, pyréthriinoïdes et les neonicotinoïdes (Dar et al., 2020).

1.2.1 Les organochlorés

Les organochlorés (Figure 2) sont des composés chimiques stables, très persistants dans l'environnement et susceptibles de s'accumuler dans les tissus adipeux des mammifères (Richardson et al., 2019). L'exposition directe de l'homme aux organochlorés se produit par les fruits, les légumes, les céréales, les produits laitiers et les viandes contaminés, ainsi que les milieux agricoles (Bradman et al., 2007). Chez l'homme, ces pesticides ou leurs métabolites agissent principalement au niveau du système nerveux central en modifiant les membranes enzymatiques des nerfs et leurs propriétés électro-physiologiques, ce qui entraîne des changements dans la cinétique du flux de K^+ et du Na^+ à travers la membrane de la cellule nerveuse.

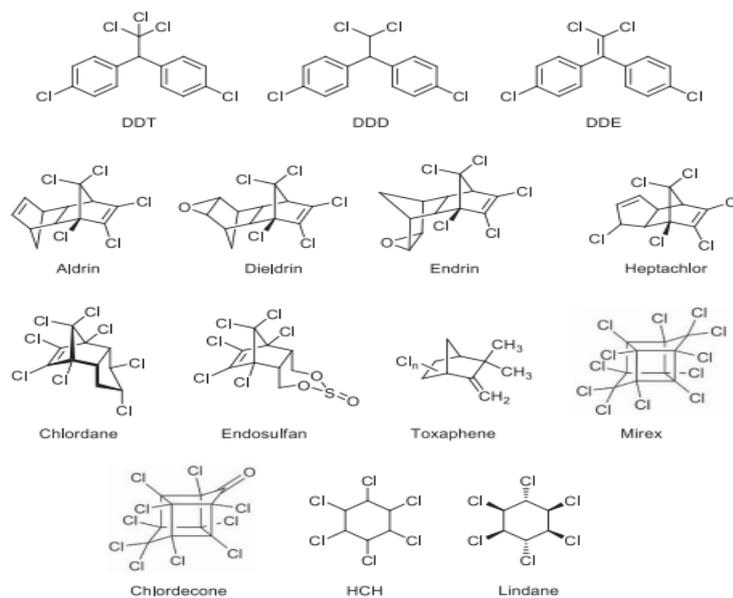


Figure 2: Structure de quelques organochlorés (Hassaan et al., 2020).

1.2.2 Les organophosphorés

Certains esters dérivés de l'acide phosphorique sont connus sous le nom de pesticides organophosphorés (Figure 3). Chez l'homme, ces esters agissent sur le système nerveux central en bloquant l'enzyme acétylcholinestérase, et perturbent l'influx nerveux par la phosphorylation de la sérine du groupe OH dans le site actif de l'enzyme (Vale and Lotti, 2015).

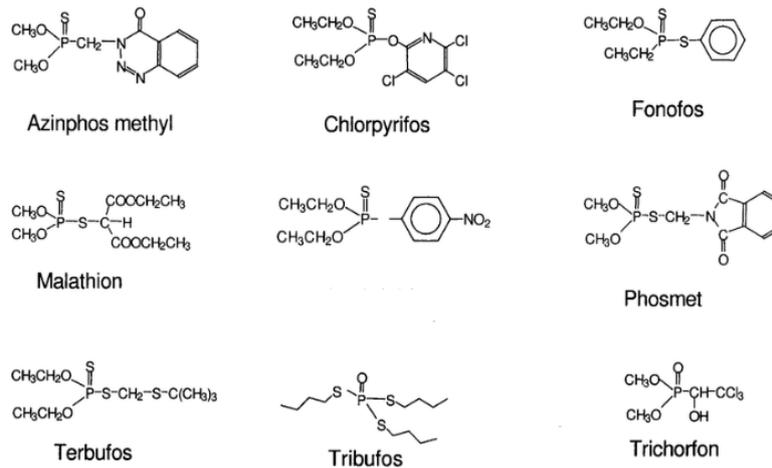


Figure 3: Structure de différents organophosphorés (Jauregui et al., 2003).

1.2.3 Les carbamates

Certains composés esters organiques dérivés de l'acide diméthyl N-méthyl carbamique sont utilisés comme herbicides, insecticides, nématocides et fongicides, et sont appelés carbamates (Figure 4). Les carbamates sont largement utilisés à des fins vétérinaires pour les chats et les chiens. La toxicité de ces composés varie en fonction de la structure moléculaire, mais elle est généralement plus courte que celle des organophosphates et des organochlorés, et ces derniers inhibent l'acétylcholinestérase (Garcia et al., 2012). Les symptômes d'intoxication par les carbamates sont souvent graves et se manifestent dans différents organes.

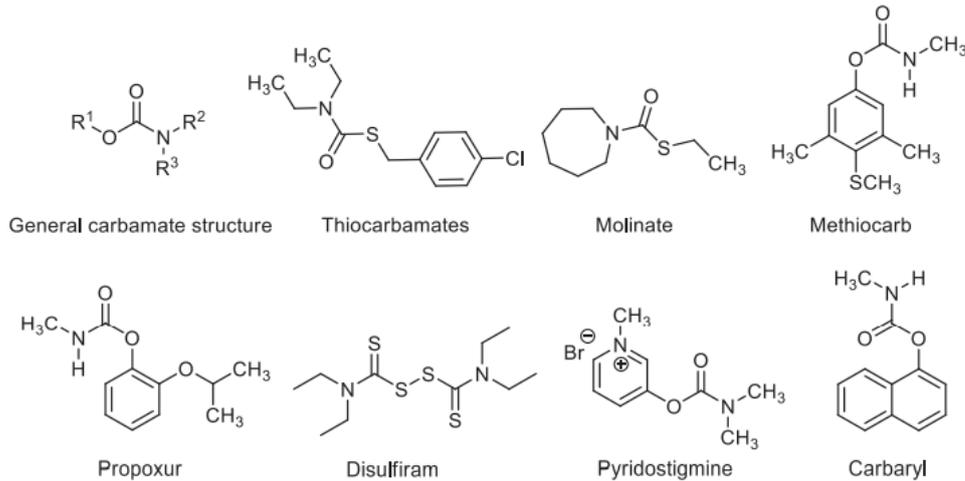


Figure 4: Structure chimique de certains pesticides carbamates et thiocarbamates (Hassaan et al., 2020).

1.2.4 Les pyréthroïdes

Les pyréthroïdes sont des insecticides naturels dérivés des extraits de pyrèthre de fleurs de chrysanthème, connus sous le nom de pyréthrine, que l'on trouve au Kenya. Ils agissent sur le système nerveux central, ce qui provoque des fluctuations dans la dynamique des canaux de cation sodium dans la membrane de la cellule nerveuse, cela entraîne une augmentation du temps d'ouverture des canaux sodiques (Perry et al., 2013). En raison de la nécessité de disposer de grandes quantités de ces pesticides et de la pénurie croissante d'huiles essentielles nécessaires à la fabrication de pyrèthres naturels et biologiques, les scientifiques se sont tournés vers la production de pyréthrinoïdes synthétiques.

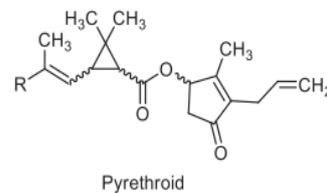


Figure 5: Structure générale des pesticides pyréthrinoïdes (Hassaan et al., 2020).

1.2.5 Les néonicotinoïdes

Les néonicotinoïdes sont des agonistes des récepteurs nicotiques de l'acétylcholine ; ils se lient fortement aux récepteurs de ces derniers dans le système nerveux central des insectes, provoquant une stimulation nerveuse à de faibles concentrations, mais aussi un blocage des récepteurs, la paralysie et la mort à des concentrations plus élevées. Les néonicotinoïdes se lient plus fortement aux nAChR des insectes qu'à ceux des vertébrés, de

sorte qu'ils sont sélectivement plus toxiques pour les insectes (Tomizawa and Casida, 2005). Ils peuvent être classés dans l'un des trois groupes chimiques suivants : les N-nitroguanidines (imidaclopride, thiaméthoxame, clothianidine et dinotefurane), les nitrométhylènes (nitenpyram) et les N-cyanoamidines (acétamipride et thiaclopride) (Jeschke et al., 2011). Ils sont généralement toxiques pour les insectes en quantités infimes.

Les néonicotinoïdes sont solubles dans l'eau et sont facilement absorbés par les plantes via leurs racines ou leurs feuilles, puis sont transportés dans tous les tissus de la plante. Grâce à leur forte toxicité pour les insectes, leur souplesse d'utilisation et leur activité systémique, les néonicotinoïdes sont rapidement devenus l'un des pesticides les plus utilisés au monde ; ils sont aujourd'hui utilisés plus que toute autre classe d'insecticides et représentent environ un quart de tous les insecticides utilisés (Jeschke et al., 2011; Pollack, 2011).

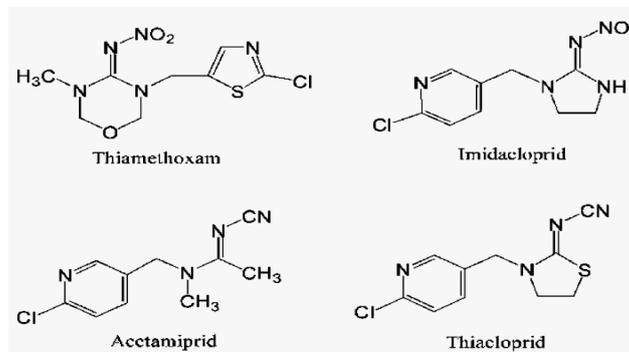


Figure 6: Structures chimiques des pesticides néonicotinoïdes (Ma et al., 2013).

1.3 Classification selon le mode d'entrée

1.3.1 Les pesticides systémiques

Les pesticides systémiques migrent dans toute la plante lorsqu'ils sont appliqués dans la région des racines, mais ce n'est pas le cas s'ils sont appliqués sur les feuilles seulement. En outre, certains pesticides sont considérés comme systémiques localement et ne migrent que du point de contact à une courte distance dans une plante. L'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) et le glyphosate sont des exemples de pesticides systémiques (Hassaan and El Nemr, 2020).

1.3.2 Les pesticides de contact

Les pesticides de contact sont ceux qui n'atteignent pas substantiellement les tissus végétaux et ne sont donc pas déplacés à l'intérieur du système vasculaire de la plante. Au contact, ces pesticides atteignent le corps de l'insecte à travers son épiderme et entraînent sa mort par empoisonnement. Le paraquat et le dibromure de diquat sont des exemples de pesticides de contact (Saari et al., 2019).

1.3.3 Les fumigants

Lors de l'application, ces pesticides forment des gaz toxiques qui pénètrent dans l'organisme de l'insecte par le système trachéal (respiratoire) via les spiracles et entraînent la mort de l'insecte. Certains ingrédients actifs des fumigants sont liquides lorsqu'ils sont conditionnés sous haute pression, mais se transforment en gaz lorsqu'ils sont libérés. D'autres ingrédients actifs, lorsqu'ils sont conditionnés dans une bouteille ordinaire et non formulés sous pression, sont des liquides volatils. Les fumigants sont utilisés pour éradiquer les parasites des fruits, des céréales et des légumes stockés et sont également utiles pour lutter contre les parasites du sol (Hassaan and El Nemr, 2020).

1.3.4 Poisons de l'estomac

Ce type de pesticides pénètrent par la bouche et le tube digestif vers l'organisme du ravageur et entraînent sa mort par empoisonnement. Cela arrive lorsque des ravageurs ingèrent l'insecticide ajouté aux feuilles et autres parties de la plante. Cette méthode est particulièrement adaptée à la lutte contre les vecteurs tels que les bactéries ou leurs poisons (Yadav and Devi, 2017).

1.3.5 Les répulsifs

Les pesticides répulsifs ne tuent pas ou ne détruisent pas les nuisibles mais sont suffisamment répugnants pour éloigner les nuisibles des zones ou des produits traités. Les répulsifs interfèrent également avec la capacité des ravageurs à trouver les cultures (Yadav and Devi, 2017).

2 Dégradation des pesticides

La dégradation fait référence à la décomposition ou à la transformation des pesticides dans l'environnement, qui implique des processus médiés par des réactions biotiques (microorganismes et plantes) et abiotiques (réactions chimiques et photochimiques) ; cette dégradation est le principal processus de perte de pesticides après l'application (Fenner et al., 2013).

La dégradation des pesticides par des processus métaboliques microbiens est considérée comme le principal mécanisme de transformation biologique ; les différents consortiums de microorganismes (principalement des bactéries et des champignons) peuvent participer à de nombreuses transformations biochimiques pour minéraliser les molécules (Chaplain et al., 2011). Ces microorganismes peuvent provoquer une grande modification de la structure des pesticides ; de nombreuses études indiquent que les microorganismes qui

participent à la biotransformation des pesticides ont tendance à être spécifiques d'un groupe, de substances, de liaisons chimiques et de structures chimiques (Cycon and Piotrowska-Seget, 2006).

Trois phases ont été décrites dans la biodégradation des pesticides :

- (a) dans la phase I, les propriétés initiales du composé sont transformées par des réactions d'oxydation, de réduction ou d'hydrolyse pour produire un métabolite plus soluble dans l'eau ;
- (b) dans la phase II, il y a conjugaison du pesticide ou du métabolite avec des sucres ou des acides aminés pour augmenter la solubilité dans l'eau et réduire la toxicité ;
- (c) la phase III consiste à transformer les métabolites de la phase II en conjugués secondaires pour les rendre excrétables et moins toxiques.

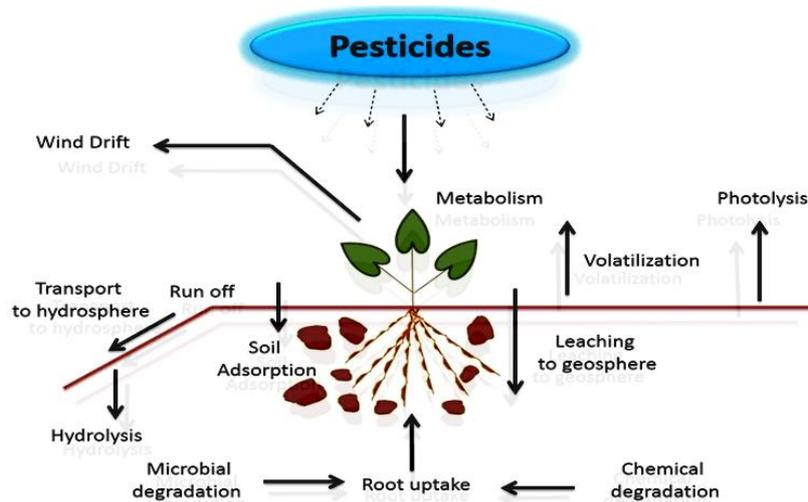


Figure 7: Schéma représentant la diffusion et la dégradation des pesticides dans l'environnement (Sudhanshu et al., 2020).

2.1 Dégradation chimique

Les réactions d'hydrolyse et d'oxydo-réduction sont les principaux mécanismes par lesquels un pesticide peut être transformé chimiquement. En général, ces réactions se produisent en raison de la présence d'acidité ou d'alcalinité dans le sol et dépendent donc du pH du sol. D'autres facteurs importants influencent la transformation chimique tels que la solubilité chimique du pesticide, la température et l'humidité du sol (Rahm et al., 2005).

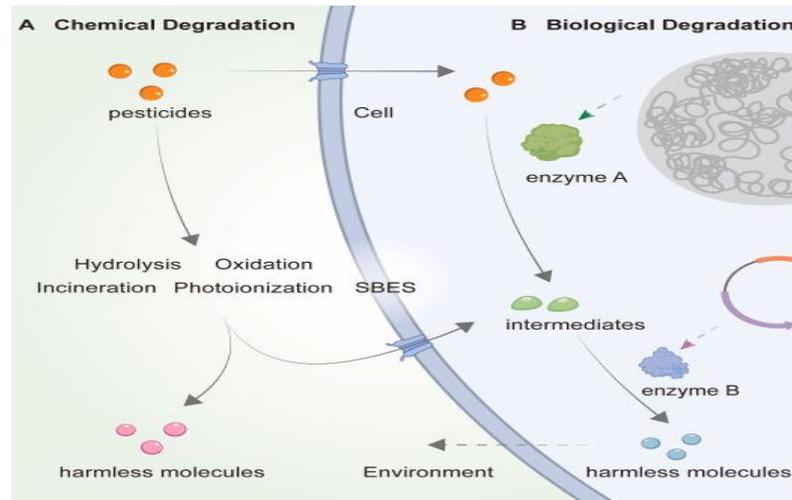


Figure 8: Schéma de dégradation chimique et biologique des pesticides (Bi Ruomeng *et al.*, 2023).

2.1.1 Hydrolyse

Les réactions d'hydrolyse sont généralement catalysées en présence d'hydrogène ou d'ions hydroxydes, et par conséquent, la disponibilité de l'eau et le pH sont les facteurs clés. Plusieurs groupes fonctionnels sont susceptibles de réagir de manière hydrophile, comme les amides, les époxydes, les lactones, les esters d'acide phosphorique et sulfonique, et les esters d'acide carboxylique. La catalyse des ions métalliques favorise l'hydrolyse par le biais de deux mécanismes :

- (a) la polarisation directe, où le métal coordonne la fonction hydrolysable rendant le composé plus électrophile et réactif ;
- (b) la génération "*in situ*" d'espèces réactives d'hydroxydes métalliques (Chaplain *et al.*, 2011).

2.1.2 Réactions d'oxydo-réduction

Les réactions d'oxydo-réduction impliquent les électrons de transition de l'espèce oxydée avec un gain/une perte d'électrons. Pour oxyder ou réduire un pesticide, il faut qu'il y ait dans le sol un composé chimique capable de se comporter comme un accepteur ou un donneur d'électrons. L'oxydation peut avoir lieu grâce à des enzymes oxydatives ou des catalyseurs abiotiques tels que les oxydes métalliques (Chaplain *et al.*, 2011). La réduction des pesticides se produit dans les sols mal drainés ou recevant des eaux souterraines, des zones humides ou des réservoirs inondés. La nature des agents réducteurs comprend des produits chimiques ou des réactifs abiotiques comme la matière organique, des produits biochimiques extracellulaires comme des métaux chélatés ou des coenzymes (Kappler and Haderlein, 2003).

2.2 Photo-dégradation

La photo-dégradation est l'un des moyens les plus destructeurs pour les pesticides de réduire leur demi-vie dans l'environnement (Katagi, 2004). Au cours de la photolyse, l'énergie rayonnante sous forme de photons rompt les liaisons chimiques, directement ou indirectement. L'absorption instantanée du photon par le composé entraîne la rupture ou la réorganisation de la liaison pour former un composé plus stable. Dans la photolyse indirecte, un photo-sensibilisateur absorbe la lumière et produit une série d'espèces réactives qui peuvent dégrader le pesticide ; la matière organique peut servir de photo-sensibilisateur (Remucal, 2014). L'intensité de la lumière solaire, la durée d'exposition, les propriétés du pesticide et la méthode d'application sont des facteurs qui affectent la vitesse de la photolyse. Les pesticides appliqués sur le feuillage ou à la surface du sol sont plus sensibles à la photolyse que ceux incorporés dans les sols (Tiryaki and Temur, 2010).

3 Impacts des pesticides

3.1 Impact des pesticides sur l'écosystème du sol

L'application fréquente de diverses formes de pesticides pour augmenter le rendement des cultures peut entraîner une contamination du sol. En plus de sa toxicité contre les insectes et les mauvaises herbes ciblés ; elle agit également contre les insectes non ciblés et bénéfiques, les plantes non ciblées et d'autres organismes tels que les oiseaux et les poissons ainsi que les abeilles (Mishra et al., 2020). Le sol est une source primaire de contamination par les pesticides dont la toxicité est supérieure à celle d'un autre écosystème. Les pesticides appliqués sur les champs agricoles sont directement déposés sur le sol (Figure 9). Ils peuvent y persister pendant quelques semaines à quelques années avec une toxicité élevée et ainsi altérer les conditions physico-chimiques du sol (Kafaei et al., 2020). Par conséquent, cela peut réduire la fertilité du sol, la diversité microbienne bénéfique et les propriétés physicochimiques. Il peut aussi causer des dommages au niveau génomique aux organismes hôtes (Yu et al., 2020). Les pesticides hydrosolubles tels que les herbicides, les carbamates, les fongicides et les insecticides organophosphorés contenus dans les sols pollués peuvent se propager à l'écosystème aquatique voisin par le biais d'activités d'altération naturelle telles que le ruissellement et la lixiviation (Nie et al., 2020). Les pesticides étant des produits chimiques susceptibles de modifier le pH du sol, cela entraîne des changements radicaux dans le biote du sol. Il en résulte une rupture massive du processus de cycle des nutriments du sol en raison d'un manque de microbes bénéfiques tels que les microbes fixateurs d'azote, les

microbes solubilisateurs de phosphate, et les microbes décomposeurs organiques (Fiorenza et al., 2020).

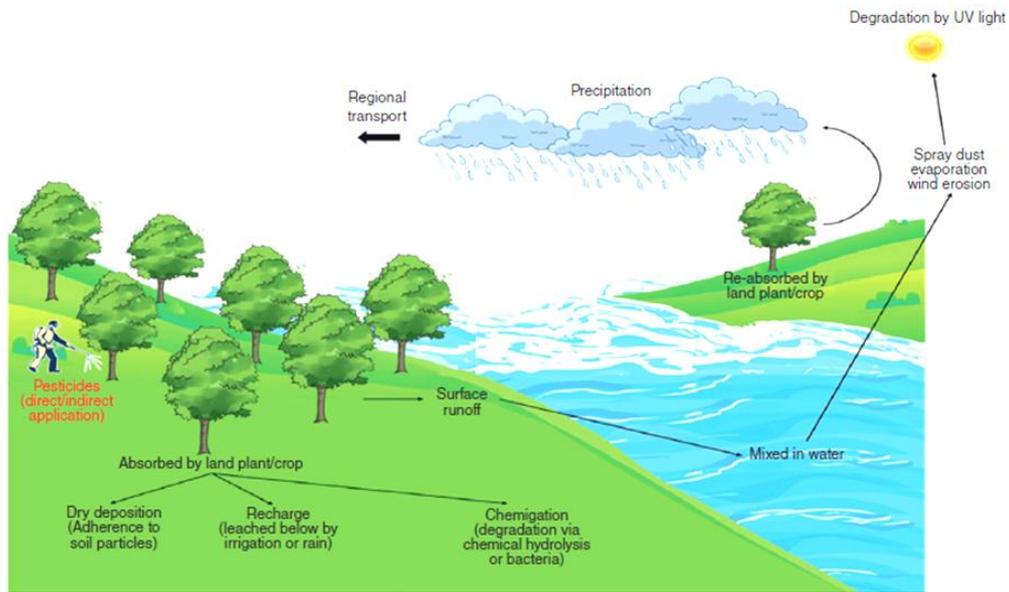


Figure 9: Les différentes sources et voies de contamination par les pesticides dans l'environnement (Singh et al., 2023).

3.2 Impacts des pesticides sur l'écosystème aquatique

Les pesticides ne sont pas volontairement utilisés directement dans le système aquatique. Néanmoins, plusieurs résultats de recherche indiquent que les écosystèmes marins ont été gravement affectés par les pesticides et d'autres polluants chimiques (Tan et al., 2020). La biotransformation des résidus de pesticides et des contaminants en créatures aquatiques est possible par l'ingestion de proies, de particules de sédiments et de débris pollués par des produits chimiques. Ces facteurs déterminent le taux de bioconcentration (Wang et al., 2020). Des recherches ont trouvés le pesticide interdit DDT accumulés dans les organes de plusieurs organismes aquatiques et cela grâce à un bio-transfert tout au long de la chaîne alimentaire (Figure 10).

L'accumulation excessive de pesticides chez les êtres vivants entraîne une interruption de l'absorption alimentaire, de la métabolisation et de l'évacuation. Ainsi, lorsque le pesticide atteint le système aquatique à partir de sites terrestres, il se dissout initialement et s'accumule sur de petites créatures telles que le plancton (phytoplancton et zooplancton) qui sont ingérés par des poissons (Suanon et al., 2020).

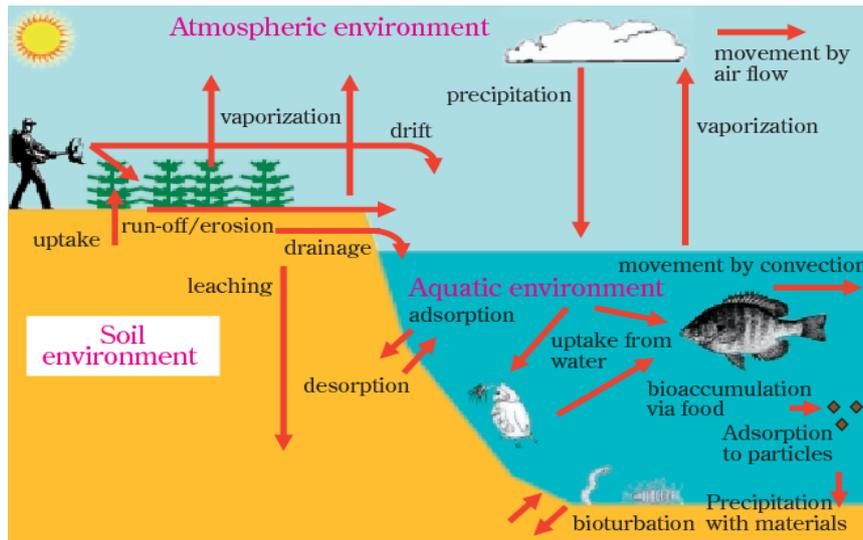


Figure 10: Évaluation du risque écotoxicologique des pesticides dans les écosystèmes aquatiques (Muhammad Bilal et al., 2019).

3.3 Impacts des pesticides sur la santé humaine

Outre les écosystèmes du sol et de l'eau, les pesticides peuvent causer des problèmes de santé directs et indirects chez l'homme. L'exposition accidentelle (la personne qui consomme des aliments contaminés par des pesticides) et fréquente (les agriculteurs) des humains aux pesticides peut entraîner des problèmes de santé aigus (à court terme) et chroniques (persistant pendant plusieurs mois ou années)(Jiao et al., 2020). Les effets aigus sur la santé, tels que les yeux irrités, les nausées, les épidémies, les gonflements, la cécité, l'évanouissement, la diarrhée et même la mort, peuvent survenir en fonction du volume d'exposition aux pesticides. Les personnes qui ont manipulé les pesticides sans respecter les procédures de sécurité appropriées sont plus vulnérables aux problèmes de santé chroniques tels que divers types de cancers, des naissances malformées, des défaillances partielles ou complètes des systèmes de reproduction, des maladies respiratoires, des anomalies du système neurologique, l'immunotoxicité et des perturbations du système endocrinien (Fantke and Jolliet, 2016). Les effets sur la santé peuvent varier en fonction de l'âge, du volume et de l'intervalle d'exposition aux pesticides. Parmi les différents groupes d'âge, les nourrissons et les jeunes sont plus sensibles aux pesticides que les adultes. Néanmoins, les agriculteurs, les ouvriers agricoles et les opérateurs de pulvérisateurs de pesticides sont plus vulnérables car ils sont en contact direct avec les différents types de pesticides.

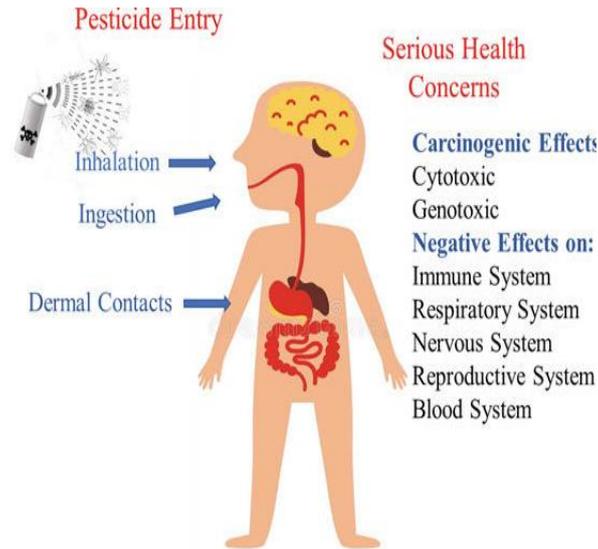


Figure 11: Voies et effets d'exposition aux pesticides sur la santé humaine (Sajjad *et al.*, 2021).

3.3.1 Effets aigus sur la santé humaine

Les effets aigus sur la santé sont plus fréquents chez les personnes qui utilisent des pesticides. Lorsque les personnes sont exposées à des sites pollués par des pesticides et ingèrent des aliments ou de l'eau contaminés par des pesticides, elles sont confrontées à des problèmes de santé graves tels que des brûlures de la peau, des irritations du nez et de la gorge, des gonflements et des éruptions cutanées, ainsi que des vertiges, des nausées et des diarrhées (Margni *et al.*, 2002). Les personnes souffrant de problèmes respiratoires comme l'asthme sont plus vulnérables et doivent faire face à de graves impacts sur la santé, en particulier lors de l'utilisation de pesticides tels que les carbamates, les organophosphates et les pesticides pyréthroïdes (Nicolopoulou-Stamati *et al.*, 2016).

Les symptômes les plus courants des effets aigus des pesticides sur la santé sont similaires à ceux d'un simple rhume ; par conséquent, un plus grand nombre d'effets des pesticides sur la santé sont mal diagnostiqués et sous-déclarés. Ainsi, plusieurs problèmes de santé liés aux pesticides ne sont même pas identifiés par les médecins, et seuls les cas d'empoisonnement aux pesticides reçoivent une attention médicale et un traitement (Karunamoorthi *et al.*, 2012).

3.3.2 Effets chroniques sur la santé

Les personnes fréquemment exposées aux pesticides peuvent subir des effets chroniques sur la santé, tels que différents types de cancer, des tumeurs, des dommages réversibles ou irréversibles au cerveau et au système nerveux, des possibilités d'infertilité, des problèmes de reproduction, des dommages graves aux organes essentiels tels que les

poumons, le foie, les reins, etc. L'identification des effets chroniques des pesticides sur la santé est assez difficile car ils peuvent persister pendant plusieurs mois, voire une année. Les médecins sont donc incapables de reconnaître les problèmes de santé identifiés chez une personne, qu'ils soient dus à la toxicité des pesticides ou à un autre problème (Cole et al., 2011).

4 Pesticide d'intérêt: Imidaclopride

4.1 Description et propriétés physicochimiques

L'imidaclopride [1-[(6-chloro-3-pyridinyl)methyl]-N-nitro-2-imidazolidinimine] est le premier insecticide néonicotinoïde à avoir été approuvé à l'utilisation et reste le produit commercial le plus important. Il fut découvert en 1984 par des chimistes de Nihon Bayer Agrochem qui étudiaient l'introduction d'un groupe 3-pyridylméthyle sur la structure de l'hétérocycle nitrométhylène (Shiokawa et al., 1986). C'est un insecticide néonicotinoïde à large spectre, doté d'une excellente activité systémique et de contact qui justifie son utilisation sur de nombreuses cultures agricoles, gazons et plantes horticoles, ainsi que pour la lutte contre les termites et les puces. Depuis la découverte de l'imidaclopride, plusieurs autres analogues chimiques avec la fraction 6-chloro-3-pyridylméthyle ont été développés.

4.2 Activité nicotinique

4.2.1 Chez les insectes

L'activité insecticide des néonicotinoïdes est attribuée à des actions sur les récepteurs nicotiques post-synaptiques chez les insectes situés exclusivement dans le système nerveux central. Chez ces derniers, de multiples sous-types de récepteurs nicotiques ont été identifiés qui expriment des propriétés physiologiques et pharmacologiques différentes (Gundelfinger and Schulz, 2000). En ce qui concerne les néonicotinoïdes, il a été déterminé que l'imidaclopride agit sur au moins trois sous-types pharmacologiquement distincts de récepteurs nicotiques chez la blatte (Buckingham et al., 1997).

Chez les insectes le traitement néonicotinoïde produit une réponse biphasique, consistant en une augmentation initiale de la fréquence des décharges spontanées suivie d'un blocage complet de la propagation de l'influx nerveux (Schroeder and Flattum, 1984). Les signes d'intoxication chez la blatte américaine (*Periplaneta americana*) après exposition à l'imidaclopride consistent en un frémissement abdominal non coordonné, une flexion des ailes, des tremblements et des secousses violentes de tout le corps, suivie de la mort (Schroeder and Flattum, 1984).

L'activité insecticide est considérablement renforcée par les synergistes qui inhibent la dégradation oxydative (Liu and Casida, 1993), ce qui semble justifier l'inclusion d'un synergiste dans les formulations commerciales.

4.2.2 Chez les mammifères

Les tissus des mammifères contiennent de nombreux sous-types de récepteurs nicotiques qui sont dérivés de cinq sous-unités homologues, dans des combinaisons formées de neuf sous-unités α , quatre sous-unités β, γ, δ et ϵ (Tomizawa et al., 1999).

Chez les mammifères, les récepteurs nicotiques sont situés dans de nombreux tissus, notamment les ganglions autonomes, les muscles squelettiques (jonction neuromusculaire), la moelle épinière et un certain nombre de régions du cerveau. Les différences dans les propriétés de liaison aux divers sous-types de récepteurs contribuent largement à l'activité beaucoup plus faible des néonicotinoïdes dans les tissus des vertébrés, par rapport aux tissus des insectes (Yamamoto et al., 1998). La spécificité relative du récepteur nicotique chez les insectes est utilisée pour sélectionner les composés à développer commercialement.

La toxicité aiguë (définie par la puissance létale) de divers insecticides néonicotinoïdes et analogues apparentés chez les mammifères est le plus étroitement liée à la puissance au niveau du sous-type de récepteur nicotique α_7 , avec une relation décroissante rapportée séquentiellement au niveau des récepteurs nicotiques $\alpha_4, \beta_2, \alpha_3$ et α_1 (Tomizawa and Casida, 1999).

Cependant, la toxicité aiguë chez les mammifères implique des actions complexes sur de multiples sous-types de récepteurs, avec une spécificité relative du sous-type conférée par des changements structurels minimes. En outre, les actions des néonicotinoïdes sur ces sous-types de récepteurs impliquent une combinaison d'activités agonistes et antagonistes (Nagata et al., 1998).

4.3 Métabolisme et toxicocinétique

Il existe deux voies principales de métabolisation chez les mammifères. La première implique un clivage oxydatif en imidazolidine et en acide 6-chloronicotinique, avec la partie imidazolidine étant excrétée dans l'urine. La fraction nicotinique est ensuite dégradée par conjugaison au glutathion en un dérivé de l'acide mercapturique, puis en acide méthylmercapto-nicotinique. Cette partie est également conjuguée à la glycine pour former un conjugué d'acide hippurique qui sera excrété. La deuxième voie importante de la biotransformation de l'imidaclopride implique l'hydroxylation de la molécule intacte de

l'anneau imidazolidine, suivie de l'élimination de l'eau et de la formation d'un métabolite insaturé.

L'imidaclopride est absorbée et largement distribuée dans les organes dans l'heure qui suit l'administration orale à des rats. L'autoradiographie du corps entier indique que l'imidaclopride n'est pas distribuée dans les tissus adipeux, dans les tissus du système nerveux central (SNC) ou dans les composants minéraux des os. Ces résultats indiquent un faible potentiel d'accumulation et une faible pénétration de la barrière hémato-encéphalique, du moins jusqu'à des doses de 20 mg/kg de poids corporel. Une faible pénétration de la barrière hémato-encéphalique a également été rapportée avec d'autres néonicotinoïdes (Yamamoto *et al.*, 1995). Cette propriété réduit leur accès aux récepteurs nicotiques du SNC, de sorte que des effets à médiation centrale ne sont pas attendus à de faibles niveaux d'exposition.

Chapitre II : Les métaux lourds

1. Introduction

En raison de leur toxicité chronique, de leur non-biodégradabilité et de leur bioaccumulation dans l'environnement, les métaux lourds sont des polluants environnementaux extrêmement nocifs (Valdés *et al.*, 2014). Ils peuvent être transférés et bio-amplifiés par les chaînes alimentaires (Liu *et al.*, 2018). Les schémas de bioaccumulation des métaux lourds, tels que le mercure (Hg), l'arsenic (As), le nickel (Ni), le cobalt (Co), le cuivre (Cu), le cadmium (Cd) et le Plomb (Pb), ont une influence significative sur la vie des organismes vivants (Rahman and Singh, 2019); ainsi, les métaux lourds provenant de différentes sources de contamination ont une influence négative sur le biote marin (Kahlon *et al.*, 2018), et sur la santé humaine (Figure 12).

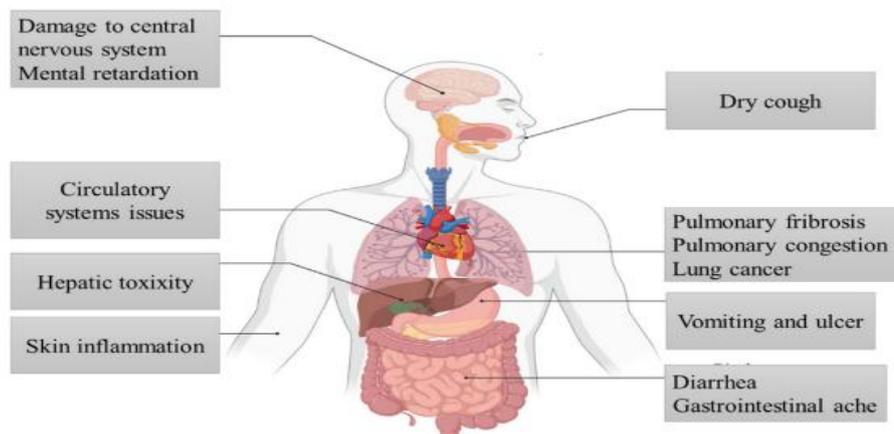


Figure 12: Les effets toxiques des métaux lourds sur la santé humaine (Zamora-Ledezma *et al.*, 2021).

Selon plusieurs études de recherche, la concentration de la bioaccumulation des métaux lourds diffère considérablement d'une espèce marine à l'autre. Les variations de leur accumulation chez les organismes aquatiques sont probablement liées à leurs différents milieux de vie, modes d'alimentation et niveaux trophiques (Liu *et al.*, 2018 ; Rajeshkumar *et al.*, 2018).

2 Sources des métaux lourds

Les activités anthropiques sont les principaux facteurs de l'augmentation de la toxicité environnementale due aux métaux lourds. Par contre, les sources naturelles comprennent les débris de sol emportés par le vent, les incendies de forêt, les éruptions volcaniques, les processus biogéniques et le sel marin (Muhammad *et al.*, 2011). Les causes anthropiques de la

contamination par les métaux lourds comprennent les opérations minières, l'utilisation de pesticides, d'engrais et d'herbicides, l'irrigation des champs de culture avec des eaux industrielles et des eaux usées (Sarkar et al., 2018 ; Srivastava et al., 2018)(Figure 13). Les niveaux de traces des métaux lourds dans les engrais sont des sources importantes de contaminants de notre alimentation. La gestion inappropriée des déchets industriels, la pollution routière, l'utilisation du Pb comme antidétonant dans les carburants, les bombes aérosols, la métallurgie et la fonte, le rejet des eaux usées et des matériaux de construction sont les pratiques anthropiques responsables de la contamination par les métaux lourds (Srivastava et al., 2017).

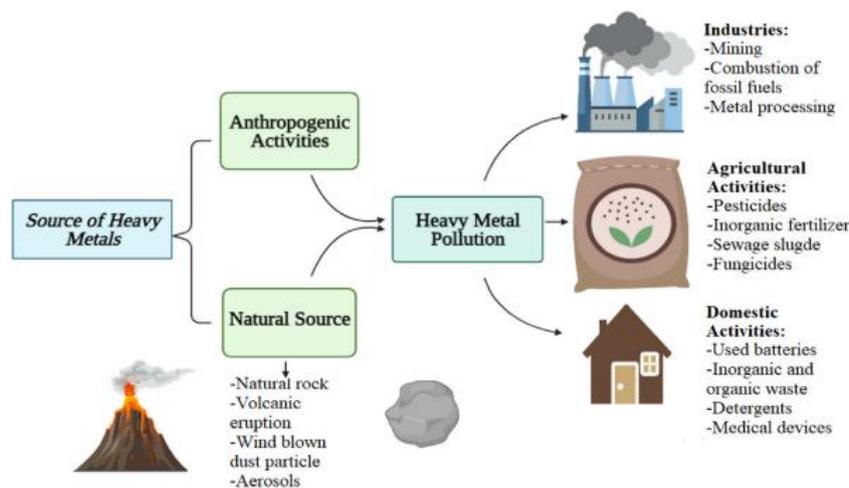


Figure 13: Principales sources de métaux lourds (Zamora-Ledezma et al., 2021).

3 Métal d'intérêt 01: Cadmium

3.1 Généralités

Le cadmium (Cd) est un métal divalent, malléable, ductile et blanc argenté. La toxicité aiguë du Cd est rare de nos jours, mais la toxicité chronique peut survenir en raison d'une protection inadéquate dans les industries manipulant des produits à base de Cd et dans les situations où la contamination de l'environnement entraîne des niveaux élevés de Cd dans les aliments (Patwa and Flora, 2020). Les concentrations élevées du Cd sont souvent associées à des sources d'émissions industrielles telles que les exploitations minières et les fonderies. Ses principales utilisations industrielles sont la galvanoplastie, les pigments et, en particulier, les stabilisants de plastiques et les batteries rechargeables Ni-Cd²⁺.

L'exposition chronique au Cd est associée à plusieurs problèmes de santé, notamment la tératogénicité, la cancérogénicité, l'hépatotoxicité, la néphrotoxicité ainsi que des problèmes

d'infertilité. Ce métal lourd est éliminé très lentement de l'organisme ; il peut y rester jusqu'à 15 à 30 ans selon les tissus. Une cigarette contient environ 1-2 μg Cd, et en moyenne environ 10% est inhalé pendant le tabagisme.

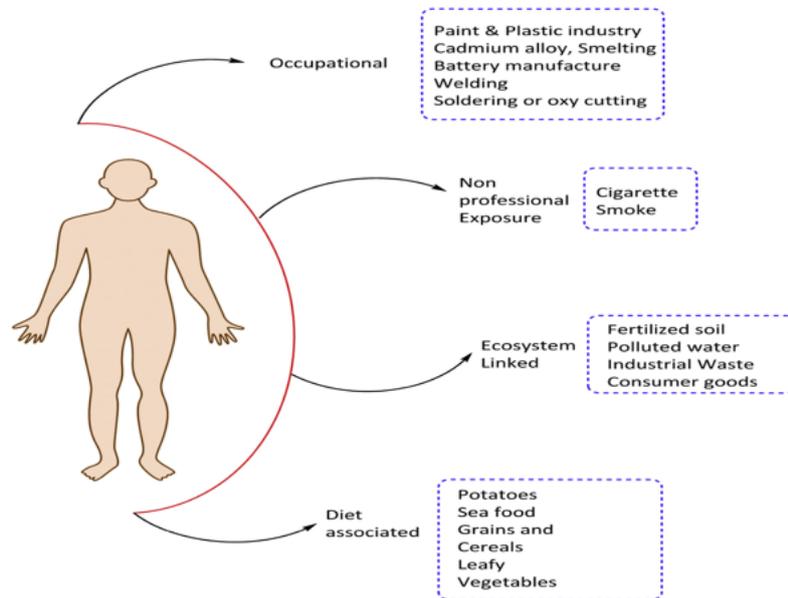


Figure 14: Les différentes sources de contamination au cadmium (Jayant et al., 2022).

3.2 Toxicocinétique

Une fois absorbé, le Cd est rapidement éliminé du sang et se concentre dans divers tissus, en particulier le foie et les reins, provoquant de nombreux changements métaboliques et histologiques, des lésions membranaires ainsi que le déclenchement de l'apoptose. Divers transporteurs d'ions métalliques divalents sont impliqués dans l'absorption du Cd, notamment ZIP14, DMT1 et ATP7A. Il a été rapporté que le Cd entraînait une plus forte expression de ZIP14, DMT1 et ATP7A autour des cellules épithéliales résorbables et de la lamina propria dans le tissu du duodénum (Ohta and Ohba, 2020). Il est d'abord lié à l'albumine dans le plasma sanguin, puis il est absorbé par les cellules sanguines. Le Cd est lié en partie à une protéine de poids moléculaire élevé et en partie à une protéine de même poids moléculaire que la métallothionéine (MT). Le Cd lié à l'albumine dans le plasma est ensuite transporté vers le foie où le complexe subit une dégradation avec libération de Cd, qui induit à son tour la synthèse de la métallothionéine. Le complexe Cd-MT est absorbé par les tubules rénaux par endocytose médiée par le transporteur ZIP8, suivie par la libération du Cd de la MT dans les lysosomes des cellules tubulaires. Chez l'homme, la demi-vie du Cd dans les reins est estimée à 10-40 ans.

3.3 Mécanismes d'action

L'exposition au Cd a un impact négatif sur le système immunitaire. A faibles doses, cette exposition stimule la réponse immunitaire ; cependant, à des doses plus élevées, elle supprime la réponse immunitaire. Elle peut également activer les macrophages, ce qui entraîne la sécrétion de divers médiateurs et cytokines intracellulaires tels que le monoxyde d'azote (NO), le TNF- α , l'IL-1, l'IL-6, et d'autres amines vasoactives qui sont chimiotactiques (Rikans and Yamano, 2000).

L'exposition au Cd à des niveaux relativement élevés et bas provoque respectivement la nécrose et l'apoptose, ce qui suggère que le mode de mort cellulaire induit par le Cd dépend du niveau d'exposition (Satoh *et al.*, 2003). Le Cd peut imiter et interférer avec des éléments essentiels perturbant les protéines (structurelles et antioxydantes), modifier les activités des enzymes de phosphorylation oxydative et altérer l'expression des gènes, conduisant ainsi à l'échec de la reproduction (Da Silva *et al.*, 2020).

3.3.1 Stress oxydatif

L'augmentation du niveau de la peroxydation lipidique après l'administration du Cd dans le foie, les reins, les testicules et le sang des rats a été impliquée dans divers dommages et dysfonctionnements des organes (Casalino *et al.*, 2002)(Figure 15). La production des espèces réactives d'oxygène (ROS) a entraîné une augmentation de la réponse inflammatoire dans les organes reproducteurs, notamment les testicules, les ovaires et le placenta. Le Cd affecterait la libération d'acétylcholine (ACh) à la jonction neuromusculaire chez les grenouilles et inhiberait l'activité de certaines enzymes dans le cerveau. Il est généralement admis que les métaux désactivent la cholinestérase (ChE) en se liant à son site anionique, empêchant ainsi l'ACh de se lier à la ChE et de se dégrader. Une diminution générale de l'activité de la SOD, de la CAT, de la GPx et de l'acétylcholinestérase ainsi qu'une augmentation des niveaux de malondialdéhyde (MDA) après un traitement aux métaux lourds ont également été observées, ce qui démontre que le Cd peut altérer la fonction et l'ultrastructure du système nerveux central (SNC) par le stress oxydatif (Zhang *et al.*, 2009). Wang *et al.* (2019) a signalé que l'exposition au Cd des cellules de Leydig de souris augmentait le niveau de ROS, ce qui entraînait l'activation des protéines liées à l'apoptose en aval, telles que Caspase-3 et PARP.

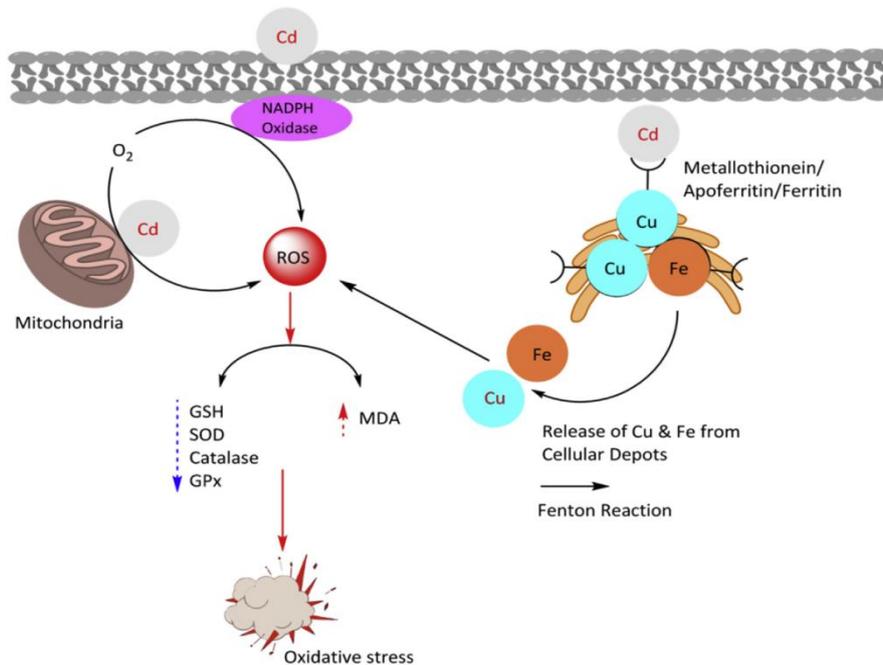


Figure 15: Mécanismes du stress oxydatif induit par le cadmium (Jayant *et al.*, 2022).

3.4 Toxicité

Le Cd est un élément extrêmement toxique. Chez l'homme une intoxication chronique ou aiguë peut entraîner des effets critiques sur divers organes notamment : les poumons, les reins et même les os. Ce métal est également cancérigène et délétère pour le processus de reproduction provoquant des retards de croissance, la stérilité et des effets embryotoxiques. L'exposition au Cd est souvent combinée à d'autres facteurs tels que la fumée de cigarette et la pollution provenant des raffineries et des générateurs de combustibles fossiles ainsi qu'aux pesticides. Une exposition prénatale entraîne un risque accru de problèmes émotionnels, et peut également influencer la santé mentale de la génération suivante (Sioen *et al.*, 2013). Des études ont également montré que le Cd modifie les neurotransmetteurs impliqués dans la régulation du niveau hypothalamique, altérant la sécrétion de l'hormone gonadotrophine et affectant la morphologie et la fonction des testicules et des ovaires (Lafuente, 2013).

3.4.1 Effets sur le système reproductif masculin

Des modifications testiculaires dues à la toxicité du Cd ont été observées dans divers modèles animal à différents stades de croissance et de maturité. La pathogénicité testiculaire induite par ce dernier comprend de graves hémorragies, œdèmes, nécroses et atrophies, ainsi qu'une réduction du nombre et de la mobilité des spermatozoïdes et une diminution des concentrations de testostérone dans le plasma et les testicules (Figure 16). Fumer une cigarette libère du Cd qui induit la production des ROS dans le plasma séminal, endommageant ainsi diverses protéines, lipides et acides nucléiques, ce qui altère la morphologie des

spermatozoïdes et provoque l'infertilité masculine. Une méta-analyse publiée suggère que la teneur élevée en Cd dans le sperme est un facteur causal de l'infertilité (Zhang *et al.*, 2019).

Les enzymes antioxydants jouent un rôle très important dans la régulation du niveau du stress oxydatif, mais l'exposition au Cd réduit leur fonction soit en remplaçant leur cofacteur métallique, soit en diminuant leur synthèse. Yang *et al.* (2019) ont rapporté que l'exposition au Cd diminuait significativement la cascade de signalisation Nrf2/ARE dans les cellules de Leydig de souris, qui est une voie de signalisation clé pour la synthèse de ces enzymes. Li *et al.* (2019) ont rapporté que l'exposition au Cd augmente la testostérone à la puberté, en plus des niveaux de gonadotrophines, y compris la LH et la FSH. Ces changements hormonaux ont été corrélés avec le dysfonctionnement reproductif masculin induit par les métaux. Il a été suggéré que le testicule des mammifères était plus sensible que d'autres organes en raison de sa vascularisation unique, et le système vasculaire est en effet une cible majeure de la toxicité du Cd. Outre un système vasculaire unique, il existe d'autres facteurs, tels que des différences génétiques, qui rendent les testicules plus sensibles aux dommages causés par l'exposition au Cd.

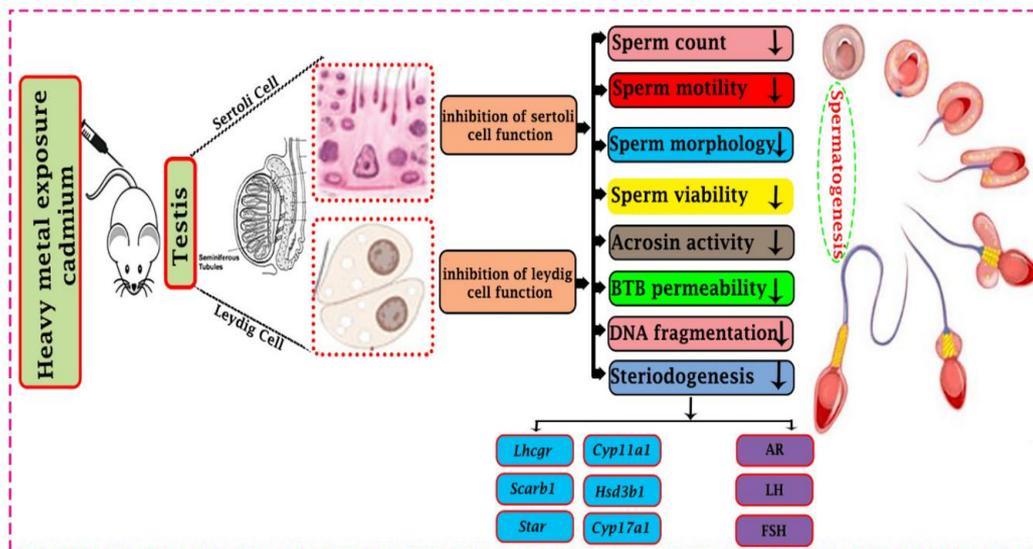


Figure 16: Effets de la toxicité du cadmium sur l'activité fonctionnelle d'un organe reproducteur mâle (Waseem Ali *et al.*, 2022).

3.4.2 Effets sur le système reproductif féminin

L'exposition au Cd est associée à diverses complications reproductives chez la femme, notamment une altération de la stéroïdogénèse, des lésions placentaires, un retard de la puberté, des troubles du cycle menstruel, une altération des hormones reproductives, des naissances prématurées et une réduction du poids à la naissance (Ali *et al.*, 2023). L'étude

préclinique suggère que l'exposition au Cd pendant la période de gestation a empêché l'implantation ou a provoqué une diminution des sites d'implantation, un plus grand nombre de résorptions, un plus petit nombre de fœtus, et donc une incidence moindre de la grossesse. Pendant la grossesse, le Cd peut cibler le placenta et l'utérus pour exercer ses effets toxiques et diminue l'implantation, et peut-être l'activité anormale des enzymes liées à l'implantation : la cathepsine-D et la phosphatase alcaline (Jacobo-Estrada *et al.*, 2017).

De nouvelles données suggèrent que le Cd agit comme perturbateur endocrinien sur l'hypophyse, l'ovaire et le placenta (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2021). Récemment, Xiong *et al.* (2021) ont signalé qu'une exposition au Cd réduisait l'expression de la protéine VEGF-A (un indicateur clé de l'angiogenèse) et du récepteur de la progestérone dans les trophoblastes placentaires. En outre, l'exposition au Cd a réduit de manière significative le niveau de progestérone, diminue l'expression de la progestérone synthase clé (StAR, CYP11A1) et active la réponse au stress mitochondrial et la signalisation GCN-2/p-eIF2a dans les trophoblastes placentaires (Figure 17).

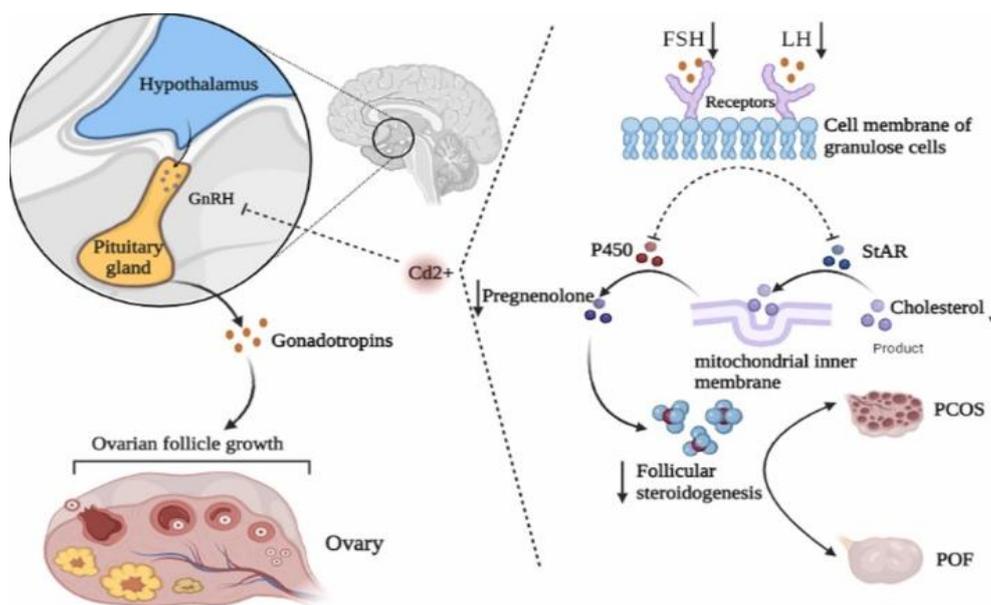


Figure 17: Le Cd en tant que perturbateur endocrinien (Qu *et al.*, 2022).

3.4.3 Toxicité sur le développement

Des études menées par Samuel *et al.* (2011) suggèrent que le traitement gestationnel au Cd induit une toxicité ovarienne en perturbant l'histo-architecture ovarienne et prolonge le cycle œstral avec un retard pubertaire et un dysfonctionnement reproductif par l'augmentation du stress oxydatif. L'embryogenèse commence par la fécondation d'un ovule par un

spermatozoïde, plusieurs voies moléculaires clés sont impliquées, notamment Fgf, Hedgehog, Wnt, TGFβ et Notch, parmi les plus importantes (Valet *et al.*, 2022).

Le SNC (Système nerveux centrale) des nouveau-nés est très sensible aux métaux lourds. L'exposition au Cd pendant la gestation et au début de la période postnatale peut être plus toxique pour le SNC en développement en raison de l'absence d'une BHE (barrière hémato-encéphalique) fonctionnelle, une prolifération cellulaire intense, la différenciation et la synaptogenèse (Ortega *et al.*, 2021). En outre, le Cd peut perturber les composants structurels de la BHE en causant des lésions aux cellules endothéliales, gliales et épithéliales, ainsi que perturbation de la formation des jonctions lacunaires. En outre, le Cd augmente le Ca^{2+} intracellulaire dans les neurones et peut provoquer la mort neuronale. Le Cd provoque une tératogénicité en raison de l'augmentation du stress oxydatif et de l'activation des voies apoptotiques (Dasharathy *et al.*, 2022).

Il est bien connu que le Cd est transféré de la maman au fœtus au cours des trois premières semaines suivant la naissance, une exposition pendant la grossesse et l'allaitement a des effets critiques sur le poids et le cerveau du bébé. La charge toxique accrue de Cd après une exposition précoce au cours du développement (c'est-à-dire *in utero* et pendant la période de lactation) peut endommager les enzymes de biotransformation hépatique de la génération F1 en fonction du sexe (Robinson *et al.*, 2011).

4 Métal d'intérêt 02 : Plomb

4.1 Généralités

Le plomb (Pb) est le polluant environnemental le plus toxique, et sa dispersion ne cesse d'augmenter dans l'environnement en raison de l'utilisation extensive de produits contenant du Pb, notamment les batteries, les peintures, les pigments et le plastique (Turner and Filella, 2021). Les symptômes les plus courants de l'intoxication aiguë au Pb sont les suivants : douleurs abdominales, nausées, vomissements, diarrhée, faiblesse musculaire et constipation. L'intoxication chronique affecte plusieurs organes en fonction de l'accumulation du Pb. Les tissus mous sont plus sensibles en raison d'une accumulation plus importante. Les plus sensibles au Pb sont les nourrissons, les enfants et les femmes enceintes (Kabamba and Tuakuila, 2020).

Les recherches axées sur la toxicité reproductive induite par le Pb sur la base d'études épidémiologiques ont montré une corrélation entre l'infertilité masculine et l'exposition professionnelle au Pb (Chen *et al.*, 2012). Il peut causer des dommages aux cellules de Leydig,

aux spermatogonies, à la vésicule séminale et à l'épididyme du testicule(Ilieva et al.,2020).Une augmentation du Pb dans le sang peut réduire le volume et la densité du sperme. En outre, l'analyse du sperme suggère que le niveau élevé de Pb dans le sperme pourrait induire diverses anomalies dans les spermatozoïdes, y compris des défauts au niveau de la tête ou de la queue des spermatozoïdes, de la motilité des spermatozoïdes et des dommages à l'ADN (Zhang et al., 2014).

4.2 Toxicocinétique

Les études de toxico-cinétiques suggèrent que l'absorption de Pb chez l'homme se produit principalement par inhalation et ingestion. Les enfants ont un taux d'absorption du Pb plus élevé que les adultes. Selon des rapports antérieurs, les enfants absorbent de 30 % à 50 % de Pb par voie gastro-intestinale, alors que les adultes n'absorbent que 5 % à 10 % (Sridevi Sangeetha and Umamaheswari, 2020).Le transporteur de métaux divalents 1 (DMT1) régule son absorption intestinale. Ce transporteur joue également un rôle dans l'absorption du Pb par la BHE, le placenta et les ovocytes chez l'homme. Une étude *in vitro* a remarqué que les fibroblastes de reins embryonnaires humain (cellules HEK293) sur-exprimant DMT1 et montraient également une absorption plus élevée de Pb que les cellules HEK293 sans une surexpression de DMT1 (Bannon et al., 2002).

Le Pb se répartit dans plusieurs compartiments de l'organisme, chacun ayant une demi-vie différente. Lorsque le Pb pénètre dans la circulation sanguine, il se fixe sur les globules rouges (GR) et a une demi-vie d'environ 25 jours (Leal et al., 2023). Le Pb traverse facilement le placenta, exposant ainsi le fœtus en développement et son système nerveux. Il est également stocké dans les muscles, où il a une demi-vie plus longue d'environ 40 jours(Collin et al., 2022).

Les besoins en calcium des enfants sont plus élevés que ceux des adultes et cela est en partie à cause de la croissance rapide des os. Le plomb se substitue facilement au calcium et est stocké dans les os, avec une demi-vie dans est d'environ 20 ans (Ciosek et al., 2021). Toutefois, si le renouvellement des os est accru, le Pb est donc mobilisé dans le sang à partir de ces derniers.

Le GSH, la mitochondrie et δ -ALAD jouent un rôle essentiel dans la toxico-cinétique du Pb. Le Pb inorganique n'est pas métabolisé par le foie, il ne se lie qu'au GSH et aux molécules de thiol ; cependant, le Pb organique peut être métabolisé en Pb inorganique(Balali-Mood et al., 2021). L'élimination rénale est la principale voie

d'élimination du Pb de l'organisme, les autres voies telles que la sueur, la salive, les cheveux et les ongles étant par comparaison négligeables (Jayant *et al.*, 2022).

4.3 Mécanismes d'action

4.3.1 Mimer un métal essentiel : Ca^{2+}

La toxicité du Pb est largement due à sa capacité à imiter le calcium et à le remplacer dans de nombreux processus cellulaires fondamentaux qui dépendent du calcium. Il peut traverser la membrane cellulaire par divers mécanismes qui ne sont pas clairement élucidés. Le transport du Pb à travers la membrane érythrocytaire est assuré par l'échangeur d'anions dans un sens et par la pompe Ca-ATPase dans l'autre. Dans d'autres tissus, le Pb traverse la membrane cellulaire par l'intermédiaire de canaux calciques dépendants du voltage ou d'autres types de canaux calciques (Fang *et al.*, 2021).

Une fois à l'intérieur de la cellule, le Pb occupe les sites de fixation du calcium sur de nombreuses protéines dépendantes du Ca^{2+} , dont il modifie les fonctions. Le Pb se lie à la calmoduline, une protéine qui agit comme un capteur du flux de calcium libre au niveau du terminal synaptique et comme un médiateur de la libération des neurotransmetteurs. En outre, il modifie le fonctionnement de l'enzyme PKC, une protéine pratiquement omniprésente, qui joue un rôle crucial dans de nombreuses fonctions physiologiques. La kinase C est normalement activée par des modulateurs exogènes à la cellule (hormones, neurotransmetteurs, etc.) par l'intermédiaire d'une chaîne enzymatique de manière dépendante du calcium. Outre de nombreuses autres fonctions, la kinase activée affecte directement l'expression des "gènes de réponse immédiate" (Niu *et al.*, 2023).

Le Pb a une grande affinité pour les sites typiques de liaison au calcium de cette protéine et des concentrations picomolaires de Pb peuvent remplacer des concentrations micromolaires de calcium. Dans des systèmes cellulaires modèles, il a été démontré que le Pb peut stimuler l'expression génique par des mécanismes médiés par la PKC et il est postulé que cet effet peut être corrélé avec des altérations du fonctionnement synaptique (Rahimova *et al.*, 2020).

4.3.2 Stress oxydatif

Le stress oxydatif est un mécanisme moléculaire clé suggéré pour la sub-fertilité induite par le Pb chez les hommes et les femmes. L'accumulation de Pb dans les organes reproducteurs entraîne une production excessive de ROS. De nature très réactive, les ROS

interagissent avec divers lipides, protéines et acides nucléiques dans les cellules et altèrent leurs fonctions physiologiques, voire même les rendant inactives.

La production excessive de ROS aboutit à la peroxydation lipidique de la membrane cellulaire, entraînant ainsi une production excessive de MDA hautement toxique dans les organes reproducteurs (Jamil *et al.*, 2020). En outre, la production excessive de ROS affecte négativement la qualité du sperme et provoque une déformation de la morphologie des spermatozoïdes, une diminution de leur nombre dans l'éjaculat, une diminution de leur mobilité et une réduction de la capacité de pénétration de l'ovocyte. Les effets délétères de l'excès de ROS peuvent finalement aboutir à la nécrose cellulaire. Les complications de la grossesse, telles que l'avortement spontané, et les pertes de grossesse récurrentes, peuvent également se développer en réponse à la production excessive de ROS chez les femmes (Hussain *et al.*, 2021) (Figure 18).

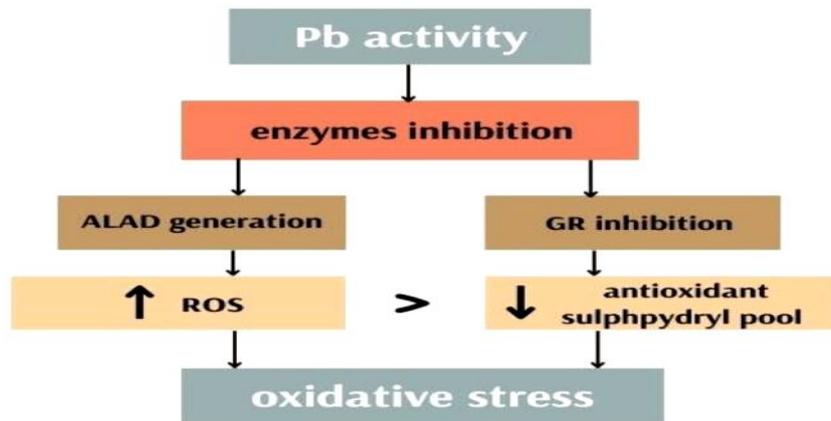


Figure 18: L'effet du plomb sur la génération du stress oxydatif (Furtak *et al.*, 2022).

4.4 Toxicité

4.4.1 Système reproductif masculin

Le retard de la puberté masculine a été associé à des niveaux élevés de plomb dans le sang (Williams *et al.*, 2010). Une étude menée par Anjum *et al.* (2011) indiquait que des rats adultes exposés au Pb via l'eau potable présentaient une diminution significative du nombre de spermatozoïdes épидидymaires, des spermatozoïdes mobiles et de la production de spermatozoïdes viables. Cela indique une diminution de la production de spermatozoïdes et une détérioration de la qualité du sperme. Une diminution significative du niveau de la testostérone sérique a également été observée chez les rats, indiquant une diminution de la stéroïdogénèse, ce qui entraîne une suppression de la reproduction (Anjum *et al.*, 2011).

L'acétylation et la succinylation de la lysine sont des modifications post-traductionnelles omniprésentes chez les eucaryotes et jouent un rôle important dans divers processus cellulaires, notamment la transcription des gènes, le métabolisme cellulaire et la réponse aux lésions de l'ADN. Les fonctions anormales de ces modifications post-traductionnelles sont associées à une altération de la spermatogenèse. Il a été rapporté que l'exposition au Pb inhibe l'acétylation et la succinylation de la lysine au cours de la spermatogénèse dans les testicules de la souris, ce qui provoque un empêchement du remplacement des protéines de transition dans les spermatozoïdes en cours d'élongation (Yang *et al.*, 2020) (Figure 19).

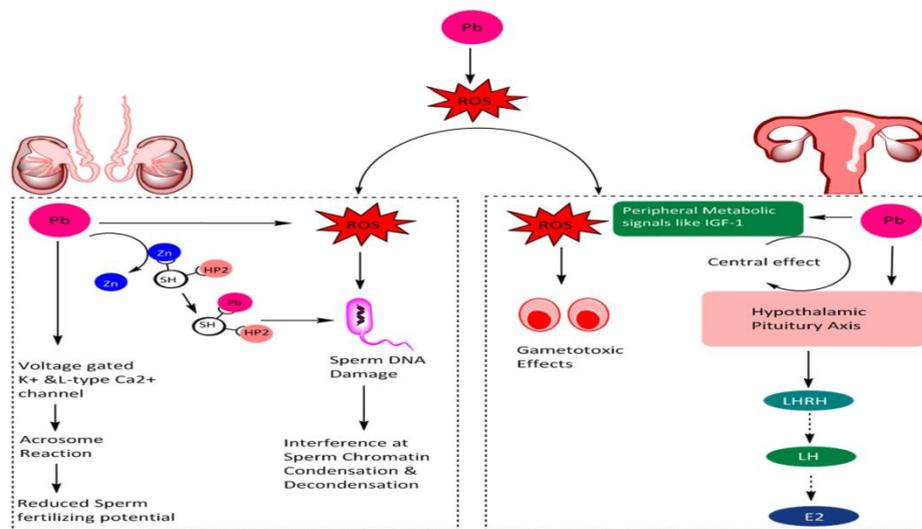


Figure 19: Mécanismes proposés pour la toxicité reproductive induite par le plomb (Jayant *et al.*, 2022).

4.4.2 Système reproductif féminin

Il a été rapporté que l'exposition au Pb diminuait de manière significative la concentration d'estradiol et diminuait également l'expression génique de la protéine qui est spécifiquement impliquée dans la stéroïdogénèse ovarienne (He *et al.*, 2020). Il a également été observé que l'exposition au Pb augmentait l'apoptose cellulaire et provoquait des changements significatifs dans l'expression des gènes impliqués dans la mort cellulaire dans l'ovaire. L'augmentation du stress oxydatif dans les organes reproducteurs pendant l'exposition au Pb peut également modifier les changements hormonaux ou altérer les différentes voies de régulation. Des études *in vitro* et *in vivo* suggèrent que l'exposition au Pb a augmenté de manière significative le niveau de ROS dans les organes reproducteurs féminins et a également diminué le niveau d'enzymes antioxydantes.

Jiang et al. (2021) a rapporté que l'exposition au Pb chez des souris femelles augmentait de manière significative les niveaux de ROS, diminuait les niveaux de glutathion et causait des dommages structurels aux mitochondries et au réticulum endoplasmique dans les ovaires des souris. En outre, l'augmentation du stress oxydatif dans les ovocytes active la voie Nrf2/Keap1 et nuit à la maturation des ovocytes et à la fécondation.

4.4.3 Toxicité sur le développement

Des preuves considérables suggèrent que l'expositions prénatales et postnatales au Pb peut induire des toxicités développementales chez les nourrissons (Wang et al., 2009). Le Pb se dépose dans le placenta, et signalé comme étant plus élevé chez les femmes exposées professionnellement que chez les femmes non exposées. Pendant la grossesse, la majeure partie du Pb atteignant le fœtus est mobilisé à partir du squelette maternel, absorbée par le tractus gastro-intestinal et transférée à travers le placenta. De faibles niveaux de Pb dans le liquide amniotique sont signalés, mais par contre les niveaux de Pb dans le sang du cordon sont estimés à environ 85% des niveaux de plomb dans le sang maternel (Khanam et al., 2021). Bien que des avortements précoces dus à de faibles expositions au Pb aient été signalés, leur mécanisme exact n'est pas clair. Toutefois, des rapports font état d'études indépendantes démontrant des effets génotoxiques via des lésions de l'ADN, un déséquilibre hormonal chez les mâles et les femelles et des effets tératogènes directs. En outre, l'exposition au Pb provoquerait une élévation de la pression artérielle chez les femmes enceintes. Il existe une corrélation directe avec les effets vasculaires sur le placenta, qui peuvent constituer un facteur de risque pour la mère et le fœtus (Figure 20).

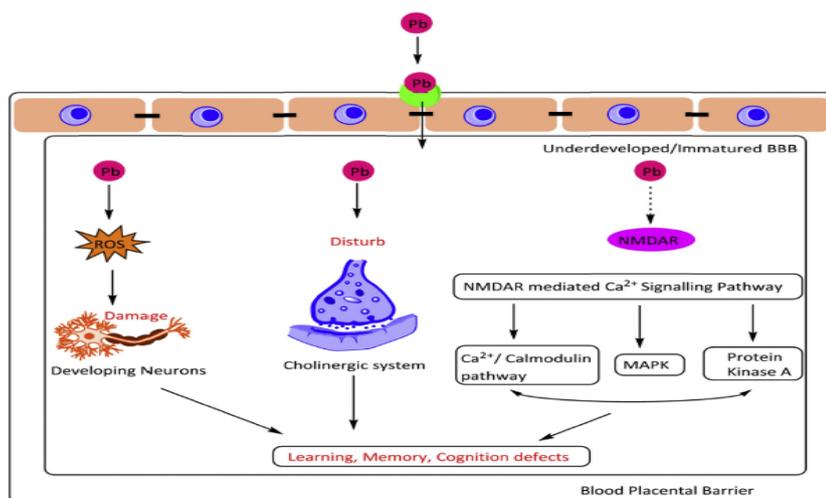


Figure 20: Mécanismes possibles de la neurotoxicité développementale induite par le plomb (Jayant et al., 2022).

Chapitre III :
Physiopathologie
cellulaire –
exemple :
Mécanismes du
stress oxydatif

1 Introduction

1.1 Espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) est un terme couramment utilisé en biologie et en médecine. Ce terme peut être défini comme des espèces réactives contenant de l'oxygène. Le mot ROS est considéré comme un terme collectif qui comprend le superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle ($\bullet OH$), l'oxygène singulet (1O_2), le radical peroxy (ROO^{\bullet}), le radical alkoxy (RO^{\bullet}), l'hydroperoxyde lipidique (LOOH), le peroxydinitrite ($ONOO^-$), l'acide hypochloreux (HOCl) et l'ozone (O_3) (Li *et al.*, 2016). Les ROS sont des sous-produits des processus métaboliques cellulaires normaux nécessaires à la production d'énergie pour les processus vitaux (Snezhkina *et al.*, 2019). Ils sont produits dans les réactions catalysées par la chaîne de transport d'électrons, la NAD(P)H oxydase et d'autres oxydases spécialisées, et sont un sous-produit inévitable de nombreuses réactions d'oxydo-réduction. Cependant, la quantité de ROS produite dans une cellule dans des conditions normales est relativement faible. En tant que tels, les ROS peuvent servir de molécules de signalisation pour réguler les processus biologiques et physiologiques (Schieber *et al.*, 2014). Des preuves récentes suggèrent également les ROS comme d'importants régulateurs physiologiques des voies de signalisation intracellulaires (Barvitenko *et al.*, 2021).

Pendant la normoxie, il existe un équilibre stable entre les ROS et les antioxydants cellulaires. Cependant, une surproduction de ROS dans les espaces intra- ou extracellulaires peut se produire en raison de l'exposition à des xénobiotiques et à d'autres facteurs environnementaux tel que les pesticides et les métaux lourds, ce qui peut entraîner un dysfonctionnement cellulaire et l'apoptose (Ullah *et al.*, 2021). Les ROS sont capables d'endommager les biomolécules, ce qui entraîne des lésions cellulaires et tissulaires (Martemucci *et al.*, 2022). Les antioxydants réagissent avec les ROS et les RNS pour neutraliser ou interrompre la réaction en chaîne avant que les molécules clés de l'organisme ne soient affectées (Pisoschi *et al.*, 2021). Les principaux mécanismes enzymatiques de défense antioxydante sont constitués de différentes formes de superoxyde dismutases (SOD), de catalase (CAT) et de glutathion peroxydases (GPX). On pense que les SOD constituent une première ligne de défense contre les radicaux oxygénés, en particulier l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) qui est le principal ROS produit par la respiration mitochondriale et diverses réactions métaboliques. Les SOD éliminent les anions superoxydes potentiellement dangereux des systèmes biologiques en les convertissant en H_2O_2 , tandis que la CAT, présente dans les

peroxydase, catalyse la conversion de deux molécules de H_2O_2 en O_2 et en deux molécules de H_2O (Lismont *et al.*, 2019). L'antioxydant intracellulaire le plus abondant, le glutathion (GSH), participe à la protection des cellules contre le stress oxydatif (Shi *et al.*, 2015). Toutefois, l'exposition aux pesticides semble être associée à une augmentation significative des ROS et à l'induction d'un stress oxydatif, au-delà de ce que le système antioxydant cellulaire intrinsèque peut réduire à des niveaux physiologiques normaux (Figure 21).

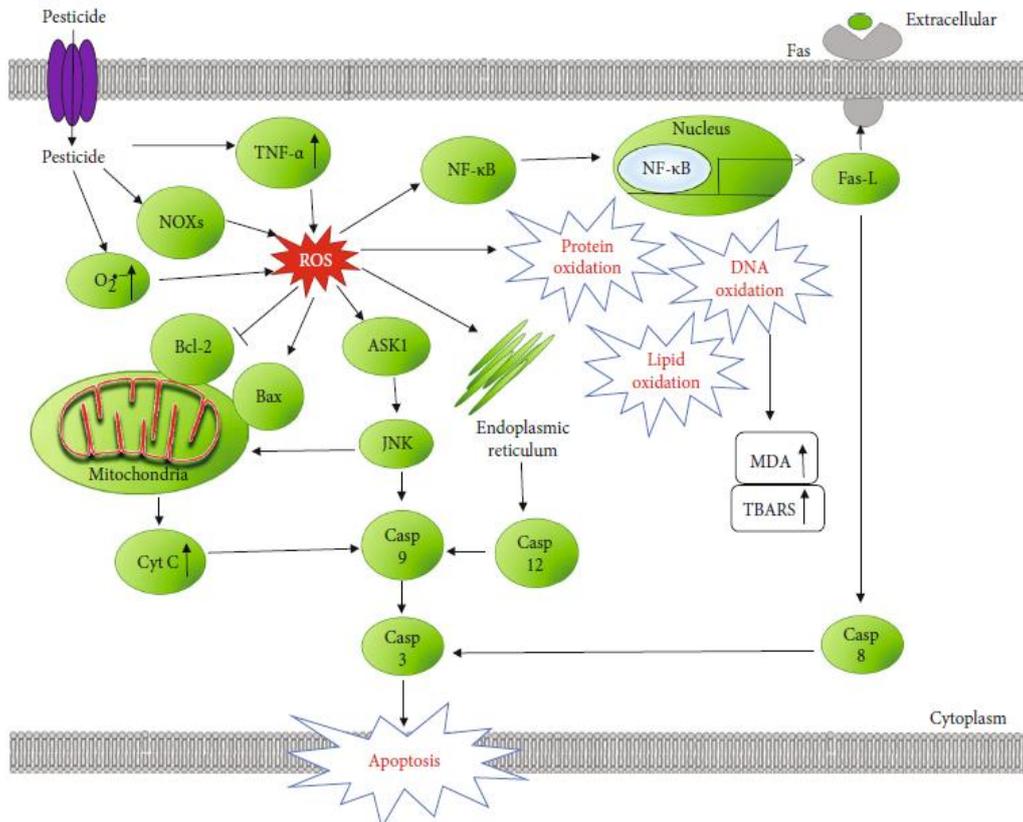


Figure 21: Représentation schématique des voies de signalisation impliquées dans le stress oxydatif induits par les pesticides (Mittal *et al.*, 2014).

1.2 Espèces réactives de l'azote (RNS)

Les espèces azotées réactives (RNS) appartiennent à une famille de groupements azotés étroitement associés à l'oxygène (Alhasawi *et al.*, 2019). L'interaction entre le monoxyde d'azote (NO) produit de manière exogène et endogène et les oxydants tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et des réducteurs tels que l'hydrure de lithium et d'aluminium donne généralement naissance aux RNS (Krasuska *et al.*, 2023). Les RNS peuvent être classés comme des composés dérivés de l'oxyde nitrique, y compris l'anion nitroxyde (NO^-) (dérivé de la réduction de $\cdot NO$), le cation nitrosonium (NO^+), les oxydes d'azote supérieurs (NO_2 , N_2O_4 , etc.), les S-nitrosothiols (RSNO) et les complexes dinitrosyl-fer (Pérez de la Lastra *et al.*, 2022). Le NO est un messager intracellulaire omniprésent qui

Chapitre III : Physiopathologie cellulaire - exemple : Mécanismes du stress oxydatif

régule les fonctions physiologiques, y compris les activités neuronales et cardiovasculaires. Cependant, dans des conditions pathologiques, le NO peut devenir nocif en raison de sa forte réactivité avec d'autres radicaux libres, tels que l' O_2^- (Di Meo and Venditti, 2020). NO^+ est créé lors de l'élimination d'un électron de $\bullet NO$, il peut réagir avec des centres nucléophiles, produisant des composés nitrosés. Les halogénures de nitrosyle sont libérés lorsque $\bullet NO$ réagit avec le fluor, le chlore ou le brome (Alhasawi et al., 2019). Bien que les RNS jouent un rôle essentiel dans de nombreux processus biologiques tels que la régulation physiologique des cellules musculaires lisses, des cardiomyocytes, des plaquettes et des cellules nerveuses et juxtaglomérulaires, ils sont nocifs pour les cellules s'ils sont produits et présents en quantités excessives (Pérez de la Lastra et al., 2022).

Les RNS ont des propriétés pléiotropiques sur les cibles cellulaires, y compris des effets même après des modifications post-traductionnelles et l'interaction des cibles avec les ROS (Cerezo-Magaña et al., 2020). Ces effets sont probablement dus à des niveaux accrus de RNS réagissant avec différentes biomolécules telles que les lipides, les bases de l'ADN et de l'ARN, les cofacteurs métalliques et les protéines. L'interaction du RNS avec divers composants cellulaires entraîne des anomalies cellulaires, des lésions et la mort des cellules par l'induction d'un stress nitrosatif.

Le stress nitrosatif peut se produire lorsque le NO ou des espèces apparentées sont induits lors de l'exposition à certains facteurs xénobiotiques tels que les pesticides et les métaux lourds, ce qui entraîne la nitrosylation des cystéines thiols critiques des protéines (S-nitrosylation) et des métallocofacteurs des protéines (Figure 22). La nitrosylation est l'ajout d'un groupe nitroso ($\bullet NO$) à un centre d'ion métallique actif ou au thiol d'une protéine (Li et al., 2016).

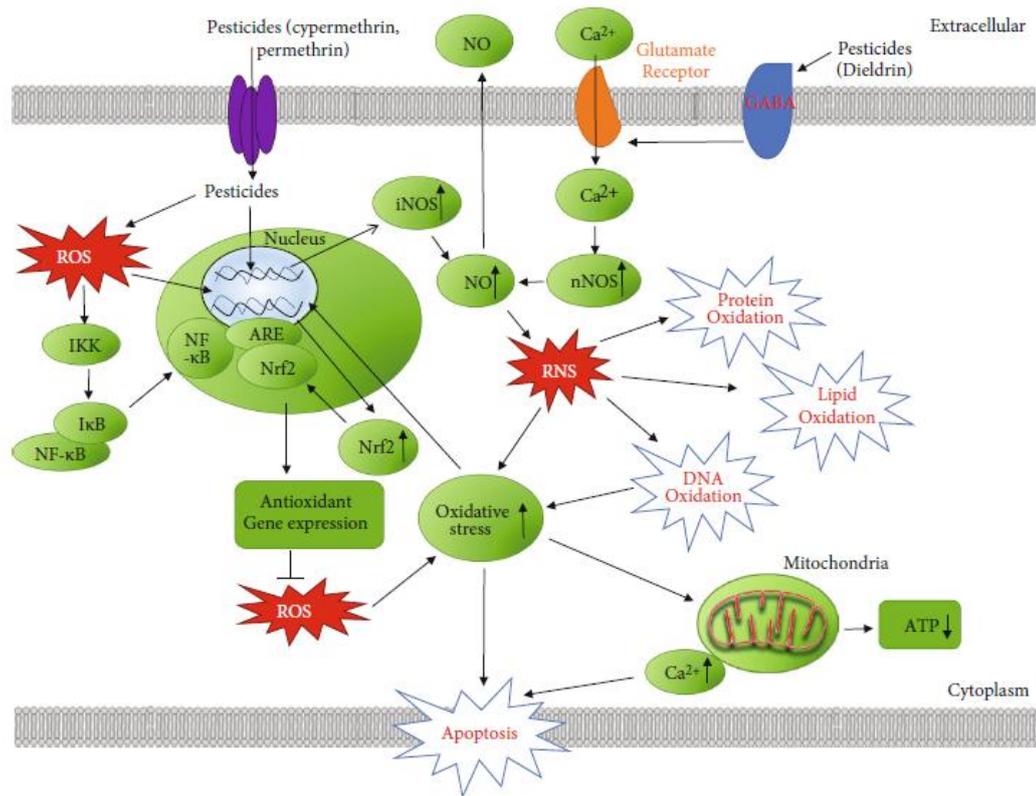
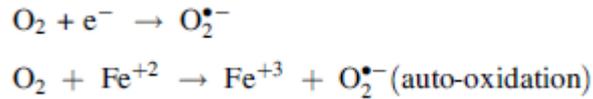


Figure 22: Représentation schématique des voies de signalisation impliquées dans la signalisation des espèces réactives de l'azote (RNS) et le stress oxydatif induits par les pesticides (Mittal *et al.*, 2014).

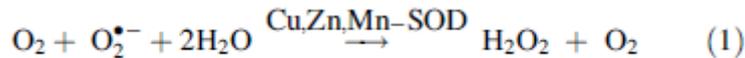
2 Propriétés de certains radicaux libres

2.1 Ion superoxyde (O_2^-)

L'ion superoxyde est le plus important des ROS répandus, formé par processus enzymatique via la réaction d'auto-oxydation et par réaction non enzymatique de transfert d'électrons dans laquelle un électron est transféré à l'oxygène moléculaire (Dumanović *et al.*, 2021). Il est principalement produit dans les mitochondries et sa réactivité avec les biomolécules est faible. Les enzymes qui peuvent produire du superoxyde comprennent la xanthine oxydase, la lipooxygénase, la cyclooxygénase et l'oxydase dépendante du NADPH (Martemucci *et al.*, 2022 ; Napolitano *et al.*, 2022). Il peut exister sous deux formes telles que l' $O_2^{\cdot-}$ ou le radical hydroperoxyde (HO_2) à faible pH (Nimal *et al.*, 2022). Le radical hydroperoxyde est la forme la plus importante et peut facilement pénétrer dans la bicouche phospholipidique que la forme chargée ($O_2^{\cdot-}$). Au pH physiologique, la forme la plus fréquente est le superoxyde. Il peut agir comme agent réducteur et réduire les complexes de fer tels que le cytochrome-c et l'acide ferrique-éthylène-diamine-tétra-acétique (Fe^+-EDTA), dans lequel le Fe^{+2} est réduit en Fe^{+3} . Il peut également agir comme agent oxydant et oxyder l'acide ascorbique et le tocophérol.

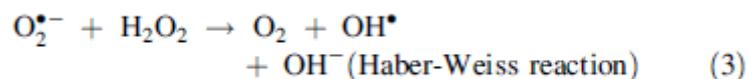
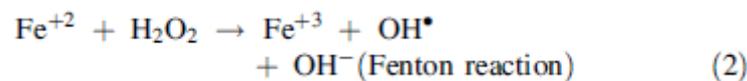


Le radical superoxyde réagit avec un autre radical superoxyde dans une réaction de dismutation (Eq. 1), dans laquelle un radical est oxydé en oxygène et l'autre est réduit en peroxyde d'hydrogène (Costa *et al.*, 2021).



2.2 Radical hydroxyle (OH \cdot)

Le radical hydroxyle est la forme neutre de l'ion hydroxyde, c'est un radical libre très réactif (Wang and Wang, 2020). Il peut réagir fortement avec les molécules organiques et inorganiques, y compris l'ADN, les protéines, les lipides et les hydrates de carbone, et causer de graves dommages aux cellules, plus que n'importe quel autre ROS (Wang and Wang, 2020). Il se forme dans une réaction de Fenton (Eq. 2), dans laquelle H₂O₂ réagit avec des ions métalliques (Fe⁺² ou Cu⁺), souvent liés en complexe avec différentes protéines telles que la ferritine (une protéine intracellulaire qui stocke le fer) et la céruloplasmine (protéine plasmatique porteuse de cuivre) ou d'autres molécules. Dans des conditions de stress, un excès d'O₂ libère le fer libre de la ferritine, le fer libre libéré participe à la réaction de Fenton pour former des OH \cdot . Il est également formé par la réaction entre le radical superoxyde et H₂O₂ dans une réaction appelée réaction de Haber-Weiss (Eq. 3).



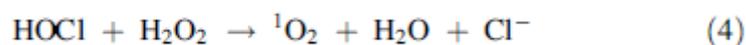
2.3 Peroxyde d'hydrogène H₂O₂

Le peroxyde d'hydrogène se forme *in vivo* dans une réaction de dismutation catalysée par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) (Eq. 1). Il ne s'agit pas d'un radical libre, mais il peut endommager la cellule à une concentration relativement faible, par contre à des niveaux plus élevés il peut inactiver les enzymes cellulaires productrices d'énergie telles que la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase de par sa capacité de pénétrer facilement les membranes biologiques. Le H₂O₂ n'a pas d'effet direct sur l'ADN mais peut l'endommager en produisant le radical hydroxyle (OH \cdot) en présence d'ions métalliques de transition (Juan *et*

al.,2021). Les principales enzymes antioxydantes capables d'éliminer le H₂O₂ sont la catalase, la glutathion peroxydase et les peroxiredoxines (Sharapov *et al.*, 2021 ; Powers *et al.*, 2022).

2.4 Oxygène singulet (¹O₂)

Il s'agit d'un état électroniquement très excité et méta-stable de l'oxygène moléculaire (Lyle *et al.*, 2021). Lors de l'activation, l'oxygène moléculaire est excité à l'état ¹Δ_g, puis à l'état supérieur singulet 1ε_g. Le premier état excité ¹Δ_g, possède deux électrons de spins opposés dans la même orbitale π*, tandis que le second état excité 1ε_g, possède un électron dans chaque orbitale π* dégénérée avec des spins opposés (Li and Li, 2021). L'état ¹Δ_g est extrêmement réactif, comparé aux autres états excités électroniquement (Zhang *et al.*, 2021). Il est produit *in vivo* par l'activation des neutrophiles (Eq. 4) et des éosinophiles (Michaeloudes *et al.*, 2022). Il est également formé par certaines réactions enzymatiques catalysées par des enzymes telles que les lipoxygénases, les dioxygénases et la lactoperoxydase (Mandal, 2022). C'est un agent oxydant très puissant qui peut endommager l'ADN (Jomova *et al.*, 2023) et les tissus (Nakane, 2020).



2.5 Peroxynitrite (OONO⁻) et autres espèces réactives de l'azote

Le peroxynitrite (OONO⁻) est formé par la réaction entre l'O₂⁻ et le NO[•]. Il est hautement toxique (Zhao *et al.*, 2021) et peut réagir directement avec le CO₂ pour former d'autres nitroso-peroxo carboxylates hautement réactifs (ONOOCO²⁻) ou de l'acide peroxynitreux (ONOOH). L'ONOOH subit ensuite une homolyse pour former à la fois OH[•] et NO₂ ou se réarrange pour former NO₃. L'OONO⁻ peut oxyder les lipides, les résidus de méthionine, de tyrosine dans les protéines et l'ADN pour former de la nitroguanine (Martemucci *et al.*, 2022). Les résidus de nitrotyrosine sont considérés comme des marqueurs des dommages cellulaires induits par les peroxynitrites (Andrés *et al.*, 2022).

Le NO réagit avec l'O₂ et l'eau pour former des ions nitrate et nitrite. L'oxydation de NO[•] par un électron produit le cation nitrosonium (NO₂^{•+}), tandis que la réduction par un électron produit l'anion nitroxyl (NO⁻). Ces deux ions peuvent réagir avec le NO et former du N₂O et du OH[•]. Le NO[•] peut réagir avec une variété de radicaux tels que H₂O₂ et HOCl pour former N₂O₃, NO²⁻ et NO³⁻ (Andrabi *et al.*, 2023).

3 Sources de radicaux libres

Les ROS peuvent être produits à partir de sources endogènes ou exogènes. Les sources endogènes de ROS comprennent différents organites cellulaires tels que les mitochondries, les peroxysomes et le réticulum endoplasmique où la consommation d'oxygène est élevée (Konno *et al.*, 2021).

3.1 Mitochondries

La plupart des ROS intracellulaires proviennent des mitochondries (Figure 23). Les radicaux superoxydes sont produits dans deux sites principaux de la chaîne de transport des électrons, à savoir le complexe I (NADH déshydrogénase) et le complexe III (ubiquinone cytochrome c réductase). Le transfert d'électrons du complexe I ou II au coenzyme Q ou à l'ubiquinone (Q) aboutit à la formation de la forme réduite du coenzyme Q (QH₂). La forme réduite QH₂ régénère la coenzyme Q via un anion semi-quinone intermédiaire instable Q^{•-} dans le cycle Q. Le Q^{•-} formé transfère immédiatement des électrons à l'oxygène moléculaire, ce qui conduit à la formation du radical superoxyde. La génération de superoxyde n'est pas enzymatique donc plus le taux métabolique est élevé, plus la production de ROS est importante (Napolitano *et al.*, 2021).

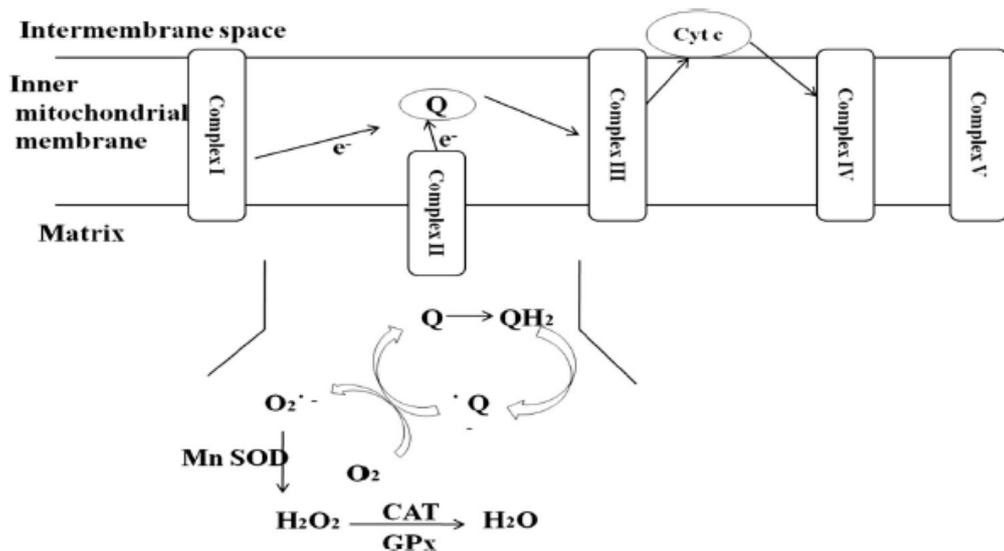


Figure 23: Production de ROS mitochondriales (Phaniendra *et al.*, 2015).

L'anion superoxyde est transformé en peroxyde d'hydrogène par l'action de la superoxyde dismutase mitochondriale (MnSOD). Le H₂O₂ peut être détoxifié par la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx).

Chapitre III : Physiopathologie cellulaire - exemple : Mécanismes du stress oxydatif

Les autres composants mitochondriaux qui contribuent à la formation de ROS comprennent la monoamino oxydase, l' α -ketoglutarate déshydrogénase, le glycérol phosphate déshydrogénase et le p66shc (Beygi et al., 2021).

La p66Shc est un membre important de la famille des protéines ShcA, qui contient deux autres protéines, la p46Shc et la p52 Shc. La p66Shc des mammifères est une isoforme de 66 kDa de la protéine adaptatrice du facteur de croissance impliquée dans l'apoptose. Elle intervient dans la production de ROS dans les mitochondries. La majeure partie de la p66Shc est située dans le cytoplasme, une petite fraction étant localisée dans l'espace inter-membranaire des mitochondries. En cas de stress oxydatif, p66Shc se déplace vers l'espace inter-membranaire mitochondrial, où il s'associe au cytochrome c, induisant ainsi la production de ROS (Su et al., 2023).

3.2 Peroxysomes

Dans les peroxysomes, la voie respiratoire implique le transfert d'électrons de divers métabolites vers l'oxygène, ce qui conduit à la formation de H_2O_2 (Lismont et al., 2019) mais n'est pas couplée à la phosphorylation oxydative pour produire de l'ATP ; l'énergie libre est plutôt libérée sous forme de chaleur. Les autres radicaux libres produits dans les peroxysomes comprennent H_2O_2 , $O_2^{\cdot -}$, OH^{\cdot} et NO^{\cdot} . La β -oxydation des acides gras est le principal processus métabolique produisant du H_2O_2 dans les peroxysomes. Comme indiqué ailleurs, il a été démontré que les différentes enzymes peroxysomales telles que les acyl-CoA oxydases, la D-amino-acide oxydase, la L- α -hydroxy-oxydase, l'urate oxydase, la xanthine oxydase, la D-aspartate oxydase produisent différents ROS (Dogan et al., 2022).

3.3 Réticulum endoplasmique

Les enzymes du réticulum endoplasmique, telles que les cytochromes p-450 et b5 et la diamine oxydase contribuent à la formation des ROS (Lee et al., 2022). Une autre enzyme importante qui est la thiol oxydase et Ero1p catalyse le transfert d'électrons des dithiols vers l'oxygène moléculaire, ce qui entraîne la formation de H_2O_2 (Ponnampalam et al., 2022).

Les autres sources endogènes des ROS comprennent la synthèse des prostaglandines, l'auto-oxydation de l'adrénaline, les cellules phagocytaires, la réduction de la riboflavine, du FMNH₂, du FADH₂, du cytochrome P450, l'activation des cellules immunitaires, l'inflammation, le stress mental, l'exercice excessif, l'infection, le cancer, le vieillissement et l'ischémie (Li et al., 2022).

4 Cibles moléculaires des radicaux libres

Lorsqu'il y a un déséquilibre entre la production de radicaux libres (ROS/RNS) et les antioxydantes, les premiers sont produits en plus grandes concentrations, ce qui entraîne un stress oxydatif et un stress nitrosatif. Comme ces radicaux libres sont très réactifs, ils peuvent endommager les trois classes importantes de molécules biologiques, notamment les acides nucléiques, les protéines et les lipides (Singh *et al.*, 2019 ; Nemmiche, 2017).

4.1 Acide désoxyribonucléique (ADN)

Les ROS/RNS peuvent tous deux endommager les acides nucléiques par oxydation. L'ADN mitochondrial est plus vulnérable à l'attaque des ROS que l'ADN nucléaire, car il est situé à proximité du lieu où les ROS sont générés. Les ROS, en particulier le radical OH[•], réagit directement avec tous les composants de l'ADN tels que les bases puriques et pyrimidiques, le squelette du sucre désoxyribose (Huang *et al.*, 2020) et provoque un certain nombre d'altérations, y compris des cassures simple et double brin dans l'ADN. Le radical OH[•] absorbe des atomes d'hydrogène pour produire un certain nombre de purines modifiées ainsi que des sous-produits de la base pyrimidine et des liaisons transversales ADN-protéines. L'attaque de la pyrimidine par le radical OH[•] produit différents adduits pyrimidiniques tels que la thymine glycol, l'uracile glycol, la 5-hydroxydésoxyuridine, la 5-hydroxydésoxycytidine, l'hydantoïne et d'autres encore.

Les adduits puriques formés par l'attaque du radical hydroxyle comprennent la 8-hydroxydéoxy guanosine, la 8-hydroxydéoxy adénosine, la 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine. Les autres adduits des bases de l'ADN induits par les radicaux libres comprennent le 5-formyluracile, la cytosine glycolée, la 5,6-dihydrothyronine, la 5-hydroxy-6-hydro-cytosine, la 5-hydroxy-6-hydro uracile, l'uracile glycolée et l'alloxan (Shadfar *et al.*, 2023). Les principaux produits d'addition de la partie sucre de l'ADN induits par les radicaux libres comprennent l'acide glycolique, le 2-désoxytétrodialdose, l'érythrose, la lactone de l'acide 2-désoxypentonique, le 2-désoxypentose-4-ulose (Shadfar *et al.*, 2023). La 8-hydroxydésoxyguanosine (8-OHdG) est considérée comme le biomarqueur des dommages oxydatifs de l'ADN et est impliquée dans la mutagénèse, la cancérogenèse et le vieillissement. Les niveaux de 8-OHdG sont plus élevés dans l'ADN mitochondrial que dans l'ADN nucléaire (Tryfidou *et al.*, 2020).

D'autre part, le RNS, et plus particulièrement le peroxy-nitrite (OONO[•]), interagit avec la guanine pour produire des lésions nitratives et oxydatives de l'ADN telles que la 8-nitroguanine et la 8-oxodéoxyguanosine (Chaudhary *et al.*, 2023). La 8-nitroguanine formée

est instable et peut être spontanément éliminée, ce qui entraîne la formation d'un site purinique (Andrés et al., 2023). Inversement, l'adénine peut être appariée à la 8-nitroguanine pendant la synthèse de l'ADN, ce qui entraîne une transversion G-T (Kino et al., 2020). En conséquence, la 8-nitroguanine est une lésion mutagène de l'ADN impliquée dans la cancérogenèse.

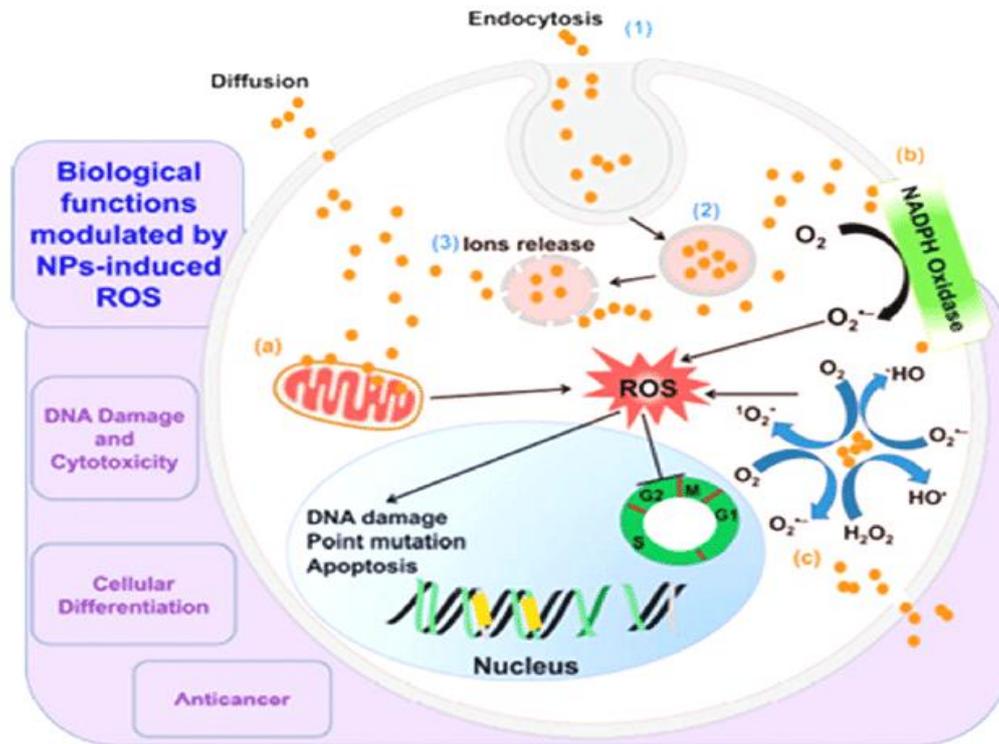


Figure 24: La production des ROS et ses conséquences, notamment les lésions de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire, l'altération de l'apoptose et les lésions de la membrane cellulaire (Sarfraz et al., 2020).

4.2 Acide ribonucleique

Les ROS peuvent attaquer différents ARN produits dans l'organisme. L'ARN est plus sujet aux dommages oxydatifs que l'ADN, en raison de sa nature monocaténaire, de l'absence de mécanisme de réparation actif pour l'ARN oxydé, d'une protection moindre par les protéines que l'ADN et, surtout, parce que ces ARN cytoplasmiques sont situés à proximité des mitochondries, où des charges de ROS sont produites. En effet, l'ARN est soumis à davantage de dommages oxydatifs que l'ADN chez l'homme (Kowalska et al., 2020). La 7, 8-dihydro-8-oxoguanosine (8-oxoG) est le produit de dégradation de l'ARN le plus étudié et ses niveaux sont élevés dans diverses conditions pathologiques comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, l'athérosclérose, l'hémochromatose et les myopathies (Liu et al., 2021).

4.3 Lipides

Les lipides membranaires, en particulier les résidus d'acides gras polyinsaturés des phospholipides, sont plus sensibles à l'oxydation par les radicaux libres (Hajieva. *et al.*, 2023). La peroxydation des lipides est très importante *in vivo* en raison de son implication dans diverses conditions pathologiques. Elle entraîne une perte de fonctionnement des membranes, par exemple une diminution de la fluidité, l'inactivation des enzymes et des récepteurs liés à la membrane (Su *et al.*, 2019).

La peroxydation des lipides est déclenchée lorsqu'un radical libre attaque et prélève l'hydrogène d'un groupe méthylène (CH_2) dans un acide gras (LH), ce qui entraîne la formation d'un radical lipidique centré sur le carbone ($\text{L}\cdot$). Le radical lipidique peut réagir avec l'oxygène moléculaire pour former un radical peroxy lipidique ($\text{LOO}\cdot$). Ce dernier subit un réarrangement via une réaction de cyclisation pour former des endoperoxydes, qui forment finalement le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxyl nonenal (4-HNA), les produits finaux toxiques de la peroxydation lipidique qui endommagent l'ADN et les protéines (Martemucci *et al.*, 2022).

Ces radicaux peroxydes lipidiques peuvent propager le processus de peroxydation en prélevant des atomes d'hydrogène sur les autres molécules lipidiques. Les isoprostanes (substances semblables aux prostaglandines produites dans l'organisme par l'estérification de l'acide arachidonique) constituent le produit important de la peroxydation lipidique de l'acide arachidonique et sont considérés comme les responsables des dommages lipidiques oxydatifs (Mas-Bargues *et al.*, 2021).

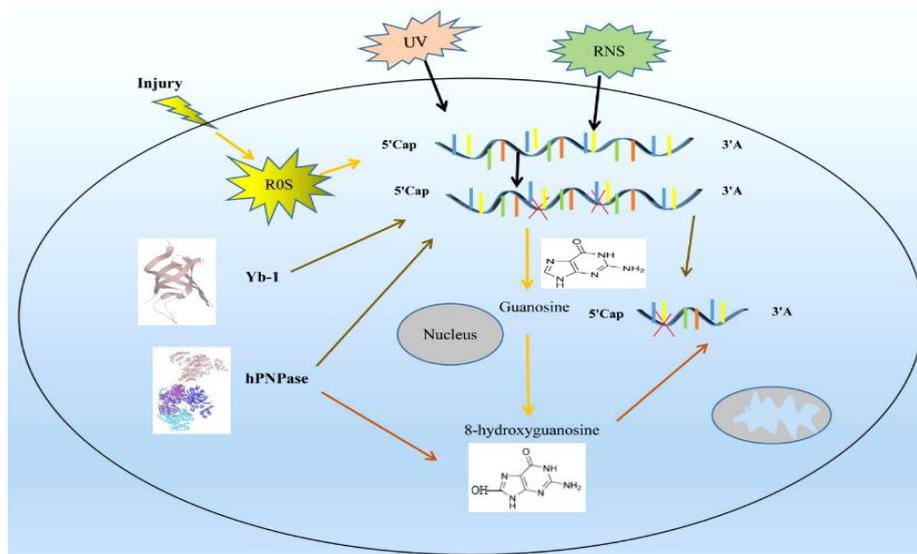


Figure 25: Les mécanismes de dommages oxydatifs de l'ARN (Zhe *et al.*, 2020).

4.4 Protéines

L'oxydation des protéines peut être induite par des espèces radicalaires telles que O_2^- , OH, peroxy, alkoxy, hydroperoxy ainsi que par des espèces non radicalaires telles que H_2O_2 , O_3 , HOCl, oxygène singulet, $OONO^-$ (Demirci-Cekic et al., 2022). Les ROS oxydent différents acides aminés présents dans les protéines, provoquant la formation de liaisons transversales protéine-protéine, entraînant la dénaturation et la perte de fonctionnement des protéines, la perte d'activité enzymatique, la perte de fonction des récepteurs et des protéines de transport (Fuentes-Lemus et al., 2021).

Les acides aminés contenant du soufre, tels que la méthionine et la cystéine, sont plus sensibles à l'oxydation par les ROS et sont convertis en disulfures et en méthionine sulfoxyde, respectivement (Miller and Schmidt, 2020). Cependant, dans les systèmes biologiques, seules ces deux formes oxydées de protéines peuvent être reconverties en leur forme native par deux enzymes différentes, à savoir les disulfures réductases et les méthionine sulfoxyde réductases, respectivement (Garcia-Caparros et al., 2021).

Les dommages oxydatifs induits par les ROS sur les résidus d'acides aminés tels que la lysine, la proline, la thréonine et l'arginine produisent des dérivés carbonylés. La présence de groupes carbonyles dans les protéines a été considérée comme le marqueur de l'oxydation des protéines par les ROS (Zhu et al., 2023). Les autres marqueurs spécifiques de l'oxydation des protéines sont l'O-tyrosine (marqueur du radical hydroxyle) et la 3-nitrotyrosine (marqueur du RNS). Une augmentation des niveaux de carbonyles protéiques est observée dans un certain nombre de conditions pathologiques telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la dystrophie musculaire, la cataractogénèse, l'arthrite rhumatoïde, le diabète, l'athérosclérose, et le vieillissement (Zahra et al., 2021 ; George et al., 2022)

5 Les antioxydants (AOX)

Étant donné que les radicaux libres sont produits dans l'organisme peuvent causer des dommages oxydatifs sur les bio-macromolécules telles que les lipides, les protéines et l'ADN, l'importance des AOX est que ces molécules retardent ou préviennent ces dommages en piégeant les espèces réactives ne peut pas être sous-estimée.

Les AOX peuvent avoir différentes fonctions cela dépend du type d'espèces radicalaires produites et de la molécule cible protégée (Demirci-Cekic et al., 2022). Les AOX peuvent réduire le risque du développement de maladies dégénératives en contrebalançant un excès d'espèces réactives, ils sont vitaux pour la santé humaine (Nimal et al., 2022). En outre, l'apport d'AOX provenant de sources exogènes est très important car les oxydants dans

l'organisme peuvent augmenter dans diverses conditions pathologiques. Si certains AOX peuvent être synthétisés naturellement dans l'organisme, d'autres sont absorbés par la nutrition.

Parmi les différentes classes d'AOX, on peut citer les AOX enzymatiques tels que la SOD, la CAT et la glutathion peroxydase, les AOX hydrophiles tels que l'urate, l'ascorbate, le glutathion et les flavonoïdes, et les AOX lipophiles tels que les tocophérols, les caroténoïdes et l'ubiquinol (Mavridi-Printezi et al., 2023).

Les AOX peuvent être classés en AOX primaires ou secondaires en fonction de leur mécanisme d'action. Les AOX primaires piègent les espèces radicalaires par transfert d'atomes d'H ou d'électrons, tandis que les AOX secondaires inactivent les catalyseurs pro-oxydants.

5.1 Les antioxydants enzymatiques

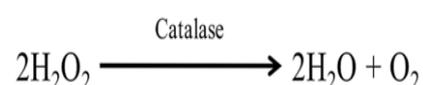
SOD, CAT, GPx sont les enzymes AOX les plus connues. Comme elles ont une grande affinité pour les ROS, elles fournissent une protection plus efficace en cas de stress oxydatif (Demirci-Cekic et al., 2022).

5.1.1 Superoxyde dusmutase (SOD)

La SOD appartient à la famille des enzymes protéiques classées dans la classification mondiale EC 1.15.1.1. C'est une métalloenzyme, elle est l'une des AOX enzymatiques les plus efficaces que l'on trouve dans tous les compartiments subcellulaires et elle agit comme un agent protecteur contre les effets toxiques de grandes quantités de ROS (Kesawat et al., 2023). La SOD catalyse la décomposition du superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène. Selon leurs cofacteurs métalliques, il existe trois types d'enzymes SOD dans le corps humain : la CuZn-SOD cytosolique, la Mn-SOD mitochondriale et la Fe-SOD. Elle aide à prévenir la formation de radicaux hydroxyles catalysée par les métaux de transition (Dumanović et al., 2021).

5.1.2 Catalase

Il s'agit d'une enzyme antioxydante qui a la nomination systématique (EC, 1.11.1.6). La catalase est une enzyme à groupe hémique-tétramérique qui participe à la détoxification du H₂O₂ produit dans les peroxysomes par les oxydases impliquées dans divers événements cataboliques (Baker et al., 2023). Elle catalyse la réaction de décomposition du peroxyde d'hydrogène en produits non toxiques que sont l'eau et l'oxygène via la réaction :



Chapitre III : Physiopathologie cellulaire - exemple : Mécanismes du stress oxydatif

Cette enzyme, qui peut décomposer environ 6 millions de molécules de H_2O_2 par minute, a pratiquement le taux de renouvellement le plus élevé (Takio *et al.*, 2020). En outre, il a également été signalé que la CAT était efficace sur certains composés toxiques par le biais d'une réaction peroxydative (Chu *et al.*, 2023).

Les catalases (hydroperoxydases) ont été largement étudiées jusqu'à présent, avec plus de 300 types, à savoir les catalases monofonctionnelles, les catalases bi-fonctionnelles et les catalases contenant du manganèse (Demirci-Cekic *et al.*, 2022).

5.1.3 Glutathion réductase (GR)

La glutathion réductase, que l'on trouve généralement dans les chloroplastes joue un rôle important dans le cycle ascorbate-glutathion. Cette enzyme catalyse la réaction de réduction du glutathion, un AOX de faible masse moléculaire, et joue un rôle dans de nombreux événements métaboliques. Comme le montre la figure 26, la glutathion réductase ne joue pas seulement un rôle dans la réduction du glutathion, mais protège également le cycle ascorbate-glutathion et agit comme un piègeur de ROS (Hasanuzzaman *et al.*, 2019).

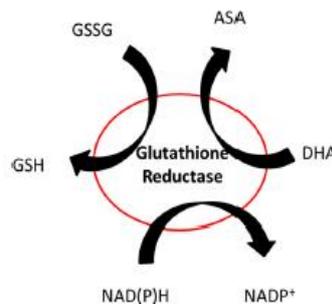


Figure 26: l'implication du glutathion réductase dans les cycles d'oxydoréduction cellulaires (Chang *et al.*, 2021).

5.1.4 Glutathion S-transférase

L'enzyme glutathion-S-transférase catalyse principalement la réaction du tri-peptide glutathion avec des substrats xénobiotiques électrophiles. En outre, elle est impliquée dans la conversion de substances toxiques telles que l'hydroxy-péroxyde et les pesticides en métabolites non toxiques dans l'homéostasie hormonale (Vašková *et al.*, 2023).

5.2 Les antioxydants non-enzymatiques

5.2.1 Acide ascorbique

L'acide ascorbique est un AOX soluble dans l'eau largement disponible dans les plantes ; c'est un piègeur de radicaux et un agent réducteur très efficace en milieu aqueux (Capanoglu *et al.*, 2020). L'une des tâches importantes de la vitamine C est d'empêcher la formation de composés N-nitrosés dans l'estomac et de favoriser la formation de collagène.

Chapitre III : Physiopathologie cellulaire - exemple : Mécanismes du stress oxydatif

C'est pourquoi elle a un effet protecteur contre diverses maladies, y compris le cancer (Lbban *et al.*, 2023).

La vitamine C peut également agir comme piègeur direct de ROS et comme recycleur d' α -tocophérol, qui joue un rôle important contre la peroxydation des lipides. De plus, elle est importante pour la prévention des maladies neurodégénératives en raison de son rôle dans le transport de médicaments qui ne peuvent pas traverser la barrière hémato-encéphalique (Kumar *et al.*, 2022). En outre, la littérature indique que la conjugaison de ligands de liposomes avec de l'acide ascorbique (c'est-à-dire le système de libération de disulfure d'acide ascorbique et de thiamine) peut être une stratégie efficace pour améliorer la capacité de libération des médicaments du système nerveux central dans le cerveau (Alexander *et al.*, 2019).

5.2.2 Gluthation (GSH)

Le GSH est un antioxydant hydrosoluble de faible masse moléculaire. Le GSH permet la réduction des hydroperoxydes par certaines hydroperoxines et GPx, jouant ainsi un rôle important dans le système de défense cellulaire (Jomova *et al.*, 2023). À la fin de la réaction, certaines réactions catalysées par la glutathion-S-transférase sont observées et le GSH est oxydé en une forme GSSG. Le GSH peut être oxydé de manière réversible en GSSG (disulfure de glutathion) sous l'action d'oxydants et de radicaux libres (Chai *et al.*, 2023).

Il existe un équilibre délicat entre les formes sulfhydryle et disulfure du glutathion, qui jouent un rôle protecteur dans l'homéostasie redox cellulaire, appelée "homéostasie dynamique thiol/disulfure", et le rapport entre les formes réduites et oxydées du glutathion (GSH/GSSG) est considéré comme un indicateur de bien-être important pour la santé humaine (Ulrich and Jakob, 2019 ; Nemmiche, 2017). L'homéostasie redox est généralement considérée comme un équilibre dynamique entre les électrophiles et les nucléophiles afin de maintenir un état d'équilibre redox optimal (Sies, 2021). En général, les biothiols antioxydants peuvent réagir avec les radicaux libres tout en étant oxydés en radicaux thiyles (RS \cdot) et exercer un effet protecteur en empêchant la cellule cible d'être endommagée, l'effet dépendant de la réactivité des RS \cdot formés (Apak, (2019).

5.2.3 Proline

La proline est connue comme un inhibiteur de la mort cellulaire programmée (PCD). C'est pourquoi, elle est considérée comme un puissant AOX qui réduit le stress oxydatif. De plus, il a été prouvé dans des études scientifiques que la proline est un piègeur de radicaux hydroxyyles (Huynh *et al.*, 2020).

5.2.4 Tocophérol

La vitamine E existe sous huit formes différentes, quatre tocophérols et quatre tocotriénols, dont la forme essentiellement utilisée est l' α -tocophérol: α , β , γ , et δ -tocophérol ; α , β , γ , et δ -tocotrienol. L' α -tocophérol est le plus efficace d'entre eux (Figure 27), la raison en est le groupe -OH attaché au carbone numéro 6 de sa structure (Yang et al., 2020). L'atome H du groupe -OH dans l'anneau chromanol peut être donné à un radical libre, donnant lieu à un électron non apparié délocalisé et stabilisé ; le radical de vitamine E qui en résulte est cinétiquement inerte de manière à mettre fin à la réaction en chaîne de la peroxydation lipidique (Gulcinl., 2020).

La vitamine E est un AOX liposoluble qui brise la chaîne en raison de sa capacité de réaction contre les radicaux peroxydes lipidiques, et empêche ce radical de réagir avec un nouvel AGPI. La radicale de la vitamine E, qui participe à la défense contre la peroxydation des lipides, est converti en vitamine E par la vitamine C à l'interface eau-lipide (Bayram and Decker, 2023), ce qui permet la régénération de la vitamine E par la vitamine C grâce à des potentiels redox favorables. Un autre rôle important de la vitamine E est d'empêcher la formation de composés N-nitrosés dans l'estomac, ce qui a un effet protecteur contre diverses maladies (Richa et al., 2022). Ainsi, la vitamine E peut agir à la fois comme piègeur direct de radicaux et comme AOX en régulant diverses enzymes telles que la SOD, la CAT et la GPx (Demirci-Cekic et al., 2022).

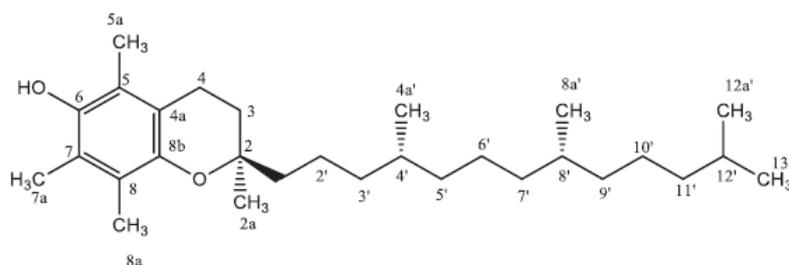


Figure 27: Structure chimique de l' α -tocophérol (Arai and Kono, 2021).

5.2.5 Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des AOX ayant de fortes propriétés, ils sont divisés en deux groupes principaux : (i) les carotènes (ii) les xanthophylles. Ces deux groupes diffèrent l'un de l'autre par leur structure chimique. Alors que le premier groupe contient du carbone et de l'hydrogène dans sa structure, les composés du second groupe contiennent au moins un atome d'oxygène (Saini et al., 2022). Ce groupe contient des AOX solubles dans les lipides, et son autre rôle important est de former la vitamine A par clivage enzymatique dans l'organisme (Blaner et al., 2021). Il existe plus de 600 caroténoïdes dans la nature, dont le plus abondant

Chapitre III : Physiopathologie cellulaire - exemple : Mécanismes du stress oxydatif

est le β -carotène que l'on trouve dans les fruits orange et jaunes et dans les légumes à feuilles vertes. Des études ont également prouvé que les caroténoïdes peuvent piéger le $^1\text{O}_2$ (Singh and Sambyal, 2022).

Matériels et méthodes

1 Objectif de l'expérimentation

L'objectif du présent travail est de déterminer si une exposition séparément ou combiné aux métaux lourds (cadmium et plomb) et au pesticide imidaclopride pouvait avoir un effet additif, synergique ou antagoniste et ainsi évaluer leurs effets toxicologiques sur l'organisme.

2 Choix des animaux et conditions d'expérimentation

Dans nos études nous avons choisi des rats albinos mâles de souche Wistar provenant de l'Institut Pasteur (Alger). Des rats mâles âgés de deux mois pesant 80 ± 5 g ont été utilisés dans les expériences, après une période d'adaptation sous conditions contrôlées avec un cycle d'éclairage (12 h/12 h) et une température ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), et un régime alimentaire sous forme de granulés (SIM Sanders, Algérie) et de l'eau ad libitum. Les rats sont élevés dans des cages sur une litière constituée de copeaux de bois. Un nettoyage tous les 2 jours a été requis.

3 Dispositif expérimental

3.1 Première Expérimentation

Au cours de la première expérimentation, des lots de rats sont traités au chlorure de cadmium et d'acétate de plomb par voie intraveineuse pendant 15 jours. Vingt rats Wistar ont été répartis au hasard en quatre groupes de cinq rats chacun.

- Groupe 1 (T) : C'est un groupe témoin ayant reçu une solution saline physiologique stérile ;
- Groupe 2 (Cd) : Groupe traité avec 2 mg Cd/kg de poids corporel/jour;
- Groupe 3 (Pb) : Groupe traité par 2 mg Pb/kg de poids corporel/jour;
- Groupe 4 (Cd+Pb) : Il a reçu une dose combinée de 2 mg Cd et de 2 mg Pb/kg de poids corporel/jour.

3.2 Deuxième Expérimentation

Au cours de la deuxième expérimentation, des lots de rats sont traités au chlorure de cadmium et d'imidaclopride par voie intrapéritonéale pendant 15 jours. Vingt rats Wistar ont été répartis au hasard en quatre groupes de cinq rats chacun.

- Groupe 1 (T) :Groupe témoin ayant reçu des injections de solution saline physiologique stérile ;
- Groupe 2 (Cd) :Ce groupe a reçu un traitement de 5 mg Cd/kg de poids corporel/jour;
- Groupe 3 (IMI) :Groupe traité avec 20 mg imidaclopride/kg de poids corporel/jour ;
- Groupe 4 (Cd+IMI) : Ce groupe a reçu une dose combinée de 5 mg de chlorure de cadmium et de 20 mg de pesticide imidaclopride/kg de poids corporel/jour.

Les animaux ont été soumis à un contrôle quotidien, durant toute la durée de l'expérimentation de l'état comportementale afin de détecter un état de stress ou d'anxiété.

Après une période d'exposition de 15 jours, les rats des groupes expérimentaux ont été sacrifiés sous anesthésie avec une solution de chloral à 10% (3ml/Kg de poids corporel). Ils ont été traités conformément aux lignes directrices relatives aux soins des animaux de laboratoire.

4 Prélèvement des organes et préparation de l'homogénat

Le sang est prélevé tout de suite, après dissection de l'abdomen par une ponction de l'aorte abdominale, dans des tubes EDTA (Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid), le plasma est récupéré après centrifugation du sang total à $1600 \times g$ et conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

Les organes (cerveau, foie et rein) ont été immédiatement prélevés puis rincés dans une solution saline tamponnée glacée (20 mM Tris-HCl, 14 mM NaCl, pH 7.4), pesés et ensuite divisés en plusieurs parties dans la même solution et homogénéisés (10 % p/v). L'homogénat obtenu et le plasma ont été utilisés pour le dosage des marqueurs biochimiques et les aliquotes d'homogénat ont été conservées pour le dosage des autres paramètres.

5 Techniques analytiques

5.1 Dosage des paramètres biochimiques et hématologiques

Les paramètres hématologiques (hématocrite, hémoglobine, globules rouges et globules blancs) et les oligoéléments (Fe^{2+} , Ca^{2+} et Mg^{2+}) ont été analysés par des techniques standards.

5.1.1 Dosage des paramètres hématologiques

Le sang a été prélevé dans des flacons d'échantillonnage EDTA et les paramètres hématologiques ont été analysés à l'aide d'un analyseur hématologique automatique.

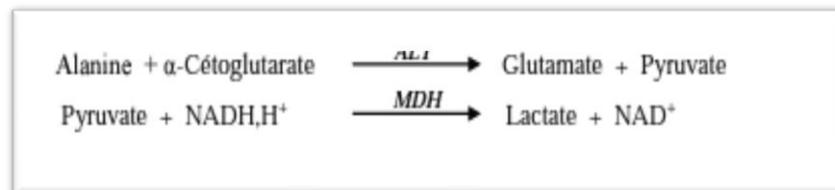
5.1.2 Dosage des oligoéléments (Fe^{2+} , Ca^{2+} et Mg^{2+})

Tous les oligoéléments mentionnés à savoir Fe^{2+} , Ca^{2+} et Mg^{2+} ont été effectués à l'aide d'un analyseur biochimique automatisé.

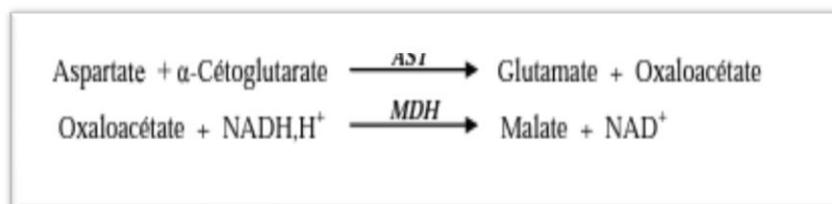
5.2 Dosage des activités des transaminases sériques (ALAT, ASAT)

L'activité de l'alanine amino-transférase (ALAT) et de l'aspartate amino-transférase (ASAT) ont été utilisées comme marqueurs biochimiques des premiers stades des lésions hépatiques aiguës.

L'ALAT est une transaminase connue sous le nom de glutamate-pyruvate-transaminase (GTP), elle catalyse le transfert réversible d'un groupement amine à partir de l'alanine au α -cétoglutarate formant ainsi le glutamate et le pyruvate selon la réaction :



Quant à l'ASAT, c'est une transaminase connue sous le nom de glutamate oxaloacetate- transaminase (GOT), elle catalyse le transfert réversible d'un groupement amine à partir de l'aspartate au α -cétoglutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate selon la réaction :



L'activité de ces transaminases a été déterminée selon une méthode enzymatique colorimétrique à l'aide d'un kit ChronoLab® (Suisse) et est mesurée à une longueur d'onde de l'ordre de 505 nm.

5.3 Marqueurs des lésions rénales

Un kit commercial de BioassaySystems (QuantiChrom™, USA) a été utilisé pour mesurer les taux d'urée et de créatinine.

5.3.1 Dosage de l'acide urique

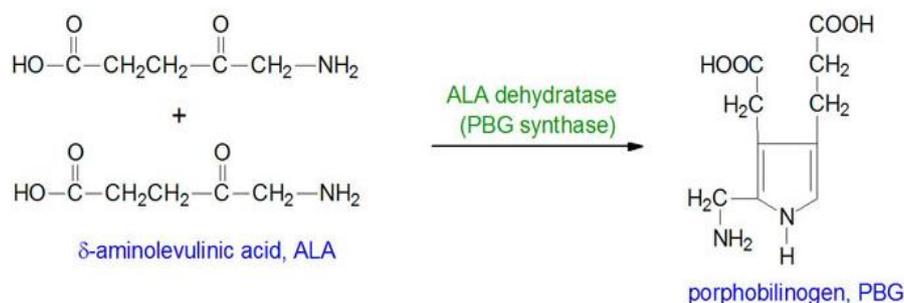
L'urée est principalement produite par le foie et sécrétée par les reins. L'urée est le principal produit final du catabolisme des protéines chez les animaux. C'est le principal vecteur d'élimination de l'ammoniac toxique de l'organisme. La molécule d'urée réagit avec le diacétylmonooxime en présence des ions Fe^{3+} pour donner un complexe coloré, cette réaction est quantifiée par spectrophotométrie à 520 nm.

5.3.2 Dosage de la créatinine

La créatinine est synthétisée dans l'organisme à un rythme relativement constant à partir de la créatine, qui est produite lors des contractions musculaires à partir de la créatine phosphate. Dans le sang, la créatinine est éliminée par filtration à travers les glomérules du rein et est sécrétée dans l'urine. La technique selon la méthode Jaffe (Jaffe, 1986) améliorée utilise du picrate qui forme un complexe coloré rouge avec la créatinine. L'intensité de la couleur mesurée à 510 nm, est directement proportionnelle à la concentration de créatinine dans l'échantillon. La formulation optimisée réduit considérablement l'interférence des substances présentes dans l'échantillon brut.

5.4 Détermination de l'activité de la δ -aminolévulinate déshydratase (δ -ALAD)

L'enzyme δ -aminolévulinate déshydratase (δ -ALA-D), également appelée porphobilinogène synthase, est une enzyme cytosolique contenant du sulfhydryle qui catalyse la condensation de deux molécules d'acide aminolévulinique (ALA) afin de former du porphobilinogène, qui est le précurseur de l'hème, des cytochromes et des cobalamines, selon la réaction :



L'activité de l'ALAD a été déterminée selon la procédure de Fujita (1999). Les échantillons ont été incubés avec de l'acide δ aminolévulinique (δ -ALA) à 37°C pendant 60 minutes et centrifugés. Le surnageant a été incubé avec le réactif d'Ehrlich. L'absorbance a été enregistrée à 555 nm.

5.5 Evaluation de l'activité des enzymes antioxydants

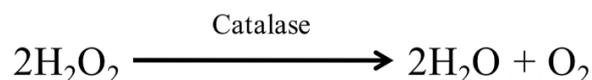
5.5.1 Dosage des protéines totales au niveau tissulaire

Le taux des protéines tissulaires a été quantifié selon la méthode colorimétrique de [Bradford \(1976\)](#). Cette méthode utilise le Bleu Brillant de coomassie (BBC) comme réactif et l'albumine de sérum de bœuf (BSA) comme standard. Le BBC réagit avec les groupements amines (-NH₂) des protéines ainsi un complexe de couleur bleue se forme. Cette apparition reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité établit la concentration des protéines qui est mesurée par spectrophotométrie à 595nm.

5.5.2 Dosage de l'activité de la catalase

L'activité de la catalase a été déterminée par la méthode d'[Aebi \(1984\)](#). La catalase est l'une des enzymes antioxydantes les plus importantes. Elle est présente dans presque tous les organismes aérobies.

La catalase décompose deux molécules de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en une molécule d'oxygène (O₂) et deux molécules d'eau (H₂O) selon la réaction :



La réaction est mesurée à 240 nm dans un tampon phosphate (50 mM, pH 7,0) contenant 10 mM H₂O₂. L'unité d'activité catalase est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour décomposer 1mol de H₂O₂ en 1 min. L'activité a été calculée en utilisant le coefficient d'extinction de H₂O₂ ($\epsilon = 0,0394 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

5.5.3 Activité de la superoxyde dismutase (SOD)

Les superoxydes dismutases (SOD) sont un groupe d'enzymes qui catalysent la dismutation des radicaux superoxydes (O₂⁻) en oxygène moléculaire (O₂) et en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), assurant ainsi la défense cellulaire contre les espèces réactives de l'oxygène.

La méthode de [Spitz et Oberley \(2001\)](#) a été utilisée pour mesurer l'activité de la SOD dans les homogénats de tissus. À 560 nm, l'anion superoxyde produit par la réaction de la xanthine oxydase a été utilisé pour mesurer le taux de réduction du nitro-bleutétrazolium (NBT) en bleu de formazan. L'unité d'activité SOD est définie comme la quantité d'enzyme qui inhibe la réduction de 50 % du NBT.

5.6 Paramètres de stress oxydatif

5.6.1 Détermination de la teneur en glutathion réduit (GSH)

La teneur en GSH a été évaluée par la méthode d'[Akerboom et Sies \(1981\)](#). Le protocole pour le GSH total était le suivant : pour un volume final d'un (01) mL, 730 μ L de tampon phosphate de potassium 0.1 M (pH 7.0) contenant 1 mM d'EDTA, 50 μ L de 4 mg/ml de NADPH dans 0.5% de NaHCO_3 et 20 μ L de 1.5 mg/ml de 5,5-dithiobis (acide 2-nitrobenzoïque) (DTNB) (Sigma) dans 0.5% de NaHCO_3 ont été ajoutés. La réaction a été déclenchée par l'ajout de 6 unités de GSH réductase. L'absorbance a été mesurée pendant 1 min à 412 nm, à une température de 25°C, et la teneur est exprimée en nmol.mg^{-1} protéine.

5.6.2 Dosage du glutathionréductase(GR)

L'activité de la GR a été mesurée selon la méthode décrite par [Carlberg et Mannervik \(1975\)](#). Cette méthode est basée sur la mesure de l'absorbance décroissante résultant de l'oxydation du NADPH liée à la réduction du glutathion oxydé (GSSG) à 340 nm. Le protocole était le suivant : 500 μ L tampon phosphate de potassium (0.2 mM, pH 7, comprenant 2 mM d'EDTA), 50 μ L GSSG à 20 mM, 50 μ L NADPH à 2 mM sont ajoutés à l'échantillon puis le volume final complété à 1 ml. Une unité enzymatique a été définie comme l'oxydation de 1 μ mol de NADPH par minute dans les conditions de l'essai.

5.6.3 Dosage du malondialdéhyde (MDA)

Le MDA a été déterminé par spectrophotométrie à 532 nm selon la méthode décrite par [Ohkawa et al. \(1979\)](#). Brièvement, une aliquote de 200 μ L d'homogénat de sérum ou de tissu (10%, w/v) a été mélangée soigneusement avec une solution aqueuse d'acide thiobarbiturique et chauffée à 95 °C pendant 30 min dans un bain-marie. La suspension est ensuite refroidie à température ambiante, centrifugée à 4000 r/min pendant 10 minutes, et le surnageant coloré en rose a été prélevé pour une mesure spectrophotométrique à 532 nm. La concentration de MDA a été calculée par le coefficient d'absorbance du complexe MDA-TBA (coefficient d'extinction moléculaire = $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La teneur a été exprimée en $\mu\text{mol MDA mg}^{-1} \text{ Hb}$ ou $\mu\text{mol MDA g}^{-1}$ poids de tissu.

5.6.4 Dosage du glutathion peroxydase (GPx)

L'activité GPx a été dosée par la méthode de [Paglia et Valentine \(1967\)](#) avec des modifications selon [Lawrence et Burke \(1978\)](#). Le mélange réactionnel contenait 50 mM de tampon phosphate de potassium (pH 7.0), 10 mM GSH, 2 mM NADPH et 1 mM de sodium azide. La réaction a été initiée par l'addition du peroxyde d'hydrogène à 5 mM. L'activité

enzymatique a été estimée à partir du taux d'oxydation du NADPH, et est exprimée en $\mu\text{mol}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de protéines.

5.6.5 Dosage des carbonyles protéiques

Les dommages oxydatifs des protéines ont été mesurés selon la méthode de [Levine et al. \(1990\)](#) par la quantification des groupes carbonyles basée sur la réaction avec la dinitrophénylhydrazine (DNPH). Brièvement, les protéines ont été précipitées par l'ajout de 20% d'acide trichloracétique et re-dissoutes dans la DNPH. L'absorbance a été déterminée par spectrophotométrie à 370 nm et la teneur est exprimée en $\text{nmol carbonylesmg}^{-1}$ protéines.

6 Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm SD. Une analyse de variance à un seul facteur de classification (ANOVA) et une comparaison de moyennes sont effectués par le logiciel SPSS version 23. Les statistiques ont été considérées comme significatives pour les valeurs avec $p < 0,05$.

Résultats et discussion

Expérimentation 01: Effets du Cadmium (Cd) et du Plomb (Pb) séparément ou en combinaison sur le rat *Wistar*.

1.1 Effets du Cd et du Pb séparément ou en combinaison sur les paramètres hématologiques, biochimique et les activités enzymatiques antioxydantes

Les résultats des paramètres hématologiques sont présentés dans la [Figure 28](#). Une réduction significative ($p < 0.001$) du nombre de globules rouges (GR), de la teneur en hémoglobine (Hb) et du taux d'hématocrite (Ht) a été enregistrée pour les deux groupes traités au Pb, Cd et Pb+Cd par rapport au groupe témoin, tandis que le nombre de globules blancs (GB) a augmenté de manière significative.

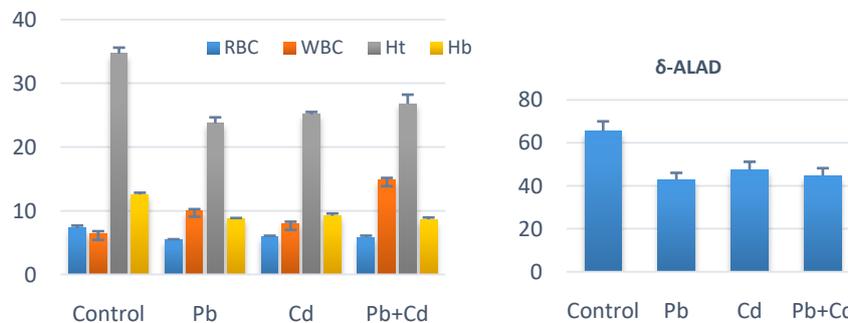


Figure 28: Effets du Cd et du Pb, séparément ou en combinaison, sur les paramètres hématologiques et de la δ -aminolévulinique déshydratase (δ -ALAD) sérique des rats *Wistar*.

En ce qui concerne l'enzyme δ -aminolévulinate déshydratase (δ -ALAD), nous avons observé une inhibition significative après l'exposition aux métaux et confirmé une corrélation positive entre l'activité de la δ -ALAD et l'hémoglobine, ce qui suggère que l'inhibition de cette enzyme pourrait accentuer l'anémie. L'effet de l'exposition des rats aux métaux seuls est similaire à celui de l'exposition combinée. Les activités du superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase (CAT) dans le sang ont été inhibées de manière similaire dans tous les groupes exposés parallèlement à une augmentation du niveau de malondialdéhyde (MDA). L'activité de la δ -aminolévulinate déshydratase (δ -ALAD) dans le sang est en corrélation positive avec la teneur en hémoglobine ($r = 0.99$; $p < 0.001$). Par ailleurs, la δ -ALAD est en corrélation négative avec la teneur en MDA ($r = -0,83$). Dans l'ensemble des groupes exposés aux métaux, une diminution significative de la teneur en glutathion réduit ([Figure 29](#)) et une

augmentation significative des niveaux de carbonyle dans les protéines (Figure 30) et de la teneur en MDA (Figure 31) ont été observées par rapport aux rats témoins.

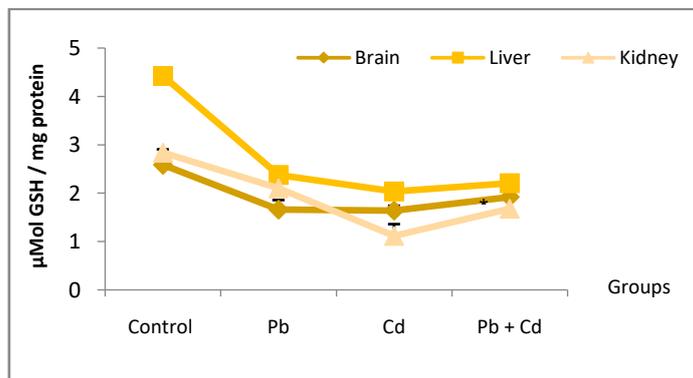


Figure 29: Effets du Cd, du Pb et de leur combinaison sur la teneur en glutathion du cerveau, du foie et des reins des rats Wistar. Chaque résultat représente la moyenne \pm SD de cinq rats par groupe.

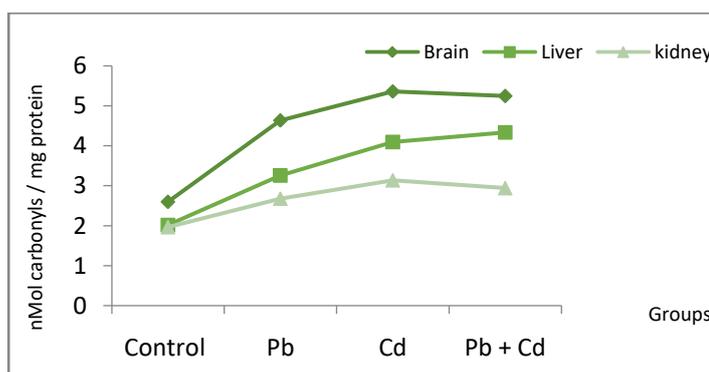


Figure 30: Effets du Cd, du Pb et de leur combinaison sur les niveaux de carbonyle des protéines du cerveau, du foie et des reins des rats Wistar. Chaque résultat représente la moyenne \pm SD de cinq rats par groupe.

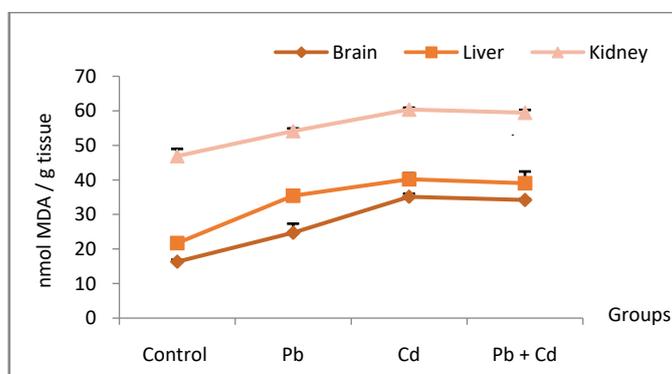


Figure 31: Effets du Cd, du Pb et de leur combinaison sur la teneur du malondialdéhyde (MDA) des organes de rats Wistar. Chaque résultat représente la moyenne \pm SD de cinq rats par groupe.

1.2 Effets du Cd et du Pb séparément ou en combinaison sur les paramètres biochimiques du sérum et des organes

Les résultats des effets des métaux, seuls ou combinés, sur les paramètres biochimiques (urée, créatinine, ALT et AST) sont présentés dans la [Figure 32](#). Les taux sériques d'alanine aminotransférase (ALT), d'aspartate amino-transférase (AST), d'urée et de créatinine ont augmenté de manière significative ($p < 0.001$) dans les groupes traités au Pb, au Cd et à la combinaison (Pb+Cd) par rapport au groupe témoin.

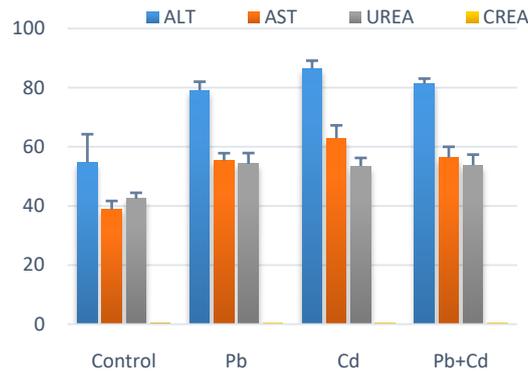


Figure 32: Effets du plomb et du cadmium, séparément ou en combinaison, sur l'alanine aminotransférase (ALT), l'aspartate aminotransférase (AST), et teneurs de l'urée et créatinine.

1.3 Effets du Cd et du Pb séparément ou en combinaison sur l'activité des enzymes antioxydants (CAT et SOD)

Nos résultats ont montré une inhibition significative ($p < 0.001$) de l'activité de la SOD et de la CAT dans tous les organes (foie, cerveau et reins) traités avec des métaux seuls ou combinés par rapport au groupe témoin ([Figure 33](#)).

Les données pour l'exposition combinée sont approximativement les mêmes que pour l'exposition individuelle. Les activités enzymatiques hépatiques de la CAT et de la SOD ont diminué à la suite de l'administration de Cd de 25 % ($p < 0.001$) et de 52 % ($p < 0.001$), respectivement ; tandis que la concentration de MDA a augmenté d'environ deux fois ($p < 0.001$) par rapport aux rats non exposés aux métaux. Des changements similaires ont été observés après un traitement au Pb seul. Les activités CAT et SOD ont diminué de 21 % ($p < 0.001$) et 47 % ($p < 0.001$), et la concentration de MDA a été multipliée par deux ($p < 0.001$). Chez les rats co-exposés au Cd et au Pb, les activités de la CAT et de la SOD ont diminué de 23% et 50% par rapport au contrôle.

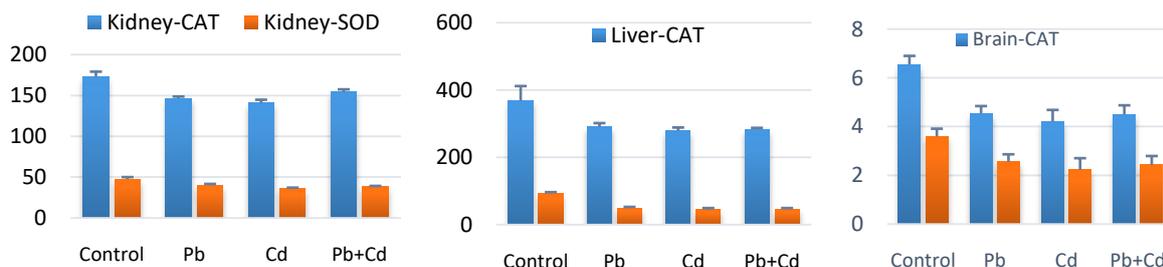


Figure 33: Effets du plomb et du cadmium, séparément ou en combinaison, sur la catalase et la superoxyde dismutase dans le cerveau, le foie et les reins.

1.4 Teneur en Cd et Pb dans les organes

Le Figure 34 montre la concentration de Cd et de Pb dans le plasma, le cerveau, le foie et les reins des groupes expérimentaux et du groupe témoin. Nous avons trouvé une quantité significative élevée de Cd et de Pb dans les groupes exposés au traitement au Pb et au Cd par rapport au groupe témoin. Les concentrations de Cd et de Pb déterminées dans le sang des groupes exposés au Pb et au Cd étaient très significativement plus élevées que dans le groupe témoin. La co-exposition n'a pas influencé de manière significative la bioconcentration de chaque métal où nous avons trouvé presque la même quantité de chaque métal.

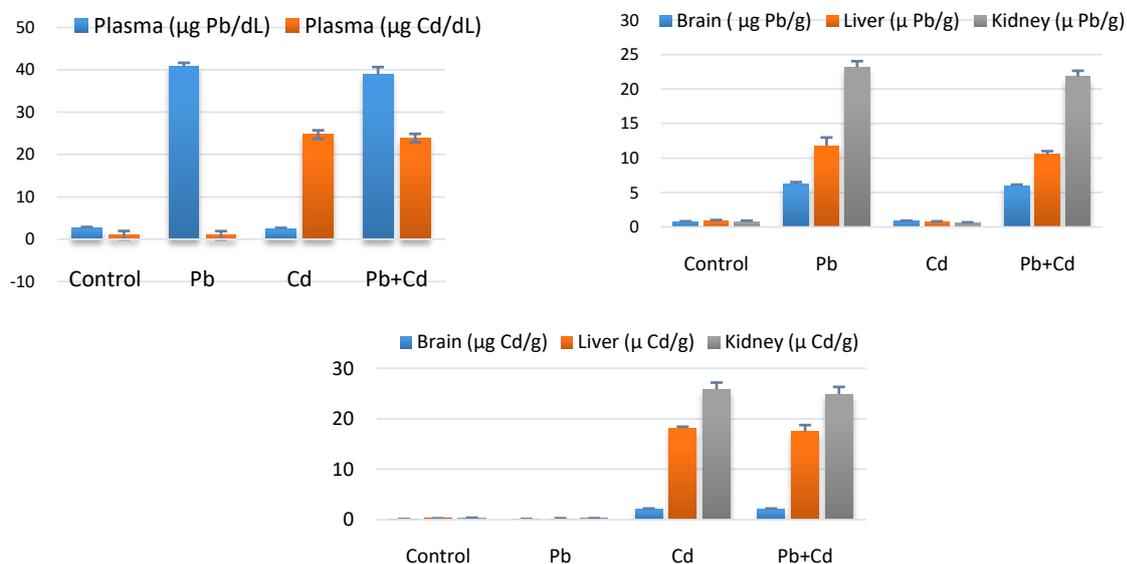


Figure 34: Effet dose-dépendant du Cd et du Pb, séparément ou en combinaison, sur la teneur en plomb et en cadmium du plasma, du cerveau, du foie et des reins des rats Wistar.

2 Discussion

Notre objectif au cours de cette expérimentation était d'évaluer si l'exposition aux deux métaux, seuls ou combinés, pouvait induire un effet oxydatif additif, synergique ou antagoniste. Pour étudier la toxicité de la distribution et de l'accumulation des métaux dans les organes et les tissus, nous devons nous appuyer sur de nombreux facteurs, tels que leurs propriétés et leurs formes, la période d'exposition, leur biodisponibilité, ainsi que leur capacité à se lier à des ligands.

Le système hématopoïétique est l'un des organes les plus sensibles pour déterminer la toxicité dans un organisme. Dans la présente étude, une baisse significative du nombre de GR, de la teneur en Hb et du taux Ht a été observée dans tous les groupes traités, tandis que le nombre de GB a augmenté de manière significative. Les paramètres hématologiques sont étroitement liés au système circulatoire. Dans une étude réalisée par [Corredor-Santamaría et al. \(2016\)](#), il a été souligné que pendant la saison des pluies, lorsque les rejets d'eaux usées industrielles et domestiques chargées de métaux lourds augmentaient, les deux espèces *Astyanax bimaculatus* et *Aequidens metae* présentaient une altération des paramètres hématologiques Hb, Ht, et GR avec une augmentation de globules blancs (GB) principalement des thrombocytes et des neutrophiles.

La corrélation positive entre la δ -aminolévulinate déshydratase (δ -ALAD) et l'hémoglobine pourrait accentuer l'anémie induite par l'accumulation du Cd et le Pb dans les organes de l'animal expérimental (rein, foie et rate). Nos résultats sont en accord avec d'autres recherches menées sur différents modèles animaux. [Andjelkovic et al. \(2019\)](#) ont rapporté que la présence du Cd dans le sang de rat indique une anémie normocytaire normochrome. [Zhang et al. \(2017\)](#) a démontré une diminution significative de la concentration d'Hb chez les poissons exposés au Cd, attribuée à une baisse significative des niveaux de fer dans le sang en raison de l'absence d'absorption par l'estomac. En tant que métal lourd connu pour son effet anémique, le Cd provoque l'anémie en induisant une carence en fer ([Cirovic et al., 2022](#)), l'hémolyse ([Unsal et al., 2020](#)) et une altération de la production d'érythropoïétine (EPO) ([Thévenod et al., 2022](#)). Les cytosquelettes des globules rouges (GR) peuvent être détruits au début de l'exposition au Cd, ce qui entraîne des membranes cellulaires déformées ([Liu et al., 2022](#)). Le Cd et le fer (Fe) sont en compétition pour les mêmes sites de liaison de la protéine transporteuse de métaux et du transporteur de métaux divalents-1, et comme le Fe entre dans

la production du complexe hémique, un tel manque de fer augmentera la toxicité du Pb pour la synthèse de l'hème (Nemmiche and Guiraud 2016).

Ohta and Ohba (2020) ont examiné l'absorption gastro-intestinale du Cd au moyen de différents transporteurs de métaux, notamment les métallothionéines (MT), le transporteur de métaux divalents 1 (DMT1), la protéine importatrice de zinc 14 (ZIP14), l'ATPase de type P transportant le Cu (ATP7A) et le TRPV6 (Transient Receptor Potential Vanilloid 6), dans trois segments distincts de l'intestin des rats. Il a été constaté que les concentrations intestinales de Cu et de Fe diminuaient, contrairement à l'augmentation du niveau de Cd. En outre, l'augmentation de l'exposition duodénale au Cd a entraîné une augmentation de l'expression des gènes MTI, MTII, DMT1, ZIP14, ATP7A et TRPV6. Selon leurs conclusions, le Cd se lie à MT et à d'autres transporteurs de métaux dans l'intestin grêle et s'accumule dans les tissus. Des troubles du métabolisme du Zn ont été constatés dans l'étude menée par Borowska et al. (2017) sur des rats où il a été montré qu'après un traitement de 10 mois au Cd, l'absorption du zinc a diminué.

Mladenović et al. (2014) ont démontré que l'injection i.p du Cd provoquait la production de radicaux libres et la peroxydation des lipides impliquant l'hémolyse des GR, provoquant une anémie sévère. Un autre effet toxique du Cd sur les érythrocytes est la mort suicidaire, connue sous le nom de pyroptose, observée chez les fumeurs (Attanzio et al., 2019).

L'augmentation des niveaux des globules blancs (GB) pourrait s'expliquer par un désordre immunologique conduisant l'organisme à en produire davantage ; en effet, les GB font partie du système immunitaire et ont un rôle critique dans les réponses immunologiques non spécifiques et spécifiques dans la défense de l'organisme contre les xénobiotiques. Une altération du système immunitaire a été observée chez le tilapia du Nil provenant d'une zone influencée par le déversement d'eaux de ruissellement provenant d'activités agricoles et urbaines contaminées par des métaux lourds.

L'analyse des GB a révélé un pourcentage élevé d'éosinophiles et de monocytes et moins de thrombocytes (Corrêa et al., 2017). Donmez et al. (2019) a rapporté que les GB augmentaient de manière significative dans les groupes traités au Cd, ce qui entraînait une augmentation des niveaux de radicaux libres, une diminution de l'activité antioxydante et l'inhibition de l'inflammation systémique. Ma et al. (2022) a constaté que des niveaux élevés de cadmium augmentaient les facteurs inflammatoires, y compris les GB ; Ali et al. (2021) a également constaté que le Cd diminuait de manière significative les paramètres

hématologiques, à l'exception des GB. Le traitement contenant du Pb a donné un niveau plus élevé de GB que celui contenant du Cd.

Nos résultats concordent avec ceux de [Chen et al. \(2021\)](#), qui ont démontré que le Pb a un effet immunotoxique. [Aladaileh et al. \(2020\)](#) a trouvé les mêmes résultats ; il a été expliqué que le Pb augmentait le niveau des GB en raison de son effet inflammatoire. Nos résultats sont en accord avec ceux d'[Aladaileh et al. \(2020\)](#). Le Pb entre en compétition avec le Ca sur les sites de fixation du calcium, ce qui peut modifier le fonctionnement des protéines et le maintien de l'homéostasie calcique. Il a été démontré qu'un déficit en calcium augmente l'absorption et la rétention du plomb ([Ettinger et al., 2007](#)).

Les principaux mécanismes de la toxicité du plomb ont été identifiés comme étant l'activation des fonctions cellulaires en raison de son activité d'imitation du calcium et l'inhibition de la fonction des protéines par sa liaison aux groupes sulfhydryl (-SH) des acides aminés. [Zulfahmi et al. \(2021\)](#) a rapporté que l'exposition au nitrate de plomb induit des réductions significatives des taux de GR, d'Hb et d'Ht chez le poisson. L'exposition au Pb a augmenté les protéines sériques totales et le nombre de globules blancs totaux et différentiels chez les cobayes ([Farkhondeh et al., 2014](#)). Les effets hématologiques de la toxicité chronique du Pb dans l'eau de boisson pendant 12 semaines chez des rats mâles adultes ont montré une diminution significative du nombre de globules rouges (GR), ainsi qu'une augmentation du nombre de GB totaux et différentiels ([Mugahi et al., 2003](#)). En outre, dans notre étude, nous avons évalué que le Pb était le métal ayant l'impact le plus négatif par rapport au Cd, alors que le mélange n'implique pas d'effet additif.

Nous avons observé une inhibition significative de la δ -aminolévulinate déshydratase (δ -ALAD), une enzyme de la voie de biosynthèse de l'hème, après l'exposition aux métaux par rapport au groupe témoin, avec une inhibition plus forte chez les groupes traités au Pb. Cela peut s'expliquer par la capacité du Pb à endommager l'activité du δ -ALAD en remplaçant le Zinc (Zn). Contrairement au Cd, le Pb induit une anémie en inhibant l'activité de la pyrimidine 5' nucléotidase ([Fakoor et al., 2019](#)), en diminuant la quantité d'hème ([Ugwuja et al., 2020](#)) et en induisant l'érythrophagocytose et l'externalisation de la phosphatidylsérine dans les GR ([Kwon et al., 2015](#)). La forte affinité du Pb pour le site de liaison du Zn inhibe la fonction du δ -ALAD et peut entraîner l'accumulation d'acide δ -aminolévulique (δ -ALA), qui peut perturber le métabolisme aérobie et a également une certaine activité pro-oxydante. Dans leur étude, [Jang et al. \(2011\)](#) ont démontré que le plomb pouvait accélérer la séquestration splénique des érythrocytes par l'exposition à la phosphatidylsérine (PS) et augmenter par la

suite l'érythrophagocytose. Nos résultats sont cohérents avec ceux de [Qader et al. \(2021\)](#) qui suggèrent que le Pb altère le gène δ -ALAD responsable de la production d'hémoglobine et provoque donc l'anémie. Ces résultats sont également en accord avec les études rapportées par [Hemmaphan and Bordeerat \(2022\)](#).

Les activités de la SOD et de la CAT dans le sang, le foie, le cerveau et les reins ont été significativement inhibées après l'exposition au métal, tandis qu'une élévation significative du niveau de MDA a été observée dans le sang et une diminution significative de la teneur en GSH avec une augmentation significative des niveaux de carbonyle dans les protéines, ces résultats sont en accord avec les travaux de [Riaz et al. \(2019\)](#) qui a montré une diminution importante des marqueurs du stress oxydatif notamment, CAT, SOD et GSH due à l'exposition aux métaux lourds. Il est documenté dans la littérature que le Pb s'attache aux groupes -SH des enzymes et des protéines, ce qui réduit l'activité de certaines d'entre elles, y compris la SOD et la CAT, et induit la production d'une quantité considérable de MDA ([Matović et al., 2015](#)). Le traitement au Cd seul et mélange de Cd+Pb a donné l'effet le plus négatif, avec une très légère différence suggérant de possibles interactions synergiques entre ces deux métaux sur l'état oxydatif par rapport à l'hématopoïétique. Ces résultats sont en accord avec les études réalisées par [Andjelkovic et al. \(2019\)](#).

Les effets toxicologiques des métaux lourds sont principalement attribués à leur capacité à générer des radicaux libres dans le système biologique. On sait que les ROS sont générés soit directement par la production catalytique de superoxyde par les réactions de Haber-Weiss et de Fenton, soit indirectement par d'autres mécanismes lors de l'exposition aux métaux lourds ([Nemmiche, 2017](#)). La production excessive de ROS dépasse les défenses antioxydantes naturelles et exerce une toxicité par le biais de la peroxydation des lipides, qui est considérée comme la première étape de l'endommagement des membranes cellulaires. Le niveau de peroxydation des lipides est largement utilisé comme indicateur des dommages oxydatifs causés par les ROS. [Cobbina et al. \(2015\)](#) a trouvé que l'exposition à un mélange de métaux lourds a induit une augmentation du niveau de MDA.

La présente étude a révélé une diminution de l'activité enzymatique de la CAT et de la SOD, cela a été documenté précédemment dans d'autres travaux faits par [Sudjarwo et al. \(2017\)](#), et [Winiarska et al. \(2015\)](#).

Le système rénal est le principal organe responsable de l'élimination des substances toxiques dans l'organisme, y compris les métaux lourds ; il sert également de point d'absorption de ces substances. Par conséquent, la toxicité des métaux lourds a également un

impact sur les reins, qui sont l'un des principaux organes cibles étudiés pour la toxicité des métaux lourds. Les niveaux d'amino-transférases ont augmenté de manière significative chez les rats traités au Pb, au Cd et à la combinaison (Pb+Cd) par rapport au groupe témoin. Cependant, ces paramètres hépatiques n'ont pas été intensifiés chez les rats exposés à la combinaison (Cd+Pb). En fait, c'est le Cd qui a eu l'effet négatif le plus fort, suivi par le mélange Cd+Pb.

Le taux de créatinine et l'urée ont augmenté de manière significative dans les groupes intoxiqués au Pb, au Cd et à la combinaison (Pb+Cd) par rapport au groupe témoin. Cette augmentation pourrait être due à une lésion rénale. Alors que l'urée est un sous-produit du métabolisme des protéines, la créatinine est en fait le produit de dégradation de la créatine phosphate dans les myocytes. En comparant les effets de ces deux métaux, chacun seul, on se rend compte que le Pb a eu un effet plus négatif sur l'urée et la créatinine que le Cd, suivi du mélange (Cd+Pb), contrairement à l'ALT et l'AST. Le potentiel néphrotoxique du Cd et de différents métaux lourds (Pb et Cr) a été signalé dans d'autres études telles [Matović et al. \(2015\)](#) ; [Tsai et al. \(2017\)](#). L'exposition sub-chronique au Pb par dans l'eau de boisson chez les rats a augmenté l'activité de l'ALT de l'AST et les niveaux d'urée et de créatinine. En outre, l'exposition au Pb a induit des changements nécrotiques dans le foie et les reins ([Jadhav et al., 2007](#)). L'administration intrapéritonéale de Pb induit une hépatotoxicité chez les rats, ce qui accentue les anomalies des hépatocytes et augmente les niveaux d'AST et d'ALP ([Abirami et al., 2007](#)). Récemment, [Andjelkovic et al. \(2019\)](#) a signalé les effets toxiques d'une exposition aiguë au Cd et au Pb sur les reins des rats. Il a été rapporté que le Pb endommage les reins en interagissant avec les protéines de liaison au calcium, qui servent de substrat aux transporteurs de calcium dans les mitochondries et modifient le métabolisme oxydatif des cellules des tubules proximaux rénaux ([Jia et al., 2012](#)).

Une teneur élevée et significative est enregistré en Cd et Pb dans les groupes qui ont été exposés au traitement au Pb et au Cd par rapport au contrôle, alors que la co-exposition n'a pas influencé de manière significative la concentration finale de chaque métal, où nous avons trouvé presque la même quantité de chaque métal. Des résultats similaires ont été obtenus dans une expérimentation faite par [Pillai et al. \(2005\)](#) de quinze jours sur des rats traités par voie i.p avec Cd et Pb seul et combiné, où après un traitement mixte les niveaux de Cd et de Pb dans le foie étaient conformes aux régimes à dose unique. Cette observation pourrait s'expliquer par des interactions toxico-cinétiques entre ces deux métaux au niveau de l'absorption intestinale, ce qui modifie la distribution dans le sang et les tissus. Le transporteur de cations équivalents (DCT1), également connu sous le nom de DMT1, est l'un des

transporteurs et un participant possible à l'interaction entre les métaux toxiques (Nemmiche and Guiraud, 2016).

Expérimentation 02 : Effets de l'imidaclopride (IMI) et du Cadmium séparément ou en combinaison sur le foie du rat *Wistar*.

2.1 Effets de l'IMI et du Cd séparément ou en combinaison sur la teneur en malondialdéhyde (MDA)

Une augmentation significative du niveau de MDA a été observée dans tous les groupes traités par rapport au groupe témoin ($p < 0,001$) (Figure 35), la teneur la plus élevée a été observée dans le groupe IMI avec 4 fois plus par rapport au groupe témoin, suivi par le groupe traité avec le Cd puis le groupe IMI+Cd (2,5 fois et 2 fois, respectivement).

Dans cette étude, le MDA a été utilisé comme indicateur pour évaluer la peroxydation des lipides induite par le stress oxydatif, l'IMI a eu un effet plus prononcé que la co-exposition d'IMI et du Cd, ce qui signifie que nous avons une grande quantité d'accumulation de radicaux libres dans le tissu hépatique.

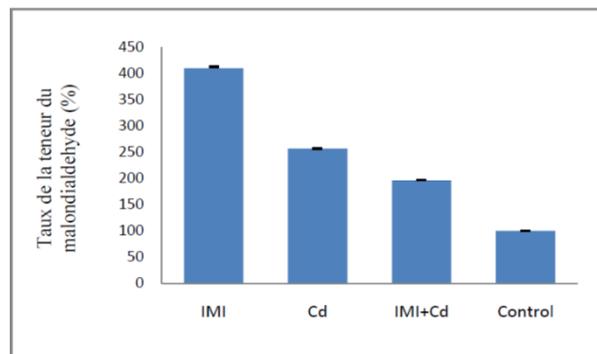


Figure 35: Effets de l'IMI et du Cd séparément ou en combinaison sur la teneur en malondialdéhyde. Chaque résultat représente la moyenne \pm SD de quatre rats par groupe.

2.2 Effets de l'IMI et du Cd séparément ou en combinaison sur l'activité enzymatique antioxydante (SOD, CAT, GPx et GR)

2.2.1 Effets de l'IMI et du Cd séparément ou en combinaison sur l'activité de la catalase (CAT) et la superoxyde dismutase (SOD)

L'activité de la catalase (CAT) a été significativement inhibée ($p < 0,001$) dans tous les groupes traités par rapport au groupe témoin, avec une légère diminution dans le groupe co-

exposé IMI+Cd, suivi par le Cd et l'IMI (environ 56 % et 48 %, respectivement) (Figure 36), tandis que l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) a significativement augmentée ($p < 0,001$) après le traitement par rapport au groupe témoin (Figure 37). Le groupe traité au Cd présente la plus grande activité SOD, tandis que l'IMI et le groupe co-exposé IMI+Cd ont presque la même activité, avec seulement 15 % de différence.

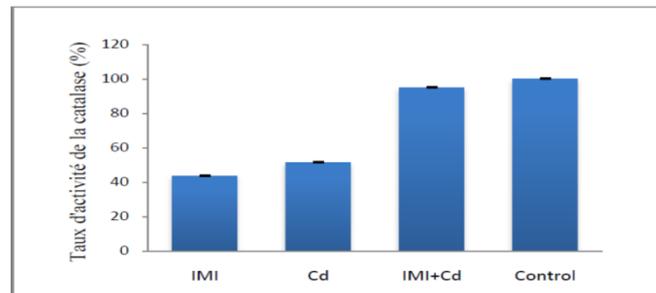


Figure 36: Effets de l'IMI et du Cd séparément ou en combinaison sur l'activité catalasique. Chaque résultat représente la moyenne \pm SD de quatre rats par groupe.

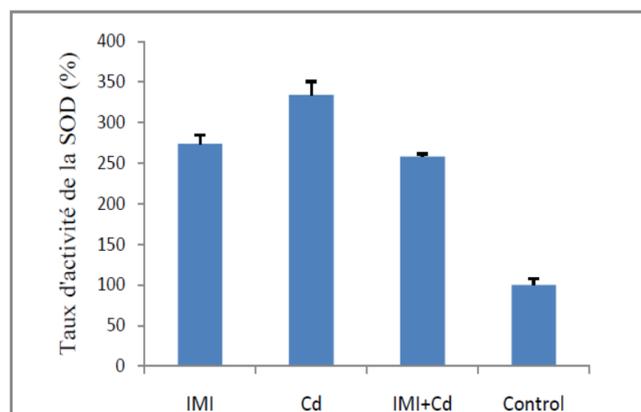


Figure 37: Effets de l'IMI et du Cd séparément ou en combinaison sur le taux d'activité du superoxyde dismutase. Chaque résultat représente la moyenne \pm SD de quatre rats par groupe.

2.2.2 Effets de l'IMI et du Cd séparément ou en combinaison sur l'activité de la glutathion peroxydase (GPx)

Une augmentation significative du niveau de GPx a été observée dans tous les groupes traités par rapport au groupe témoin ($p < 0,001$) (Figure 38). Le taux d'activité le plus élevé a été observé dans le groupe IMI avec une augmentation de 4 fois par rapport au groupe témoin, suivi par le groupe traité au Cd et le groupe IMI+Cd (2,5 fois et 2 fois, respectivement).

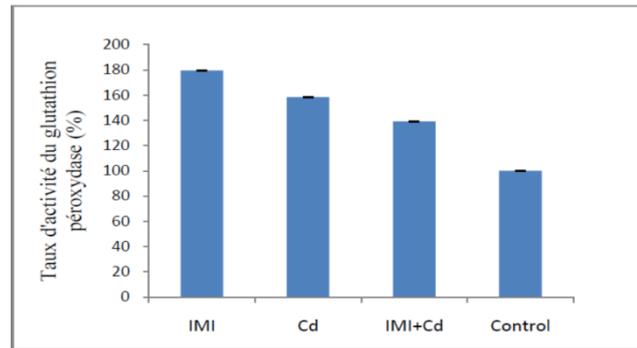


Figure 38: Effets de l'IMI et du Cd séparément ou en combinaison sur le taux d'activité du glutathion peroxydase. Chaque résultat représente la moyenne \pm SD de quatre rats par groupe.

2.2.3 Effets de l'IMI et du Cd séparément ou en combinaison sur le taux d'activité du glutathion réductase (GR)

L'activité de la GR s'est avérée significativement diminuée ($p < 0,001$) dans tous les groupes traités par rapport au groupe témoin (Figure 39). Le groupe IMI a enregistré l'augmentation la plus importante avec un facteur de presque 2, suivi par le Cd avec un facteur de 1,5 et enfin le groupe co-exposé (IMI+Cd).

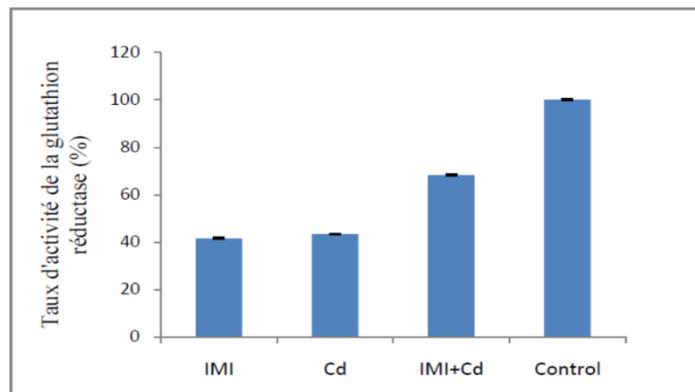


Figure 39: Effets de l'IMI et du Cd séparément ou en combinaison sur le taux d'activité du glutathion réductase. Chaque résultat représente la moyenne \pm SD de quatre rats par groupe.

2.2.4 Effets de l'IMI et du Cd séparément ou en combinaison sur l'activité des thiols totaux (T-SH) et glutathion réduit (GSH)

Les niveaux de GSH et de T-SH ont diminué de manière significative dans tous les groupes traités ($P < 0,001$) par rapport au groupe témoin (Figure 40). Le groupe co-exposé à l'IMI+Cd a connu la plus forte augmentation du taux de GSH, tandis que l'IMI a entraîné la plus forte augmentation du taux de T-SH. Cependant, le Cd a entraîné la plus faible augmentation des niveaux de GSH et de T-SH.

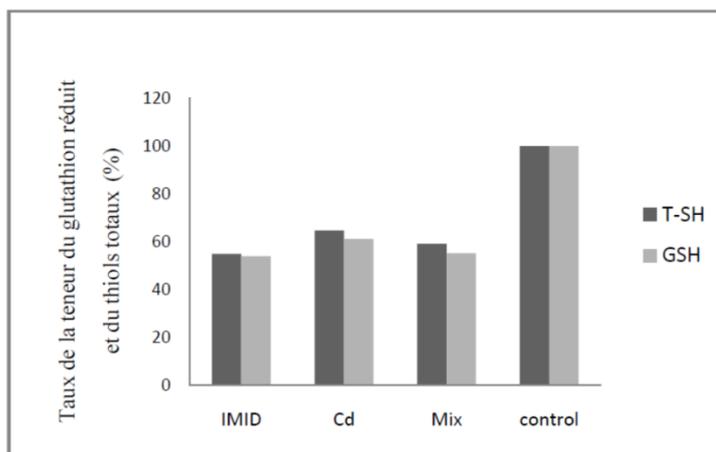


Figure 40: Effets de l'IMI et du Cd séparément ou en combinaison sur la teneur en thiols totaux et glutathion réduit. Chaque résultat représente la moyenne \pm SD de quatre rats par groupe.

2.2.5 Effets de l'IMI et du Cd séparément ou en combinaison sur la teneur en carbonyles protéiques

L'oxydation des protéines est un excellent indicateur des dommages oxydatifs causés par les ROS. Les niveaux des carbonyles protéiques ont augmenté de manière significative dans tous les groupes traités par rapport au groupe témoin ($p < 0,001$) (Figure 41). L'augmentation la plus importante a été enregistrée dans le groupe Cd et IMI+Cd avec un doublement par rapport au groupe témoin, suivi du groupe traité par IMI.

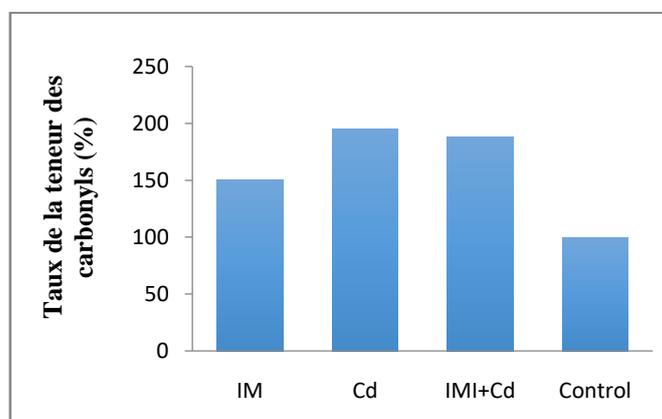


Figure 41: Effets de l'IMI et du Cd séparément ou en combinaison sur la teneur des carbonyles protéiques. Chaque résultat représente la moyenne \pm SD de quatre rats par groupe.

2.3 Discussion

L'objectif de la présente étude est d'évaluer si une exposition unique ou combinée au cadmium et à l'imidaclopride, un pesticide néonicotinoïde, peut avoir un effet oxydatif additif, synergique ou antagoniste. L'interaction entre les différents produits chimiques peut

varier en fonction des concentrations, des durées d'exposition et du système biologique spécifique étudié.

Le foie est le site principal du métabolisme des xénobiotiques et il est sensible aux effets nocifs des substances toxiques. L'imidaclopride et le cadmium ont tous les deux démontré des effets hépatotoxiques potentiels (Das and Al-Naemi, 2019 ; Niture et al., 2021 ; Toghan et al., 2022).

Le stress oxydatif survient lorsqu'il y a un déséquilibre entre la production des ROS/RNS et d'antioxydants (Nemmiche, 2017). Les radicaux libres s'engagent facilement avec les acides gras polyinsaturés présents dans la bicouche lipidique des membranes cellulaires, provoquant ainsi une peroxydation importante. Ce processus conduit à la génération de divers produits, dont le malondialdéhyde (MDA), le peroxyde d'hydrogène et les radicaux hydroxyles. Le MDA sert de bio-marqueur du processus de peroxydation des lipides et il est utilisé pour évaluer la dégradation des lipides polyinsaturés dans les tissus soumis à un stress oxydatif (Mahajan et al., 2020). L'exposition à l'IMI et le Cd seul a augmenté le niveau du MDA et a eu un effet plus prononcé avec une plus grande augmentation en utilisant l'IMI que la co-exposition de l'IMI+Cd, il est bien connu que ces deux substances chimiques induisent la peroxydation lipidique causée par le stress oxydatif. Nos résultats sont en accord avec d'autres études antérieures (Goodarzi et al., 2020 ; Taha et al., 2021 ; Yan et al., 2021 ; Di Paola et al., 2022).

Les résultats obtenus avec une co-exposition à l'IMI+Cd peuvent s'expliquer par un possible effet antagoniste. Dans l'antagonisme, deux substances sont impliquées, dont l'une, appelée agoniste partiel, a une faible efficacité et entre en compétition avec une seconde substance, appelée agoniste complet, qui a une grande efficacité (Singh et al., 2017). Ces résultats sont en accord avec ceux de Wang et al. (2023) qui a combiné des approches biochimiques et omiques pour expliquer la toxicité de l'IMI et du Cd lorsqu'ils sont administrés ensemble. Les résultats ont montré que la co-exposition a significativement réduit l'accumulation de MDA par rapport à une exposition seule, il a été expliqué que l'administration combinée a principalement réduit l'accumulation de glycérol-phospholipides induite par le Cd et a ralenti la régulation à la baisse des acides gras induite par l'IMI.

Dans les réactions biochimiques de chaque organisme, les groupes sulfhydryl (-SH) présents dans les protéines et les thiols non protéiques constituent le principal moyen de neutraliser les radicaux ROS/RNS générés. Le métabolisme élevé des xénobiotiques entraîne

une surproduction de radicaux libres, qui sont neutralisés par l'interaction avec les groupes -SH disponibles. La diminution du niveau de T-SH observée dans le tissu hépatique après exposition à un produit toxique peut être attribuée à une diminution de la production et/ou à une augmentation de la consommation de T-SH pour la neutralisation des radicaux libres générés de manière excessive au cours du métabolisme du toxique dans les hépatocytes de rat (Mahajan et al., 2018). Le niveau du GSH et T-SH a diminué de manière significative dans tous les groupes traités, le groupe co-exposé à l'IMI+Cd a donné la plus forte augmentation du niveau de GSH ; cela peut s'expliquer par un effet synergique possible des deux substances toxiques, tandis que dans le niveau de T-SH, l'IMI a donné la plus forte augmentation.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Mahjan et al. (2020) qui ont utilisé l'IMI en combinaison avec l'arsenic. Les thiols totaux englobent les thiols intracellulaires et extracellulaires existant soit sous forme libre en tant que glutathion oxydé (GSSG) ou réduit (GSH), soit sous forme de thiols liés aux protéines (Baba et al., 2018). Des niveaux réduits de thiols ont été observés dans divers troubles médicaux, tels que l'insuffisance rénale chronique (Otal et al., 2018), les maladies cardiovasculaires (Andreadou et al., 2021), les troubles neurologiques (Vural et al., 2021), le diabète sucré (Ates et al., 2016) et la cirrhose (Damar Çakırca et al., 2020). Par conséquent, l'exposition à des substances toxiques telles que les pesticides et les métaux lourds amplifie les risques de développer diverses pathologies. Nazima et al. (2015) ont également rapporté une diminution du niveau de GSH chez les rats traités au Cd induisant un stress oxydatif cardiaque chez les rats ; des résultats similaires ont été trouvés dans d'autres recherches avec le traitement IMI (Lohiya et al., 2017 ; Sevim et al., 2020).

La superoxydedismutase (SOD) est une enzyme cruciale de la première ligne de défense du système antioxydant, aux côtés de la catalase (CAT), de la glutathion peroxydase (GPX) et de la glutathion réductase (GR) (Rajput et al., 2021). Ces enzymes jouent collectivement un rôle protecteur contre le stress oxydatif (Carmo de Carvalho e Martins et al., 2022).

L'activité de la SOD a augmenté de manière significative après l'exposition au traitement (IMI, Cd, IMI+Cd) par rapport au groupe témoin. Le groupe traité au Cd présentait la plus grande quantité de SOD, tandis que l'IMI et le groupe co-exposé (IMI+Cd) étaient presque au même niveau. La glutathion peroxydase (GPX), tout comme la CAT et la SOD, est considérée comme un indicateur du stress oxydatif et joue un rôle crucial dans la protection en normalisant les niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Une augmentation

significative du niveau de GPx a été observée dans tous les groupes traités par rapport au groupe témoin. La quantité la plus élevée a été enregistrée dans le groupe IMI, tandis que l'augmentation la plus faible a été observée dans le groupe co-exposé. Ces résultats sont en accord avec [El-Garawani et al. \(2021\)](#) qui a trouvé une augmentation de la quantité de SOD et de GPx dans les tissus du foie des poissons recevant un traitement IMI, ce qui peut s'expliquer par la production de ROS. [Vieira et al. \(2018\)](#) a également constaté une augmentation significative du niveau de SOD et de GPx due au traitement IMI chez les poissons néotropicaux, des résultats similaires ont été obtenus avec le Cd ([Liu et al., 2015](#)). D'autres études ont montré que l'IMI et le Cd réduisaient les niveaux de GPx et de SOD ([Lonare et al., 2016](#) ; [Azhdari et al., 2019](#)).

La catalase, une enzyme qui contient l'hème, sert à neutraliser le peroxyde d'hydrogène produit dans les peroxysomes par les oxydases ([Sharapov et al., 2021](#)). En outre, elle joue un rôle dans la dégradation du peroxyde d'hydrogène généré lors de l'oxydation des acides gras, dans le cycle du glyoxylate (photorespiration) et dans le métabolisme des purines ([Huang et al., 2019](#)). L'activité de la CAT a été significativement inhibée après l'exposition au traitement par rapport au groupe témoin, l'IMI et le Cd seuls ont montré une diminution remarquable. Cependant, dans le groupe co-exposé IMI+Cd, il y avait une légère diminution par rapport au groupe témoin, nous pouvons suggérer que l'IMI et le Cd se sont concurrencés et ont eu un effet antagoniste. Ces résultats sont en accord avec ceux de [Wang et al. \(2016\)](#) qui ont constaté une inhibition complète de l'activité de la CAT chez les vers de terre exposés à l'IMI ; [Liu et al. \(2023\)](#) ont également obtenu les mêmes résultats.

L'activité du GR s'est avérée significativement réduite dans tous les groupes traités par rapport au groupe témoin. Le groupe IMI a enregistré la plus forte augmentation, suivi du Cd et enfin du groupe co-exposé. Ces résultats sont en accord avec ceux de [Shan et al. \(2019\)](#) qui a étudié l'effet de l'IMI sur les branchies et les glandes digestives des palourdes d'eau douce asiatiques ; le GR ainsi que la CAT, SOD et GST jouent un rôle important dans l'atténuation de l'effet toxique de l'IMI ([Wang et al., 2016](#)). [Al-Sarar et al. \(2015\)](#) a également obtenu les mêmes résultats en utilisant l'IMI et différents pesticides, dont l'abamectine et le chlorfénapyr. [Akkoyun et al. \(2018\)](#) ont également constaté que le Cd diminuait le niveau de GR chez les rats.

Le niveau de la teneur en carbonyles protéiques a augmenté de manière significative dans tous les groupes traités, cette élévation est une preuve de la détérioration des protéines dans le foie. Le Cd a présenté la plus forte augmentation, suivi par l'exposition combinée,

tandis que l'IMI a donné l'augmentation la plus faible. Ces résultats sur l'effet toxique du Cd et de l'IMI sont en accord avec d'autres études. [Cupertino et al. \(2017\)](#) a constaté que le Cd augmentait la teneur en carbonyles protéiques, provoquant des lésions testiculaires ; [Kumar et al. \(2021\)](#) ont également obtenu les mêmes résultats chez des rats intoxiqués au Cd. [Taha et al. \(2021\)](#) ont constaté une augmentation significative de la teneur en carbonyles protéiques dans le foie de rats albinos mâles exposés à l'IMI et à d'autres pesticides ; [Guerra et al. \(2021\)](#) ont obtenu le même résultat dans les tissus cérébraux du poisson zèbre, ce qui a entraîné une altération du comportement de nage.

Des études similaires utilisant différents pesticides et métaux lourds sur d'autres modèles animaux sont en accord avec nos résultats. Dans son étude, [Chen et al. \(2015\)](#) a observé un effet antagoniste sur la létalité du papillon lorsqu'il est exposé simultanément à la perméthrine et au Cd. Notamment, le groupe traité par le Cd a présenté un effet antagoniste plus prononcé que le groupe traité par la perméthrine. Des résultats contraires ont été rapportés par d'autres études. Dans la recherche menée par [Yang et al. \(2017\)](#), il a été observé que la mortalité du poisson zèbre adulte augmentait de manière significative lorsqu'il était exposé à la rac-cis-bifenthrine et à la R-cis-bifenthrine en présence de Cd, de Cu et de Pb. [Wang et al. \(2015\)](#) ont rapporté que l'effet combiné de la λ -cyhalothrine et du Cd sur la survie d'*Eisenia fetida* variait en fonction de la concentration du pesticide.

Conclusion & Perspectives

L'exposition continue à ces xénobiotiques provoque un stress oxydatif altérant les différentes voies dans l'organisme, et constitue un background dans le dysfonctionnement et la physiopathologie moléculaire et cellulaire. La présente étude a permis d'examiner les effets seuls et combinés, de certains pesticides et métaux sélectionnés, sur un modèle *in vivo*.

Nos résultats suggèrent que les rats exposés aux différentes combinaisons de pesticide imidaclopride, au cadmium et au plomb (IMI, Cd, Pb, Cd+Pb, IMI+Cd) ont eu des conséquences prononcées sur les paramètres hématologiques et modifient divers paramètres de stress oxydatif dans les tissus. Le foie, le cerveau et les reins ont subi des lésions tissulaires dues aux oxydants, comme le montre la corrélation entre l'augmentation des niveaux de malondialdéhyde et la diminution des activités des enzymes antioxydants tels que superoxyde dismutase et catalase. L'absence observée d'effets additifs ou synergiques de la combinaison Cd et Pb ainsi que IMI et Cd peut être valable pour les doses et les durées d'exposition choisies, mais il ne s'agit pas d'un mécanisme général.

Les études protéomiques et métabolomiques permettraient de mieux comprendre l'effet d'interaction des xénobiotiques sur la réponse biologique finale. Ces outils pourront être utilisés dans nos futures investigations.

*Références
bibliographiques*

Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105:121–126. doi: 10.1016/s0076-6879(84)05016-3.

Akerboom TPM, Sies H. 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 77:373–382. doi: 10.1016/s0076-6879(81)77050-2.

Aladaileh SH, Khafaga AF, Abd El-Hack ME, Al-Gabri NA, Abukhalil MH, Alfwuaires MA, Abdelnour S. 2020. *Spirulina platensis* ameliorates the sub chronic toxicities of lead in rabbits via anti-oxidative, anti-inflammatory, and immune stimulatory properties. *Sci Total Environ.* 701:134879. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134879.

Ali S, Bashir S, Mumtaz S, Shakir HA, Ara C, Ahmad F, Tahir HM, Faheem M, Irfan M, Masih A, et al. 2021. Evaluation of cadmium chloride-induced toxicity in chicks via hematological, biochemical parameters, and cadmium level in tissues. *Biol Trace Elem Res.* 199(9):3457–3469. doi:10.1007/s12011-020-02453-9.

Ali, W., Bian, Y., Zhang, H., Qazi, I. H., Zou, H., Zhu, J., & Liu, Z. (2023). Effect of cadmium exposure during and after pregnancy of female. *Environmental Pollutants and Bioavailability*, 35(1), 2181124.

Al-Sarar, A. S., Abobakr, Y., Bayoumi, A. E., & Hussein, H. I. (2015). Cytotoxic and genotoxic effects of abamectin, chlorfenapyr, and imidacloprid on CHO K1 cells. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 17041-17052.

Andjelkovic M, BuhaDjordjevic A, Antonijevic E, Antonijevic B, Stanic M, Kotur-Stevuljevic J, Spasojevic- Kalimanovska V, Jovanovic M, Boricic N, Wallace D, et al. 2019. Toxic effect of acute cadmium and lead exposure in rat blood, liver, and kidney. *Int J Environ Res Public Health.* 16(2):274. doi: 10.3390/ijerph16020274.

Andreadou, I., Efentakis, P., Frenis, K., Daiber, A., & Schulz, R. (2021). Thiol-based redox-active proteins as cardioprotective therapeutic agents in cardiovascular diseases. *Basic Research in Cardiology*, 116, 1-32.

Anjum, R., Grohmann, E., & Malik, A. (2011). Molecular characterization of conjugative plasmids in pesticide tolerant and multi-resistant bacterial isolates from contaminated alluvial soil. *Chemosphere*, 84(1), 175-181.

Attanzio A, Frazzitta A, Vasto S, Tesoriere L, Pintaudi AM, Livrea MA, Cilla A, Allegra M. 2019. Increased eryptosis in smokers is associated with the antioxidant status and C-reactive protein levels. *Toxicology.* 411:43–48. doi: 10. 1016/j.tox.2018.10.019.

Azhdari, A., Hosseini, S. A., & Farsi, S. (2019). Antioxidant effect of high intensity interval training on cadmium-induced cardiotoxicity in rats. *Gene, Cell and Tissue*, 6(3).

Baba, S. P., & Bhatnagar, A. (2018). Role of thiols in oxidative stress. *Current opinion in toxicology*, 7, 133-139.

Balali-Mood, M., Naseri, K., Tahergorabi, Z., Khazdair, M. R., & Sadeghi, M. (2021). Toxic mechanisms of five heavy metals: mercury, lead, chromium, cadmium, and arsenic. *Frontiers in pharmacology*, 227.

- Bayramoğlu Akkoyun, M., Bengü, A. Ş., Temel, Y., Akkoyun, H. T., Ekin, S., & Ciftci, M. (2018). The effect of astaxanthin and cadmium on rat erythrocyte G6PD, 6PGD, GR, and TrxR enzymes activities in vivo and on rat erythrocyte 6PGD enzyme activity in vitro. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 32(8), e22170.
- Blus, L.J., 2003. Organochlorine pesticides. In: Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton, G.A., Cairns, J. (Eds.), *Handbook of Ecotoxicology*. 2nd edn. Lewis Publishers, BocaRaton, FL, pp. 313–339
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72(1–2):248–254. doi: 10.1006/abio.1976.9999.
- Bradman AS, Schwartz JM, Fenster L, Barr DB, Holland NT, Eskenazi B (2007) Factors predicting organochlorine pesticide levels in pregnant Latina women living in a United States agricultural area. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 17:388–399. <https://doi.org/10.1038/sj.jes.7500525>
- Cai Y, Yin Y, Li Y, Guan L, Zhang P, Qin Y, Wang Y, Li Y. 2020. Cadmium exposure affects growth performance, energy metabolism, and neuropeptide expression in *Carassius auratus gibelio*. *Fish Physiol Biochem*. 46 (1):187–197. doi: 10.1007/s10695-019-00709-3.
- Çakırca, G., Damar Çakırca, T., Üstünel, M., Torun, A., & Koyuncu, I. (2021). Thiol level and total oxidant/antioxidant status in patients with COVID-19 infection. *Irish Journal of Medical Science* (1971-), 1-6.
- Carmo de Carvalho e Martins, M. D., Martins, da Silva Santos Oliveira, A. S., da Silva, L. A. A., Primo, M. G. S., & de Carvalho Lira, V. B. (2022). Biological indicators of oxidative stress [Malondialdehyde, Catalase, Glutathione Peroxidase, and Superoxide Dismutase] and their application in nutrition. In *Biomarkers in Nutrition* (pp. 1-25). Cham: Springer International Publishing.
- Carpenter MC, Shami Shah A, DeSilva S, Gleaton A, Su A, Goundie B, Croteau ML, Stevenson MJ, Wilcox DE, Austin RN. 2016. Thermodynamics of Pb(ii) and Zn(ii) binding to MT-3, a neurologically important metallothionein. *Metallomics*. 8(6):605–617. doi: 10.1039/c5mt00209e.
- Chaplain, V., Mamy, L., Vieuble-Gonod, L., Mougin, C., Benoit, P., Barriuso, E., Nelieu, S., 2011. Fate of pesticides in soils: toward an integrated approach of influential factors. In: Stoytcheva, M. (Ed.), *Pesticides in the Modern World—Risks and Benefits*. InTech, <https://doi.org/10.5772/17035>.
- Chen Z, Huo X, Zhang S, Cheng Z, Huang Y, Xu X. 2021. Relations of blood lead levels to echocardiographic left ventricular structure and function in preschool children. *Chemosphere*. 268:128793. doi: 10.1016/j.chemosphere. 2020.128793.
- Chen, S.; Wang, Y.; Liu, X.; Ding, L. Recent Advances for Imidacloprid Detection Based on Functional Nanomaterials. *Chemosensors* 2023, 11, 300. <https://doi.org/10.3390/chemosensors11050300>

Chen, T., Zhou, Z., Han, R., Meng, R., Wang, H., & Lu, W. (2015). Adsorption of cadmium by biochar derived from municipal sewage sludge: impact factors and adsorption mechanism. *Chemosphere*, 134, 286-293.

China. Sci. Total Environ. 2020, 741, 140227.

Ciosek, Ź., Kot, K., Kosik-Bogacka, D., Łanocha-Arendarczyk, N., & Rotter, I. (2021). The effects of calcium, magnesium, phosphorus, fluoride, and lead on bone tissue. *Biomolecules*, 11(4), 506.

Cole, D.C., Orozco, F., Pradel, W., Suquillo, J., Mera, X., Chacon, A., Prain, G., Wanigaratne, S., Leah, J., 2011. Agriculture and health inter-sectorial research process to reduce hazardous pesticide health impacts among smallholder farmers in the Andes. *BMC Int. Health Hum. Rights* 11, S6.

Collin, M. S., Venkatraman, S. K., Vijayakumar, N., Kanimozhi, V., Arbaaz, S. M., Stacey, R. S., ...& Swamiappan, S. (2022). Bioaccumulation of lead (Pb) and its effects on human: A review. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 7, 100094.

Cui J, Liu Y, Hao Z, Liu Y, Qiu M, Kang L, Teng X, Tang Y. 2023. Cadmium induced time-dependent kidney injury in common carp via mitochondrial pathway: impaired mitochondrial energy metabolism and mitochondrion-dependent apoptosis. *AquatToxicol.* 261:106570. doi: 10.1016/j.aquatox.2023.106570.

Cuomo D, Foster MJ, Threadgill D. 2022. Systemic review of genetic and epigenetic factors underlying differential toxicity to environmental lead (Pb) exposure. *Environ SciPollut R.* 29(24):35583–35598. doi: 10.1007/s11356-022- 19333-5.

Cupertino, M. C., Novaes, R. D., Santos, E. C., Neves, A. C., Silva, E., Oliveira, J. A., & Matta, S. L. (2017). Differential susceptibility of germ and leydig cells to cadmium-mediated toxicity: impact on testis structure, adiponectin levels, and steroidogenesis. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017.

Cycon, M., Piotrowska-Seget, Z., 2006. Transformations of pesticides in soil environment—a review. *Pestycydy* 3–4, 45–56.

Dar, M.A., Kaushik, G., Villarreal-Chiu, J.F., 2019. Pollution status and bioremediation of chlorpyrifos in environmental matrices by the application of bacterial communities: a review. *J. Environ. Manage.* 239,124–136.

Das, S. C., & Al-Naemi, H. A. (2019). Cadmium toxicity: Oxidative stress, inflammation and tissue injury.

Dasharathy, S., Arjunan, S., Maliyur Basavaraju, A., Murugasen, V., Ramachandran, S., Keshav, R., & Murugan, R. (2022). Mutagenic, carcinogenic, and teratogenic effect of heavy metals. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022.

De, A.; Bose, R.; Kumar, A.; Mozumdar, S. Targeted Delivery of Pesticides Using Biodegradable Polymeric Nanoparticles; Springer:New Delhi, India, 2014; ISBN 978-81-322-1689-6.

Di Paola, D., D'Amico, R., Genovese, T., Siracusa, R., Cordaro, M., Crupi, R., ...& Di Paola, R. (2022). Chronic exposure to Vinclozolin induced fibrosis, mitochondrial dysfunction,

oxidative stress, and apoptosis in mice kidney. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11296.

Donmez HH, Donmez N, Kısadere I, Undag I. 2019. Protective effect of quercetin on some hematological parameters in rats exposed to cadmium. *Biotech Histochem*. 94(5):381–386. doi: 10.1080/10520295.2019.1574027.

Drum, C., 1980. *Soil Chemistry of Pesticides*. PPG Industries Inc, Pittsburgh.

Ebrahimi M, Khalili N, Razi S, Keshavarz-Fathi M, Khalili N, Rezaei N. 2020. Effects of lead and cadmium on the immune system and cancer progression. *J Environ Health Sci Eng*. 18(1):335–343. doi: 10.1007/s40201-020- 00455-2.

El-Garawani, I. M., Khallaf, E. A., Alne-Na-Ei, A. A., Elgendy, R. G., Mersal, G. A., & El-Seedi, H. R. (2021). The role of ascorbic acid combined exposure on Imidacloprid-induced oxidative stress and genotoxicity in Nile tilapia. *Scientific reports*, 11(1), 14716.

Ettinger AS, Hu H, Hernandez-Avila M. 2007. Dietary calcium supplementation to lower blood lead levels in pregnancy and lactation. *J NutrBiochem*. 18:172–178. doi: 10.1016/j.jnutbio.2006.12.007.

European Food Safety Authority. Neonicotinoids: Risk to Bees Confirmed. 2018. Available online: <https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/180228> (accessed on 23 August 2023).

Fan R, Hu P, Wang Y, Lin H, Su K, Feng X, Wei L, Yang F. 2018. Betulinic acid protects mice from cadmium chloride-induced toxicity by inhibiting cadmium-induced apoptosis in kidney and liver. *Toxicol Lett*. 299:56–66. doi: 10.1016/j.toxlet.2018.09.003.

Fang, Y., Lu, L., Liang, Y., Peng, D., Aschner, M., & Jiang, Y. (2021). Signal transduction associated with lead-induced neurological disorders: A review. *Food and Chemical Toxicology*, 150, 112063.

Fenner, K., Canonica, S., Wackett, L., Elsner, M., 2013. Evaluating pesticide degradation in the environment: blindspots and emerging opportunities. *Science* 341, 752–758. <https://doi.org/10.1126/science.1236281>.

Fiorenza, R., Di Mauro, A., Cantarella, M., Iaria, C., Scalisi, E.M., Brundo, M.V., Gulino, A., Spitaleri, L., Nicotra, G., Dattilo, S., 2020. Preferential removal of pesticides from water by molecular imprinting on TiO₂ photocatalysts. *Chem. Eng. J*. 379, 122309.

Fishel, F., 1997. *Pesticides and the Environment*. URL/paper/Pesticides-and-the-environment-Fishel/0cab7538682d089a4f0d4886de24ea2c1a63b3a1 (accessed 10.10.23).

Fishel, F.M. and Ferrell, J.A. (2013). Managing pesticide drift. Agronomy department.PI232. University of Florida, Gainesville, FL, USA (<http://edis.ifas.ufl.edu/pi232>)(accessed 12 October 2023)

Fujita H. 1999. Measurement of δ -aminolevulinate dehydratase activity. In: Costa LG, Hodgson E, Lawrence DA, Reed DJ Greenlee WF, editors. *Current protocols in toxicology*. John Wiley & Sons Inc. 8.6.1-8.6.11. 10.1002/ 0471140856.tx0806s01.

- Garcia, F.P., Ascencio, S.Y.C., Oyarzun, J.G., Hernandez, A.C. and Alavarado, P.V., 2012. Pesticides: classification, uses and toxicity. Measures of exposure and genotoxic risks. *J. Res. Environ. Sci. Toxicol*, 1(11), 279-293.
- Genchi G, Sinicropi MS, Lauria G, Carocci A, Catalano A. 2020. The effects of cadmium toxicity. *Int J Env Res Pub He*. 17(11):3782. doi: 10.3390/ijerph17113782.
- Gong, P., Li, X., Gao, H., Wang, C., Li, M., Zhang, Y., Li, X., Liu, E., Zhu, X., 2021. Field evolved resistance to pyrethroids, neonicotinoids, organophosphates and macrolides in *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus) and *Sitobion avenae* (Fabricius) from China. *Chemosphere* 269, 128747
- Goodarzi, Z., Karami, E., Yousefi, S., Dehdashti, A., Bandegi, A. R., & Ghanbari, A. (2020). Hepatoprotective effect of atorvastatin on Cadmium chloride induced hepatotoxicity in rats. *Life sciences*, 254, 117770.
- Guerra, L. J., do Amaral, A. M. B., de Quadros, V. A., da Luz Fiuza, T., Rosemberg, D. B., Prestes, O. D., ... & Loro, V. L. (2021). Biochemical and behavioral responses in zebrafish exposed to imidacloprid oxidative damage and antioxidant responses. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 81(2), 255-264.
- Gwozdziński K, Pieniżek A, Gwozdziński L. 2021. Reactive oxygen species and their involvement in red blood cell damage in chronic kidney disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. doi: 10.1155/2021/6639199.
- Hassaan, M. A., & El Nemr, A. (2020). Pesticides pollution: Classifications, human health impact, extraction and treatment techniques. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*. doi:10.1016/j.ejar.2020.08.007
- Hemmaphan S, Bordeerat NK. 2022. Genotoxic effects of lead and their impact on the expression of DNA repair genes. *Int J Env Res Pub He*. 19(7):4307. doi: 10.3390/ijerph19074307.
- Huang H, Chen J, Sun Q, Liu Y, Tang Y, Teng X. 2021. NLRP3 inflammasome is involved in the mechanism of mitigative effect of selenium on lead-induced inflammatory damage in chicken kidneys. *Environ Sci Pollut R*. 28 (9):10898–10908. doi:10.1007/s11356-020-11322-w.
- Huang, H., Ullah, F., Zhou, D. X., Yi, M., & Zhao, Y. (2019). Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. *Frontiers in plant science*, 10, 800.
- Hussain, T., Murtaza, G., Metwally, E., Kalhor, D. H., Kalhor, M. S., Rahu, B. A., ...& Tan, B. (2021). The role of oxidative stress and antioxidant balance in pregnancy. *Mediators of Inflammation*, 2021, 1-11.
- IARC, International Agency for Research on Cancer. 1993. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to humans, beryllium, cadmium, mercury and exposures in the Glass Manufacturing Industry. Lyon, France: IARC Scientific Publications; pp. 119–238.
- Ilieva, I., Sainova, I., & Yosifcheva, K. (2020). Toxic effects of heavy metals (lead and cadmium) on sperm quality and male fertility. *Acta morphol. anthropol*, 27, 63-75.

- Jamil, M., Debbarh, H., Aboulmaouahib, S., Filali, O. A., Mounaji, K., Zarqaoui, M., ...& Cadi, R. (2020). Reactive oxygen species in reproduction: harmful, essential or both?. *Zygote*, 28(4), 255-269.
- Kabamba, M., & Tuakuila, J. (2020). Toxic metal (Cd, Hg, Mn, Pb) partition in the maternal/foetal unit: A systematic mini—Review of recent epidemiological studies. *Toxicology Letters*, 332, 20-26.
- Kafaei, R., Arfaeina, H., Savari, A., Mahmoodi, M., Rezaei, M., Rayani, M., Sorial, G.A., Fattahi, N., Ramavandi, B., 2020. Organochlorine pesticides contamination in agricultural soils of southern Iran. *Chemosphere* 240, 124983.
- Kappler, A., Haderlein, S.B., 2003. Natural organic matter as reductant for chlorinated aliphatic pollutants. *Environ.Sci. Technol.* 37, 2714–2719. <https://doi.org/10.1021/es0201808>. Katagi, T., 2004. Photodegradation of pesticides on plant and soil surfaces. In: Ware, G.W. (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer New York, New York, pp. 1–78, https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9098-3_1.
- Karunamoorthi, K., Mohammed, M., Wassie, F., 2012. Knowledge and practices of farmers with reference to pesticide management: implications on human health. *Arch. Environ. Occup. Health* 67, 109–116.
- Kaur, R., Mavi, G.K., Raghav, S., Khan, I., 2019. Pesticides classification and its impact on environment. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 8, 1889–1897.
- Khanam, R., Kumar, I., Oladapo-Shittu, O., Twose, C., Islam, A. A., Biswal, S. S., ...& Baqui, A. H. (2021). Prenatal environmental metal exposure and preterm birth: a scoping review. *International journal of environmental research and public health*, 18(2), 573.
- Kumar, A., Subrahmanyam, G., Mondal, R., Cabral-Pinto, M. M. S., Shabnam, A. A., Jigyasu, D. K., ...& Yu, Z. G. (2021). Bio-remediation approaches for alleviation of cadmium contamination in natural resources. *Chemosphere*, 268, 128855.
- Kumar, S., Kaushik, G., Dar, M.A., Nimesh, S., Lopez-Chuken, U.J., Villarreal-Chiu, J.F., 2018. Microbial degradation of organophosphate pesticides: a review. *Pedosphere* 28 (2), 190–208.
- Leal, M. F. C., Catarino, R. I., Pimenta, A. M., & Souto, M. R. S. (2023). The influence of the biometals Cu, Fe, and Zn and the toxic metals Cd and Pb on human health and disease. *Trace Elements and Electrolytes*, 40(1), 1.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186:464–478. doi: 10.1016/0076-6879(90)86141-h.
- Lewis, K.A., Tzilivakis, J., Warner, D.J., Green, A., 2016. An international database for pesticide risk assessments and management. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 22, 1050–1064.
- Li, A.J., Martinez-Moral, M.-P., Kannan, K., 2020. Variability in urinary neonicotinoid concentrations in single-spot and first-morning void and its association with oxidative stress markers. *Environ. Int.* 135, 105415.

- Liu Y, Lin X, Hao Z, Yu M, Tang Y, Teng X, Sun W, Kang L. 2023. Cadmium exposure caused cardiotoxicity in common carps (*Cyprinus carpio* L.): miR-9-5p, oxidative stress, energetic impairment, mitochondrial division/ fusion imbalance, inflammation, and autophagy. *Fish & Shellfish Immunology*. 138:108853. doi: 10.1016/j.fsi. 2023.108853.
- Liu, J., Zheng, Y., Dong, F., Li, Y., Wu, X., Pan, X., ...& Xu, J. (2023). Insight into the Long-Lasting Control Efficacy of Neonicotinoid Imidacloprid against Wheat Aphids during the Entire Growth Period. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(32), 12167-12176.
- Liu, L., Li, J., Yue, F., Yan, X., Wang, F., Bloszies, S., & Wang, Y. (2018). Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation and biochar amendment on maize growth, cadmium uptake and soil cadmium speciation in Cd-contaminated soil. *Chemosphere*, 194, 495-503.
- Lohiya, A., Kumar, V., & Punia, J. S. (2018). Sub-acute oxidant and histopathological effects of imidacloprid on kidney of adult female Wistar rats. *Indian Journal of Animal Research*, 52(9), 1324-1330.
- Lonare, M. K., Kumar, M., More, A., & Telang, A. G. (2019). Toxicological Investigation of Single Oral Dose Administration of Imidacloprid in Male Wistar Rats. *Toxicology International*, 26(1), 8-14.
- Ma S, Zhang J, Xu C. 2022. Increased serum levels of cadmium are associated with an elevated risk of cardiovascular disease in adults. *Environ Sci Pollut Res*. 29(2):1836–1844. doi:10.1007/s11356-021-15732-2.
- Mahajan, L., Verma, P. K., Raina, R., & Sood, S. (2018). Toxic effects of imidacloprid combined with arsenic: Oxidative stress in rat liver. *Toxicology and industrial health*, 34(10), 726-735.
- Mahajan, M. S., Upasani, C. D., Upaganlawar, A. B., & Gulecha, V. S. (2020). Renoprotective effect of co-enzyme Q10 and N-acetylcysteine on streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. *Int J Diabetes clin res*, 7(2), 1-12.
- Mahmood, I.; Imadi, S.R.; Shazadi, K.; Gul, A.; Hakeem, K.R. Effects of Pesticides on Environment. In *Plant, Soil and Microbes*; Hakeem, K., Akhtar, M., Abdullah, S., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2016; ISBN 978-33-192-7455-3.
- Margni, M., Rossier, D., Crettaz, P., Jolliet, O., 2002. Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems. *Agric. Ecosyst. Environ*. 93, 379–392.
- Massányi P, Massányi M, Madeddu R, Stawarz R, Lukáč N. 2020. Effects of cadmium, lead, and mercury on the structure and function of reproductive organs. *Toxics*. 8(4):94. doi: 10.3390/toxics8040094.
- Matovič V, Buha A, Dukić-Cosić D, Bulat Z. 2015. Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys. *Food Chem Toxicol*. 78:130–140. doi: 10.1016/j.fct.2015.02.011.
- Mishra, S., Zhang, W., Lin, Z., Pang, S., Huang, Y., Bhatt, P., Chen, S., 2020. Carbofuran toxicity and its microbial degradation in contaminated environments. *Chemosphere* 259, 127419.

- Mladenović J, Ognjanović B, Dorđević N, Matić M, Knežević V, Štajn A, Saićić Z. 2014. Protective effects of oestradiol against cadmium-induced changes in blood parameters and oxidative damage in rats. *ArhHig Rada Toksikol.* 65(1):37–46. doi: 10.2478/10004-1254-65-2014-2405.
- Naiel, M. A. E., Shehata, A. M., Negm, S. S., Abd El-Hack, M. E., Amer, M. S., Khafaga, A. F., ... Allam, A. A. (2020). The new aspects of using some safe feed additives on alleviated imidacloprid toxicity in farmed fish: a review. *Reviews in Aquaculture.* doi:10.1111/raq.12432
- Narahashi, T., Frey, J.M., Ginsburg, K.S., Roy, M.L., 1992. Sodium and GABA-activated channels as the targets of pyrethroids and cyclodienes. *Toxicology Letters* 64,429–436.
- Narayanan, M., Kumarasamy, S., Ranganathan, M., Kandasamy, S., Kandasamy, G., Gnanavel, K., 2020a. Enzyme and metabolites attained in degradation of chemical pesticides β Cypermethrin by *Bacillus cereus*. *Mater.*
- Nazima, B., Manoharan, V., & Miltonprabu, S. (2020). Retraction: Grape seed proanthocyanidins ameliorates cadmium-induced renal injury and oxidative stress in experimental rats through the up-regulation of nuclear related factor 2 and antioxidant responsive elements.
- Nemmiche S, Chabane-Sari D, Guiraud P. 2007. Role of α -tocopherol in cadmium-induced oxidative stress in Wistar rat's blood, liver and brain. *Chemico-Biological Interactions.* 170(3):221–230. doi: 10.1016/j.cbi.2007.08.004.
- Nemmiche S, Guiraud P. 2016. Cadmium-induced oxidative damages in the human BJAB cells correlate with changes in intracellular trace elements levels and zinc transporters expression. *Toxicol In Vitro.* 37:169–177. doi: 10.1016/j.tiv.2016.09.014.
- Nemmiche, S. (2017). Oxidative signaling response to cadmium exposure. *Toxicological sciences*, 156(1), 4-10.
- Neuwirth LS, Kim Y, Barrerra ED, Jo C, Chrisphonte J-M, Hameed N, Rubi S, Dacius TF Jr, Skeen JC, Bonitto JR, et al. 2019. Early neurodevelopmental exposure to low lead levels induces fronto-executive dysfunctions that are recovered by taurine co-treatment in the rat attention set-shift test: implications for taurine as a psychopharmacotherapy against neurotoxicants. *AdvExp Med Biol.* 1155:821–846. doi: 10.1007/978-981-13-8023-5_70.
- Nicolopoulou-Stamati, P., Maipas, S., Kotampasi, C., Stamatis, P., Hens, L., 2016. Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. *Front. Public Health* 4, 148.
- Nie, J., Sun, Y., Zhou, Y., Kumar, M., Usman, M., Li, J., Shao, J., Wang, L., Tsang, D.C., 2020. Bioremediation of water containing pesticides by microalgae: mechanisms, methods, and prospects for future research. *Sci. Total Environ.* 707, 136080.
- Niture, S., Lin, M., Qi, Q., Moore, J. T., Levine, K. E., Fernando, R. A., & Kumar, D. (2021). Role of autophagy in cadmium-induced hepatotoxicity and liver diseases. *Journal of Toxicology*, 2021.

- Niu, C., Dong, M., & Niu, Y. (2023). Lead toxicity and potential therapeutic effect of plant-derived polyphenols. *Phytomedicine*, 154789.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *anal. Biochem (Moscow)*. 95(2):351–358. doi: 10.1016/0003-2697(79)90738-3.
- Qader A, Rehman K, Akash M. 2021. Genetic susceptibility of δ -ALAD associated with lead (Pb) intoxication: sources of exposure, preventive measures, and treatment interventions. *Environ SciPollut Res*. 28 (33):44818–44832. doi: 10.1007/s11356-021-15323-1.
- Ortega, D. R., Esquivel, D. F. G., Ayala, T. B., Pineda, B., Manzo, S. G., Quino, J. M., ... & de la Cruz, V. P. (2021). Cognitive impairment induced by lead exposure during lifespan: Mechanisms of lead neurotoxicity. *Toxics*, 9(2).
- Ortiz-Hernández, M.L., Sánchez-Salinas, E., Dantañ-González, E., Castrejoñ-Godínez, M.L., 2013. Pesticide biodegradation: mechanisms, genetics and strategies to enhance the process. *Biodegr. Life Sci*. <https://doi.org/10.5772/56098>.
- Otal, Y., Demircan, S., Sener, A., Alısık, M., Tanrıverdi, F., & Haydar, F. G. E. (2018). Acute renal failure and thiol-disulfide homeostasis. *J Nephrol Ther*, 8(312), 2161-0959.
- Qu, J., Wang, Q., Sun, X., & Li, Y. (2022). The environment and female reproduction: Potential mechanism of cadmium poisoning to the growth and development of ovarian follicle. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 244, 114029.
- Rahimova, N., Cooke, M., Zhang, S., Baker, M. J., & Kazanietz, M. G. (2020). The PKC universe keeps expanding: From cancer initiation to metastasis. *Advances in Biological Regulation*, 78, 100755.
- Rahm, S., Green, N., Norrgran, J., Bergman, A. °., 2005. Hydrolysis of environmental contaminants as an experimental tool for indication of their persistency. *Environ. Sci. Technol*. 39, 3128–3133. <https://doi.org/10.1021/es0484698>.
- Rahman MM, Hossain KFB, Banik S, Sikder MT. 2019. Selenium and zinc protections against metal-(oids)-induced toxicity and disease manifestations: a review. *Ecotox Environ Safe*. 168:146–163. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.10.054.
- Rajendran S, Naushad M, Durgalakshmi D, Lichtfouse E. 2021. Metal, metal oxides and metal sulphides for biomedical applications. *Environmental Chemistry for a sustainable world (ECSW)*. Eds. Vol. 58. Springer. edit. doi: 10.1007/978-3-030-56413-1.
- Rajput, V. D., Harish, Singh, R. K., Verma, K. K., Sharma, L., Quiroz-Figueroa, F. R., ... & Mandzhieva, S. (2021). Recent developments in enzymatic antioxidant defence mechanism in plants with special reference to abiotic stress. *Biology*, 10(4), 267.
- Remucal, C.K., 2014. The role of indirect photochemical degradation in the environmental fate of pesticides: a review. *Environ Sci Process Impacts* 16, 628–653. <https://doi.org/10.1039/C3EM00549F>.
- Remucal, C.K., 2014. The role of indirect photochemical degradation in the environmental fate of pesticides: a review. *Environ Sci Process Impacts* 16, 628–653. <https://doi.org/10.1039/C3EM00549F>.

- Richardson, J. R., Fitsanakis, V., Westerink, R. H. S., & Kanthasamy, A. G. (2019). Neurotoxicity of pesticides. *Acta Neuropathologica*. doi:10.1007/s00401-019-02033-9
- Satarug S. 2018. Dietary cadmium intake and its effects on kidneys. *Toxics*. 6(1):15. doi: 10.3390/toxics6010015.
- Sevim, Ç., Akpınar, E., Aksu, E. H., Ömür, A. D., Yıldırım, S., Kara, M., ... & Ersoylu, R. N. (2023). Reproductive Effects of *S. boulardii* on Sub-Chronic Acetamiprid and Imidacloprid Toxicity in Male Rats. *Toxics*, 11(2), 170.
- Sharapov, M. G., & Gudkov, S. V. (2021). Peroxiredoxin 1-Multifunctional antioxidant enzyme, protects from oxidative damages and increases the survival rate of mice exposed to total body irradiation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 697, 108671.
- Sharma, A.; Kumar, V.; Shahzad, B.; Tanveer, M.; Sidhu, G.P.S.; Handa, N.; Kohli, S.K.; Yadav, P.; Bali, A.S.; Parihar, R.D. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Appl. Sci.* 2019, 1, 1446.
- Sheets, L. P. (2010). Imidacloprid: a neonicotinoid insecticide. In Hayes' handbook of pesticide toxicology (pp. 2055-2064). Academic Press.
- Shiokawa, K., Tsuboi, S., Kagabu, S., and Moriya, K. (1986). *Jpn. KokaiTokkyoKoho JP 61-267575*.
- Singh, N., Gupta, V. K., Kumar, A., & Sharma, B. (2017). Synergistic effects of heavy metals and pesticides in living systems. *Frontiers in chemistry*, 5, 70.
- Singh, S., Garg, V. K., Ramamurthy, P. C., Singh, J., & Pandey, A. (2023). Impact and prospects of pesticides on human and environmental health. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 1-32). Elsevier.
- Spitz DR, Oberley LW. 2001. Measurement of MnSOD and CuZn-SOD activity in mammalian tissue homogenates. In: Costa LG, Hodgson E, Lawrence DA, Donald J, Reed W Greenlee F, editors. *Current protocols in toxicology*. John Wiley & Sons Inc. pp. .7.5.1-.7.5.11. doi: 10.1002/0471140856.tx0705s08.
- Sriapha, C.; Trakulsrichai, S.; Intaraprasong, P.; Wongvisawakorn, S.; Tongpoo, A.; Schimmel, J.; Wananukul, W. Imidacloprid poisoning case series: Potential for liver injury. *Clin. Toxicol.* 2020, 58, 136-138.
- Sridevi Sangeetha, K. S., & Umamaheswari, S. (2020). Human Exposure to Lead, Mechanism of Toxicity and Treatment Strategy-A Review. *Journal of Clinical & Diagnostic Research*, 14(12).
- Sulbato, L., 1994. Mammalian toxicology of organo-phosphorus pesticides. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 43, 271-1189.
- Syafrudin, M., Kristanti, R. A., Yuniarto, A., Hadibarata, T., Rhee, J., Al-onaziWedad A., Al-Mohaimed, A. M. (2021). Pesticides in Drinking Water—A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(2), 468. doi:10.3390/ijerph18020468
- Taha, M. A., Badawy, M. E., Abdel-Razik, R. K., Younis, H. M., & Abo-El-Saad, M. M. (2021). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in liver of male albino rats after

exposing to sub-chronic intoxication of chlorpyrifos, cypermethrin, and imidacloprid. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 178, 104938.

Tan, H., Li, Q., Zhang, H., Wu, C., Zhao, S., Deng, X., Li, Y., 2020. Pesticide residues in agricultural topsoil from the Hainan tropical riverside basin: determination, distribution, and relationships with planting patterns and surface water. *Sci. Total Environ.* 722, 137856.

Thévenod F. 2009. Cadmium and cellular signaling cascades: to be or not to be? *Toxicol. Appl Pharmacol.* 238 (3):221–239. doi: 10.1016/j.taap.2009.01.013.

Thompson, D. A., Lehmler, H.-J., Kolpin, D., Hladik, M. L., Vargo, J., Schilling, K., ... Field, R. W. (2020). A critical review on the potential impacts of neonicotinoid insecticide use: current knowledge of environmental fate, toxicity and implications for human health. *Environmental Science: Processes & Impacts*. doi:10.1039/c9em00586b

Tinkov AA, Filippini T, Ajsuvakova OP, Skalnaya MG, Aaseth J, Bjørklundh G, Gatiatulina ER, Popova EV, Nemereshina ON, Huangk PT, et al. 2018. Cadmium and atherosclerosis: a review of toxicological mechanisms and a meta-analysis of epidemiologic studies. *Environ Res.* 162:240–260. doi: 10.1016/j.envres.2018.01.008.

Today Proc. 33 (7), 3640–3645. Suanon, F., Tang, L., Sheng, H., Fu, Y., Xiang, L., Herzberger, A., Jiang, X., Mama, D., Wang, F., 2020. TW80 and GLDA-enhanced oxidation under electrokinetic remediation for aged contaminated-soil: does it worth? *Chem. Eng. J.* 385, 123934.

Toghan, A., Fawzy, A., Alakhras, A. I., & Farag, A. A. (2022). Electrochemical and theoretical examination of some imine compounds as corrosion inhibitors for carbon steel in oil wells formation water. *International Journal of Electrochemical Science*, 17(12), 2212108.

Tordoir, William F., van Sittert, Nico J., 1994. Organochlorines. *Toxicology* 91 (1), 51. Tu, W., Niu, L., Liu, W., Xu, C., 2013. Embryonic exposure to butachlor in zebrafish (*Danio rerio*): Endocrine disruption, developmental toxicity and immunotoxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 89, 189–195.

Turner, A., & Filella, M. (2021). Hazardous metal additives in plastics and their environmental impacts. *Environment International*, 156, 106622.

Vale, A., Lotti, M., 2015. Chapter 10 - Organophosphorus and carbamate insecticide poisoning. *Handbook of Clinical Neurology* 131, 149-168. DOI:10.1016/B978-0-444-62627-1.00010-X.

Valet, M., Siggia, E. D., & Brivanlou, A. H. (2022). Mechanical regulation of early vertebrate embryogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(3), 169-184.

Vieira, C. E. D., Pérez, M. R., Acayaba, R. D. A., Raimundo, C. C. M., & dos Reis Martinez, C. B. (2018). DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in different tissues of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 195, 125-134.

Vuong AM, Zhang C, Chen A. Associations of neonicotinoids with insulin and glucose homeostasis parameters in US adults: NHANES 2015-2016. *Chemosphere*. 2022 Jan;286(Pt 1):131642. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.131642. Epub 2021 Jul 22. PMID: 34351280; PMCID: PMC8578312.

Wan, Y.; Han, Q.; Wang, Y.; He, Z. Five degradates of imidacloprid in source water, treated water, and tap water in Wuhan, central

Wang J, Chen X, Chu S, You Y, Chi Y, Wang R, Yang X, Hayat K, Zhang D, Zhou P. 2022. Comparative cytology combined with transcriptomic and metabolomic analyses of *Solanum nigrum* L. in response to Cd toxicity. *J Hazard Mater.* 423(Pt B):127168. doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.127168.

Wang X, An Y, Jiao W, Zhang Z, Han H, Gu X, Teng X. 2018. Selenium protects against lead-induced apoptosis via endoplasmic reticulum stress in chicken kidneys. *Biol Trace Elem Res.* 182(2):354–363. doi:10.1007/s12011-017-1097-9.

Wang, J., Wang, J., Wang, G., Zhu, L., & Wang, J. (2016). DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in the earthworm *Eisenia fetida*. *Chemosphere*, 144, 510-517.

Wang, X., Zhu, X., Peng, Q., Wang, Y., Ge, J., Yang, G., ...& Shen, W. (2019). Multi-level ecotoxicological effects of imidacloprid on earthworm (*Eisenia fetida*). *Chemosphere*, 219, 923-932.

Wang, Y., Chen, C., Qian, Y., Zhao, X., Wang, Q., & Kong, X. (2015). Toxicity of mixtures of λ -cyhalothrin, imidacloprid and cadmium on the earthworm *Eisenia fetida* by combination index (CI)-isobologram method. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 111, 242-247.

Wang, Y., Liu, Y., Zhan, W., Zheng, K., Wang, J., Zhang, C., Chen, R., 2020. Stabilization of heavy metal contaminated soils by biochar: challenges and recommendations. *Sci. Total Environ.* 729, 139060.

Wintermantel D, Odoux JF, Decourtye A, Henry M, Allier F, Bretagnolle V (2020) Neonicotinoid-induced mortality risk for bees foraging on oilseed rape nectar persists despite EU moratorium. *Sci Total Environ* 704:135400

Yadav, I. C., & Devi, N. L. (2017). Pesticides classification and its impact on human and environment. *Environmental science and engineering*, 6, 140-158.

Yadav, I.S. Devi, N.L., 2017. Pesticides Classification and its Impact on Human and Environment. In book: *Environment Science and Engineering*, Vol. 6: Toxicology Chapter: 7 Publisher: Studium Press LLC, USA

Yan, L. J., & Allen, D. C. (2021). Cadmium-induced kidney injury: Oxidative damage as a unifying mechanism. *Biomolecules*, 11(11), 1575.

Yang, Y., Ji, D., Huang, X., Zhang, J., & Liu, J. (2017). Effects of metals on enantioselective toxicity and biotransformation of cis-bifenthrin in zebrafish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(8), 2139-2146.

Yu, H., Liu, Y., Shu, X., Ma, L., Pan, Y., 2020. Assessment of the spatial distribution of organochlorine pesticides (OCPs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in urban soil of China. *Chemosphere* 243, 125392.

Zare MF, Niknazar S, Yadegari M. 2020. Carvacrol reduces hippocampal cell death and improves learning and memory deficits following lead-induced neurotoxicity via antioxidant

activity. *NaunynSchmiedebergs Arch Pharmacol.* 393(7):1229–1237. doi:10.1007/s00210-020-01866-6.

Zhai Q, Narbad A, Chen W. 2015. Dietary strategies for the treatment of cadmium and lead toxicity. *Nutrients.* 7 (1):552–571. doi: 10.3390/nu7010552. Zhang Z, Zheng Z, Cai J, Liu Q, Yang J, Gong Y, Wu M, Shen Q, Xu S. 2017. Effect of cadmium on oxidative stress and immune function of common carp (*Cyprinus carpio* L.) by transcriptome analysis. *AquatToxicol.* 192:171–177. doi: 10.1016/j.aquatox.2017.09.022.

Zhang D, Lu S. Human exposure to neonicotinoids and the associated health risks: A review. *Environ Int.* 2022 May;163:107201. doi: 10.1016/j.envint.2022.107201.

Zhang J, Zheng S, Wang S, Liu Q, Xu S. 2020. Cadmium-induced oxidative stress promotes apoptosis and necrosis through the regulation of the miR-216a-PI3K/AKT axis in common carp lymphocytes and antagonized by selenium. *Chemosphere.* 258:127341. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.127341.

Zhang, H., Zhang, R., Zeng, X., Wang, X., Wang, D., Jia, H., Xu, W., Gao, Y., 2022. Exposure to neonicotinoid insecticides and their characteristic metabolites: Association with human liver cancer. *Environ. Res.* 208, 112703.

Zhao, G., Li, J., Yang, F., Yin, X., Ren, F., Fang, B., & Pang, G. (2021). Spermogenesis toxicity of imidacloprid in rats, possible role of CYP3A4. *Chemosphere*, 282, 131120. doi:10.1016/j.chemosphere.2021.131120

Zheng R, Wang P, Cao B, Wu M, Li X, Wang H, Chai L. 2021. Intestinal response characteristic and potential microbial dysbiosis in digestive tract of *Bufo gargarizans* after exposure to cadmium and lead, alone or combined. *Chemosphere.* 271:129511. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.129511.

Zulfahmi I, Rahmi A, Muliari M. 2021. Exposure to lead nitrate alters growth and Haematological parameters of Milk fish (*Chanoschanos*). *Bull Environ ContamToxicol.* 107(5):860–867. doi:10.1007/s00128-021-03344-y.

Zuščíková L, Bažány D, Greifová H, Knížatová N, Kováčik A, Lukáč N, Jambor T. Screening of Toxic Effects of Neonicotinoid Insecticides with a Focus on Acetamiprid: A Review. *Toxics.* 2023; 11(7):598. <https://doi.org/10.3390/toxics11070598>