

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE BATNA1 -BATNA-
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES
ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES



THESE

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière

Sciences vétérinaires

Option

Pathologie des Animaux Domestiques

Présentée Par :

SELLAOUI SASSIA

THEME

**Les Biomarqueurs Immunotoxicologiques suite à
l'Exposition aux Métaux Lourds chez les Animaux
Domestiques**

JURY

	Grade	Université
Président : MELIZI Mohamed	Prof	Batna 1
Examineur : MEKROUD Abdessalam	Prof	Constantine
Examineur : TLIDJANE Madjid	Prof	Batna 1
Examineur : MEDDOUR Abderafik	MC	Annaba
Rapporteur : MEHENNAOUI Smail	Prof	Batna 1

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2016-2017

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en tout premier lieu ALLAH, le tout puissant, de m'avoir donné l'énergie, la force et la patience pour aller au bout de ce projet.

Toute ma gratitude va au Professeur MEHENNAOUI Smail, mon Directeur de thèse, de m'avoir donné la chance de travailler sur ce projet; pour le suivi qu'il m'a accordé, pour sa disponibilité et pour tous les conseils qu'il m'a donnés au cours de ces années.

Je remercie cordialement les membres du jury;

Le Professeur MELIZI Mohamed pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de soutenance, le Professeur MEKROUD Abdessalam, le Professeur TLIDJANE Madjid et le Professeur MEDDOUR Abderafik d'avoir eu l'amabilité d'accepter de juger ce travail. Veuillez recevoir ici toute ma reconnaissance.

Mes remerciements s'adressent également à Mme BOUFEDDA Nadia, au Docteur BOUDAOUOUD Amine et au Docteur TOUMI Widad pour toute leur aide, leur disponibilité durant ces années de travail que nous avons partagées.

Je tiens à adresser un grand merci aux Docteurs Vétérinaires MERAD Sofiane, Bala Wassim et Bouali Faysal, qui étaient étudiants au moment de la réalisation du projet, pour leur aide, leur disponibilité et pour leur gentillesse.

Je tiens également à remercier Mr BENDAIKHA Ouheb Technicien de Laboratoire et Mr TITAOUINE Nadir ingénieur informatique au niveau de notre Laboratoire de Recherche, Environnement, Santé et Production Animale (LRESPA), pour leur aide précieuse et leur gentillesse.

Je remercie toutes les personnes qui m'ont apporté à un moment ou à un autre, d'une façon ou d'une autre leur soutien et leurs engagements; le Professeur ALLOUI Nadir, le Dr ARAB Hadda, le Dr DEKHINET Saïd, le Dr BENHARKAT Salah, le Dr DJAABA Sadek, le Dr BENTERKI Mohammed et Mr GHAZEM Boualem.

Je remercie sincèrement les collègues de notre institut des sciences vétérinaires et agronomiques pour leur soutien et encouragements.

Mes remerciements vont également à Mr KHELIFI Nacer et Mr MECHENENE Djamel, employés de l'animalerie du Département Vétérinaire, pour leur aide et disponibilité.

Mes derniers remerciements s'adressent à tous les membres de ma famille pour leurs encouragements et spécialement à tous ceux qui m'ont permis d'en arriver jusque là et qui m'ont accompagné tout au long de cette expérience extra ordinaire, ma maman pour son soutien inconditionnel et mes enfants, Bouchra, Yacine et Amina, pour tout ce qu'ils m'apportent tous les jours.

Table des Matières

Avant-propos

Introduction & Problématique

Partie Bibliographique

Chapitre I: Mécanisme de toxicité des deux éléments traces métalliques (Pb et Cd)

I.	Le Plomb	
	A. Toxicocinétique du plomb et de ses dérivés minéraux	5
	1. Absorption	5
	2. Distribution	6
	3. Elimination	8
	B. Toxicité subchronique et chronique du plomb	9
II.	Le Cadmium	12
	A. Toxicocinétique du Cadmium (Cd)	12
	1. Absorption	12
	2. Distribution	13
	3. Elimination	14
	B. Toxicité subchronique et chronique du cadmium	15
III.	Toxicité cellulaire et moléculaire des deux ETM (Pb et Cd)	17

Chapitre II: Les Biomarqueurs : Concept & intérêt

1.	Définition	22
2.	Notions et concepts	23
3.	Identification de biomarqueurs	24
4.	Différentes natures de biomarqueurs	25
5.	Caractéristiques des biomarqueurs	27

Chapitre III: Modélisation et Toxicocinétique / Principe & Application

1.	Introduction	29
----	--------------	----

2. Les paramètres pharmaco-toxicocinétiques	30
3. Modélisation toxicocinétique	32

Partie Expérimentale

Chapitre I. Matériels et Méthodes

1. Animaux	53
2. Conception de l'expérimentation	55
3. Nature et rythme des prélèvements	57
4. Analyses élémentaires réalisées sur le sang	57
4.1.Hématologie	57
4.2.Analyses toxicologiques	58
4.3.Analyses biochimiques	64
5. Examen anatomopathologique des organes	66
6. Dosage des éléments traces dans l'aliment	67
7. Modélisation et Analyse toxicocinétique	67
8. Analyse statistique	68

Chapitre II. Présentation des Résultats

1. Symptomatologie	
2. Eléments traces dans l'aliment	70
3. Eléments traces métalliques	72
3.1.Plombémie	72
3.2.Cadmiémies	77
4. Eléments essentiels	79
4.1.Le Zinc plasmatique	79
4.2.Le Cuivre plasmatique	81
5. Les paramètres hématologiques	83
5.1.Hémoglobine	83
5.2.Hématocrite	85

6. Analyses biochimiques	87
6.1. Transaminases (ALT, AST)	87
6.2. Protides totaux - Ratio Albumine / Globuline	90
6.3. Créatinine	92
Chapitre III. Discussion des Résultats	
I. Argumentation du protocole expérimental	99
1. Choix du modèle animal	99
2. Choix de la voie et de la durée de contamination	102
3. Choix des traitements (métaux lourds) : Pb et Cd	103
II. Contribution de l'aliment dans l'apport en éléments traces	105
III. Evaluation du profil Plombémie / Temps	107
IV. Evaluation du profil Cadmiémie / Temps ³	113
V. Hématotoxicité	117
VI. Interaction Plomb/Cadmium-Eléments essentiels	121
VII. Evolution Temporelle des Marqueurs Hépatiques	125
VIII. Néphrotoxicité	130
IX. Modélisation Toxicocinétique par Approche non compartimentale	133
X. Etude anatomopathologique	153
Conclusion & Perspectives	161
Références bibliographiques	164
Résumés	178
Annexes	185

Liste des Figures

Figure 1: Transport sanguin du plomb dans le sang et redistribution dans les tissus	6
Figure 2: Le transport et la distribution du cadmium après son absorption	14
Figure 3: Représentation des relations entre l'exposition (dose et/ou durée), l'état de santé et la réponse des biomarqueurs (d'après Depledge 1994)	26
Figure 4: Devenir d'un xénobiotique après administration extravasculaire	30
Figure 5: Calcul de l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques par la méthode des trapèzes (Louchahi., 2007)	34
Figure 6 : Modèle Monocompartimental (Administration extravasculaire)	38
Figure 7 : Modèle bicompartimental (Administration extravasculaire)	39
Figure 8 : Modèle tricompartmental (Administration extravasculaire)	41
Figure 9 : Courbe d'étalonnage du cadmium en milieu sanguin	60
Figure 10: Courbe d'étalonnage du plomb en milieu sanguin	61
Figure 11: Courbe d'étalonnage pour le Cu plasmatique	63
Figure 12: Courbe d'étalonnage pour le Zn plasmatique	63
Figure 13 : Evolution des plombémies individuelles chez le lot plomb durant les trois périodes de l'expérimentation	74
Figure 14: Evolution des plombémies individuelles chez le lot (Pb+Cd) durant les trois périodes de l'expérimentation	75
Figure 15: Evolution des plombémies (Moyennes \pm Ecart types) durant les trois périodes chez le lot traité au Pb	76
Figure 16: Evolution des plombémies (Moyennes \pm Ecart types) durant les trois périodes chez le lot traité aux Pb+Cd	76
Figure 17: Evolution des cadmiémies (Moyennes \pm Ecart types) durant les trois périodes chez le lot traité au Cd	78
Figure 18: Evolution des cadmiémies (Moyennes \pm Ecart types) durant les trois périodes chez le lot traité aux Pb+Cd	78
Figure 19: Evolution des zincémies (Moyennes \pm Ecart types) durant les trois périodes chez les deux lots traités au Pb et au Cd	80
Figure 20: Evolution des zincémies (Moyennes \pm Ecart types) durant les trois périodes chez le lot traité aux Pb+Cd	80
Figure 21: Evolution des cuprémies (Moyennes \pm Ecart types) durant les trois périodes chez les deux lots traités au Pb et au Cd	82
Figure 22: Evolution des cuprémies (Moyennes \pm Ecart types) durant les trois périodes chez le lot traité aux Pb+Cd	82

Figure 23: Evolution de l'hémoglobine (Moyennes \pm Ecart types) durant les trois périodes chez les deux lots traités au Pb et au Cd	84
Figure 24: Evolution de l'hémoglobine (Moyennes \pm Ecart types) durant les trois périodes chez le lot traité aux Pb+Cd	84
Figure 25: Evolution de l'hématocrite (Moyennes \pm Ecart types) durant les trois périodes chez les deux lots traités au Pb et au Cd	86
Figure 26: Evolution de l'hématocrite (Moyennes \pm Ecart types) durant les trois périodes chez le lot traité aux Pb+Cd	86
Figure 27: Evolution de l'Alanine aminotransférase (Moyennes \pm Ecart types) durant les trois périodes chez les deux lots traités au Pb et au Cd	88
Figure 28: Evolution de l'Alanine aminotransférase (Moyennes \pm Ecart types) durant les trois périodes chez le lot traité aux Pb+Cd	89
Figure 29: Evolution de l'Aspartate aminotransférase (Moyennes \pm Ecart types) durant les trois périodes chez les deux lots traités au Pb et au Cd	89
Figure 30: Evolution de l'Aspartate aminotransférase (Moyennes \pm Ecart types) durant les trois périodes chez le lot traité aux Pb+Cd	90
Figure 31: Evolution des protides totaux (Moyennes \pm Ecart types) durant les trois périodes chez les deux lots traités au Pb et au Cd	91
Figure 32: Evolution des protides totaux (Moyennes \pm Ecart types) durant les trois périodes chez le lot traité aux Pb+ Cd	91
Figure 33: Evolution de la créatinine (Moyennes \pm Ecart types) durant les trois périodes chez les deux lots traités au Pb et au Cd	93
Figure 34: Evolution de la créatinine (Moyennes \pm Ecart types) durant les trois périodes chez le lot traité aux Pb+Cd	93
Figures 35: (a) Frottis sanguin normal (avant exposition). (b) Globules rouges déformés avec spicules et projections de la surface (poikilocytes /Acanthocytose) (X100)	117
Figures 36: Evolution des plombémies individuelles (exprimées en $\mu\text{g/l}$) présentées en coordonnées semi-logarithmiques chez les brebis des deux lots (Pb) et (Pb+Cd) pendant et après exposition	135
Figure 37: Plombémies en plateau (Oscillations entre les concentrations maximales C_{max} et minimales C_{min} après administration répétées de la même dose de Pb	137
Figure 38 : Exemple de l'évolution des plombémies individuelles (Brebis n°2) en fonction du temps sous forme de perfusion continue après adaptation en coordonnées semi-log et lissage des courbes	138
Figures 39 : Evolution des plombémies individuelles (exprimées en $\mu\text{g/l}$) présentées en coordonnées semi-logarithmiques chez les brebis du lot (Pb) pendant les 9 semaines de l'exposition	148
Figures 40 : Evolution des plombémies individuelles (exprimées en $\mu\text{g/l}$) présentées en coordonnées semi-logarithmiques chez les brebis du lot (Pb+Cd) pendant les 9 semaines de l'exposition	149

Figure 41 : Foie de la brebis n°6	154
Figures 42 : Microphotographies du foie de la brebis n°6 (X40)	155
Figures 43 : Aspect macroscopique du foie de la brebis n°9	156
Figures 44 : Microphotographies du foie de la brebis 9 (X100)	156
Figures 45 : Les deux reins de la brebis n°15	158
Figures 46 : Microphotographies des reins (X40)	159
Figures 47 : Microphotographies des reins (X100)	160
Figures 48 : Le logiciel PK Solver 2.0 (plombémies saisies et paramètres toxicocinétiques calculés)	187
Figures 49 : Membrane d'électrophorèse (gel après coloration, révélant la migration des différentes fractions protéiniques)	188
Figures 50 : Exemples de profils électrophorétiques normaux chez les témoins (brebis avant l'exposition)	189
Figures 51 : Exemples de profils électrophorétiques atypiques chez des brebis après traitements métalliques	190
Figures 52 : Pâleur des muqueuses (conjonctive et muqueuse buccale) chez la brebis n°6	192
Figure 53 : Les brebis de l'expérimentation au sein de la bergerie	

Liste des tableaux

Tableau 1 : Détermination des paramètres toxicocinétiques par calcule/Administration intraveineuse	40
Tableau 2 : Modalités d'administration des sels métalliques pendant 4 mois (mg/kg/j rapporté au métal)	55
Tableau 3 : Programmes thermiques pour les dosages sanguins	59
Tableau 4 : Gamme d'étalonnage du plomb et cadmium	60
Tableau 5 : Teneurs en minéraux dans l'alimentation	71
Tableau 6 : Protides totaux et les différentes fractions protéiques (albumine, alpha1 globuline, alpha 2 globuline, béta globuline et gamma globuline) (Moyennes et Ecart types en g/l) chez les brebis des trois lots traités pendant la période de l'exposition	94
Tableau 7 : Modifications hématologiques et biochimiques durant 9 semaines d'exposition au Pb et au Cd chez les brebis des deux lots (Pb et Pb+Cd)	95
Tableau 8 : Modifications hématologiques et biochimiques durant les dernières 8 semaines d'exposition au Pb et au Cd et la période de récupération chez les brebis des deux lots (Pb et Pb+Cd)	96
Tableau 9 : Modifications hématologiques et biochimiques durant la période d'acclimatation et les 9 semaines d'exposition chez les brebis du lot Cd	97
Tableau 10 : Modifications hématologiques et biochimiques durant les huit dernières semaines d'exposition et la période de récupération chez les brebis du lot Cd	98
Tableau 11 : Classement des prélèvements dans les deux catégories du saturnisme (subclinique et clinique) selon les lots et la durée de l'exposition	112
Tableau 12 : Paramètres toxicocinétiques individuels chez les animaux traités au Pb	141
Tableau 13 : Paramètres toxicocinétiques individuels chez les animaux traités aux Pb+Cd	142
Tableau 14 : Paramètres toxicocinétiques (Moyennes \pm Ecart types) chez les deux lots traités	146
Tableau 15 : Paramètres toxicocinétiques chez les brebis du lot Pb après 9 semaines d'exposition	148
Tableau 16 : Paramètres toxicocinétiques chez les brebis du lot (Pb+Cd) après 9 semaines d'exposition	150
Tableau 17 : Paramètres toxicocinétiques chez les deux lots de brebis traités Pb et (Pb+Cd) après 9 semaines d'exposition (Moyennes \pm Ecart types)	150
Tableau 18 : Références des paramètres biochimiques usuels chez le mouton	186

Liste des Abréviations

Ag : Argent

AIC : Akaike information criterion

ALT : Alanine aminotransferase

ANC : Analyse non compartimentale

AST : Aspartate aminotransferase

AUC: Area under curve (aire sous la courbe :SSC)

AUMC: aire sous les moments de la courbe

C : Concentration

Ca : Calcium

Cd : Cadmium

Cl: Clairance totale

Cmax: Concentration maximum

CRE : Créatinine

Cu : Cuivre

ETM : Eléments traces métalliques

F : Biodisponibilité

Fe : Fer

GGT : Gammaglutamyl- transférase

Hct : Hématocrite

Hg : Mercure

Hgb : Hémoglobine

Ke : Constante d'élimination

LD : Limite de détection

MRT : Temps de séjour moyen (mean residence time)

MS : Matière sèche

ND : Non détectable

OMS : Organisation mondiale de la santé

Pb : Plomb

PBPK : Physiologically based pharmacokinetic

PK : pharmacocinétique

PV : Poids vif

S : Moment statistique

t : Temps

$t_{1/2}$: Temps de demi-vie

TK : toxicocinétique

T_{max} : Temps maximum de concentration

V_d : Volume de distribution

V_{ss} : Volume de distribution à l'état d'équilibre

Zn : Zinc

α, β : Vitesses de décroissance respectivement des phases de distribution et d'élimination

λ_z : Constante d'élimination d'ordre 1

Avant - propos

La thématique de cette thèse de Doctorat en sciences vétérinaires porte sur la détermination et l'évaluation des effets néfastes des métaux lourds sur l'organisme exposé chroniquement à des doses infratoxiques. Ce travail a pour mission de contribuer à l'optimisation de l'utilisation des outils toxicologiques dans le cadre de l'évaluation du risque pour la santé animale.

La première partie de ce manuscrit sera consacré à la synthèse des données bibliographiques nécessaires pour comprendre les bases de ce travail. L'ensemble des méthodes analytiques et des résultats seront présentés et discutés dans la deuxième partie de ce manuscrit, consacrée à la contribution personnelle.

Afin d'évaluer l'exposition du mouton aux deux ETM Plomb (Pb) et Cadmium (Cd), administrés individuellement ou combinés, notre étude expérimentale s'articule autour de la mesure de l'exposition et ses conséquences métaboliques après que le sujet ait ingéré des doses sublétales de manière répétée, néanmoins cumulatives; c'est de mettre en évidence les altérations fonctionnelles et anatomopathologiques de l'organisme, de constater éventuellement la réversibilité des modifications et les phénomènes cumulatifs ainsi que les effets retardés. La toxicité de nombreux xénobiotiques apparaît souvent à la suite d'administration ou d'exposition répétée durant une période de 90 jours au moins (Viau et Tardif., 2003). Dans notre étude nous nous sommes intéressés aux effets d'une exposition à long terme au Pb et au Cd car, c'est à ce type d'exposition que les organismes en général sont soumis.

La stratégie expérimentale adoptée au cours de ce travail s'est orientée selon plusieurs axes, la détermination des profils plombémies et cadmémies/ temps étaient les premiers indicateurs par excellence pour marquer une exposition à ses deux métaux. L'évolution des concentrations métalliques dans le sang avait dessiné des cinétiques spécifiques à chaque traitement reflétant la contamination. Etant donné que, l'exposition environnementale est toujours à une mixture d'éléments traces, l'effet synergique des deux métaux a été évalué lors d'une contamination concomitante aux Pb+Cd, comparativement au traitement par un élément trace seul, d'où la formation de trois lots de brebis liés à la nature des traitements.

Nous nous sommes attachés à étudier les effets hématologiques liés à l'exposition au Pb et au Cd avec une exploration du système hématopoïétique notamment une

évaluation des paramètres se rapportant aux hématies à l'hémoglobine et à l'hématocrite sachant que l'anémie constitue l'effet majeur en relation avec une toxicité hématologique liée à ces deux éléments traces.

Un autre axe a fait l'objet d'une exploration dans ce travail, l'intégrité hépatique et rénale a été évaluée. Pour cela, la détermination des paramètres pour une évaluation d'une agression hépatique a été réalisée, basée sur le dosage des transaminases (ALT : alanine aminotransférase et AST : aspartate aminotransférase) ainsi que celle des protéides totaux et du ratio albumine/globuline. Et afin d'estimer l'impact de l'exposition sur le rein, la créatinine sérique a été déterminée. Comme le foie et le rein constituent des organes cibles pour les métaux lourds et contribuent à leur bioaccumulation dans l'organisme, l'anatomopathologie de ces deux organes prélevés sur des sujets morts a constitué un autre axe pour mettre en évidence les lésions liées à cette exposition.

Les éléments essentiels Zn et Cu ont fait l'objet d'une exploration par détermination des taux plasmatiques. Cet axe a permis de mettre en évidence des interactions entre les éléments traces et les éléments essentiels en établissant un lien entre les concentrations sanguines en Pb et Cd et les teneurs plasmatiques en Zn et Cu.

Par ailleurs, afin de déceler une contamination de l'aliment administré aux animaux ainsi qu'un apport alimentaire en éléments traces pouvant contribuer à la posologie administrée, un dosage du Pb et du Cd a été réalisé. Cet axe relatif à l'alimentation nous a permis par détermination des différents éléments essentiels (Zn, Cu, Ca et Fe) d'évaluer le statut nutritionnel des animaux et de déceler des carences.

Un autre axe tout aussi porteur a été considéré; l'évaluation du risque en toxicologie peut avoir une approche mathématique en utilisant les techniques de modélisation toxicocinétique, dans une perspective d'une évaluation quantitative. Dans ce contexte, l'usage d'une analyse non compartimentale a permis une reproduction des profils temporels des plombémies pour caractériser la relation entre l'exposition et la quantité interne de toxique.

Finalement, à travers une analyse statistique globale de tous les résultats, la pertinence de l'effet traitement et temps a été mise en évidence.

Note aux lecteurs :

Etant donnée l'orientation qu'a connu notre protocole expérimental vers l'exploration d'autres biomarqueurs. L'intitulé de cette thèse aurait dû être :

« Les Biomarqueurs d'Exposition et d'Effets lors d'Administration Répétée de Métaux Lourds (Plomb et Cadmium) chez le Mouton ».

Introduction & Problématique

L'origine de la pollution de l'environnement par les métaux lourds est multiple ; l'industrialisation, l'urbanisation et l'intensification de l'agriculture. La présence des éléments traces métalliques (ETM) dans tous les milieux est aujourd'hui problématique. Ils sont présents en quantité anormale dans l'air, l'eau et dans le sol et les transferts vers les êtres vivants se font continuellement.

Le Plomb (Pb) et le Cadmium (Cd) sont des éléments chimiques considérés comme uniquement toxiques, et ce pour tous les organismes (Homme, animaux, plantes). Les ruminants sont organismes bio-accumulateurs de métaux lourds et leurs manières d'exposition sont diverses, d'où une certaine variabilité de la réponse toxicologique. Ils sont souvent utilisés comme espèces sentinelles de la contamination métallique.

Le mouton fait partie des espèces les plus touchés par les intoxications aux polluants, notamment par le plomb (Mehennaoui et *al.*, 1995 ; Pareja-Carrera, 2014). Un aspect important à prendre en compte est l'accumulation des ETM dans les différents tissus et organes des ruminants contaminés, ainsi que leur excrétion dans le lait. Cette accumulation représente une source significative de contamination du consommateur et constitue un problème réel de santé publique.

Leur impact sur la santé des êtres vivants et leur capacité à perturber beaucoup de paramètres physiologiques font du plomb et du cadmium une préoccupation majeure, qui prend de plus en plus de l'ampleur dans la recherche sur l'environnement et dans l'évaluation du risque liée aux polluants. L'intérêt grandissant pour l'étude de la toxicité de ces deux ETM est dû également à leur utilisation large.

Pour une meilleure évaluation des effets biologiques des ETM, une compréhension de leurs cinétiques et leurs mécanismes d'action est essentielle. Il existe deux types de méthodes principalement utilisées dans l'évaluation de l'exposition aux polluants d'une façon générale, une approche de mesure à la source de l'exposition (surveillance environnementale) et une autre approche de mesures centrées directement sur l'individu concerné (surveillance biologique). Cette dernière impose l'utilisation des biomarqueurs afin d'évaluer l'impact des ETM sur la santé des êtres vivants. Ainsi, selon Heredia Ortiz (2014), la surveillance biologique est une

technique fondamentalement nécessaire dans l'évaluation de l'exposition et la caractérisation du risque toxique. D'ailleurs, le concept de biomarqueur est en pleine expansion et ne peut que profiter de l'évolution des connaissances en biologie, ce qui rend plus performantes les méthodes d'évaluation des risques liés à ces toxiques. Ces méthodes tentent d'établir des outils fiables permettant de reconstituer les doses absorbées de polluants par les individus à partir des mesures de biomarqueurs d'exposition.

On part du constat simple qu'un seul biomarqueur ne suffit pas. Le développement d'approches avec plusieurs biomarqueurs est nécessaire pour diagnostiquer les effets des métaux lourds et évaluer les risques encourus. Plusieurs examens s'imposent lors de l'évaluation de la toxicité chronique ou subchronique, notamment, l'identification d'indicateurs biologiques, témoins de l'exposition totale des sujets contaminés. Ainsi, des biomarqueurs sensibles intégrant la réponse de l'organisme (réponse physiopathologique au danger) sont à évaluer et à caractériser. Toutefois, porter son intérêt à la croissance des animaux, leur consommation de nourriture et l'étude du comportement constituent aussi des indicateurs importants de cette évaluation.

Une approche multimarqueurs, combinant des mesures de biomarqueurs relativement spécifiques et non-spécifiques pourrait apporter des informations sur la nature des substances présentes dans un environnement pluricontaminé. Étant donnée la diversité des polluants, l'exposition aux mélanges de contaminants est une réalité à laquelle sont confrontés les chercheurs. Ainsi, au niveau des tissus et organes cibles, les contaminants peuvent interagir entre eux et moduler les effets toxicologiques auxquels chacun d'eux est normalement associé.

Une investigation en se basant sur différents marqueurs va permettre une évaluation du risque liée à une exposition aux ETM (Pb et Cd). Cette investigation aura un intérêt pour la santé animale, non seulement en termes de régulation d'une fonction physiologique mais également en termes de toxicocinétique (TK).

Pour répondre aux objectifs fixés et dans le but de mimer une contamination chronique de l'organisme à une dose environnementale, la mise en œuvre d'un protocole en station expérimentale s'est imposée. Le modèle *in vivo* est basé sur une exposition de 17 semaines par voie orale de brebis non gestantes et non lactantes au Pb et au Cd individuellement ou combinés.

Nous avons ainsi fait le choix de nous intéresser au comportement toxicocinétique du Pb ainsi qu'à différents aspects toxicologiques du Pb et du Cd.

Mesurer ou évaluer la dose interne d'un ETM au niveau sanguin est l'un des marqueurs essentiels de la surveillance biologique et l'un des premiers pas de l'évaluation des risques en toxicologie, notamment celle du Pb et du Cd qui passe également par une étude de leur toxicocinétique. Cette dernière vise à établir un lien entre l'exposition à une substance toxique et la quantité de celle-ci atteignant les tissus cibles de l'action toxique.

Plusieurs études se sont intéressées à la modélisation de la toxicocinétique dans une perspective d'évaluation quantitative des risques. Dans ce contexte, il existe différentes techniques de modélisation et des approches d'analyse toxicocinétiques multiples. Dans le cas des métaux lourds, les modèles simples sont aussi performants que les modèles complexes. Une étude impliquant une analyse non compartimentale est toute indiquée pour obtenir une meilleure compréhension de la toxicocinétique du Pb suite à une administration individuelle ou combinée au Cd. Cette approche peut s'adapter à toutes les applications dans l'évaluation des risques de l'exposition ou de co-exposition aux xénobiotiques à court ou à long terme et par voies multiples.

Pendant longtemps, l'évaluation toxicologique visait essentiellement à reconnaître et à décrire les effets néfastes pouvant découler d'exposition aux xénobiotiques. Aujourd'hui, la dimension prédictive de la toxicologie s'impose de plus en plus et vise entre autre à établir l'innocuité et à définir des niveaux d'exposition sécuritaire et acceptable (Viau et Tardif, 2003).

La finalité de notre étude est d'apporter des réponses aux questions suivantes:

- ✓ L'évolution des concentration sanguine en Pb et Cd sera t-elle en relation avec les doses administrées et la durée d'exposition ?
- ✓ Ces doses administrées en sels métalliques considérées comme sublétales peuvent-elles donner des plombémies et des cadmiémies élevées, classant les animaux traités dans la catégorie clinique ?
- ✓ Pb et Cd administrés en chronique à des doses sublétales, induiseront-ils des perturbations au niveau hématologique; peuvent –ils avoir un impact biologique notamment sur le foie et le rein et interférer avec les éléments essentiels ?

- ✓ L'administration concomitante du Cd pourra t-elle moduler les concentrations sanguines du Pb ainsi que son effet toxique?
- ✓ La cinétique du Pb sera t-elle modifiée quand il est combiné au Cd?

Ce travail de recherche fondamentale avec son axe méthodologique a pour objectif la mise en place d'outils et de concepts qui trouveront une application notamment dans l'évaluation du risque lié aux métaux lourds. Explorer *in vivo* l'action des deux éléments traces Pb et Cd sur certains marqueurs biologiques pourra contribuer à :

- ✓ Progresser dans la validation et l'utilisation des outils toxicologiques et écotoxicologiques (Biomarqueurs), en se basant sur l'évolution des différents paramètres pendant et après les traitements.
- ✓ Combiner à l'examen clinique la pertinence des biomarqueurs pour évaluer l'exposition, afin de constituer un signal d'alerte permettant de prévenir efficacement d'éventuelles réponses spécifiques impliquant les métaux lourds (biomarqueurs d'exposition précoce, véritables signaux d'alerte).
- ✓ Harmonisation des méthodes d'analyses relatives aux différents paramètres pour l'évaluation du risque en toxicologie.
- ✓ Standardisation des conditions d'exposition aiguë ou chronique adaptées pour chaque espèce.
- ✓ Déceler des interactions relatives à l'administration concomitante du Pb et du Cd, notamment par des analyses toxicocinétiques.
- ✓ Renforcer la pertinence de l'utilisation du mouton autant que modèle animal expérimental en toxicologie.

PARTIE I.
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I.

MECANISMES DE TOXICITE DES DEUX ELEMENTS TRACES METALLIQUES (PLOMB & CADMIUM)

I. Le Plomb

A. Toxicocinétique du plomb

1. Absorption

Les voies de pénétration du plomb sont pulmonaire, digestive et secondairement cutanée. L'absorption digestive est beaucoup plus importante chez les sujets jeunes. Elle s'effectue par transport actif; même lorsque la concentration dans la lumière du tube digestif est élevée, la diffusion passive représente moins de 20% du flux total (Bismuth et *al.*, 2002).

En effet, l'absorption est accrue en présence de régime riche en graisse ou lors de certaines carences, notamment en fer et en calcium (la gestation et la lactation). On suppose que le calcium et le plomb entrent en compétition au niveau de récepteurs communs de la paroi digestive. Plusieurs études ont montré que le zinc peut réduire de manière significative la proportion de plomb absorbée. Différentes vitamines peuvent avoir le même rôle : la thiamine (vitamine B₁) (Dupont, 2002 ; Perrin, 2007).

Concernant l'absorption pulmonaire, il y a une rétention des particules de plomb de plus de 0,5 µm de diamètre dans l'arbre respiratoire inférieur (Manet, 2012), on considère que 35% des particules inhalées se déposent dans les poumons et que 10% de celle-ci sont absorbées (Mahaffey, 1995).

Le passage transcutané des dérivés inorganiques du plomb est très faible (< 0,5%) si la peau est intacte (Fussler, 2011).

2. Distribution

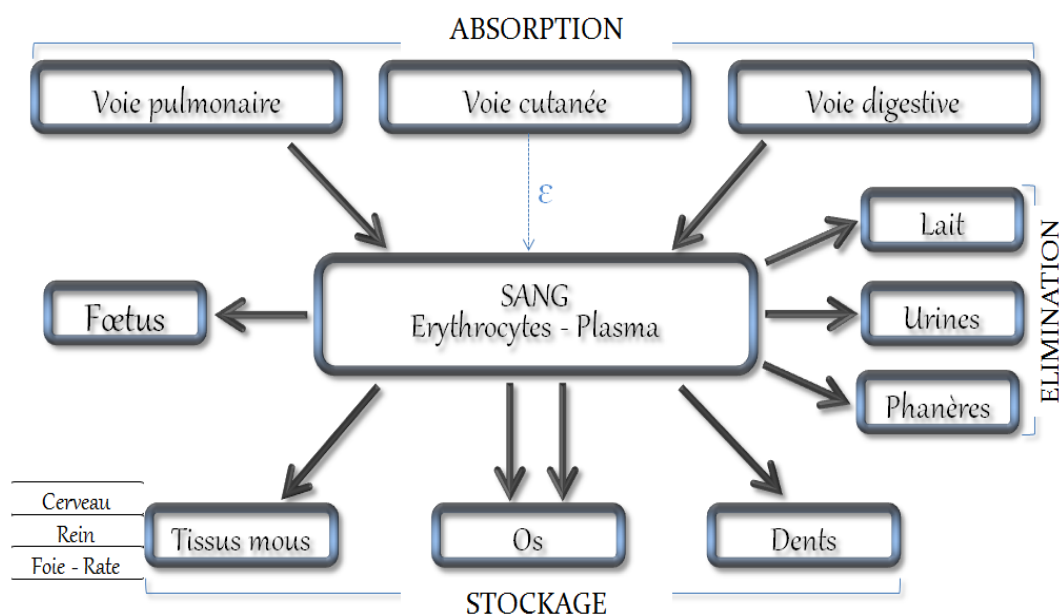


Figure 1: Transport sanguin du plomb dans le sang et redistribution dans les tissus (Caubet, 1999 –Modifié-).

2.1. Transport sanguin

Après absorption pulmonaire ou digestive, le plomb passe dans le sang (à l'état d'équilibre : 1% à 2% de la charge corporelle totale) où il se répartit dans les hématies, sous une forme non diffusible; selon (Humphreys, 1991), les proportions du plomb transportées par les globules rouges : 85 à 90% chez le mouton. Dans le plasma, le plomb est en partie lié aux protéines, la fraction diffusible correspond à 0,2% . Selon Ong et Lee 1980, dans le plasma, les molécules responsables du transport du plomb sont l'albumine (88,2%) et les gammaglobulines (11,8). Une partie du plomb plasmatique est libre et diffusible.

Dans les hématies (membrane et hémoglobine) le plomb membranaire, qui représente environ 14% du plomb sanguin, est lié à 88% au niveau des protéines et moins de 10% au niveau des phospholipides (Humphreys, 1991, Bisson et Houeix.,2014). Lolin et O'Gorman (1988), considèrent que le plomb est d'abord lié aux fractions membranaires avant d'être redistribué dans l'hématie (Glorennec et *al.*, 2000). Le transport s'effectue à 90% par un mécanisme passif, aussi bien pour l'entrée que pour la sortie de l'hématie. La vitesse d'entrée est directement proportionnel à la quantité de plomb. Le système d'accumulation du plomb dans l'hématie est saturable (Bismuth et *al.*, 2002).

La concentration totale dans le sang de plomb reflète le plomb contenu dans ce compartiment et considérée comme un indicateur fiable d'une récente exposition, elle constitue d'ailleurs le test le plus communément utilisé pour évaluer l'intoxication par le plomb chez l'homme et les animaux.

2.2. Répartition du Plomb dans l'organisme

Le plomb est un toxique cumulatif, lorsque son absorption dépasse les capacités d'excrétion, il y a alors accumulation. Cette dernière se fait dans l'organisme en deux temps (Figure 1):

2.2.1. Le premier temps / Le plomb dans les tissus mous et les organes :

l'accumulation de plomb se fait principalement dans les reins puis dans le foie. Un stockage provisoire au niveau du foie, du rein, des intestins et du muscle... ; la fixation se fait sur des protéines de faible poids moléculaire, les Métallothionéines.

la répartition du plomb varie avec le mode d'absorption. Ainsi, les taux hépatiques et intestinaux sont trois fois plus importants quand l'absorption est digestive que par voie pulmonaire (Barthelemy *et al.*, 1975).

Les tissus mous contiennent 5 à 10% de la dose interne : la plus grande partie du plomb biologiquement actif. Le plomb dans les tissus mous est responsable de la majorité des effets toxiques (Bismuth *al.*, 2002). Dans le foie, la distribution du plomb semble assez homogène, excepté en ce qui concerne les voies biliaires où la concentration de plomb est plus importante, alors que dans les reins, on trouve la plus part du plomb dans la corticale, surtout dans les tubules proximaux (Picot, 2010).

Le passage hémoméningé est faible : la concentration dans le liquide céphalo-rachidien est égale à la moitié du taux sérique (Perrin, 2007).

La concentration du plomb dans les muscles est habituellement assez basse, mais elle est corrélée avec la quantité de plomb dans les reins (Bismuth *al.*, 2002).

Une mobilisation secondaire peut avoir lieu et le plomb peut alors être mobilisé du foie et des autres organes de stockage et redistribué, une partie pouvant être excrétée aussi.

2.2.2. Le deuxième temps / Le plomb dans les tissus durs

Pendant ce temps, la fixation osseuse se fait par une réaction échange/ absorption entre la partie minérale de l'os et le fluide extra-cellulaire (Barthelemy et *al.*, 1975 ; Bismuth et *al.*, 2002). Le plomb se substitue au calcium (substitution des phosphates tricalcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) par les phosphates triplombique $\text{Pb}_3(\text{PO}_4)_2$); l'os devient radio opaque.

Le plomb dans le squelette représente de 80 à 99% de la charge corporelle totale. Le plomb est susceptible de continuer à s'accumuler dans les os 6 mois après la fin de l'exposition. Sa demi-vie est estimée à 3 ans. La fraction stockée dans l'os trabéculaire et dans le périoste est encore relativement mobile (biologiquement active et facilement mobilisable). Tandis que, celle stockée dans le cortex profond est très stable (ne produit pas d'effet toxique et ses mouvements sont très lents) (Pinault et Milhaud, 1998., 2002; Fussler, 2011). Le plomb se trouve à plus forte concentration dans les os plats; les os longs en contiennent toutefois la plus grande quantité. Le plomb s'incorpore au cristal d'hydroxyapatite (phosphate tricalcique) en déplaçant l'ion calcium Ca^{++} (Ribera et Taberly., 2011).

Les dents constituent un autre site de stockage du plomb, principalement au niveau de la dentine, dans les zones adjacentes à la pulpe. Les dents de lait ont ainsi été pendant longtemps utilisées comme marqueurs rétrospectifs d'exposition cumulée dans les enquêtes épidémiologiques ou comme des équivalents de biopsies osseuses (Glorennec et *al.*, 2000).

Bien que le stockage du plomb ait un impact limité sur la santé, des processus physiologiques peuvent induire une redistribution du plomb. C'est le cas par exemple, de la gestation et de la lactation. La mobilisation du plomb des stock accumulés avant la gestation a été établie chez l'animal dès 1977 par Buchet et ses collaborateurs. Et aussi une mobilisation du plomb accumulé lors de maladies chroniques (ostéoporose, tumeur osseuse, fractures...) ou lors d'administration d'hormone parathyroïdiennes (Perrin, 2007 ; Benyoussef, 2012).

Différentes études ont montré que le plomb traverse la barrière placentaire et contamine le fœtus dès le premier trimestre, et donne des plombémies maternelles et dans le cordon ombilical à peu près identique (Bellinger et *al.*, 1987 ; Goyer., 1990). La distribution du métal chez le fœtus est similaire à celle rencontrée chez l'adulte, le plomb s'accumule dans la plupart des organes fœtaux, incluant le foie, les reins, le cerveau, l'intestin et surtout les os (Pinault et Milhaud, 1998 ; Bismuth et *a.l.*, 2002).

Le plomb peut aussi passer de la mère à l'enfant par l'intermédiaire du lait maternel ; sachant que la mobilisation du plomb osseux durant la lactation semble être supérieure encore à celle observée durant la gestation (Roquet-Noël, 2002).

3. Biotransformation

Le plomb inorganique, forme la plus souvent impliquée dans les cas d'intoxications saturnines ne subit pas de biotransformations (Bismuth et *al.*, 2002 ; Fussler, 2011) alors que le plomb tétraéthyle subit une déalkylation au niveau du foie pour donner le plomb tri éthyle qui est le métabolite toxique (Hammond, 1973).

4. Elimination

D'après Sugita (1978), le plomb serait éliminé de l'organisme selon trois phases :

- Une première, rapide, correspondrait à l'élimination du plomb non fixé ;
- Une seconde, lente, représenterait la fraction du plomb faiblement liée ;
- Une troisième, très lente, pourrait n'intervenir que plusieurs années après les deux premières, car elle correspond au plomb fortement fixé notamment au niveau osseux (Glorennec et *al.*, 2000)

Etant donné que la principale voie de contamination est orale, la plupart du plomb est éliminée dans les fèces. Ainsi, 90% à 96% du plomb ingéré n'est pas absorbé et est donc éliminé dans les fèces. La partie absorbée est d'abord excrétée par l'urine (plus de 75%), le reste est éliminé par la bile (16%), la concentration du plomb dans la visicule biliaire et dans la bile est connue pour être plus élevée que dans les autres parties du foie (Dupont, 2002 ; Perrin, 2007), les sécrétions bronchiques et gastro-intestinales, puis dans la salive, la sueur et les phanères à peu près (8%) (Bisson et Houeix, 2014).

Selon Picot (2010), la concentration de plomb dans l'urine reflète celle dans le plasma. L'excrétion rénale se fait par filtration glomérulaire, avec une réabsorption tubulaire possible. Il est probable que le plomb excrété par voie biliaire, soit en grande partie réabsorbé par la muqueuse intestinale pour être finalement excrété par voie urinaire.

L'excrétion du plomb semble répondre à un mécanisme physiologique semblable à celui du calcium, ce qui explique que l'excrétion soit sensible à toute réduction de la fonction rénale (Caubet et *al.*, 1999).

Chez le mouton exposé de façon aiguë au plomb, l'excrétion urinaire est décelable la première semaine uniquement. Pinault et Milhaud G (1998) ont aussi montré que le plomb urinaire est fortement corrélé avec le plomb dans le sang chez le mouton. Toute fois, chez la brebis, l'élimination du plomb est lente, en effet, le temps de demi-vie d'élimination est grand (213 - 252 jours) (Mehennaoui, 1995).

Le plomb est aussi éliminé dans le lait, proportionnellement à la concentration observée dans les cellules sanguines mais sans vraisemblablement dépasser les 1.00 ppm (Picot, 2010). La concentration chez la brebis est de 0,11 -0,15 mg/l (Humphreys, 1991).

B. Toxicité subchronique et chronique du plomb

L'ingestion quotidienne réitérée de plomb ou ses dérivés est beaucoup plus toxique. Après exposition subchronique ou chronique, le plomb modifie la biologie de la cellule en perturbant de nombreuses voies métaboliques et différents processus physiologiques. Il inhibe les enzymes de la biosynthèse de l'hème, catalyse des réactions de peroxydation des lipides et interfère avec les processus médiés par le calcium au niveau membranaire et cytosolique (Viau et Tardif., 2003; Picot, 2010 ; Ribera et Taberly., 2011). Le plomb peut ainsi altérer certains mécanismes neurobiologiques jouant un rôle essentiel dans le développement cérébral. Ces éléments peuvent être mis en regard des effets du plomb sur le développement cognitif de l'enfant et des déficits d'apprentissage observés lors d'intoxications systémiques expérimentales (Roquet-Noël, 2002).

Les études de comportement chez l'animal ont permis d'affirmer le lien de cause à effet entre l'imprégnation par de faibles doses de plomb pendant la période de maturation cérébrale et les troubles neuropsychologiques ultérieurs (Viau et Tardif., 2003). L'exposition chronique à de petites doses de plomb a des effets nocifs qui ne sont pas toujours cliniquement évidents.

Le plomb interfère surtout avec le métabolisme de deux autres éléments : le soufre et le calcium; son action thioloprive (affinité Pb pour groupements thiols(SH)), cible surtout les protéines structurales et les protéines enzymatiques. Son action compétitive Pb/Ca est derrière tout un désordre au niveau nerveux, l'induction d'effets rénaux et d'une action cardiovasculaire et digestive (Viau et Tardif, 2003; Fussler, 2011).

1. Toxicité hématologique

L'anémie est une manifestation classique de l'intoxication subchronique et chronique au plomb (Mahaffey, 1981 ; Ognjanovic et *al.*, 2008 ; Gensheng et Bruce, 2008). Il s'agit d'une anémie micro ou normochrome. Elle provient de la diminution de la durée de vie des érythrocytes et de l'inhibition de la synthèse de l'hémoglobine causée par les effets du plomb sur la biosynthèse de l'hème suite à une altération de l'activité de certaines enzymes, ce qui provoque l'augmentation de la production et de l'excrétion des différents précurseurs de l'hème. La sévérité de l'anémie est en relation directe avec la plombémie (Goyer, 1993 ; Peyret, 2013)

Inhibition de la synthèse de l'hème : le plomb inhibe particulièrement trois enzymes ;

- L'acide delta aminolévurique déshydratase (ALA-D)
- La coproporphyrine décarboxylase
- La ferrochélatase

Les substrats de chacune de ces trois enzymes vont donc s'accumuler. On constatera alors une élévation de ces précurseurs :

- Dans les urines : l'acide delta aminolévulinique et les coproporphyrines,
- Dans le sang : les porphyrines érythrocytaires ou leur fraction liée au Zinc. (PPZ) (Glorennec et *al.*, 2000 ; Picot, 2010)

2. Toxicité nerveuse

Le plomb passe facilement la barrière hémato-méningée. Une intoxication au plomb a des effets à la fois sur le système nerveux central et sur le système nerveux périphérique. Au niveau du système nerveux central, le plomb inhibe également certaines enzymes (ALA déshydratase, hexokinase, déshydrogénase succinique) entraînant des perturbations du métabolisme glucidique (très important pour la cellule nerveuse) et de la respiration cellulaire. Il en résulterait des micro-lésions vasculaires et des troubles de l'excitabilité nerveuse (Anne- (Roquet-Noël, 2002, Ribera et Taberly, 2011). Chez l'homme, les effets toxiques du plomb observés aux niveaux de plombémie les plus bas sont de nature neurocomportementale, des troubles mentaux décelables chez l'adulte et un déficit cognitif persistant dès l'enfance (Manet, 2012).

Les principales cibles de la toxicité du plomb sur le système nerveux périphériques sont les motoneurones, qui subissent une démyélinisation segmentaire et une dégénérescence axonale ralentissant la conduction électrique (Perrin, 2007). La neuropathie périphérique se caractérise par une baisse de la conduction nerveuse, des lésions du nerf auditif ont été montrées chez le cobaye et une cécité nocturne chez le singe (Goyer, 1993).

Un troupeau de bovins qui avait reçu de la nourriture contaminée par du plomb pendant plusieurs semaines a développé des tremblements musculaires, une cécité et de l'ataxie ; une paralysie pharyngienne avec hyper salivation ont été décrites. La neurotoxicité liée au plomb chez le mouton est somme toute assez similaire à ce qui est observé chez les bovins.

Le plomb interfère aussi avec le calcium dans les cellules, ce qui est considéré comme la raison principale des modifications des mouvements d'ions au niveau des membranes aussi bien que de la libération de neurotransmetteurs. De légers changements dans l'homéostasie du calcium peuvent affecter différents systèmes (Glorennec et *al.*, 2000 ; Roquet-Noël, 2002).

3. Toxicité rénale

Comme les reins ont un rôle important dans l'excrétion du plomb, la néphropathie chronique conduisant à la défaillance rénale est une manifestation classique de la toxicité au plomb. Elle résulte généralement d'une exposition longue à des doses relativement faibles provoquant une diminution de la filtration glomérulaire. Les cellules les plus sensibles semblent être les cellules des tubules proximaux (Gagan et *al.*, 2012 ; Peyret, 2013) .

Un certains nombre d'études animales ont montré que l'administration chronique de composés de plomb, par voie orale ou cutanée, induit une néphropathie interstitielle chronique évoluant vers l'atrophie et la fibrose (Goyer, 1993; Peyret, 2013).

4. Toxicité hépatique

La répartition du plomb dans l'organisme varie avec le mode d'absorption. Ainsi, les taux hépatiques et intestinaux sont trois fois plus importants en cas d'absorption digestive que par voie pulmonaire (Bonnard et *al.*, 2006).

L'ictère est l'un des symptômes observés chez le mouton lors de l'intoxication chronique par le plomb.. Les modifications des enzymes hépatiques sont aussi notées, mais de manière plus inconstante, il semble que les transaminases (AST, ALT) et les phosphatases

alcalines augmentent lors d'intoxication chronique. Cependant, aucun seuil n'a encore été fixé pour cet effet (Karmakar et *al.*, 2000 ; Abdou et Newair., 2006).

5. Immunotoxicité

L'immunotoxicité peut être définie comme l'ensemble des effets délétères provoqués par un xénobiotique ou par tout autre constituant biologique ou physique de l'environnement sur le système immunitaire à la suite d'une exposition professionnelle, environnementale ou thérapeutique (Kouassi et Fournier, 2003).

Diverses manifestations d'immunotoxicité liées au plomb. Il induit une immunodépression par suppression de l'immunité humorale. Le plomb agit sur les cellules myéloïdes par augmentation des précurseurs dans la moelle osseuse, avec une diminution consécutive des cellules matures. Il provoque aussi une altération de la reconnaissance immunitaire et peut inhiber la production de l'interleukine-2 (Goyer, 1993).

Le plomb possède des propriétés immunodépressives, qui proviennent en partie à ses effets cytotoxiques, par induction d'apoptose ou de nécrose dans les cellules du système immunitaire (Kouassi et Fournier, 2003).

II. Le Cadmium

A. Toxicocinétique du Cadmium (Cd)

1. Absorption

Bien que n'appartenant pas aux métaux essentiels, la présence du cadmium dans l'organisme n'est pas négligeable. Les deux principales voies d'absorption sont l'inhalation et l'ingestion, l'exposition par voie percutanée est considérée comme négligeable (< 1%) (Picot, 2010 ; Faiz, 2011).

1.1. Voie pulmonaire

Concernant l'exposition par inhalation, le cadmium et ses sels sont peu volatils et essentiellement présents dans l'air sous forme d'aérosols riches en particules fines de matière (Bonet, 2011), seules les particules qui ont un diamètre aérodynamique inférieur ou égal à 5µm peuvent pénétrer dans le compartiment pulmonaire (OMS, 1993). Une fraction du cadmium se dépose le long du tractus respiratoire en fonction de la taille des particules, seules

les particules d'un diamètre d'environ 0,1µm, atteignent les alvéoles et sont résorbées (Faiz, 2011). 10 à 50% des particules inhalées sont déposées au niveau des alvéoles pulmonaires et la majeure partie restante, au niveau de la muqueuse trachéo-bronchiale ciliée. Une partie du métal est repoussée par action mucociliaire vers l'œsophage au niveau duquel il peut être également absorbé, cette fois par voie orale (Bonet, 2011; Bisson et Houeix, 2014).

Selon l'hydrosolubilité, les sels les plus solubles : chlorures et oxydes sont absorbés à environ 90-100% et les sulfures sont absorbés à hauteur de 10%. Cette absorption peut se poursuivre pendant plusieurs semaines même après une inhalation unique (Bonet, 2011). Dans l'appareil respiratoire, les particules de Cd sont capturées par les cellules phagocytaires (macrophages) et oxydées à l'état de cation divalent (Cd^{++}) qui peut ainsi passer dans le sang (Picot, 2010).

1.2.Voie digestive

Le transfert du Cd présent dans le sol vers les plantes peut être rapide, source d'exposition chez les herbivores. C'est surtout l'apport d'origine alimentaire qui va contribuer majoritairement à l'augmentation du Cd dans l'organisme. Au niveau gastro-intestinale, le taux d'absorption varie de 3 à 7 % chez l'homme tandis qu'il est de l'ordre de 0,5 à 3% chez les animaux (Faroon et *al.*, 2012).

Ce taux d'absorption peut être augmenté lors de carence alimentaires en calcium, en fer, en zinc, en cuivre, en vitamine D ou en protéines. Les niveaux de ces éléments varient selon l'âge et l'état physiologique. Une augmentation de l'absorption du Cd est favorisée aussi dans le cas de régimes alimentaires riches en graisses (Perrin, 2007 ; Faiz, 2011).

Le taux d'absorption dépend souvent de la spéciation. Sous forme élémentaire, le Cd n'est pas toxique, mais il le devient une fois qu'il se trouve sous sa forme cationique Cd^{++} qui est électrophile. Il peut être absorbé sous cette forme au niveau intestinal et pulmonaire. Ainsi, il entre en compétition avec d'autres métaux divalents essentiels (Ca^{++} , Zn^{++} , Fe^{++}) (Bonet, 2011).

2. Distribution

2.1. Transport sanguin

Après avoir été absorbé au niveau des épithéliums pulmonaires et intestinaux, le Cd se retrouve dans la circulation sanguine (Figure 2). Le Cd est transporté dans le sang en étant

fixé à l'albumine, à l'hémoglobine (70%) ou aux métallothionéines (MT), protéines de faible poids moléculaire riches en groupements SH dont la synthèse est stimulée en présence de Cd. Les lymphocytes peuvent aussi fixer de grandes quantités de Cd, ils le gardent lié avec la métallothionéine (Nordberg *et al.*, 2007 ; Faiz, 2011).

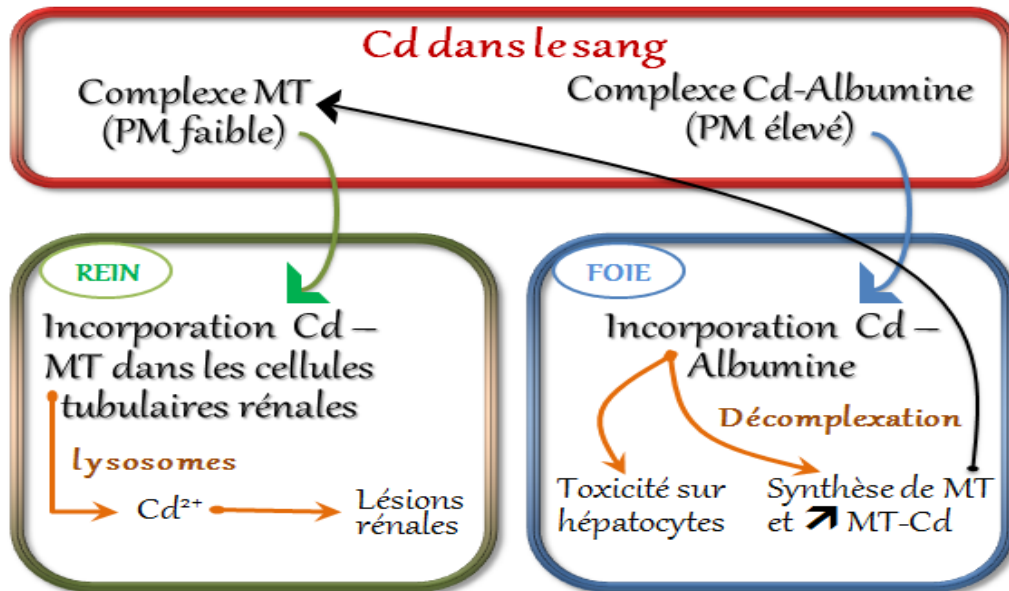


Figure 2: Transport et la distribution du cadmium après son absorption (Falcy *et al.*, 2013 -Modifié -).

En cas d'exposition prolongée, le taux sanguin en Cd monte lentement et régulièrement jusqu'à un plateau ; il baisse en fin d'exposition avec une demi-vie estimée entre 40 et 80 jours chez l'homme (Falcy *et al.*, 2013).

Chez le mouton et suite à une administration orale de chlorure de cadmium, la biodisponibilité est de 0,15 à 0,5% avec une demi-vie d'élimination de 101 à 151,5 jours (Mehennaoui *et al.*, 1995).

2.2. Le cadmium dans les tissus

Le Cd est un toxiques cumulatif. Il se concentre surtout dans le foie, les os et les reins, mais le muscle, la thyroïde, le pancreas, les testicules et la vésicule biliaire peuvent également en contenir. L'accumulation du Cd dans l'organisme humain et animal augmente en fonction de l'âge. Le cadmium libre est à l'origine des effets toxiques observés (Picot, 2010; Faroon *et al.*, 2012).

a. Distribution du cadmium dans les reins

Le transport du Cd au rein dépend de la formation du complexe MT-Cd. Le transport de MT-Cd sanguin aux cellules tubulaires rénales est rapide et permet son incorporation dans les reins (Bonet, 2011). Le Cd se retrouve essentiellement dans le cortex du rein; en effet, chez l'homme faiblement exposé, environ 50% de la charge corporelle est retrouvée dans le cortex des reins (Nordberg et *al.*, 2007; Faiz, 2011).

A l'intérieur des cellules tubulaires, le complexe MT-Cd est dégradé par les lysosomes ce qui libère le Cd sous sa forme cationique qui s'y accumule et cause des lésions provoquant un dysfonctionnement rénal, tandis que le Cd filtré non lié à la MT n'est pas si bien réabsorbé (Nordberg et *al.*, 2007; Faroon et *al.*, 2012).

C'est seulement lors d'une exposition chronique, une fois les MT rénales saturées, que la partie de Cd qui ne peut être complexée est à l'origine de lésions au niveau des cellules tubulaires (Falcu et *al.*, 2013).

b. Distribution du cadmium dans le foie

Suite à une exposition chronique le Cd est distribué de façon plus importante aux reins qu'au foie. Chez l'homme, le Cd sanguin est distribué aux autres parties de l'organisme, il se retrouve essentiellement dans le cortex du rein et dans le foie (Figure 2); en effet, chez les humains faiblement exposés, environ 50 % de la charge corporelle est retrouvée dans le cortex des reins, 15 % dans le foie et 20 % dans les muscles (Nordberg et *al.*, 2007; Faroon et *al.*, 2012)

Comme le foie reçoit par l'intermédiaire de la veine porte un grand nombre de molécules issues de la digestion et de ce fait, joue un rôle important dans l'accumulation du Cd. Ce dernier lié à l'albumine est incorporé dans le foie, puis décomplexé pouvant ainsi avoir un effet toxique sur les hépatocytes et entraîner une augmentation progressive de la proportion de complexe MT-Cd. Ainsi les complexes MT-Cd formés dans le foie vont être relargués dans le sang et pouvoir atteindre les glomérules des reins et y être filtrés (Bonet, 2011 ; Faroon et *al.*, 2012).

3. Elimination

Le cadmium par sa forte rétention dans l'organisme, il est très faiblement éliminé résultant en une longue demi-vie biologique. Le cadmium n'est pas métabolisé. Il est excrété

principalement par l'urine et les fèces (0,01 – 0,02 % de la charge corporelle totale de Cd quotidienne). Il existe également une faible excrétion par la salive, la sueur et les phanères. L'excrétion urinaire est proportionnelle à la charge corporelle en Cd au niveau rénal et hépatique (Perrin, 2007).

Le cadmium urinaire est principalement lié à la métallothionéine et au glutathion car ces complexes peuvent facilement être filtrés par le glomérule.

La sécrétion biliaire permet d'éliminer les molécules non excrétées par le rein. Le cadmium excrété par les voies biliaires et le pancréas est majoritairement réabsorbé au niveau du tube digestif, le reste est éliminé dans les fèces (Faiz, 2011).

Chez l'homme, le cadmium possède une demi-vie de l'ordre de 20 à 30 ans dans le rein, de 4,7 à 9,7 ans dans le foie et de un à plusieurs mois dans le sang (Picot, 2010).

3. Toxicité subchronique et chronique

1. Toxicité rénale

Indépendamment de la voie d'absorption, des effets toxiques sur les reins sont connus. L'exposition chronique au cadmium entraîne l'apparition d'une néphropathie irréversible pouvant évoluer vers l'insuffisance rénale, particulièrement des lésions tubulaire induisant une protéinurie, une glycosurie, amino-acidurie et une polyurie suite à une capacité affaiblie de réabsorption. Les découvertes d'histologie montrent des lésions focales de nécrose de l'épithélium des tubules proximaux et une inflammation des tubules rénaux (Bonet, 2011 ; Faiz, 2011; Faroon *et al.*, 2012).

2. Toxicité osseuse

Au niveau osseux, le Cd perturbe le métabolisme du calcium. Une excrétion excessive de ce dernier induit de l'ostéomalacie, de l'ostéoporose, avec des douleurs osseuses intenses. Ces troubles constituent une partie des signes de la maladie « Itäi-Itäi » observées au Japon chez les populations exposées au Cd (lors de la consommation de riz contaminé (Falczy *et al.*, 2013). Les atteintes squelettiques consécutives au cadmium résultent de plusieurs mécanismes: compétition calcium/cadmium et interférence du cadmium dans le métabolisme de la vitamine D (Perrin, 2007).

3. Toxicité hépatique

Le Cd lié à l'albumine dans le sang est décomplexé dans le foie et devient hépatotoxique. Shashi et *al.* (2002) ont constaté un gain de poids significatif concernant le foie lors d'une exposition intratrachéale au cadmium chez le rat. Il a été aussi constaté et de façon moins précoce, une nécrose des lobules hépatique centraux et une fibrose et hyperplasie biliaire (Falcu et *al.*, 2013). Des lésions dégénératives ont été observées au niveau du foie, après administration per os chez le rat (Shashi et *al.*, 2002).

4. Immunotoxicité

Le cadmium possède des propriétés immunotoxiques qui proviennent en partie de leurs effets cytotoxiques, par induction d'apoptose ou de nécrose dans les cellules immunitaires, entraînant une diminution de la résistance aux infections (Kouassi et *al.*, 2003). L'exposition orale au cadmium chez le rat, provoque une suppression significative de l'immunité humorale par une réduction du taux des IgM et des lésions dégénératives au niveau de la rate (Shashi et *al.*, 2002).

5. Effets cancérogènes

Le cadmium est un agent chimique classé dans le groupe 1, c'est-à-dire comme cancérogène certain pour l'homme. Plusieurs expertises ont conclu aussi à son pouvoir cancérogène certain chez l'animal. Il s'agit des cancers broncho-pulmonaires; deux autres sites ont été évoqués dans la littérature : le cancer du rein et le cancer du pancréas (Picot, 2010 ; Bonet,2011).

III. Toxicité Cellulaire et Moléculaire des deux ETM (Pb et Cd)

Peu de travaux ont été réalisés sur l'effet d'une contamination métallique au niveau cellulaire. Le plomb modifie la biologie de la cellule en perturbant de nombreuses voies métaboliques et différents processus physiologiques. Il inhibe les enzymes de la biosynthèse de l'hème, catalyse des réactions de peroxydation des lipides et interfère avec les processus médiés par le calcium au niveau membranaire et cytoplasmique. Par ailleurs, le Cd est connu pour induire la production des radicaux hydroxyles; il réduit l'activité de glutathion peroxydases, des dismutases de superoxyde et des catalases qui sont des enzymes reconnues pour leur rôle de régulation du stress oxydatif. Il semble que les ions Cd²⁺ peuvent interagir avec les groupements thiols de protéines avec une forte affinité, engendrer une altération de la

structure de ces protéines et entraîner la formation des radicaux thiyles. (Nzengue, 2008; Pareja-Carrera, 2014).

A cause de son analogie structurale, Pb^{2+} concurrence certains cations métalliques essentiels (notamment Ca^{2+}) et se fixe sur leurs récepteurs. Les conséquences peuvent être variables, mais la plupart du temps la fonction biologique des molécules concernées s'en trouve altérée : activités enzymatique inhibée, diminution du transport de certains cations (Perrin, 2007; Lane et al., 2015).

Par ailleurs, Phillips et al. (2005) ont suggéré l'existence d'une certaine synergie entre les effets toxiques des métaux lourds au niveau cellulaire, quand il ya exposition concomitante.

1. Effet sur la membrane cytoplasmique

La membrane cytoplasmique représente la première barrière pour les métaux au niveau de la cellule. Il a été démontré qu'en se liant aux protéines cytoplasmiques et aux phospholipides, les métaux engendrent une altération de leurs structures ainsi que de leurs fonctions (Lopez et al., 2000). L'un des effets le plus important des cations métalliques tel que le cadmium (Cd), le cuivre (Cu), le mercure (Hg) et l'argent (Ag) est l'inhibition de l'activité des ATP ases Na-K dépendantes (Lane et al., 2015).

Les métaux lourds peuvent aussi altérer la structure de la membrane cellulaire en stimulant par exemple la peroxydation lipidique et en épuisant le contenu cellulaire en glutathion (GSH) nécessaire pour la protection contre le stress oxydatif (Nzengue, 2008).

2. Effet sur le noyau

Une fois dans la cellule, les métaux vont rapidement s'accumuler dans le noyau. A ce niveau, ils vont stimuler la synthèse d'ARNm codant pour les métallothionéines (MTs), inhiber l'activité de l'ARN polymérase I et II responsables de la synthèse de l'ARNr et l'ARNm respectivement, altérer la structure et le métabolisme de l'ADN et causer des anomalies au niveau des chromosomes (Lopez et al., 2000).

Des études de cultures cellulaires indiquent que le plomb affecte d'une certaine manière l'expression du gène codant pour la transformation cellulaire. Le plomb peut se lier aux groupes phosphates des nucléotides (Dupont, 2002).

3. Effet sur le système vacuolaire lysosomal

L'exposition au Cu ou au Cd engendre une déstabilisation au niveau des membranes des lysosomes, organites cellulaires assurant le catabolisme des macromolécules, suivi d'une augmentation du catabolisme protéique (Bremner, 1979 ; Lopez et *al.*, 2000). En effet, il a été démontré qu'une contamination des moules par le cuivre engendre une activation des enzymes lysosomales protéolytiques (mytilidases) au niveau de la glande digestive (Perrin, 2007). Il semble donc qu'une exposition des invertébrés à de faibles concentrations de métaux lourds a pour conséquence le catabolisme des macromolécules telles que les protéines. Ce qui peut être confirmé par l'augmentation de l'activité du glucuronidase au niveau des cellules de la glande digestive des moules contaminées par le cuivre (Ribera et Taberly., 2011).

Cependant une contamination par des concentrations importantes de métaux peut amener à une inhibition des protéases lysosomales et par conséquent une augmentation de la demi-vie des protéines peut être observée (Wang et *al.*, 2011). Les métaux lourds altèrent donc la physiologie de ces organites par deux voies : d'une part en déstabilisant les membranes des lysosomes primaires et secondaires et en augmentant le taux d'activité des lysosomes, d'autre part en bloquant l'activité des enzymes hydrolytiques et en inhibant le processus catabolique cellulaire, lorsque les concentrations en métaux sont élevées (Viau et Tardif., 2003).

4. Effets sur les mitochondries

Au niveau des organites cellulaires, la cible principale du plomb est les mitochondries dans lesquelles il s'accumule et provoque des lésions structurales (Perrin, 2007). Goyer (1990) a pu montrer une altération du métabolisme énergétique dans tous les organes qui reflètent cliniquement une intoxication par le plomb, à savoir : le cerveau, le rein, le système hématopoïétique. D'autres fonctions de la mitochondrie sont aussi affectées, par exemple les pompes à sodium, potassium et calcium ATPases.

La capacité des mitochondries à accumuler les métaux lourds a été démontrée (Viau et Tardif, 2003). Cette accumulation a pour conséquence la perturbation de la fonction mitochondriale en altérant les membranes mitochondriales par la voie de la peroxydation lipidique et en augmentant la perméabilité aux polypeptides ce qui entraîne une perturbation au niveau du gradient protonique responsable de la synthèse d'ATP (Wang et *al.*, 2011). Les

métaux peuvent agir également, sur l'activité des enzymes mitochondriales tel que l'inhibition d'isocitrate déshydrogénase nécessaire pour la synthèse de l'ATP (Perrin, 2007).

Par ailleurs, la liaison du Cd avec les métallothionéines dont il a induit la synthèse, exacerbe les effets toxiques au niveau des cellules de la muqueuse intestinale, en particulier par perturbation de la fonction mitochondriale (Phillips *et al.*, 2005).

5. Effet sur le réticulum endoplasmique

Il a été démontré que les métaux lourds altèrent la distribution des ribosomes entre le cytosol et le réticulum endoplasmique. Au niveau des cellules saines, très peu de ribosomes libres sont présents dans le cytosol, la plupart se présentent sous la forme de polyribosomes ou attachés au réticulum endoplasmique (Picot, 2010 ; Ribera et Taberly, 2011).

Une exposition au cadmium provoque une augmentation du nombre des ribosomes libres et une diminution du nombre des polyribosomes ce qui amène à une diminution de la synthèse protéique. Les métaux lourds affectent, également les activités enzymatiques du réticulum endoplasmique. Parmi ces enzymes on peut citer : la phosphatase alcaline, les oxygénases et la benzopyrène hydroxylase (Nzengue, 2008 ; Ribera et Taberly, 2011).

CHAPITRE II.

LES BIOMARQUEURS - CONCEPT & INTERET

1. Définition

Différentes définitions ont été données au terme « biomarqueur » :

Selon la définition proposée par le National Institute of Health (USA), un biomarqueur est : une caractéristique qui est objectivement mesurée et évaluée comme un indicateur de processus biologiques normaux ou pathologiques, ou de réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique.

En toxicologie et en écotoxicologie, le terme biomarqueur se réfère à tous les paramètres biochimiques, cellulaires, physiologiques ou comportementaux qui peuvent être mesurés dans les tissus ou les fluides d'un organisme ou sur l'organisme entier, pour mettre en évidence l'exposition à / ou les effets, d'un ou plusieurs contaminants (Depledge, 1994 ; Flammarion *et al.*, 2000).

Selon Lagadic *et al.* (1997), un biomarqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant.

Ce terme est généralement utilisé dans un sens très large, incluant quasiment toutes les mesures reflétant une interaction entre système biologique et un danger potentiel ; ce danger pouvant être chimique, physique, ou biologique (OMS, 1993).

2. Notions et concepts

Les biomarqueurs ne sont pas un concept nouveau même s'ils n'étaient pas utilisés sous cette dénomination et de manière aussi fréquente dans le passé. Pour autant, en médecine clinique la mesure et le suivi de la température corporelle pour une infection ou la détermination de la glycémie pour le diabète sont des exemples simples et utilisés depuis longtemps qui répondent à la définition des biomarqueurs (Romanetto, 2011).

Depuis plusieurs années, le développement et la validation des biomarqueurs est un axe majeur de recherche en médecine et en écotoxicologie. Ainsi, les biomarqueurs les plus accessibles et les plus connus sont sans doute les paramètres physiologiques, biochimiques ou moléculaires qui peuvent être détectés dans les tissus ou dans les fluides biologiques, et ils

peuvent aussi correspondre à d'autres natures, ex : mesure d'un biomarqueur par technique d'imagerie ou à un ensemble de caractéristiques physiologiques mesurées simultanément.

Les xénobiotiques peuvent impacter différents niveaux de l'organisation biologique et peuvent engendrer des altérations pathologiques. Les progrès de la biologie cellulaire ont permis une identification des mécanismes d'action toxiques des xénobiotiques. Ces connaissances fondamentales ont ouvert la possibilité de forger de nouveaux outils d'évaluation et de surveillance fondés sur les réponses biologiques induites par l'exposition d'organisme à des xénobiotiques. Ceci a donné naissance au concept de biomarqueurs, en référence à des mesures de modifications des réponses biologiques suite à une contamination (Depledge, 1994; Flammarion *et al.*, 2000 ; Alkaddissi, 2012).

Les biomarqueurs représentent aujourd'hui un domaine vaste puisqu'ils se présentent sous différentes formes physiques et biologiques et couvrent différents domaines d'application aussi bien au cours du développement pharmaceutique que dans la médecine clinique (Romanetto, 2011).

Dans le domaine de la toxicologie environnementale, l'approche « biomarqueurs » a largement montré sa pertinence, d'où l'importance de replacer l'approche des biomarqueurs dans un contexte fonctionnel. En effet, ce que l'on considère comme biomarqueur consiste en une modification d'une structure ou encore une variation anormale d'une activité biologique (Manet, 2012). Or, dans des conditions normales, toute structure ou activité biologique joue un rôle dans l'état d'homéostasie d'une cellule, d'un tissu, d'un organisme ou même d'une population. En ce sens, l'analyse de son rôle fonctionnel présente un intérêt important (Barillet, 2009).

L'analyse chimique des polluants présents dans les différents écosystèmes n'est pas toujours possible du fait de la multiplicité des molécules présentes, et ceci à des concentrations inférieures aux limites de détection analytique (Flammarion *et al.*, 2000; Manet, 2012). Ainsi la mesure de biomarqueurs est un des moyens envisagés pour établir de manière fiable un diagnostic de risque environnemental (Garric, 2010).

La détermination des biomarqueurs peut correspondre à des procédures extrêmement simples ou à des procédures plus récentes et complexes comme l'identification d'une mutation spécifique du génome. Un biomarqueur mesuré au niveau individuel ne trouve sa signification écotoxicologique que lorsqu'il permet de décrire, d'expliquer, voire même

éventuellement de prédire, les effets des polluants sur les populations et communautés évoluant dans leur environnement (Lagadic et *al.*, 1997).

La question de la frontière entre « les effets dommageables » et les « réponses nettes mais sans impact pour la santé » peut faire l'objet de discussion serrée. Le développement généralisé des biomarqueurs ouvre des perspectives car les réponses à l'exposition à un agent peuvent être tracées à des niveaux très bas (Hubert, 2010). Pour ce faire, il existe divers type de stratégies, l'utilisation de biomarqueurs est une méthodologie particulièrement avantageuse. En effet, en utilisant des biomarqueurs pertinents et sensibles on peut détecter la présence d'un agent perturbateur avant que les biocénoses n'aient été modifiées par celui-ci ; ils permettent donc de mettre en évidence la présence de polluants dans le milieu en observant la variabilité d'un paramètre particulier. En outre, certains biomarqueurs sont sensibles à certains types de polluants ce qui permet de préciser la nature du problème (Moreau, 2010).

La spécificité d'un biomarqueur pour certaines familles de molécules chimiques (métaux lourds, produits phytosanitaires, hydrocarbures aromatiques polycycliques ...) permet d'une part de révéler la présence de ces polluants. Et d'autre part de renseigner sur la biodisponibilité de ces polluants ainsi que sur les effets biologiques précoces sur les organismes (Hubert, 2010).

3. Identification des biomarqueurs

Les biomarqueurs sont identifiés par l'étude de la corrélation statistique existant entre la présence ou l'intensité d'expression d'un marqueur biologique particulier (métabolite, protéine, ADN, ARN) et le résultat clinique observé (symptômes de la maladie, effet secondaire, efficacité). Cette identification passe en générale par l'analyse comparative de produits biologiques (sang, autres liquides biologiques, biopsies...) issus de sujets sains et de sujets malade (à différents stade de la maladie) ou de sujets exposés (différents niveaux d'exposition). Les caractéristiques biologiques identifiées uniquement dans l'échantillon du sujet malade ou du sujet exposé par mesures répétées ou différenciellement par rapport à un témoin peuvent alors être considérées comme des biomarqueurs de l'état physiologique correspondant (Romanetto, 2011 ; Alkaddissi, 2012)).

Une exposition à des xénobiotiques ne mène pas forcément à un effet toxique, il y a phénomène de détoxification, accumulation, tolérance et résistance. Mais ces phénomènes ont généralement des coûts physiologiques donc ils sont détectables et mesurables.

4. Différentes natures de biomarqueurs

Différents biomarqueurs ont été proposés dans la littérature pour analyser les impacts des agents toxiques (polluants métalliques et organiques) sur les organismes. On distingue classiquement les biomarqueurs d'exposition, témoins de la simple pénétration du polluant dans l'organisme et les biomarqueurs d'effets qui montrent que la substance a eu un effet, toxique ou non, sur une cible critique. Cette classification est aujourd'hui moins utilisée parce que s'il y a effet, il y a eu exposition et que réciproquement la mise en évidence de l'exposition implique qu'il y a eu interaction entre le polluant et certaines cibles (au sens large) dans l'organisme (Ribera et Taberly., 2011) et les biomarqueurs de sensibilité aux effets.

4.1. Biomarqueurs d'exposition

Les biomarqueurs d'exposition sont des indicateurs de la contamination des systèmes biologiques par un (des) xénobiotique(s) à un polluant. Ils permettent la mise en évidence d'une exposition actuelle ou passée et renseignent sur la présence dans un organisme d'une substance exogène, de ses métabolites, ou d'un produit formé par l'action du xénobiotique. Ces biomarqueurs peuvent être le résultat de l'interaction du polluant avec des molécules biologiques dans des tissus et /ou dans des liquides corporels (Lagadic et *al.*, 1997). Ils sont en général impliqués dans les mécanismes de défense cellulaire et de détoxification des xénobiotiques. Leurs variations n'entraînent pas obligatoirement d'effets délétères (Alkaddissi, 2012).

4.2. Biomarqueurs d'effet

Correspondent à des altérations biologiques qui en fonction de l'intensité des réponses peuvent être associées de manière avérée statistiquement ou possible du point de vue mécanistique à une pathologie ou un état physiologique altéré (Flammarion et *al.*, 2000). Les biomarqueurs d'effet permettent de montrer que le xénobiotique est entré dans l'organisme et, et qu'après avoir été distribué entre les différents tissus, a exercé un effet toxique sur une cible critique.

4.3. Biomarqueurs de sensibilité aux effets

Les biomarqueurs de susceptibilité indiquent quant à eux la capacité inhérente ou acquise d'un organisme à répondre au stress induit par l'exposition à un xénobiotique. Cette catégorie de biomarqueurs peut donc notamment inclure des facteurs génétiques (Kouassi et Fournier, 2003; Barillet, 2009). Cette sensibilité individuelle peut résulter de polymorphismes

des gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques ou dans la réparation des lésions de l'ADN. Néanmoins, malgré l'intérêt croissant suscité par le phénomène de variation d'origine génétique de la réponse à la contamination par les polluants, les études incluant le suivi de biomarqueurs de susceptibilité sont rares (Alkaddissi, 2012).

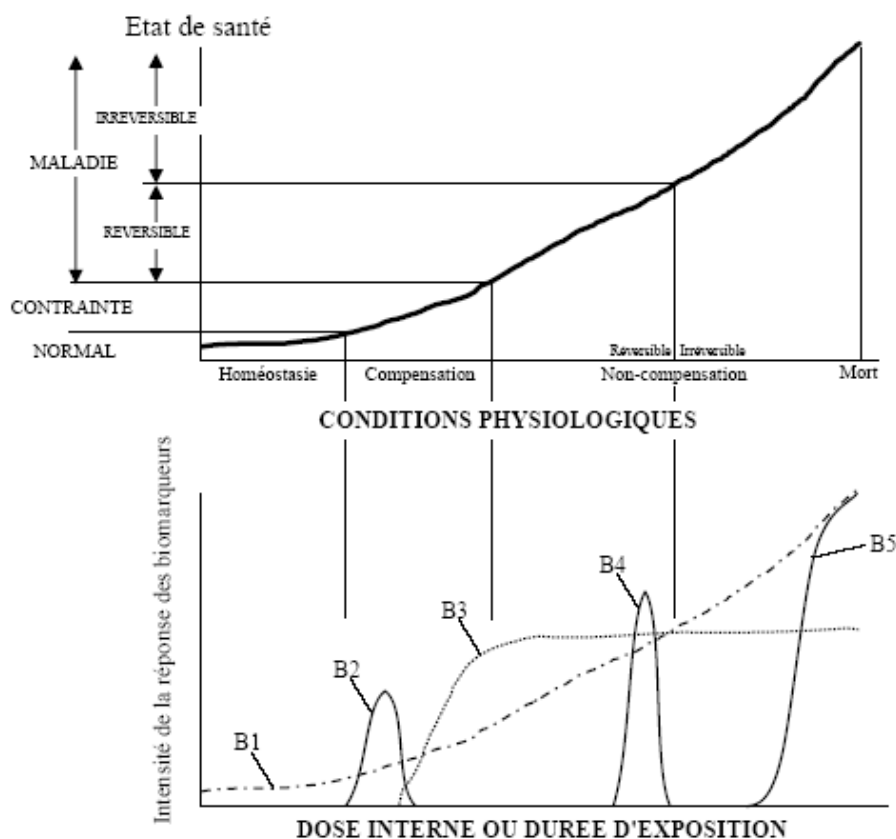


Figure 3. Représentation des relations entre l'exposition (dose et/ou durée), l'état de santé et la réponse des biomarqueurs (d'après Depledge 1994)

Cette subdivision est quelque peu imprécise du fait que les réponses des biomarqueurs peuvent être interprétées comme étant des effets biologiques ou biochimiques induits suite à l'exposition à l'agent toxique; ceci donnant théoriquement à ces réponses la capacité de mettre en évidence à la fois l'exposition et les effets toxiques (Alkaddissi, 2012).

5. Caractéristiques des biomarqueurs

Certains auteurs ont proposé de placer les réponses des biomarqueurs dans un contexte plus fonctionnel en considérant leur rôle par rapport à l'homéostasie de l'organisme (Figure 3). Ce sont des biomarqueurs relatifs à l'homéostasie de l'individu (B1) qui reflètent précisément son état de santé. D'autres biomarqueurs sont à l'origine de phénomènes de compensation qui limitent l'action toxique du polluant jusqu'à une certaine dose, de façon transitoire (B2) ou jusqu'à saturation (B3). Enfin, les biomarqueurs de non-compensation subissent l'action des toxiques de façon réversible (B4) ou irréversible (B5) et témoignent d'atteintes délétères plus ou moins irréversibles pour l'organisme (Ribera et Taberly., 2011).

Les qualités attendues d'un biomarqueur sont:

- Précocité (dans le temps) = principe des biomarqueurs
- Sensibilité (par rapport à la contamination en polluant)
- Spécificité (vis-à-vis de polluants ou de classe de polluants)
- Pertinence écologique (prévisions des effets sur l'écosystème)
- Stabilité / répétabilité et durée dans la réponse
- Facilité de mesure
- Existence de référence (ou connaissance des facteurs de variation)

L'utilisation des biomarqueurs en milieu naturel permet l'évaluation intégrée dans le temps et l'espace des polluants biodisponibles, en termes de présence mais aussi d'effets sur les populations animales, végétales ou microbiennes (Kouassi et Fournier, 2003 ; Capowiez, 2004).

Ils apportent des informations précoces sur la contamination du milieu, l'exposition et l'état de santé des organismes qui le peuplent (rôle diagnostique des biomarqueurs) et pourraient éventuellement permettre de prévoir des effets aux niveaux supérieurs d'organisation (rôle prédictif des biomarqueurs). Ils témoignent de l'exposition à des contaminants rapidement métabolisés donc difficilement détectables (Ribera et Taberly., 2011).

CHAPITRE III.
MODELISATION TOXICOCINETIQUE
PRINCIPE & APPLICATION

I. Introduction

La pharmacocinétique (PK) et la toxicocinétique (TK) consistent en l'étude de l'absorption, distribution, métabolisme et élimination (ADME) des substances toxiques ou à usage pharmacologique en fonction du temps (Gibaldi et Perrier., 1982). La pharmacocinétique est une discipline introduite par Dost en 1953, qui a pour objet l'étude qualitative et quantitative du devenir spatio-temporel du xénobiotique dans l'organisme (Fenneteau, 2009). Elle permet de décrire les différentes étapes que subit le xénobiotique depuis sa libération jusqu'à sa disposition au site d'action ainsi qu'à son élimination sous forme inchangée ou métabolites (c'est l'action de l'organisme sur le xénobiotique).

Le terme toxicocinétique possède une signification plus large, en ce sens que l'analyse toxicocinétique consiste à appliquer les principes pharmacocinétiques dans le but de prédire l'éventualité que des effets toxiques puissent apparaître et la gravité de ces effets (liés à l'intensité et la durée d'une exposition) pour des xénobiotiques (Viau et Tardif, 2003).

La toxicocinétique bénéficie de techniques de modélisation avancées, développées en grande partie en soutien au développement et à l'utilisation des médicaments (Bois, 1999). Au début des années 1930, des modèles à compartiments séquentiels ont été développés pour simuler des données expérimentales en pharmacologie et que les premiers travaux incluant une modélisation mécanistique et physiologique concernent la pharmacocinétique des xénobiotiques ont été réalisés. C'est seulement dans les années 1960 que ce type de modèles a été reconnu utile en raison des nouvelles connaissances sur la relation entre la dose et l'effet observé et l'importance des concepts cinétiques (Heredia Ortiz, 2014). Depuis les années 1990, l'application des modèles cinétiques a connu une expansion importante dans l'évaluation des risques toxicologiques (Bois, 1999 ; Heredia Ortiz, 2014).

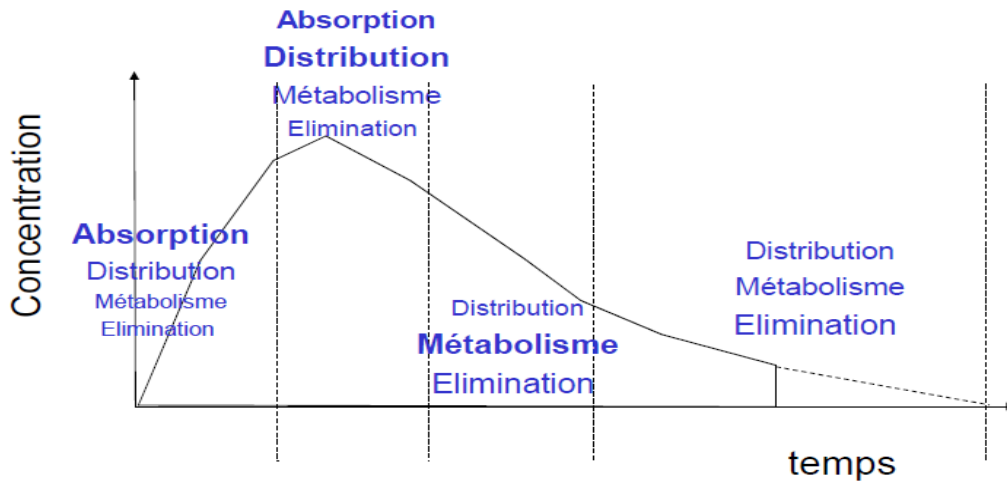


Figure 4. Devenir d'un xénobiotique après administration extravasculaire (Viau et Tardif., 2003)

II. Les paramètres pharmaco-toxicocinétiques

Spécifiques pour quantifier les différentes étapes ;

1. Volume de distribution (Vd) (Distribution)

Le volume de distribution est défini comme le volume apparent (litre/kg) dans lequel une substance semble avoir été dissoute, après absorption dans l'organisme, pour donner une concentration initiale égale à C_0 (Viau et Tardif, 2003). C'est aussi un volume théorique dans lequel le xénobiotique devrait se répartir pour être à la même concentration que celle du plasma (Louchahi, 2007); ce volume est défini comme le ratio entre la quantité de médicament présente dans l'organisme à un temps donné et sa concentration plasmatique au même instant (Toutain et Bousquet-Mélou, 2004).

La valeur du volume de distribution est inversement proportionnelle à la concentration sanguine, les substances possédant une affinité particulièrement élevée pour les tissus adipeux (insecticide, solvants industriels, certains médicaments....) ont tendance à quitter la circulation sanguine et possèdent des volumes de distribution dont les valeurs peuvent être très élevées. À l'inverse une substance qui possède une forte affinité pour les constituants sanguins, comme les protéines et les globules rouges, demeurera en grande partie dans la circulation sanguine, et la valeur de son volume de distribution sera voisine de la valeur du volume sanguin (Viau et Tardif, 2003).

2. Biodisponibilité (F) (Absorption)

Fraction de la dose administré qui parvient à la circulation générale et la vitesse avec laquelle elle y parvient (Louchahi, 2007) et qui devient par conséquent disponible pour produire un effet systémique (Bernier, 2010).

Voie IV (voie intraveineuse= voie de référence) : $F=100\%$

Lorsque la substance est administrée par voie extravasculaire, F peut varier de 0 à 100%. La biodisponibilité d'une substance après administration orale dépend de plusieurs facteurs : degré de dissolution dans les fluides intestinaux, dégradation par les sucs digestifs, métabolisme présystémique intestinal et hépatique, et de l'action de transporteurs.

3. Constante d'élimination et demi-vie biologique

k_e est la constante d'élimination. Cette constante est une mesure de la vitesse à laquelle le principe actif est éliminé de l'organisme par son métabolisme dans le foie ou son excrétion urinaire. C'est la fraction de la quantité de substance qui est éliminée par unité de temps.

Temps de demi vie : Temps nécessaire pour diviser par deux les concentrations plasmatiques lorsque l'équilibre de distribution est atteint, c'est un paramètre directement dérivé de k_e . On lit sur la courbe le temps que met le xénobiotique pour diminuer de moitié (à lire sur la pente terminale ou sur la pente unique si modèle à un compartiment). La demi vie permet de quantifier la rémanence d'un xénobiotique dans l'organisme (Schorderet et *al.*, 1989 ; Louchahi, 2007).

4. Surface sous la courbe SSC (AUC : area under curve)

L'aire ou la surface sous la courbe des concentrations sanguines d'une substance reflète la quantité de substance ayant atteint la circulation systémique. Sa valeur est directement influencée par la biodisponibilité de la substance et de la clairance et proportionnelle à la dose administrée, mais elle est indépendante de la vitesse d'absorption. On utilise les courbes de concentration en fonction du temps. L' AUC permet de calculer la disponibilité systémique (F) lorsqu'on connaît la dose administrée et la clairance. Elle correspond à l'exposition d'un sujet à un xénobiotique (Schorderet et *al.*, 1989 ; Louchahi, 2007 ; Jianghong et *al.*, 2014).

5. Clairance (CL) métabolique, rénale ou totale (Métabolisme et élimination)

C'est la capacité d'épuration du foie et du rein qui sont les moteurs primaires de l'élimination des substances xénobiotiques. La clairance est le seul paramètre quantifiant la capacité d'élimination d'une substance par un organe ou l'organisme. La clairance totale, somme des clairances hépatique et rénale, définit la part du volume apparent de distribution effectivement et irréversiblement épurée par unité de temps (Jianghong et *al.*, 2014). Plus la clairance est faible ou plus le volume apparent de distribution est grand, plus la demi-vie apparente d'élimination sera longue, et inversement (Schorderet et *al.*, 1989 ; Louchahi, 2007).

III. Modélisation toxicocinétique

La modélisation de la toxicocinétique des substances chimiques offre un intérêt certain pour l'évaluation des risques (Bois, 1999), c'est-à-dire le développement de modèle permettant de décrire la relation entre la dose du xénobiotique, sa concentration circulante (plasmatique ou sérique) et son effet (Grenier, 2009). Une telle modélisation permet en effet d'extrapoler de l'animal à l'humain, des fortes doses vers des faibles doses (ou l'inverse), ou bien d'extrapoler à d'autres voies d'exposition que celles expérimentées (Jianghong et *al.*, 2014).

L'analyse ou la modélisation, consiste à utiliser des modèles mathématiques et statistiques afin de décrire et quantifier les données observées ; elle se base sur les phénomènes physiologiques et essaie de trouver le nombre minimal de paramètres qui peuvent décrire adéquatement les données (Moksassi, 2012), les prédire et ainsi optimiser les études subséquentes (Grenier, 2009).

Dans certains cas, nous pouvons être intéressés par les caractéristiques spécifiques de la distribution aux organes et par la métabolisation du produit (ADME) dans l'organisme. La connaissance détaillée de la toxicocinétique du xénobiotique et de ses métabolites est indispensable pour estimer les concentrations aux organes cibles donc les effets biologiques en découlant (soit la toxicodynamique). La modélisation focalise alors sur la distribution et la métabolisation de la substance toxique. Dans d'autres cas, nous pouvons être plutôt intéressés par l'absorption et l'élimination globale (ADME) de la substance toxique et de ses dérivés dans l'ensemble de l'organisme, la connaissance des vitesses d'absorption et d'élimination globale de la substance et de ses métabolites de l'organisme est nécessaire afin de relier les excréments observés à des profils d'exposition. Par vitesse d'élimination, on réfère à

l'élimination globale d'un produit de l'organisme sans se soucier des détails du devenir dans l'organisme (Heredia Ortiz, 2014; Jianghong et *al.*, 2014).

Il est donc possible d'avoir une confiance raisonnable dans les capacités des modèles à décrire correctement des situations réelles (Bois, 1999). Le défi principal de la modélisation toxicocinétique est de réussir à créer une représentation fidèle de la physiologie et du devenir du composé et de ses principaux métabolites dans le sang, les tissus clés et les excréta (Viau et Tardif., 2003 ; Heredia Ortiz, 2014).

La toxicocinétique peut être prédite à l'aide d'une analyse noncompartimentale, ou par une modélisation compartimentale:

1. Analyse non compartimentale

Le passage d'un xénobiotique à travers le corps peut être considéré comme un processus stochastique, sujet à des fluctuations aléatoires. L'analyse non-compartimentale (ANC) utilise les moments statistiques de cette variable aléatoire en considérant la courbe concentration-temps comme une courbe de distribution statistique (Gibaldi et Perrier., 1982). Le modèle non compartimental est appelé aussi analyse par moments statistiques (Bernier, 2010). Ce type d'analyse est basé sur le temps moyen de séjour d'une molécule étudiée à l'intérieur de l'organisme (MRT). Comme la structure du système n'est d'aucun intérêt, le résultat de l'analyse connaît moins de variations d'un cinéticien à l'autre en comparaison avec l'analyse compartimentale ((Jianghong et *al.*, 2014).

La manipulation algébrique des formules de l'analyse compartimentale a permis d'élaborer les formules de l'analyse dite non-compartimentale pour des systèmes ayant des propriétés bien définies, en particulier l'absence d'échanges directs entre les compartiments périphériques et l'extérieur. Cette méthode de calcul fait abstraction des compartiments d'où le qualificatif de non-compartimentale (Vigouroux, 2010).

L'analyse non compartimentale du profil des concentrations plasmatiques ou sanguines (C) d'un xénobiotique en fonction du temps (t) est basée sur la théorie des moments statistiques (S) (Grenier., 2008). Malgré ses limites, l'analyse dite "non compartimentale" s'avère très utile pour simplifier l'étude pratique du métabolisme de la plupart des xénobiotique (Vigouroux, 2010). L'application de cette méthode d'analyse est cependant conditionnelle au respect de deux prémisses. Tout d'abord tous les phénomènes de transfert sont d'ordre 1 et l'élimination se fait à partir du compartiment de transfert (le sang), ce qui a

pour conséquence l'additivité des clairances. Deuxièmement, le temps de séjour moyen à l'intérieur du système pharmacocinétique est indépendant de la voie d'administration (Bernier, 2010)

Contrairement à l'analyse compartimentale, la méthode non-compartimentale (utilisant l'analyse des moments statistiques) est basée sur l'aire sous la courbe (AUC) et le moment résiduel moyen (MRT) et peut être appliquée pratiquement à toutes les données pharmaco/toxicocinétiques (Jianghong et *al.*, 2014). Cette analyse permet par des équations mathématiques simples la détermination des différents paramètres toxicocinétiques ainsi qu'une approche descriptive des phénomènes (Brochot, 2006, Jianghong et *al.*, 2014).

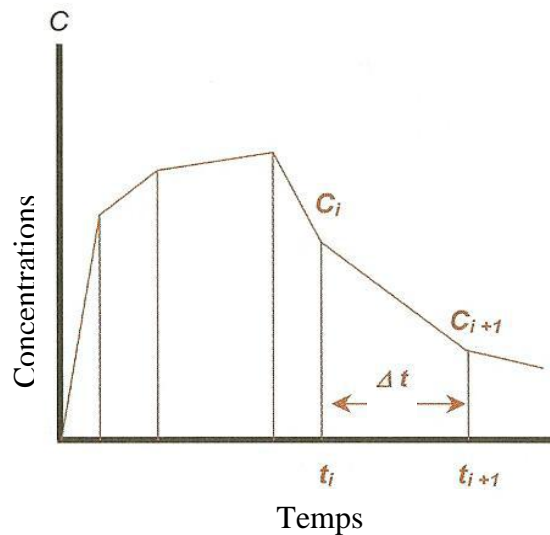


Figure 5 : Calcul de l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques par la méthode des trapèzes (Louchahi., 2007)

Le principe de base repose sur la méthode des trapèzes (Figure. 5), permettant l'estimation de la surface sous la courbe des concentrations en fonction du temps (AUC), les unités de l'AUC sont : Concentration x Temps. L'AUC peut être estimée en utilisant la méthode des trapèzes linéaire, ou log-linéaire ou par la combinaison des deux (Jianghong et *al.*, 2014). Elle consiste à découper le graphe en tranches horaires délimitant des trapèzes dont la base se confond avec l'axe des abscisses (temps) et le sommet avec la portion de courbe correspondant à la tranche horaire considérée. Il est évident que le côté supérieur oblique du trapèze n'étant pas rigoureusement superposé à l'arrondi de la courbe, entraîne une erreur inhérente à la méthode. La somme des surfaces de tous les trapèzes est à peu près égale à la surface sous la courbe. La méthode est d'autant plus précise que le nombre de trapèzes est plus élevé et les intervalles de temps plus courts (Vigouroux, 2010).

L'estimation de la constante fractionnelle d'élimination (K_e) se fait par régression log-linéaire sur les points terminaux. Cette constante permet ensuite d'estimer la surface sous la courbe au-delà du dernier point mesuré (en pratique un triangle) en l'extrapolant à l'infini. A partir de ces paramètres initiaux, sont calculés : la clairance (Cl), le volume de distribution (V_z), la demi-vie d'élimination (Abbara., 2009) et le MRT (Mean Residence Time) qui est une mesure statistique du temps moyen que passe une molécule dans l'organisme. Ce temps résulte directement des phénomènes simultanés de distribution, métabolisme et d'élimination (Fenneteau, 2009)..

l'approche non-compartmentale permet d'extraire rapidement et simplement les paramètres PK du xénobiotique étudié à partir du profil de concentration plasmatique (Jianghong et *al.*, 2014). La fiabilité de détermination des paramètres PK repose sur l'estimation adéquate de l' AUC_∞ et de k_e , qui à leur tour dépendent entièrement de la qualité et de la quantité des données plasmatiques disponibles dans la phase terminale d'élimination (Fenneteau, 2009).

2. Modélisation compartimentale

L'approche compartimentale considère l'organisme comme une succession de compartiments dans lesquels le xénobiotique se distribue et diffuse de l'un à l'autre. Deux approches de modélisation pharmaco/toxicocéniques sont principalement utilisées : les modèles compartimentaux de types classiques (Brochot, 2006) nommés aussi les modèles de données et les modèles physiologiques ou les modèles de processus. Dans le premier cas, la structure du système compartimental ne prend aucunement en compte les mécanismes physiologiques impliqués et son but premier est de fournir la description la plus précise possible des concentrations chez les animaux à l'étude. À l'opposé, les modèles de processus sont élaborés à partir des mécanismes physiologiques (Berneir, 2010 ; Jianghong et *al.*, 2014).

Ces modèles se basent sur la subdivision de l'organisme en compartiments, dans lesquels la substance est supposée se distribuer uniformément (Brochot, 2006). Typiquement, dans les modèles toxicocinétiques à compartiments, les compartiments peuvent représenter des organes individuels, des ensembles d'organes ou des fonctions (Heredia Ortiz, 2014). Un compartiment est un ensemble homogène de molécules sur le plan cinétique. C'est l'unité fonctionnelle du modèle et il peut avoir ou non une réalité biologique ; le plus souvent il s'agit d'un espace virtuel défini par des données. Lorsque les données sont exprimées en concentration, le compartiment aura un volume noté V (Toutain et Bousquet-Mélou, 2007).

L'analyse des données par une approche compartimentale peut par ailleurs se faire sur une base individuelle ou par une approche de population. Selon Grenier (2009), on parle d'une approche individuelle lorsque les données toxicocénitiques de chaque individu sont analysées sans égard aux données des autres individus alors que par une approche de population, les données de tous les individus de l'étude sont prises en considération.

En général, les compartiments représentent la quantité du composé toxique au niveau de différents sites à l'aide des fonctions analytiques. Ces fonctions obtenues sont caractérisées par des paramètres inconnus et propres au xénobiotique en question. Des données expérimentales sont nécessaires à la détermination de ces paramètres (Heredia Ortiz, 2014). Les modèles compartimentaux sont très largement employés, ils sont définissables à partir des données plasmatiques (ou urinaires) facilement accessible en expérimentation (Toutain et Bousquet-Mélou, 2007 a). L'avantage de cette méthode d'analyse réside dans son utilisation à la fois simple et claire et du fait qu'elle permet de déterminer à tout instant la concentration de la molécule étudiée dans un compartiment donné (Bernier, 2010).

Les concentrations plasmatiques sont généralement en équilibre avec les concentrations du site d'action. On pourra donc passer des profils de concentrations plasmatiques au profil des effets en fonction du temps (Toutain et Bousquet-Mélou., 2007a).

2.1. Les modèles toxicocinétiques classiques

Seuls quelques compartiments liés par des échanges de substance définissent un modèle toxicocénitique classique (Brochot, 2006). L'analyse compartimentale repose sur deux hypothèses: le xénobiotique se distribue de façon homogène dans un compartiment, et les organes et ou les tissus ayant des caractéristiques cinétiques similaires peuvent être regroupés en un même compartiment (Bernier, 2010 ; Abbara, 2009).

Typiquement, un compartiment central est défini , et des compartiments périphériques sont ajoutés jusqu'à l'obtention d'un ajustement correct du modèle aux données (un ou deux sont généralement nécessaires (Brochot, 2006). Les transferts entre les compartiments peuvent être écrits en utilisant des équations différentielles. Les systèmes d'équations différentielles sont souvent simples et une solution intégrée décrivant les concentrations au cours du temps peut être obtenue (Moksassi, 2012). Les équations décrivant la cinétique d'un xénobiotique sont des sommes d'exponentielles dans lesquelles les constantes quantifient les vitesses de résorption, de transfert entre les compartiments et d'élimination (Schorderet et *al.*,

1989 ; Jianghong et *al.*, 2014). Les compartiments ne sont pas donc nécessairement biologiquement interprétable, ni les paramètres du modèle. Ces modèles permettent de décrire de façon satisfaisante certaines cinétiques avec un minimum de paramètres (Brochot, 2006)

La construction d'un modèle compartimental va faire appel à différentes grandeurs ; nous aurons à manipuler: des variables, des constantes et des paramètres. (Toutain et Bousquet-Mélou, 2007a).

a. Cinétique Monocompartimentale

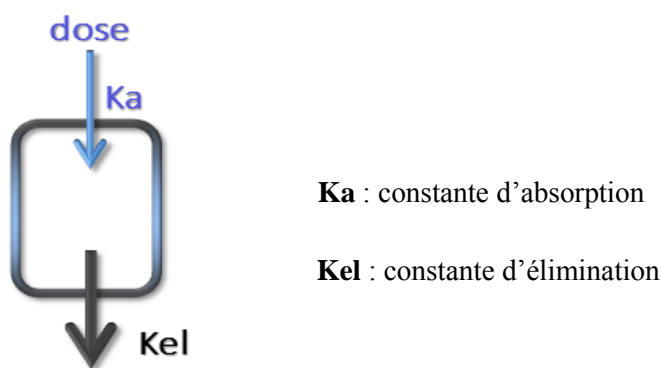


Figure 6 . Modèle Monocompartimental (Administration extravasculaire)

Les données peuvent être modélisées avec le modèle classique le plus simple, monocompartimental (Figure. 6). On considère que l'organisme est représenté par un seul compartiment. Un compartiment central et un compartiment qui sert comme dépôt à partir duquel la substance est absorbée (administration extravasculaire). Un seul compartiment peut tenir compte d'une relation entre deux mesures distinctes (une à l'entrée et l'autre à la sortie) (Heredia Ortiz, 2014). Le corps y est représenté par un seul volume V , dit volume « de distribution ». L'état d'équilibre entre le plasma et les tissus est atteint quasi instantanément (absorption et distribution quasi instantanées). Le temps de distribution est très rapide et est considéré comme nul.

La courbe de concentration en fonction du temps est une exponentielle pour le modèle monocompartimental, seule la phase d'élimination est visible.

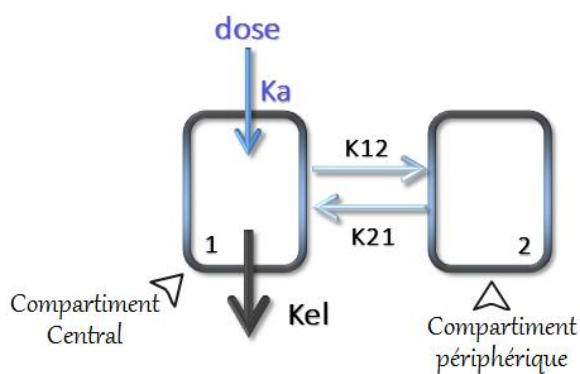
$$C_p = A e^{-\alpha t} = C_0 e^{-kt}$$

α : la vitesse de décroissance.

Le modèle inclut les paramètres suivants : K_a (constante d'absorption d'ordre 1), K_{10} (constante d'élimination d'ordre 1) et le volume de distribution (V_1). Un paramètre important qui désigne la capacité de l'organisme à éliminer le médicament est la clairance (CL) qui est le produit du V_1 et K_{10} (Louchahi, 2007 ; Toutain et Bousquet-Mélou, 2007b ; Moksassi, 2012).

Suite à l'injection IV, la concentration du principe actif s'établit dans un temps que l'on peut considérer comme instantané. Immédiatement, l'élimination commence et la concentration décroît de façon régulière, en suivant la loi exponentielle.

b. Cinétique Bicompartimentale



K_a : constante d'absorption

K_{el} : constante d'élimination

K_{12} : constante de transfert ou d'échange du compartiment 1 vers le compartiment 2

K_{21} : constante de transfert ou d'échange du compartiment 2 vers le compartiment 1

Figure 7. Modèle bicompartimental (Administration extravasculaire)

Un autre modèle structural est le modèle à deux compartiments (Figure. 7). Dans cet exemple, le compartiment 1 est le compartiment qualifié de « central », c'est-à-dire qu'il reçoit la dose administrée et c'est à partir de lui que le xénobiotique est éliminé. Il regroupe le sang et les tissus dont les concentrations de xénobiotiques s'équilibrent rapidement avec la concentration sanguine de celui-ci. Le compartiment 2 ou « périphérique » représente pour sa part un compartiment d'échanges où les molécules de xénobiotique transitent de façon différente au compartiment central. Il peut regrouper les organes moins vascularisés ou ceux qui retiennent de façon plus longue le médicament (Bernier, 2010 ; Jianghong et *al.*, 2014).

On considère l'organisme comme deux compartiments. L'utilisation d'un deuxième compartiment permet de représenter la partie qui se distribue vers les tissus ; l'étape de distribution du compartiment sanguin vers les tissus (compartiment 2) devient visible. (Mouksassi, 2012)

Après une administration intraveineuse (ou orale), un « comportement biphasique » des courbes de concentration en fonction du temps : à une phase de décroissance rapide (phase de distribution ou phase α) succède une phase plus lente (phase d'élimination ou phase β). Au cours de la phase d'élimination, le compartiment central (où s'effectue la mesure de la concentration du principe actif) est en état de pseudo-équilibre avec le compartiment périphérique ou tissulaire (Schorderet et *al.*, 1989).

Des échanges réciproques sont observés entre les compartiments central et périphérique. Cette répartition compartimentale permet d'adapter la posologie (médicament) et de mieux comprendre certains aspects toxicologiques (Benyoussef, 2014).

Quatre paramètres sont suffisants pour caractériser ce modèle. Il peut s'agir de microconstantes (K_{10} , K_{12} , K_{21}) et le volume central de distribution (V_1) servant à écrire une équation intégrée simple du modèle et de calculer les temps de demi-vie de distribution ($t_{1/2\alpha}$) et d'élimination ($t_{1/2\beta}$). Egalement les paramètres peuvent être représentés par des clairances et des volumes (CL , V_1 , V_2 et Q) qui seront plus facilement corrélés à des facteurs internes, externes ou physiologiques pouvant expliquer la variabilité (Mouksassi, 2012).

L'équation de la courbe est formée de 2 exponentielles, la 1^{ère} définit la distribution de la substance, la 2^{ème} définit l'élimination. Suite à une injection IV, la concentration plasmatique est atteinte de manière quasi instantanée, et ensuite elle décroît selon une allure exponentielle. L'équation de ce modèle est :

$$C_p = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$$

La première phase (α) correspond à la phase de distribution, la deuxième (β) à la phase d'élimination

α , β : vitesses de décroissance respectivement des phases de distribution et d'élimination

A, B : concentration au temps 0 respectivement des phases de distribution et d'élimination

Pour chaque phase, il est possible de déterminer une $t_{1/2}$:

$t_{1/2\alpha}$: la demi-vie de distribution

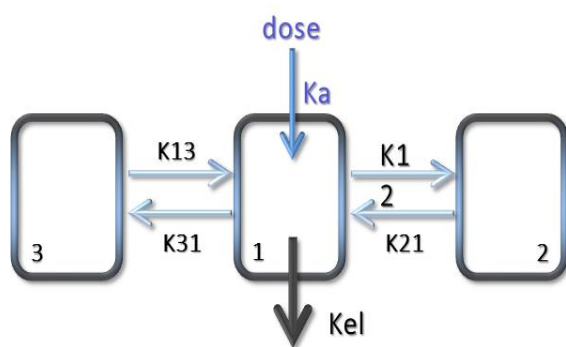
$t_{1/2\beta}$: la demi-vie d'élimination

Tableau 1: Détermination des paramètres toxicocinétiques par calcul /Administration intraveineuse

Paramètres	Vd	Cl	Ke	AUC (0, ∞)	T _{1/2}
Modèle Monocompartimental	$Vd = \frac{dose}{C_0}$	$Cl = K_e \times Vd$	$Ke = \frac{Cl}{Vd}$	$\frac{C_0}{K_e}$	$t_{1/2} = \frac{ln2}{Ke}$
		$Cl = \frac{dose}{AUC(0, \infty)}$			$= \frac{0,693}{Ke}$
Modèle Bicompartimental	$V_1 = \frac{dose}{A + B}$	$Cl = \beta \times Vd_\beta$	$\frac{K_{21}}{A \cdot \beta + B \cdot \alpha}$	$= \frac{A}{\alpha} + \frac{B}{\beta}$	$t_{1/2}(\alpha) = \frac{ln2}{\alpha}$
		$Cl = \frac{dose}{AUC(0, \infty)}$	$Ke = \frac{\alpha \cdot \beta}{K_{21}}$		$t_{1/2}(\beta) = \frac{ln2}{\beta}$

c. Cinétique tricompartmentale

On peut rendre le modèle précédent plus complexe par ajout de compartiment (Figure. 8) et de paramètres mais on dépasse rarement trois compartiments. Dans le modèle tricompartmental, il existe en plus un compartiment qui échange de manière plus lente avec le compartiment central. Il ya deux étapes de distribution : Compartiment central vers 1^{er} compartiment tissulaire vers 2^{ème} compartiment tissulaire, C’est le cas des anesthésiques généraux. On a donc trois exponentielles (2 pour les deux phases de distribution et une pour la phase d’élimination) (Louchahi, 2007; Bernier, 2010).



Ka : constante d’absorption

Kel : constante d’élimination

K12 : constante de transfert ou d’échange du compartiment 1 vers le compartiment 2

K21 : constante de transfert ou d’échange du compartiment 2 vers le compartiment 1

K13 : constante de transfert ou d’échange du compartiment 1 vers le compartiment 3

K31 : constante de transfert ou d’échange du compartiment 3 vers le compartiment 1

Figure 8. Modèle tricompartmental (Administration extravasculaire)

Contrairement à l'analyse nomcompartimentale, l'analyse compartimentale offre l'avantage de s'appliquer à tous les types d'administration et aux cinétiques linéaire et non linéaire. Elle est par contre plus complexe, moins robuste et le temps d'analyse est beaucoup plus long que l'analyse noncompartimentale. Il est à noter toutefois que les modèles pharmacocinétiques compartimentaux ne sont pas les plus complexes, pensons aux modèles physiologiques ou encore aux modèles incluant la pharmacodynamie (Grenier, 2009).

Puisque le modèle à compartiments (non physiologique) ne contient pas d'information explicite sur les valeurs physiologiques telles que le volume des tissus ou le débit sanguin, il devient nécessaire lors de l'extrapolation à l'humain d'établir la correspondance entre les paramètres cinétiques utilisés dans le modèle et les variables physiologiques associées (Heredia Ortiz, 2014).

2.2. Les modèles toxicocinétiques physiologiques (PBPK)

Les modèles toxicocinétiques physiologiques (ou PBPK pour physiologically based pharmacokinetic) peuvent décrire de façon plus détaillée les mécanismes connus de l'absorption, de la distribution, du métabolisme et de l'excrétion (Brochot, 2006).

De par leur description paramétrique de l'organisme, les modèles PBPK s'appuient sur les connaissances biologiques et anatomiques pour décrire ces processus. Plus précisément, le corps est divisé en plusieurs compartiments ayant tous une signification physiologique. Les fluides biologiques, principaux vecteurs des composés dans le corps, créent les interconnexions entre les compartiments (Bernier, 2010). De par leur description de l'organisme, les modèles PBPK fournissent un cadre paramétrique nécessaire aux extrapolations et transpositions inhérentes aux études toxico/pharmacocinétiques (Heredia Ortiz, 2014).

3. Le choix du modèle pharmaco/toxicocinétique

Dans l'analyse des données pharmaco/toxicocinétique, il est fréquemment nécessaire de sélectionner le nombre d'exponentielles utilisées pour décrire la relation concentration-temps. (Tomas et *al.*, 1994). Plusieurs approches existent mais n'ont évidemment pas les mêmes forces et faiblesses (Grenier, 2009). Chaque modèle n'est valide que sous certaines conditions. Il est donc nécessaire de définir le domaine de validité du modèle (Nazanin, 2012).

Un principe fondamental est la parcimonie : le model doit être le plus simple possible (nombre minimum de parmètres) tout en répondant aux objectifs de la modélisation (Moksassi, 2012). On choisit toujours le modèle le plus simple nous permettant de décrire le plus adéquatement possible nos données (Grenier, 2009). S'il faut choisir entre deux modèles donnant les mêmes estimations, la règle de parcimonie s'applique, le modèle le plus simple est le meilleur (Bernier, 2010) .

Le modèle structural que l'on peut construire dépend des propriétés du xénobiotique et du type de données disponibles. Si on a des données plasmatiques et urinaires pour un xénobiotique éliminé en partie par voie rénale, on va distinguer dans notre modèle l'élimination par voie rénale des autres voies d'élimination (Grenier, 2009) .

Le critère objectif le plus utilisé en pharmacocinétique pour juger de la pertinence de l'ajout de paramètres supplémentaires, tel que pour l'ajout d'un compartiment supplémentaire, est le critère d'Akaike (Akaike information criterion : AIC) ça nous aide à mieux comprendre dans quelle circonstance certaines techniques sont préférables à d'autres. Le critère d'Akaike tient compte du fait qu'en augmentant le nombre de parmètres, il y a une perte de liberté et aussi bien sur du fait que l'on veut que le modèle explique le mieux possible les données (Grenier, 2009). Ce critère tient à la fois compte de la performance du modèle et de la complexité de ce dernier (Yamaoka et *al.*, 1978) cité par (Bernier, 2010). Plus la valeur d'AIC obtenue est petite, meilleur est le modèle.

Il est calculé à partir de l'équation suivante :

$$AIC = N \cdot \ln R_e + 2p$$

N : représente le nombre de données, **R_e** : la moyenne des carrés des écarts entre le modèle et les observations et **p** : le nombre de paramètres du modèle.

4. Approche Toxicocinétique dans l'Évaluation des Risques

Mesurer ou évaluer la dose interne (au niveau sérique, urinaire ou cellulaire) est l'un des premiers pas de l'évaluation des risques en toxicologie ; disposer d'outils d'analyse, de biomarqueurs, d'outils de synthèse toxicocinétiques devient une nécessité (Bois, 1999), d'où l'intérêt de la modélisation PK/TK. Cette dernière repose sur la description mathématique des concentrations plasmatiques et/ ou tissulaires d'un xénobiotique qui résulte des processus de LADME (Brochot, 2006 ; Fenneteau, 2009).

Lorsqu'on utilise ces modèles mathématiques, on suppose que le métabolisme des substances dépend de processus (absorption, distribution, biotransformation et excrétion) de premier ordre. Cela signifie, par exemple, que le taux d'élimination d'une substance est proportionnel à la quantité de substance présente dans le corps, et ce, à tout moment. Selon Viau et Tardif (2003), la plus part des xénobiotiques se caractérisent par des cinétiques de premier ordre, pour autant que les différents processus impliqués dans leur élimination ne soient pas saturés.

Les effets relatifs à l'exposition à une substance ne sont pas uniquement liés à la dose reçue lors de l'exposition, mais dépendent de la quantité de produit actifs (parent ou métabolite) atteignant les cellules cibles (Brochot, 2006).

Dans l'exemple suivant, Collet et *al.* (2012) ont conduit une expérience pour une évaluation des effets oestrogéniques du Bisphénol A (BPA). Une approche TK a été réalisée après une administration intraveineuse (IV) et une administration orales. L'analyse non-compartimentale des données plasmatiques du BPA a été choisie. L'AUC est prise comme mesure d'exposition effective, ce paramètre a été calculé avec la méthode des trapèzes arithmétiques.

La modélisation compartimentale consiste à trouver l'équation mathématique appropriée qui permet de décrire le mieux possible le comportement cinétique d'un xénobiotique dans un compartiment, en faisant appel à une technique dite de « lissage » (Viau et Tardif, 2003).

Micallef et *al.* (2014) ont réalisé une évaluation de la concentration de butadiène (substance chimique considérée comme potentiellement carcinogène pour l'humain dans l'air exhalé), un modèle bicompartimental a été choisi. Deux compartiments ont été définis : un compartiment "central" par lequel ont lieu les échanges de butadiène avec le milieu extérieur

(inhalation et élimination métabolique) et un compartiment "périphérique" connecté au compartiment central. Un système d'équations différentielles donné en annexe, permet de décrire les variations temporelles des quantités de butadiène au sein de ces compartiments et sa cinétique d'élimination.

Plusieurs modèles toxicocinétiques ont été développés pour décrire la distribution de la dioxine (TCDD) dans le corps et son élimination. Des modèles compartimentaux de type classique, relativement simples, ont été en général utilisés pour les analyses de toxicocinétique de la TCDD chez l'homme (Bois, 2003).

Concernant la modélisation toxicocinétique de mélange de composés organiques volatils dans l'eau potable, les études ont démontré que les modèles pharmacocinétiques à base physiologique (PBPK) sont des outils éprouvés pour simuler l'exposition par voies multiples et pour évaluer divers scénarios de contamination (Bois, 2003 ; Nazanin, 2012), le modèle utilisé est en fait applicable à de nombreux autres produits organiques persistants (Bois, 2003)

Une étude relative à la cinétique du chlorure de cadmium suite à une administration orale et intraveineuse chez la brebis non lactante a été réalisée par Mehennaoui et *al.* (1994). Le profile des valeurs des concentrations du cadmium dans le sang en fonction du temps chez toutes les brebis est adapté pour une analyse selon un modèle tricompartmental ouvert. Pour certaine substances il est parfois nécessaire d'ajouter des compartiments supplémentaires pour être en mesure de fournir une description adéquate de leur comportement cinétique (Viau et Tardif., 2003). Le choix d'une analyse tricompartmentale pour caractériser la cinétique du cadmium est en accord avec le critère d'information d'Akaïk, la distribution du cadmium chez toutes les brebis est mieux adapté aux équations triexponentielles. Le calcul des paramètres toxicocinétiques du cadmium suite à l'exposition orale présente une biodisponibilité faible, un large volume de distribution et une accumulation du cadmium dans certains tissus (foie et rein) ce qui explique un taux d'élimination bas.

L'alimentation est la principale source de l'intoxication par le cadmium et la cadmiurie est considérée comme un bon biomarqueur pour évaluer l'accumulation du cadmium dans les reins. Pour l'évaluation des risques de l'exposition au cadmium à long terme, Amzal et *al.* (2009) considèrent la modélisation du lien entre les concentrations urinaires du cadmium et l'exposition alimentaire à ce polluant comme étape clé, particulièrement chez les populations sensibles. Une étude sur une période de 20 ans a été

réalisée. Les auteurs ont opté pour une analyse monocompartimentale de population, cette approche est une option adéquate pour lier l'ingestion du cadmium aux concentrations urinaires et de décrire la variabilité chez les populations exposées. Le temps de demi-vie a été estimé à à peu près 11,6 années, avec une variabilité d'environ 25%. Cette étude a démontré que le modèle monocompartimental peut prédire l'exposition alimentaire au cadmium, en se référant aux cadmiuries, aussi bien qu'un modèle plus complexe, les modèles toxicocinétiques physiologiques (PBPK.)

Plusieurs études ont été conduites, pour évaluer l'effet de la voie d'administration sur la pharmac/toxicocinétique des xénobiotiques. L'administration orale de la Cinnarizine (traitement de l'artériosclérose cérébrale...) présente une dissolution variable et une biodisponibilité basse. La forme injectable de la substance a été développée afin d'améliorer la biodisponibilité et rendre l'administration plus commode pour les patients souffrant de dysphagie. Bao-qiu et *al.* (2010) ont réalisé une étude pour comparer la pharmac- et la toxicocinétique de la Cinnarizine après une administration intraveineuse et une administration orale chez le chien, et fournir une base scientifique pour le développement de la substance en injectable. L'HPLC est utilisée pour le dosage de la Cinnarizine dans le plasma et les paramètres pharmacocinétiques et toxicocinétiques ont été calculés et comparés. La cinétique de la substance après administration orale est adaptée pour une analyse noncompartimentale, alors que celle de la Cinnarizine après administration intraveineuse est adaptée pour le modèle bicompartimental. Cette étude indique que les propriétés pharmacocinétiques et toxicocinétiques de la Cinnarizine injectable sont avantageuses par rapport à celle de la préparation orale.

Plusieurs auteurs se sont intéressés à la pharmacocinétique des antibiotiques, leur élimination mammaire et au concept de résidus. Signalons que les toxiques lipophiles accumulés dans l'organisme des femelles lactantes peuvent passer dans le lait. Goudah et *al.* (2007) ont étudié la PK et surtout l'excrétion mammaire de l'Erythromycine chez la brebis lactante après administration IV, IM et SC. La grande décroissance de la concentration sérique après une injection IV, est évidente chez tous les animaux, illustrant la phase de distribution du produit, c'est ce qui a justifié l'utilisation du modèle bicompartimental. Par ailleurs, les moyennes des concentrations sériques suite à une administration IM et SC sont inférieures comparativement aux concentrations liées à la voie IV. Toutefois, après un certain temps les concentrations augmentent et deviennent supérieures. Les courbes après administration (IM et SC) sont plus adaptées au modèle cinétique noncompartimental. Les

données relatives à la concentration du médicament dans le lait en fonction du temps ont été analysées par une approche noncompartimentale et l'importance du passage du médicament du sang vers le lait est exprimé par $AUC_{\text{lait}} / AUC_{\text{sérum}}$ et par le ratio $C_{\text{max-lait}} / C_{\text{max-sérum}}$.

Les modèles pharmaco-toxicocinétiques peuvent aussi être étendus pour décrire l'animal en gestation ou la femme enceinte, et les relations mère-embryon ou mère-fœtus.

Chez la brebis gestante, le dernier trimestre de la gestation est une période très dynamique en terme de développement fœtal, associée à des changements physiologiques profonds, qui peuvent altérer les phases de la cinétique du produit chimique. Le volume du plasma et l'eau corporelle totale augmentent presque de moitié pendant la gestation. Ces facteurs affectent le volume de distribution, qui accroît pour la majorité des xénobiotiques. La concentration des protéines plasmatiques diminue pendant la gestation causant une augmentation des fractions libres (non liées) de certains xénobiotiques lors de la distribution. Un large volume de distribution des substances lipophiles est créé par l'augmentation de la masse grasseuse corporelle. Dans ce contexte, Pérez et al. (2007) ont observé des variations des concentrations d'ivermectine (anthelminthique) dans le plasma, chez des brebis gestantes, après administration sous-cutanée. Les paramètres pharmacocinétiques ont été déterminés par une approche noncompartimentale. Les valeurs du C_{max} , T_{max} et de l'AUC sont similaires chez les deux groupes (gestantes et les non gestantes), mais les valeurs de MRT observées chez les brebis gestantes sont significativement élevées que chez les brebis non gestantes, sachant que MRT est l'un des meilleurs paramètres pour décrire la durée de la persistance d'un xénobiotique dans l'organisme.

La modélisation pharmacocinétique s'oriente vers des descriptions de plus en plus fines de l'organisme, capables d'intégrer davantage de données. La création de modèles toxicocinétiques à la fois génériques et détaillés permettrait de décrire, à l'aide d'un même modèle, la distribution de multiples substances et leurs interactions (brochet, 2006).

La modélisation de la toxicocinétique des substances chimiques permet de déduire scientifiquement et quantitativement des facteurs de sensibilité entre espèces animales. Avec son aide, il est possible de se baser sur la dose interne, effective, de toxicité pour évaluer le risque d'atteinte d'organes cibles (Collet et al., 2012). Cette technique, qui vient en support de l'évaluation des risques est maintenant bien établie.

PARTIE II.
ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I.

DEMARCHE EXPERIMENTALE/ MATERIELS & METHODES

- ANIMAUX
- CONCEPTION DE L'EXPERIMENTATION
- NATURE & RYTHME DES PRELEVEMENTS
- ANALYSES ELEMENTAIRES REALISEES SUR LE SANG
- EXAMEN ANATOMOPATHOLOGIQUE DES ORGANES (FOIE & REIN)
- DOSAGE DES ELEMENTS TRACES DANS L'ALIMENT
- ANALYSE TOXICOCINETIQUE & MODELISATION
- ANALYSE STATISTIQUE

1. Animaux

15 brebis de la race (Ouled Djellel) ont fait l'objet de l'expérimentation. Les animaux âgés de deux ans, avaient un poids moyen de 40 kg et considérés comme cliniquement sains, en se basant sur leur historique et sur l'examen général. Les brebis sont logées dans une bergerie collective au sein de l'animalerie du département des sciences vétérinaires.

Pendant toute l'expérimentation, la ration alimentaire correspondait à une alimentation standard pour l'entretien des brebis non gravides et non lactantes; composée de foin et de concentré, l'eau est distribuée *ad libitum* dans un récipient surélevé pour éviter tout risque de souillure par les aliments ou par la matière fécale et elle est renouvelée quotidiennement. De bonnes conditions d'élevage et de bien être ont été assurées, l'espace individuel est respecté, une litière propre et sèche, ainsi qu'une bonne aération de la bergerie. Des soins de routine et des manipulations pour les animaux ont été réalisés sans contraintes ni stress. Les animaux ont été tondus au printemps et un entretien des onglons a été assuré. Trois animaux sont morts durant l'expérimentation.

A la réception des animaux, un examen clinique a été réalisé, nous avons insisté particulièrement sur :

- L'allure générale et la conformation des brebis.
- Le comportement des animaux notamment le comportement alimentaire.
- La défécation et l'aspect des fèces
- L'état de la peau et des phanères, la présence éventuelle d'ectoparasites.
- L'absence totale d'une éventuelle infection (hyperthermie, abcès, jetage, larmoiement, boiterie...).

2. Conception de l'expérimentation

Pour former les lots, les animaux ont été répartis aléatoirement en 03 groupes de 05 sujets selon la nature du traitement. Les moutons ont été identifiés par des boucles numérotées de couleurs différentes.

- **Lot Plomb** : animaux traités au Pb identifiés avec des boucles vertes :

Le n° 1168(01), le n° 1169 (02), le n° 1171 (12), le n° 1179 (13) et le n° 1170 (15).

- **Lot Cadmium** : animaux traités au Cd identifiés avec des boucles jaunes:

Le n° 235 (03), le n° 236 (4), le n° 227 (05), le n° 228 (10) et le n° 238 (11).

- **Lot (Plomb + Cadmium)**: animaux traités au Pb + Cd identifiés avec des boucles rouges :

Le n° 3579 (06), le n° 84 (07), le n° 63 (08), le n° 3578 (09) et le n° 83 (14).

Le schéma expérimental a été conduit en trois périodes:

La période 1: d'une durée de 4 semaines avant de commencer l'administration des sels métalliques. Pendant cette période, les animaux sont considérés comme témoins pour l'expérimentation. Les brebis ont été vermifugées, vaccinées contre la clavelée et préservées de tout contact avec les autres animaux dans l'animalerie. Afin de déterminer l'apport en éléments traces métalliques dans l'alimentation, le dosage du Pb, du Cd et de certains éléments essentiels (Calcium, Zinc, Cuivre et Fer) a été réalisé dans le foin et dans l'aliment concentré.

Au préalable, cette phase permet de dresser un bilan général de santé des brebis qui s'est avéré satisfaisant.

La période 2 : période de l'exposition, étalée sur 17 semaines. Pendant cette période, les sujets ont reçu des doses uniques, infratoxiques et journalières de sels métalliques, 159mg de nitrates de Pb ($Pb(NO_3)_2$) et 162mg de chlorure de Cd ($CdCl_2, 2.5H_2O$). Les sels sont pesés et préparés sous forme de gélules pour une administration orale. Les doses selon les lots sont indiquées dans le tableau n°1. Les quantités de sels métalliques apportent une posologie pour le plomb et pour le cadmium respectivement de 2.5mg/kg de poids vif/j et 2mg/kg de poids vif/j (Tableau 2).

Tableau 2: Modalités d'administration des sels métalliques pendant 17 semaines (mg/kg/j rapporté au métal)

	Plomb *	Cadmium**	Plomb + Cadmium
Lot 1	2.5	-	-
Lot 2	-	2	-
Lot 3	-	-	2.5 + 2

***159 mg de nitrates de Pb, **162mg Chlorure de Cd**

L'administration des gélules est effectuée chaque matin avec le moins de contraintes possibles pour éviter de stresser les animaux. La gélule est déposée à la base de la langue et déglutit immédiatement après fermeture de la bouche de l'animal.

Après la mort de deux brebis appartenant au groupe **(Pb+Cd)**, et la constatation des signes de toxicité sur les autres animaux du même groupe, la période d'exposition a été écourtée pour ce groupe; l'arrêt du traitement a été effectué dès la 9^{ème} semaine.

La période 3 : la période post-exposition qualifiée de période de récupération, étalée sur trois mois et demi. Au cours de celle-ci, les traitements ont été arrêtés et les animaux ont été gardés dans les mêmes conditions.

Pendant les trois phases de l'expérimentation, en plus de l'entretien quotidien des animaux, de l'administration des gélules et des différents prélèvements effectués, nous avons procédé systématiquement à l'examen clinique des brebis, et de leur état général, de leur comportement, de leur appétit, la soif, et leur façon de réagir aux stimulations extérieures. Des prises de température et de pouls ont été réalisées ainsi que l'examen des muqueuses et des ganglions. L'état et l'aspect des dents ainsi que celui de la laine et la facilité de leur arrachement a été testée.

3. Nature et rythme des prélèvements

3.1. Prélèvements sanguins

Sur animal vivant, le prélèvement le plus pratique reste le sang. Les prélèvements de sang sont collectés par ponction veineuse à partir de la veine jugulaire, recueillis dans des tubes type vacutainer de 4ml, garantis sans traces de métaux lourds. Les prélèvements sont effectués le matin à la même heure avant l'administration des gélules.

- **Prélèvements destinés au dosage des métaux lourds:** Le sang était prélevé sur citrate de sodium et immédiatement stocké à 4°C en attendant le dosage du Pb et du Cd.
- **Prélèvements destinés à l'hématologie:** Le sang était prélevé sur EDTA
- **Prélèvements destinés au contrôle des éléments essentiels et des paramètres biochimiques :** Le sang était prélevé sur héparinate de sodium, puis centrifugé. Le plasma récupéré était stocké à 4°C.
- **Prélèvements destinés à l'électrophorèse des protéines sériques :** Le sang était prélevé dans des tubes secs, puis centrifugé. Le sérum a été récupéré pour doser les protéines totales et réaliser directement l'électrophorèse.

Le rythme des prélèvements a été le suivant (en jour) pendant les trois périodes :

Période 1 : Les prélèvements ont été réalisés à J0, J7, J14 et J21.

Période 2 : Les prélèvements étaient hebdomadaires, à J28, J35, J42, J49, J56, J63, J70, J77, J84, J91, J98, J105, J112, J119, J126, J133 et à J140.

Période 3 : Pendant un mois les prélèvements étaient hebdomadaires, à J147, J154, J161 et à J168, puis, on s'est mis à prélever chaque quinzaine jusqu'à la fin de la période, à J182, J196, J210, J224, J238 et à J252.

3.2. Prélèvements des organes

Les prélèvements d'organes ont été réalisés sur les trois brebis mortes durant l'expérimentation. Deux brebis appartenant au groupe (Pb +Cd) sont mortes durant la période d'exposition (la fin de la 9^{ème} semaine), la première brebis portait le n° **3579 (06)** et la deuxième portait le n°**3578 (09)**. La troisième brebis portait le n° **1170 (15)** appartenait au lot Pb morte durant la période de récupération. Les cadavres ont été autopsiés. Un rein, un lobe de foie et un os long (métacarpien) sur chaque cadavre ont été prélevés pour effectuer le dosage du Pb et Cd,

et réaliser un examen anatomopathologique. Les prélèvements destinés à l'histologie ont été immédiatement fixés dans du formol à 10%.

3.3. Prélèvement de l'aliment

Des prélèvements ont été réalisés sur l'aliment des brebis, afin d'évaluer l'apport alimentaire en éléments traces : 250 g de foin et 250g d'aliment concentré constitué d'orge, de son et de maïs.

4. Analyses élémentaires réalisées sur le sang

Les analyses toxicologiques ont été réalisées au niveau du laboratoire de toxicologie du département vétérinaire. Les analyses biochimiques et hématologiques ont été réalisées au niveau du CHU de Batna excepté celle de la l'hématocrite et les frottis sanguins.

4.1. Hématologie

La méthode automatique par *Blood Cell Analyzer, Beckman coulter* a été utilisée pour la détermination de la concentration de l'hémoglobine.

Principe : C'est une méthode colorimétrique ; par ajout de réactif provoquant l'hémolyse, les globules rouges libèrent l'hémoglobine ; Fe^{2+} de l'hémoglobine est oxydé en Fe^{3+} de la méthémoglobine par le ferricyanide, la méthémoglobine ainsi formée se combine avec le cyanure pour former un complexe la cyanméthémoglobine (un composé très stable), qui a un fort pouvoir d'absorption lumineuse à 540 nm.

Afin d'évaluer l'impact des éléments traces sur la morphologie des cellules sanguines, une analyse qualitative a été réalisée sur des frottis sanguins avec coloration.

La détermination des valeurs de l'hématocrite a été directement réalisée après prélèvement par la centrifugeuse à hématocrite.

4.2. Analyses toxicologiques

4.2.1. Plombémie et Cadmiémie

La quantification des éléments trace métalliques a reposé sur une seule et même méthode: la spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA), qui constitue un outil privilégié d'analyse en toxicologie et en écotoxicologie. Elle est très bien adaptée à toutes les matrices biologiques et environnementales. Pour pallier le manque de matériau de référence certifié, (c'est-à-dire un matériau de référence dont les concentrations d'un ou plusieurs éléments ont été certifiées par

une procédure qui établit la valeur de ces concentrations) on a eu recours à la technique du dopage, comme ils le font de nombreux analystes, qui consiste à l'ajout de quantités connues d'éléments aux échantillons.

Principe:

Son principe est basé sur la mesure des concentrations en Pb et Cd à partir de l'absorbance du spectre du Pb et Cd émis par une lampe par des atomes des éléments traces vaporisés dans le faisceau lumineux de la lampe (Delves, 1970). La vaporisation peut être obtenue dans une flamme ou à l'aide de méthodes sans flamme: il s'agit des méthodes électrothermiques (ET-SAA) qui utilisent le chauffage électrique d'un four en graphite (Subramanian, 1989). Cette dernière est plus sensible et parfaitement adaptée aux faibles concentrations de l'ordre de $\mu\text{g/l}$.

Les échantillons ont été dilués à 1 :10 dans de l'acide nitrique ultrapur à 0.05N pour l'élimination des matières organiques. L'action de ce réactif chimique oxydant a été renforcée par le Triton X à 0.5% pour perméabiliser les membranes cytoplasmiques et faciliter l'extraction.

Le dosage direct a été réalisé selon la méthode décrite par Mehennaoui et *al.* (1997) pour le plomb et Houpert et *al.* (1997) pour le cadmium en utilisant le spectrophotomètre à absorption atomique *Perkin Elmer Analyst 100* à four graphite.

La limite de détection peut être augmentée par compensation de l'absorption non spécifique à la lampe au deutérium. On peut ainsi atteindre des limites inférieures à $1 \mu\text{g/l}$ dans le sang, avec des manipulations réduites. De même l'emploi des tubes graphites pyrolytiques permet d'obtenir des températures plus homogènes sur l'ensemble de l'échantillon.

Le processus physico-chimique en analyse par absorption atomique peut être décomposé en succession de réaction à partir de la solution d'analyse. Le four en graphite reçoit l'échantillon introduit par un injecteur automatique, celui-ci est chauffé suivant un programme thermique qui se déroule comme suit :

- Vaporisation de la solution ou désolvation et séchage: évaporation de la phase liquide et formation d'un brouillard (20 à 40 secondes)
- Minéralisation par formation d'oxydes (20 à 40 seconde)
- Atomisation : réalisée par réduction des oxydes métalliques par le carbone à haute température. Les éléments à doser sont alors portés à l'état d'atomes libres sous forme de vapeur. Les atomes à l'état fondamental vont alors absorber de façon spécifique le

rayonnement émis par une source lumineuse. Cette absorption est mesurée à l'aide d'un prisme dispersif et d'une cellule photoélectrique : elle est directement proportionnelle à la concentration de l'élément (loi de Beer-Lamber).

- Purge du système, par un courant d'argon à une température de 2000°C
- Refroidissement par circulation d'eau autour du four

Les programmes thermiques utilisés pour le dosage du Pb et du Cd sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3: Programmes thermiques pour les dosages sanguins

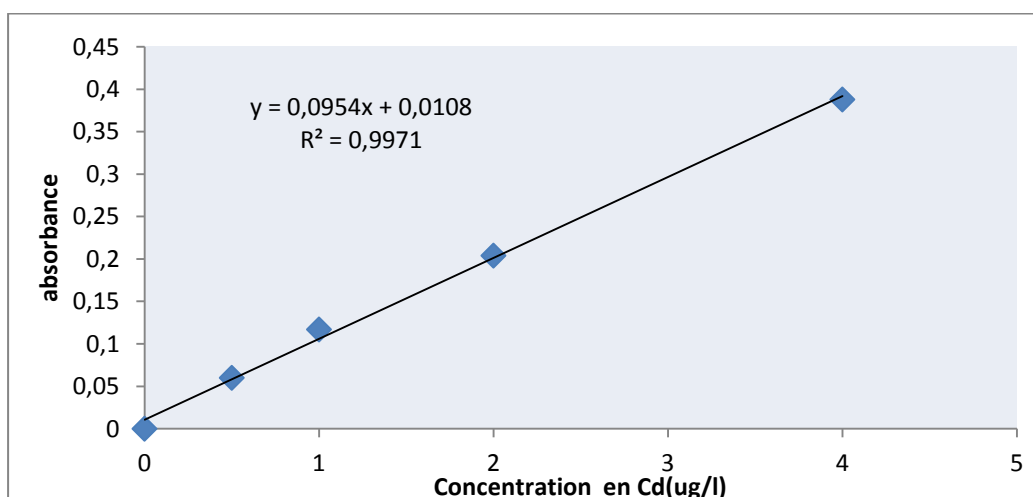
	Plomb	Cadmium
Température de séchage	200°C	150 °C
Température de calcination	700°C	500 °C
Température d'atomisation	1800°C	1400 °C

La spectrophotométrie est une technique qui se prête à la détermination de concentrations en éléments traces métalliques à l'aide d'une courbe de calibration. Afin d'éviter les variations liées à la matrice (la salinité, les propriétés physiques de la solution d'analyse et la nature du solvant) et de maîtriser au mieux les phénomènes physico-chimiques qui interviennent dans l'obtention des atomes libres à l'état fondamental, le sang de mouton non contaminé à été utilisé pour préparer les gammes d'étalonnage. La préparation a été réalisée de la même façon que les échantillons. Les modalités sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 4: Gamme d'étalonnage du plomb et cadmium

Sang Total	100 µl d'une solution étalon de Nitrate de plomb	Nitrate de cadmium	TritonX0.5%	HNO ₃ 0.05N
	0 µg/L	0 µg/L	400 µl	400 µl
	50 µg/L	10 µg/L	400 µl	400 µl
	100 µg/L	20 µg/L	400 µl	400 µl
	250 µg/L	40 µg/L	400 µl	400 µl
	500 µg/L	50 µg/L	400 µl	400 µl

Des droites ont été tracées, la linéarité est validée par l'établissement de la droite de régression sur la plage de points relatifs à l'absorbance par rapport à la concentration allant de 5 à 50 µg/l pour le plomb et de 0.5 µg/l à 5 µg/l pour le cadmium (Figure 1 et 2).

**Figure 9: Courbe d'étalonnage du cadmium en milieu sanguin**

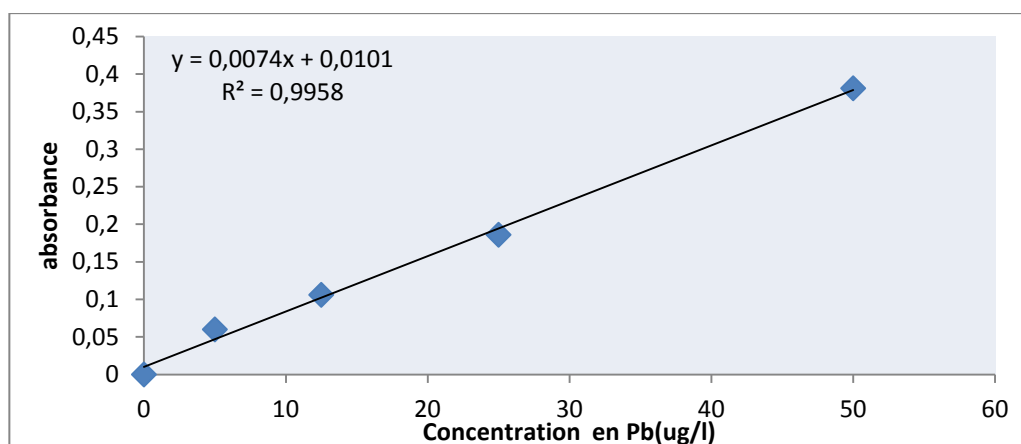


Figure 10: Courbe d'étalonnage du plomb en milieu sanguin

Les coefficients de régression entre les concentrations et les absorbances correspondantes se situent dans cette gamme de linéarité 0.995 et 0.996; la pente de la droite de régression varie d'un dosage à un autre, entre 0.006 et 0.008 pour le plomb; pour le cadmium le coefficient de régression varie entre 0.995 et 0.998 et la pente entre 0.087 et 0.115 (Figures 9 et 10). L'équation de la droite a été déterminée par le logiciel: Excell sur Windows.

La limite de détection de la méthode (LDM) : est la plus petite concentration d'un paramètre qui produit un signal détectable, sachant qu'elle est définie aussi comme étant la concentration de la solution ayant une absorbance égale à 3 fois l'écart-type de la mesure de huit blancs successifs (McKenzie et Smith., 1988). Elle a été déterminée en réalisant 10 mesures consécutives. Les limites de détection pour le plomb et le cadmium sont respectivement 4µg/ml et 0.3µg/ml.

La limite de quantification de la méthode (LQM) : est la plus petite quantité d'une substance à examiner dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec un coefficient de variation du facteur de réponse acceptable. La limite de quantification est équivalente à 10 fois l'écart type de la mesure de huit blancs (McKenzie et Smith., 1988). La limite de quantification dépend de la limite de détection, de la prise d'essai et des diverses dilutions nécessaires pour obtenir une mesure du signal correct. La limite de quantification est 12µg/l pour le Pb et 0.8µg/l pour le Cd.

Eliminations des contaminants : En absorption atomique, la contamination des échantillons (et surtout ceux dont la concentration est faible) est un problème omniprésent et il intervient à toutes les étapes depuis l'échantillonnage original jusqu'à la mesure finale. Tout au long de la

technique, un soin particulier était apporté pour limiter les contaminations qui peuvent influencer l'analyse des éléments traces métalliques. Un contrôle rigoureux de l'environnement, la verrerie et les réactifs chimiques ont fait l'objet d'une attention particulière. L'absence de contamination a été vérifiée systématiquement par passage d'un blanc constitué de 10 ml de l'électrolyte support.

4.2.2. Zincémie et Cuprémie

Rappelons que l'objectif principal d'une méthode analytique de dosage est de pouvoir quantifier le plus justement et le plus précisément possible l'élément à évaluer. La détermination du Zn et Cu plasmatiques a été réalisée selon la méthode décrite par Lamand (1978) dont les critères de performance permettent de répondre aux exigences de l'usage auquel elle est destinée. La spectrophotométrie d'absorption atomique à flamme a été utilisée pour le dosage de ces deux paramètres.

Les échantillons plasmatiques ont subi un traitement pré-analytique qui consiste en une déprotéinisation réalisée comme suit :

- Prélever 1 ml de plasma et ajouter lentement 0.5 ml d'acide chlorhydrique. Agiter, attendre 10 minutes.
- Ajouter 0.5 ml d'acide trichloracétique (20%). Agiter, attendre 10 minutes.
- Ajouter 3 ml d'eau déminéralisée. Agiter.
- Centrifuger à 4500 tour/ minutes pendant 20 minutes.
- Prélever le surnageant dont on mesure l'absorbance.

Les solutions étalon ont été préparées à partir d'une solution mère à 1000 ppm (1g/l) de cuivre et de zinc. Les concentrations s'étaient de 0.5, 1, 2 et 5 mg/l. 1ml est prélevé de chaque étalon et traité ensuite comme le plasma sans attendre 10 minutes pour avoir la même viscosité.

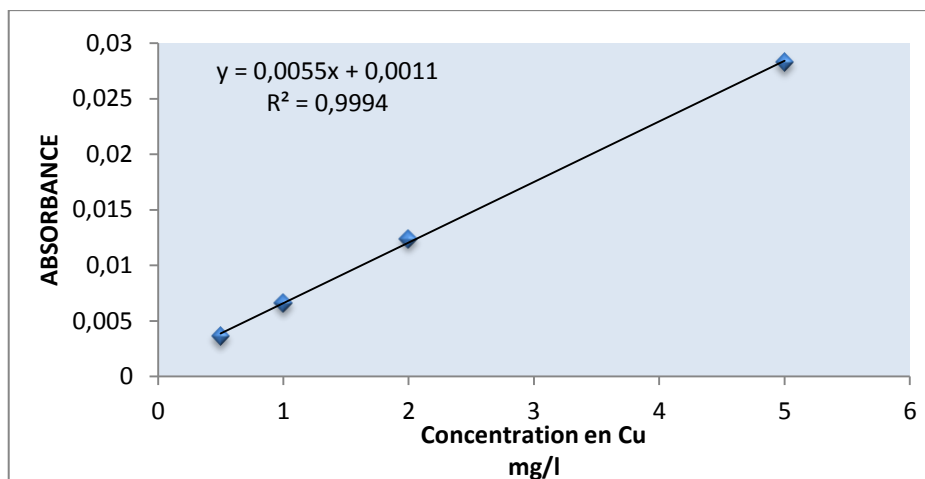


Figure 11: Courbe d'étalonnage pour le Cu plasmatique

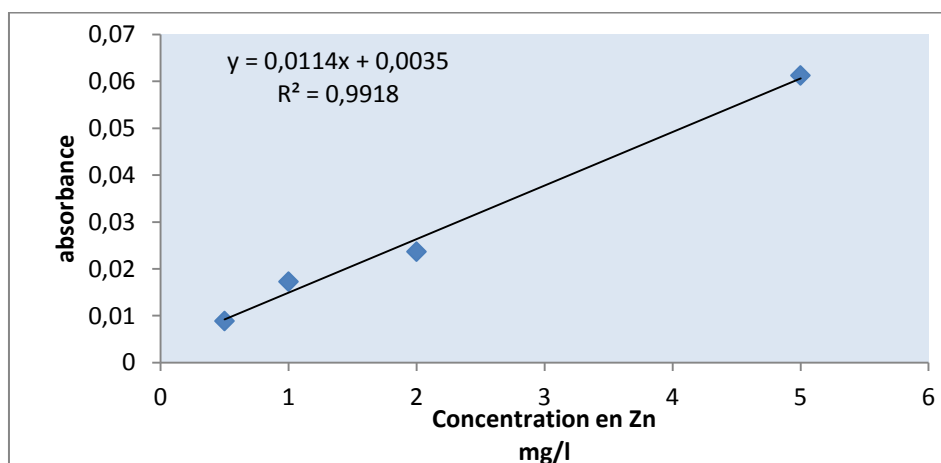


Figure 12: Courbe d'étalonnage pour le Zn plasmatique

La zone de linéarité de la courbe d'absorbance par rapport à la concentration était comprise entre 0,5 et 5 mg/l (Figure des courbes d'étalonnage 11 et 12). La linéarité de la méthode a été évaluée par le calcul du coefficient de détermination R^2 . Une relation linéaire et proportionnelle entre les concentrations et leurs absorbances correspondantes a été constatée.

L'analyse par absorption atomique à flamme peut être décrite comme suit:

- L'échantillon est aspiré par un capillaire et introduit dans l'appareil de manière fragmenté en fines gouttelettes.
- Vaporisation : production d'un aérosol solution-gaz dont les gouttes sont les plus fines possible dans le nébuliseur.

- Fusion puis volatilisation : le nébulisât est mélangé avec un complément d'air et avec le combustible le plus souvent l'acétylène, dans une chambre de pré-mélange.
- Atomisation et excitation: l'atomiseur est constitué par un brûleur à fente produisant une flamme laminaire. C'est à ce niveau que s'effectue l'atomisation et la réaction secondaire entre atomes, radicaux et molécules.
- Mesure spectrale des atomes à déterminer.

L'analyse est effectuée sur une prise d'essai de 1ml de plasma dilué au 1/5^{ème}. Le bruit de fond qui correspond à l'absorption non spécifique par des molécules non dissociées, des fumées et des particules est corrigé à l'aide d'une lampe deutérium

La lecture au spectromètre *Perkin Elmer Analyst 100* a été effectuée à une longueur d'onde de 213.9 nm pour le zinc et 324.7 nm pour le cuivre.

4.3. Analyses des paramètres biochimiques

4.3.1. Les enzymes hépatiques (les transaminases)

Les progrès de la biochimie mettent à notre disposition des méthodes de dosage de plus en plus précises et les informations que l'on peut obtenir portent schématiquement sur deux catégories de substances les nutriments et les enzymes. La détermination des niveaux de l'alanine aminotransferase (ALT) et de l'aspartate aminotransferase (AST) représente un indicateur d'une grande importance pour l'évaluation de la fonction hépatique lors d'une exploration toxicologique. *Backman Automatic biochemistry analyzer* a été utilisé pour le dosage automatique de ces deux enzymes.

Principe

Les dosages sont basés sur la mesure cinétique des transaminases sériques dans un système réactionnel dont la finalité est l'oxydation du coenzyme NADH, H⁺ (nicotinamide adénine dinucléotide oxydé). Les contenants des deux flacons du réactif ont été mélangés pour obtenir un réactif final stable. Ce réactif a été introduit dans l'automate. La solution de contrôle (sérum de contrôle) a été ajoutée à l'automate ainsi que 50 µl de chaque échantillon de sérum à doser. La calibration de l'automate et le dosage des sérums ont été ensuite programmés via un microordinateur intégré au système. Les différentes lectures de l'absorbance de NADH'H⁺ ont été réalisées grâce à un spectrophotomètre intégré à l'automate. Les résultats du dosage des transaminases sont déduits et imprimés par l'automate.

4.3.2. La créatinine sérique

La créatinine sérique est l'un des marqueurs de la fonction rénale. *Backman Automatic biochemistry analyzer* a été utilisé pour le dosage de ce métabolite.

Principe

La créatinine réagit avec l'acide picrique en milieu alcalin (NaOH) pour donner un complexe rouge orangé dont la densité optique est proportionnelle à la quantité de la créatinine. Le mélange des réactifs (R1 et R2 du kit) a été introduit dans l'automate. La solution de contrôle a été ajoutée à l'automate ainsi que 50 µl de chaque échantillon de sérum à doser.

La calibration de l'automate et le dosage des sérums ont été ensuite programmés via un microordinateur intégré au système. La densité optique du complexe formé au cours de la réaction a été mesurée par l'automate. Ensuite, la concentration de la créatinine dans les sérums a été déduite et imprimée.

4.3.3. Les protides totaux

Les protéines sériques sont un marqueur de grande importance pour évaluer le fonctionnement du foie, du rein et aussi du statut immunitaire. Le dosage a été réalisé par *Backman Automatic biochemistry analyzer*.

Principe

Les protéines sériques forment un complexe coloré (rose rouge) en présence des sels de cuivre en milieu alcalin selon la réaction de biuret. L'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle à la concentration en protéines. Le dosage des protéines totales a été effectué par colorimétrie à 450-550nm. Le réactif de Gornall a été utilisé.

4.4. L'électrophorèse des protéines totales

L'électrophorèse consiste à faire migrer et à fractionner grâce à un champ électrique, et dans un tampon de pH déterminé (en général de pH 8,6), les constituants séparés en fonction de leur charge électrique. Cette séparation des protéines du sérum en 5 ou 6 bandes sous l'effet d'un champ électrique, nous permet de les identifier et les quantifier. La répartition de ces différentes fractions apporte de nombreux renseignements qui aident au diagnostic dans le cadre de syndromes inflammatoires, dans l'évaluation de la défense immunitaire, de la fonction hépatique et rénale.

Avant de réaliser les électrophorèses, on a pratiqué sur chaque sérum un dosage des protéines totales. Les électrophorèses des protéines sériques ont été effectuées en gel d'agarose (kit Hydragel protéine) sur un appareil *SEBIA HYDRASYS 2*. Le gel d'agarose présente l'intérêt d'obtenir une électrophorèse de meilleure résolution, des résultats plus précis et la possibilité de numériser les migrations. L'intégration et la numération densitométrique de la coloration de chaque bande a été réalisée sur un densitomètre *HYRYS SEBIA* à 570 nm avec le logiciel Platinum 3®. On obtient un tracé à 5 pics correspondant à l'albumine et aux globulines $\alpha 1$, $\alpha 2$, β et γ . La surface de chaque pic est intégrée: les résultats sont obtenus en pourcentage de la surface totale et en concentration (g/l) à partir du taux des protéines totales.

5. Examen anatomopathologique des prélèvements d'organes

Des autopsies ont été réalisées sur les animaux. Une évaluation des lésions et un intérêt spécial à été apporté à l'aspect macroscopique du foie et du rein. Une histopathologie a été réalisée sur les prélèvements d'organes selon la méthode anatomopathologique classique au niveau du laboratoire de l'anatomo-pathologie du CHU de Batna.

Principe :

La description succincte de la méthode est comme suit :

- La fixation de l'organe juste après prélèvement (formol à 10%): La fixation représente le temps essentiel de la technique histologique.
- La post fixation : Mettre les cassettes dans le liquide de Bouin et les placer dans l'automate, où ils vont subir des passages successifs dans différents fixateurs (Ethanol et xylène).
- Inclusion à la paraffine : Le mode d'inclusion à la paraffine est le plus répandu, parce qu'il offre le plus grand nombre d'avantages pratiques et également le plus de possibilités pour l'application des techniques ultérieures.
- La coupe : Les coupes à la paraffine ont été réalisées à l'aide d'un « microtome à paraffine » type *MINOT*.
- Etalement et collage : Déposer au milieu de la lame, séchée et gravée, une goutte du liquide d'étalement (l'eau gélatineuse), placer une coupe à la surface du liquide, et porter l'ensemble sur une platine chauffante.
- Séchage des lames : Se fait à l'étuve à 60°C pendant 24 h
- Coloration : Hematoxyline éosine (HE)

6. Dosage des éléments traces dans l'aliment

La minéralisation par calcination sèche a été utilisée pour l'extraction des éléments de l'aliment. Le Pb et le Cd ont été déterminés par spectrophotométrie à absorption atomique à four graphite, et à flamme à été utilisé pour le dosage du Zn et Cu. Des solutions étalons appropriées à des concentrations connues ont été préparées à partir d'une solution mère à 1g/l. La zone de linéarité pour ces éléments est comprise entre 0.5 et 5 mg/l et les droites d'étalonnage montrent une relation linéaire et proportionnelle entre les concentrations choisies et leurs absorbances respectives.

7. Modélisation et analyse toxicocinétique

L'analyse toxicocinétique des teneurs en plomb dans le sang a été effectuée pour chaque animal. Les calculs ont été réalisés à l'aide d'un logiciel utilisant un programme d'analyse de régression linéaire adapté « PK Solver » version 2.0. Les paramètres pharmacocinétiques estimés et évalués pour chaque sujet. Une approche non compartimentale selon la méthode trapézoïdale linéaire après une perfusion constante par voie intraveineuse a été choisie pour l'analyse de la cinétique du plomb à l'intérieur de l'organisme.

8. Analyse statistique

La distribution statistique a été réalisée par le calcul de la moyenne et de l'écart type et pour la comparaison, nous avons utilisé le test (t) de Student, avec Excel (Microsoft). La valeur trouvée par le calcul du t peut affirmer que :

Les populations sont différentes avec un risque d'erreur P tel que :

- $P > 0,05$ = la différence n'est pas significative ns ;
- $0,05 > P > 0,01$ = la différence est significative* ;
- $0,05 > P > 0,001$ = la différence est hautement significative**;
- $P < 0,001$ = la différence est très hautement significative***.

Les résultats des plombémies, des cadmiémies, des éléments essentiels, ainsi que ceux des paramètres de l'hématologie et de la biochimie ont été transférés dans le logiciel Med Calc 12.7.1.0 pour analyse. Afin de mettre en évidence un effet traitement et un effet temps sur l'évolution des différents paramètres, l'analyse de la variance (ANOVA) a été réalisée. Quand

l'ANOVA est significative le test Bonferroni a été utilisé pour la comparaison entre les moyennes. La signification est évaluée à partir de $P < 0,05$.

Pour évaluer le rapport entre l'évolution des différents paramètres et les concentrations sanguines en ETM (Pb et Cd), le coefficient de corrélation de Pearson a été calculé.

Pour les paramètres toxicocinétiques, l'analyse statistique a fait appel à l'analyse de variance qui permet de tester globalement le traitement. Le test Student a donné une classification des moyennes.

CHAPITRE II.

PRESENTATION DES RESULTATS

- **ELEMENTS TRACES METALLIQUES (ETM)**
 - ELEMENTS TRACES DANS L'ALIMENT
 - PLOMBEMIES
 - CADMIEMIES
- **ELEMENTS ESSENTIELS**
 - LE ZINC PLASMATIQUE
 - LE CUIVRE PLASMATIQUE
- **LES PARAMETRES HEMATOLOGIQUES**
 - FROTTIS SANGUIN
 - HEMOGLOBINE
 - HEMATOCRITE
- **ANALYSES BIOCHIMIQUES**
 - TRANSAMINASES (ALT & AST)
 - PROTIDES TAUTAUX - ELECTROPHORESE - RATIO ALB/GLOB
 - CREATININE

1. Symptomatologie

Il est évident que la symptomatologie seules est insuffisante pour confirmer une intoxication saturnine ou liée à l'exposition au cadmium, mais il est important de s'intéresser aux changements cliniques révélateurs de la contamination. Ces bio-indicateurs traduisant des altérations morphologiques ou fonctionnelles qui font références à des effets observables au niveau individuel et traduisant un état clinique lié à l'exposition.

Tout au long de l'expérimentation les animaux ont été soumis à un examen clinique régoureux, les brebis ont conservé leur appétit et leur comportement normal. La brebis n° 6 avait un indice de croissance faible comparativement à ces congénères et avait perdu une incisif. C'est à partir de la 7^{ème} semaine qu'on a constaté une pâleur au niveau des muqueuses chez les brebis du lot Pb+Cd et un ictère modéré chez les brebis (n°6 et n°9). Une facilité d'arrachage de la laine a été constaté chez toute les brebis de ce lot. Chez les lot Pb et Cd, une pâleur modérée des muqueuses a été observée vers la fin de la période de l'exposition.

Il faut noter que trois brebis (n° 6, n°9 et n°15) sont mortes durant cette expérimentation. Les deux premières appartenaient au lot co-exposé, mortes à la fin de la 9^{ème} semaine d'exposition. La brebis n°9 trouvée morte sans précédent, cette brebis présentait un bon état général. La 3^{ème} brebis appartenait au lot Pb, morte vers la fin de la phase de récupération sans signes cliniques relatif à une toxicité métallique. L'autopsie a révélé une obstruction du pylore par un bésoard, deux autres ont été trouvés dans la caillette.

L'examen macroscopique et microscopique des organes cibles a révélé des aspects lésionnels relatifs à la toxicité saturnine (ces éléments seront discutés dans la partie relative à l'examen anatomopathologique).

2. Eléments traces métalliques

2.1. Les éléments traces dans l'aliment

L'évaluation de l'apport en minéraux dans l'aliment était le premier axe auquel on s'est intéressé. Dans le tableau 5 sont rassemblés les résultats qui peuvent donner une image sur l'apport minéral de la ration. L'analyse a révélé des taux de Pb et de Cd inférieurs à la limite de détection. On a évalué les teneurs en éléments essentiels par rapports aux besoins journaliers des moutons. Les différents composants de la ration exprimés en g/kg de matière sèche (MS) pour les macroéléments, en mg/kg de MS pour les oligo-éléments et en µg/kg de MS pour le Pb et le Cd.

Les quantités journalières ingérées par animal sont calculées en se basant sur la ration théorique des animaux : c'est à dire 1kg de foin, 0,2kg d'orge, 0,2kg de maïs et 0,2kg de son.

La détermination de la composition alimentaire en différents éléments est importante pour rechercher d'éventuels déficits en éléments essentiels ainsi que l'apport alimentaire en métaux lourds.

Tableau 5: Teneurs en minéraux dans l'alimentation

Ration	Foin	Maïs	Orge	Son	Teneurs
Eléments traces					ingérées /jour
Cuivre (mg/kg)	4.7	4.1	6.76	2.6	7.4 mg
Zinc (mg/kg)	19	27	23	51.3	39.4 mg
Fer (mg/kg)	106	70	73.5	87	141.9mg
Calcium (g/kg)	26	3.8	3.5	6	29 g
Cadmium(µg/kg)	<DL	<DL	<DL	<DL	-
Plomb (µg/kg)	<DL	<DL	<DL	<DL	-

LD : limite de détection

Comme il est illustré dans le tableau 5, les concentrations en Zn et en Cu dans le foin étaient respectivement $19 \pm 3,8$ mg/kg et $4,7 \pm 0,4$ mg/kg ; la teneur du Zn est supérieure à celle déterminée ($40,42 \pm 4,88$ ppm) par Djaalab et *al.* (2011) et celle du Cu proche de la teneur déterminée ($3,72 \pm 0,35$ ppm) par les mêmes auteurs. Les taux de ces deux éléments étaient dans l'orge $27 \pm 2,7$ mg/kg en Zn et $4,1 \pm 0,7$ mg/kg en Cu et dans le maïs, les teneurs en Zn et en Cu étaient respectivement $23 \pm 5,1$ mg/kg et $6,7 \pm 0,6$ mg/kg. Les teneurs en Cu dans le maïs et l'orge sont supérieures à celles trouvées par (Auza, 1983) respectivement 2,3 mg/kg MS et 4,1 mg/kg MS, tandis que la teneur déterminée dans le son est largement inférieure à celle trouvée par cet auteur, 11,7 mg/kg MS. Dans cette expérimentation les teneurs en Zn étaient inférieures à la limite de carence évaluée à 45 mg/kg (Lamand, 1978). Les valeurs du Cu restent au-dessous des valeurs bibliographiques rapportées par Blood et Henderson (1976), (11 mg/Kg MS), et inférieures à la limite de carence chez les ruminants correspondant à 7ppm (Lamand, 1978), . Par ailleurs, l'apport alimentaire en fer, les teneurs obtenues

dans le foin et l'aliment concentré étaient plus élevées que les valeurs références. Même résultat pour le Ca, sauf dans le foin la teneur était faible.

2.2. Plombémie

Les teneurs de Pb dans le sang avant administration des sels métalliques étaient non détectables (inférieures à la limite de détection de la technique analytique) chez les trois groupes de témoins (les brebis avant exposition). Pour des raisons de convenance la moyenne des plombémies avant exposition est considérée comme égale à la limite de détection estimée à 4µg/l.

2.2.1. Courbes individuelles

Les figures n° 13 et 14 illustrent l'évolution des plombémies chez les brebis des deux lots traités au Pb et à la mixture de Pb+Cd durant les trois périodes: avant exposition, pendant l'exposition et pendant la période de récupération. Les plombémies des brebis avant les traitements métalliques sont inférieures ou égales à la limites de détection qui est de l'ordre de 4µg/l. Il faut noter une augmentation sensible des plombémies dès la première semaine de l'exposition pour les deux lots, suivie d'une progression vers la hausse dessinant une courbe en dents de scie jusqu'à atteindre un pic à la dernière semaine de l'exposition. Juste après arrêt du traitement, on observe une régression des concentrations dessinant une décroissance biphasique.

2.2.2. Profil des plombémies moyennes

Pendant la période d'exposition, le profil des moyennes des plombémies-temps après une administration orale de 2,5mg/kg/j de Pb pendant 119 jours est illustré par la figure 15 pour le lot Pb et par la figure 16 pour le lot co-exposé. Les résultats ont révélé une augmentation progressive des plombémies pendant la première semaine pour atteindre au 42^{ème} jour les valeurs moyennes de 305 ± 92 µg/l pour le lot Pb. L'évolution des teneurs restent à la hausse pour atteindre la teneur de 569 ± 264 µg/l à la 17^{ème} semaine.

Les concentrations du Pb pour le lot (Pb+Cd) ont connu une augmentation significative ($P < 0,001$) après traitement. Nous avons noté une teneur de $319 \pm 117,5$ µg/l au début de l'exposition, pour atteindre la teneur de $445,2 \pm 293,5$ µg/l à la 6^{ème} semaine.

A la 12^{ème} semaine après arrêt du traitement chez le lot co-exposé, l'évolution des plombémies a révélé une diminution pour atteindre la teneur de $149 \pm 49,9$ µg/l. Malgré la durée qui s'est écoulé après le retrait du traitement les plombémies restaient importantes.

Chez le lot Pb, nous avons noté une décroissance significative des concentrations pendant la période de récupération. Au bout de 10 semaines, les plombémies ont atteint la teneur moyenne de $76 \pm 25 \mu\text{g/l}$.

Les résultats individuels de mesure des plombémies sont variables pour un même animal au cours du temps et pour les différents animaux dans un même lot à une date déterminée.

Comme les brebis avaient des plombémies très variables au sein du même groupe, la moyenne des groupes était non significativement différente entre les groupes ($P > 0,05$).

L'analyse de variance (ANOVA) a révélé l'existence d'un effet traitement ($P < 0,001$) et d'un effet combiné traitement-temps ($P < 0,001$) sur les deux lots traités pendant l'expérimentation.

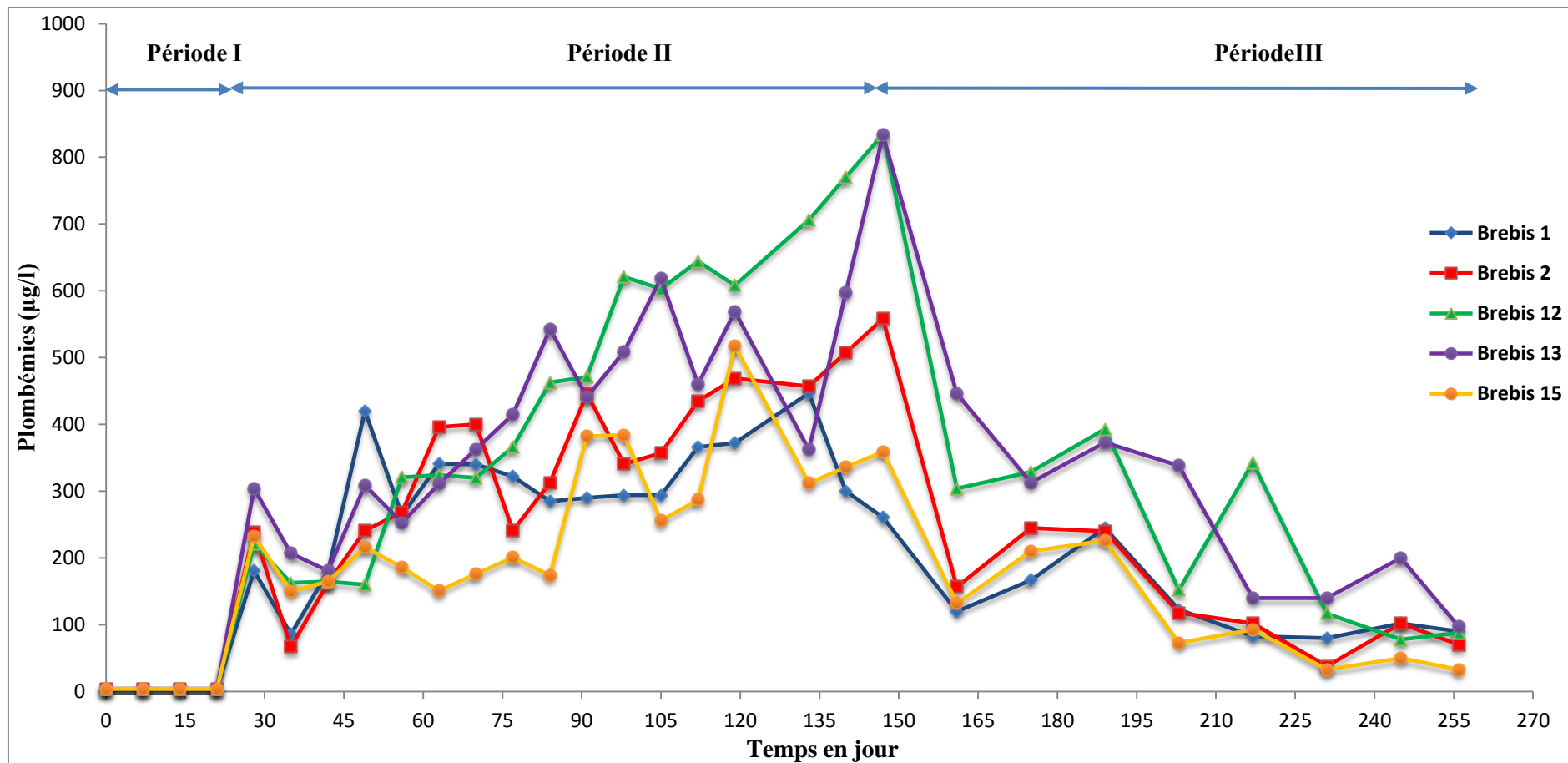


Figure 13. Evolution des Plombémies Individuelles chez le lot Pb durant les trois Périodes de l'Expérimentation

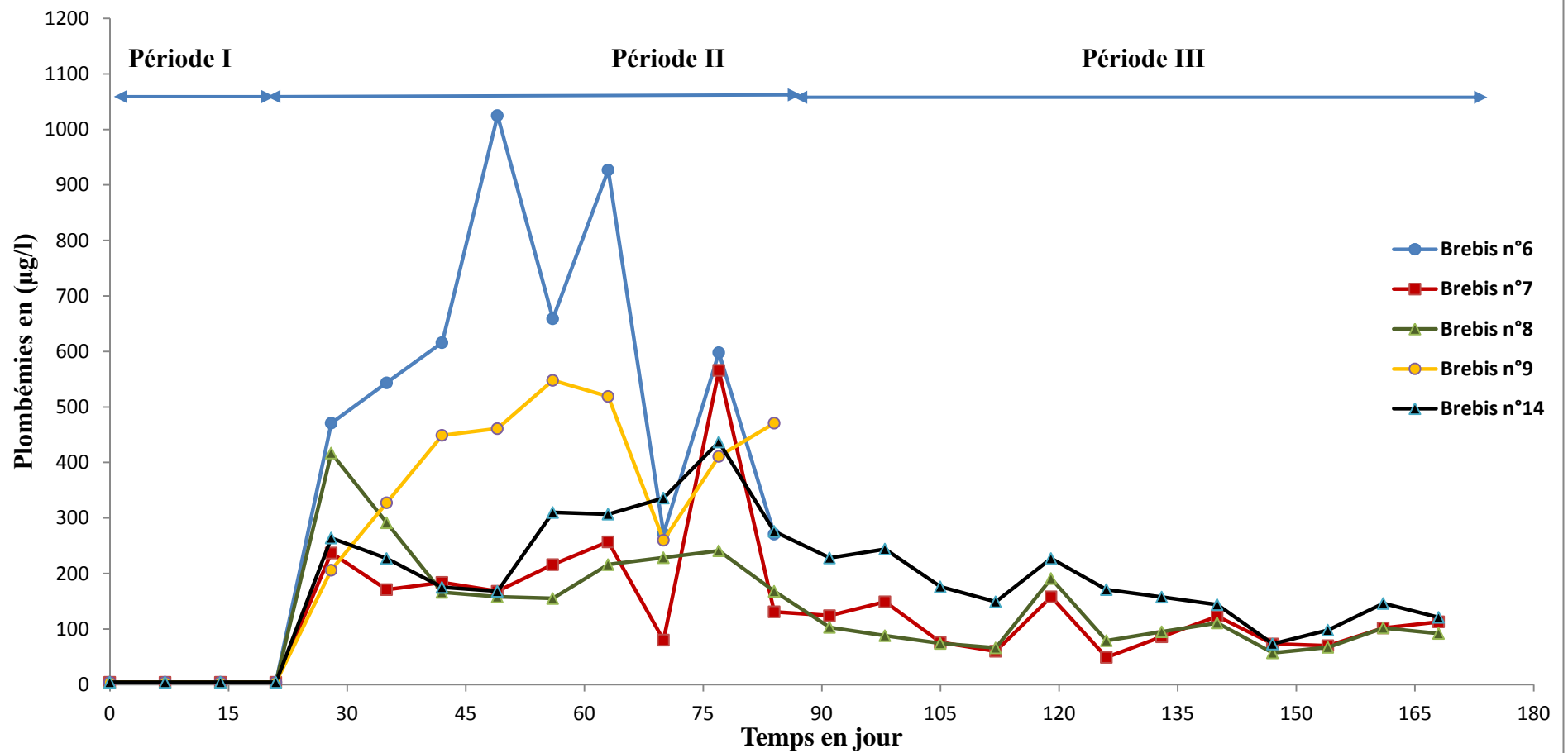
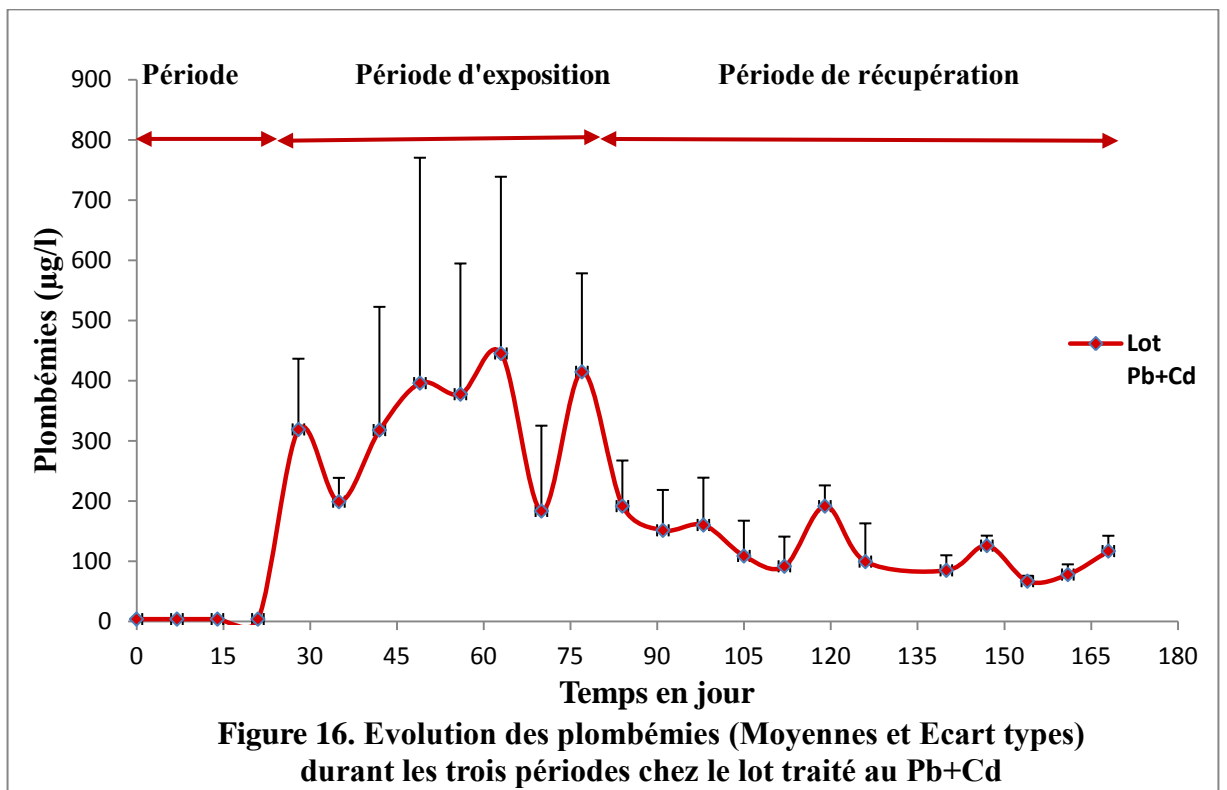
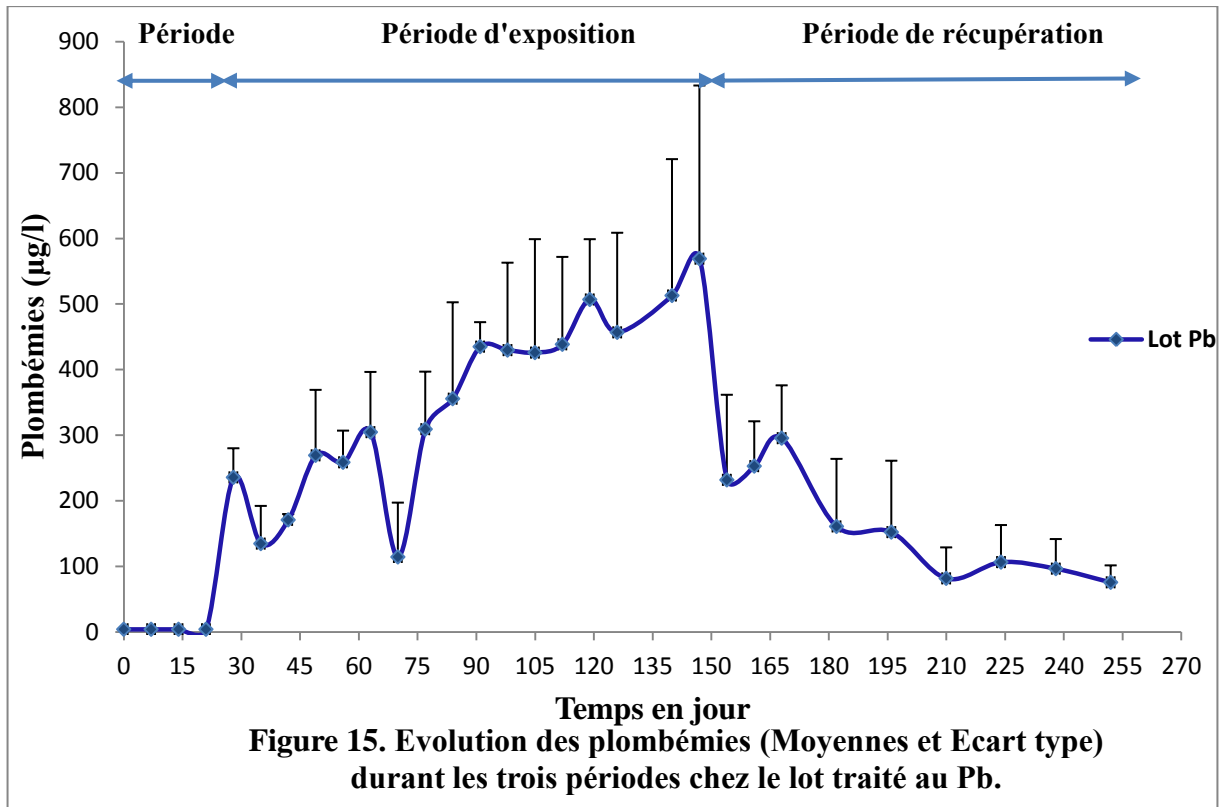


Figure 14. Evolution des Plombémies Individuelles chez le lot Pb-Cd durant les trois Périodes de l'Expérimentation



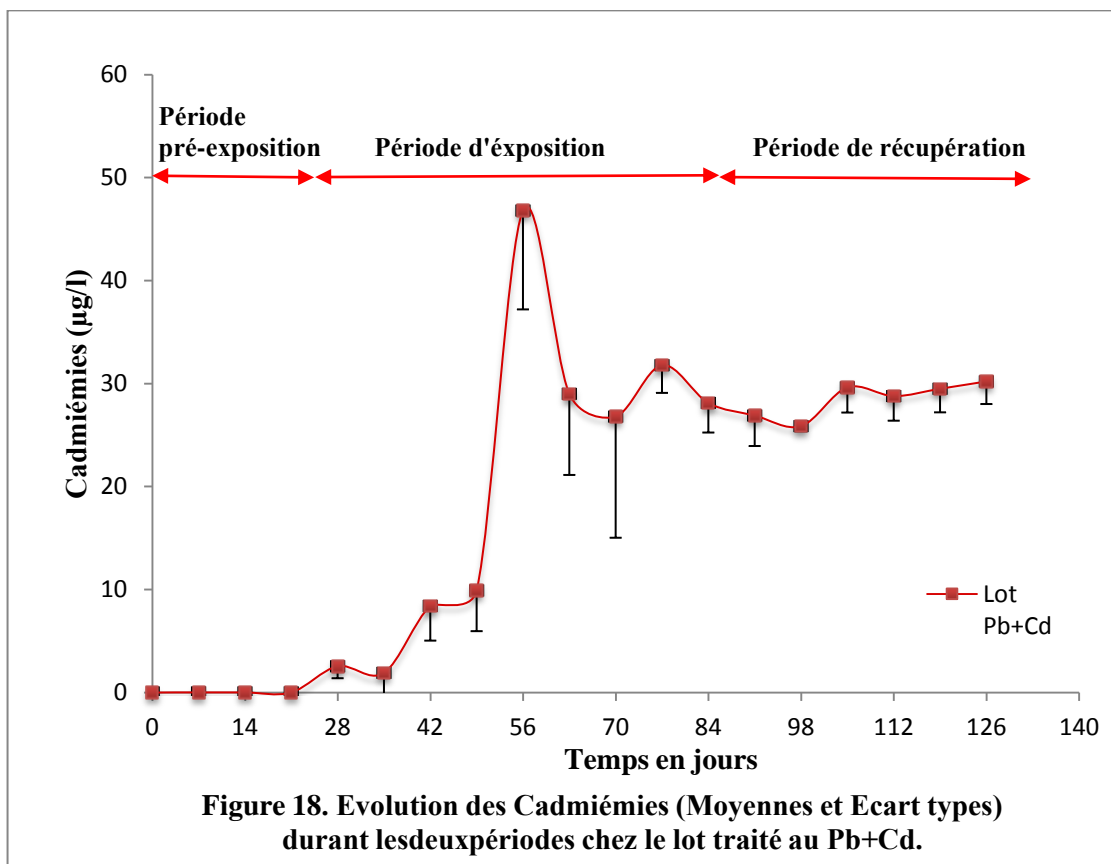
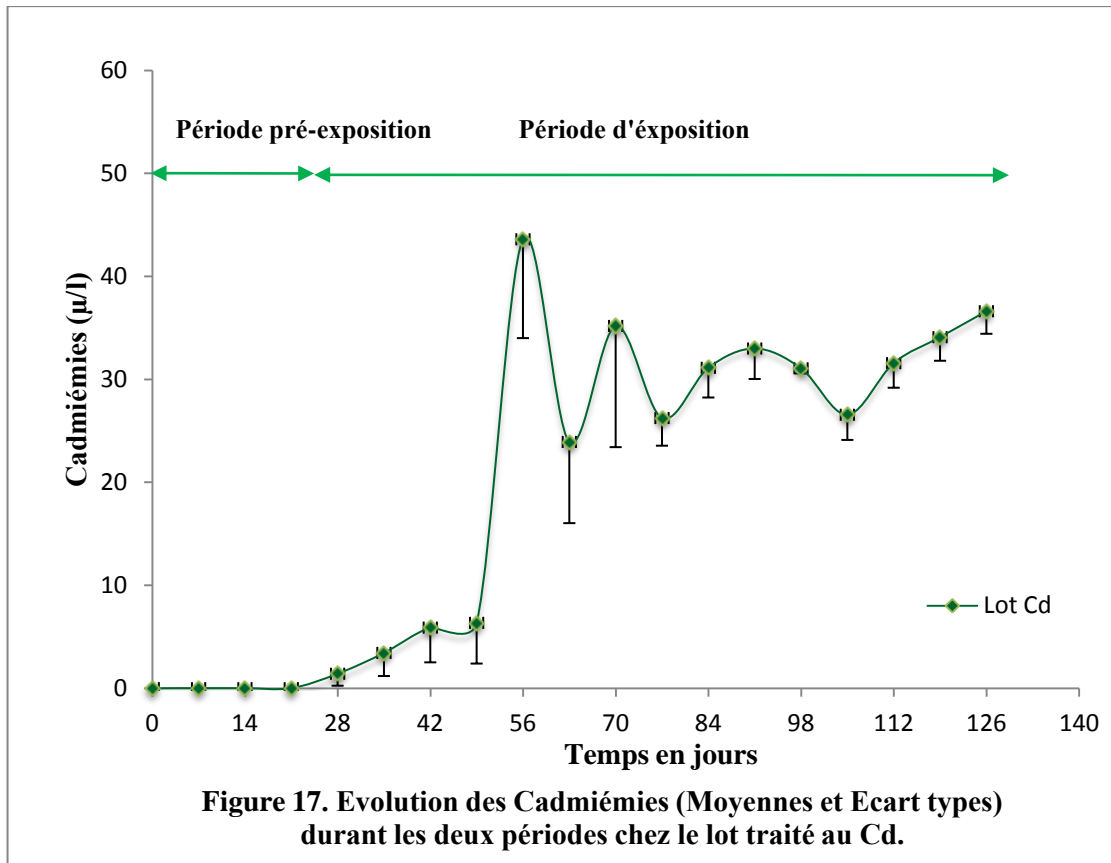
2.3. Cadmiémies

Les niveaux du Cd sanguin étaient au dessous de la limite de détection de la technique analytique chez les lots témoins (brebis avant exposition). Pour des raisons de convenance la moyenne des cadmiémies avant exposition est considérée comme égale à la limite de détection estimée à 0.3µg/l.

Les cadmiémies étaient détectables lors du dosage dès le début du traitement métallique (2mg/kg/j) ; elles sont illustrées par la figure 17 pour le lot traité au Cd et par la figure 18 pour le lot co-exposé. Le profil des concentrations a présenté une évolution croissante, les teneurs passent de 1,4±0,81 µg/l pendant la 1^{ère} semaine chez le lot Cd à la teneur de 44±6 µg/l à la 5^{ème} semaine. Cette augmentation est notamment observée chez le lot Pb+Cd, les cadmiémies passaient de 2,5±1,2 µg/l la 1^{ère} semaine de traitement à la valeur de 47±10 µg/l la 5^{ème} semaine. Par ailleurs, à la 9^{ème} semaine nous avons noté une décroissance des concentrations chez les deux lots traités pour atteindre la teneur de 31.11±5.25 µg/l à la 9^{ème} semaine chez le lot Cd et 28±12µg/l chez le lot Pb+Cd. Par la suite une hausse était notée avec des teneurs de 36,61µg/l chez le lot Cd à la 15^{ème} semaine d'exposition.

Il faut noter que, chez le lot co-exposé, malgré l'arrêt du traitement, après la 9^{ème} semaine, les cadmiémies ont gardé une évolution vers la hausse pour atteindre la teneur de 30,2 µg/l à la 6^{ème} semaine de récupération.

L'analyse de variance (ANOVA) a révélé un effet temps ($P < 0.001$) dans l'évolution des cadmiémies.



4. Eléments essentiels

Dans cette expérimentation, les valeurs moyennes des zincémies et des cuprémies chez les animaux témoins sont estimées à 80 ± 17 $\mu\text{g/dl}$ pour le Zn et 85 ± 23 $\mu\text{g/dl}$ pour le Cu, ce qui correspond aux normes physiologiques

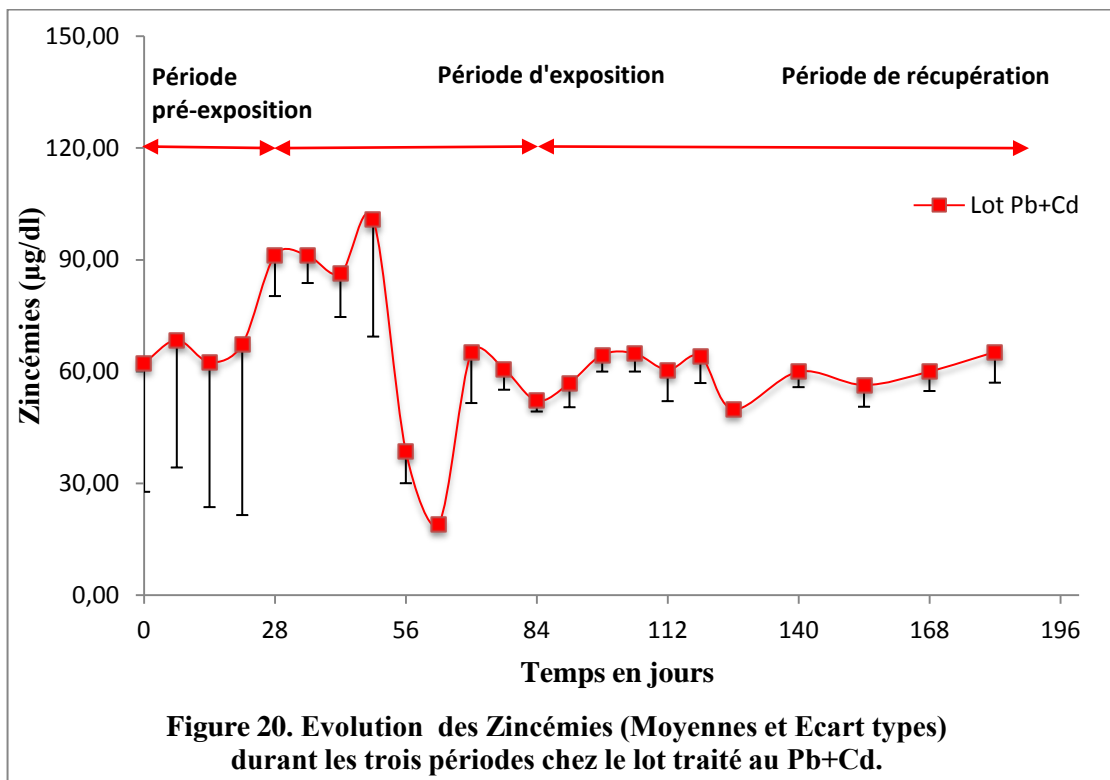
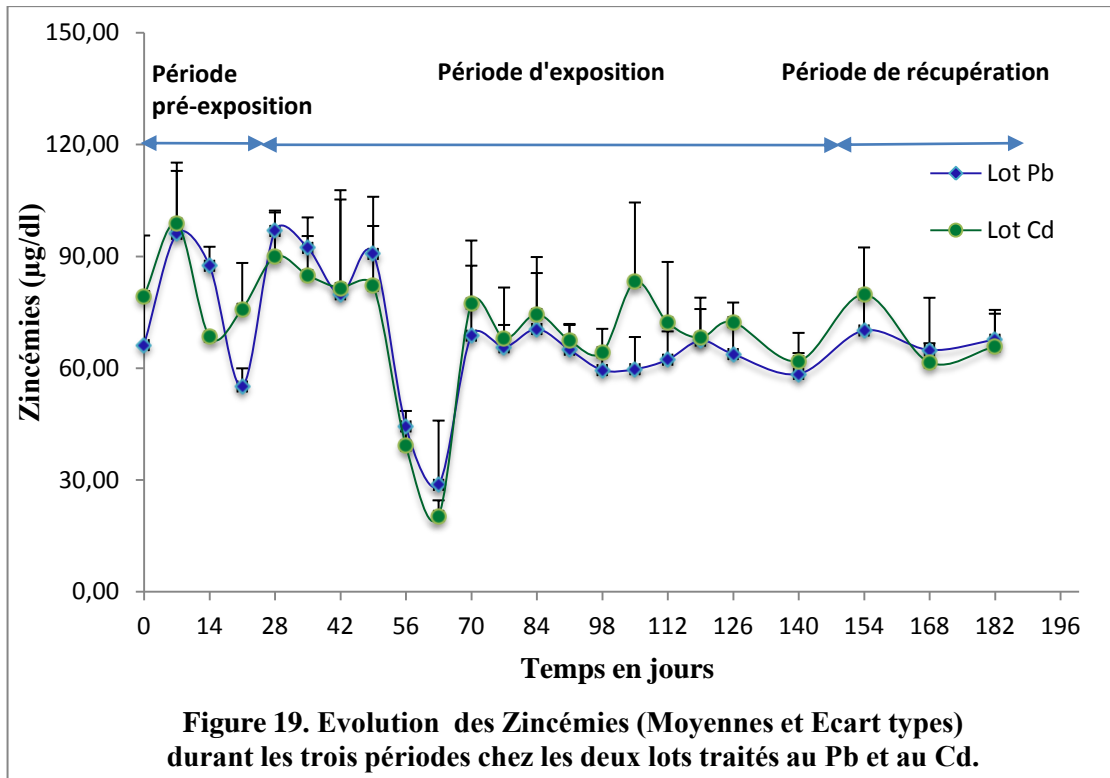
4.1. Le Zinc plasmatique

Durant les premières quatre semaines de l'exposition, les teneurs plasmatiques en Zn sont restées dans l'intervalle physiologique (Underwood et Suttle, 1999) chez les trois lots traités (figure 19 pour le lot Pb et le lot Cd et figure 20 pour le lot Pb+Cd). Les valeurs étaient comprises entre 80 ± 28 et 97 ± 5 $\mu\text{g/dl}$ pour le lot Pb et de 81 ± 24 à 90 ± 12 $\mu\text{g/dl}$ pour le lot Cd et entre 86 ± 12 et 101 ± 31 $\mu\text{g/dl}$ pour le lot Pb+Cd. A la 5^{ème} semaine, les moyennes des teneurs plasmatiques en Zn ont présenté une décroissance significative ($P < 0.001$) chez les 3 lots traités pour atteindre à la 6^{ème} semaine de traitement les teneurs les plus faibles 29 ± 17 $\mu\text{g/dl}$ chez le lot Pb, 20 ± 4 $\mu\text{g/dl}$ chez le lot Cd et une teneur de 19 ± 2 $\mu\text{g/dl}$ chez le lot co-exposé. Pendant la 9^{ème} semaine, le lot co-exposé a présenté la teneur la plus faible $52,17 \pm 2,90$ $\mu\text{g/dl}$ des trois lots. Ensuite une évolution fluctuante a été constatée pour atteindre à la fin de la période de l'exposition des valeurs moyennes de l'ordre de 58 ± 6 $\mu\text{g/dl}$ chez les lots Pb et 62 ± 8 $\mu\text{g/dl}$ pour le lot Cd.

En dépit de l'arrêt précoce du traitement chez le lot co-exposé, les teneurs ont gardé une évolution négative ; la valeur de $49,87 \pm 0,49$ $\mu\text{g/dl}$ a été noté à la 6^{ème} semaine de récupération. Les quatre dernières semaines de cette période ont révélé une augmentation des zincémies avec une teneur de $65,23 \pm 8,23$ $\mu\text{g/dl}$ pendant la dernière semaine.

Après l'arrêt du traitement aux sels métalliques chez les deux lots Pb et Cd, un retour progressif aux normes a été noté pour atteindre vers la fin de la période de récupération la valeur de 70 ± 10 $\mu\text{g/dl}$ pour le lot Pb et 80 ± 13 $\mu\text{g/dl}$ pour le lot Cd.

L'analyse de la variance a révélé un effet temps ($P < 0.001$) sur l'évolution des zincémies au cours de l'expérimentation.



4.2. Le Cuivre plasmatique

Les schémas de variations des niveaux du Cu dans le plasma sont similaires à ceux des niveaux du Zn (la figure 21 pour le lot Pb et le lot Cd et la figure 22 pour le lot Pb+Cd). Une décroissance significative ($P < 0.01$) a été notée à la 5^{ème} semaine dans le lot Pb pour atteindre à la 9^{ème} semaine la teneur de $57 \pm 10 \mu\text{g/dl}$. A la fin de l'exposition la moyenne des concentrations plasmatiques du Cu était de $65 \pm 10 \mu\text{g/dl}$.

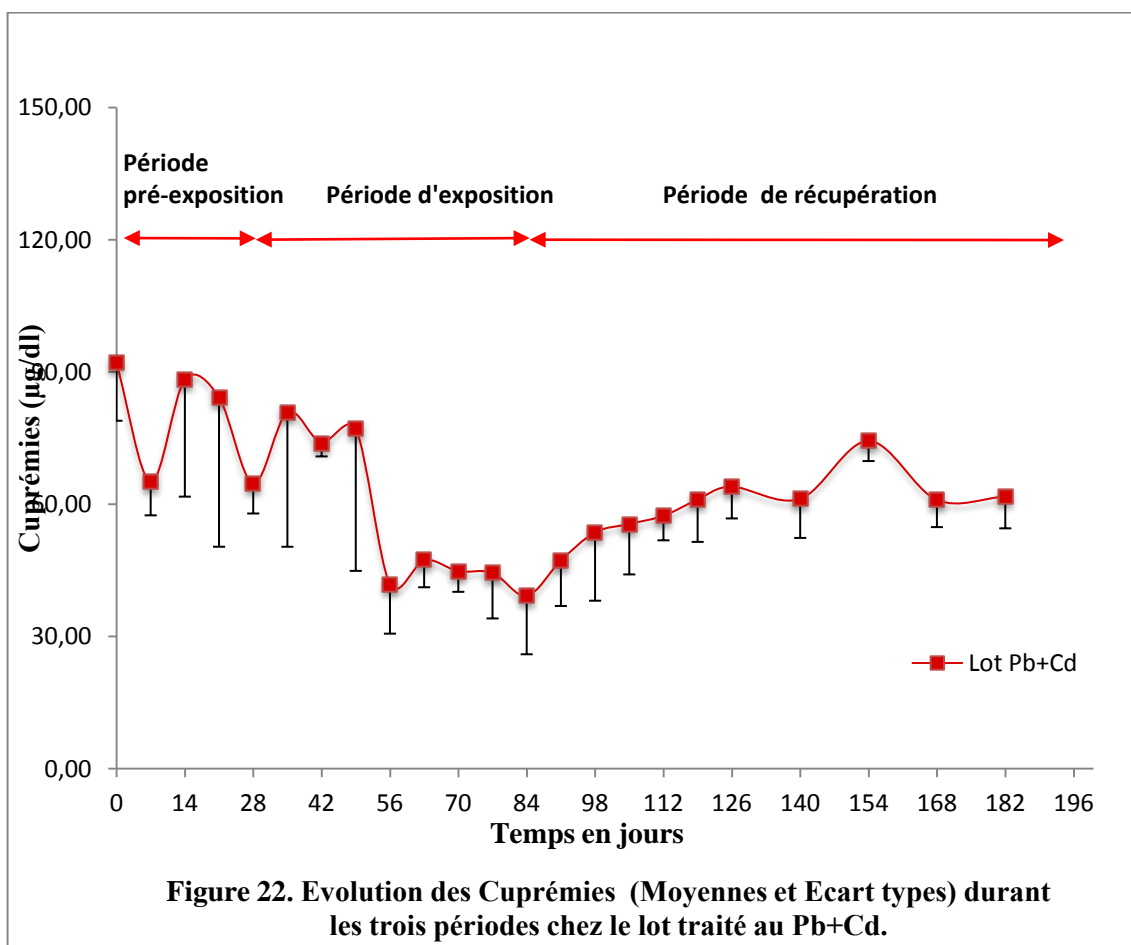
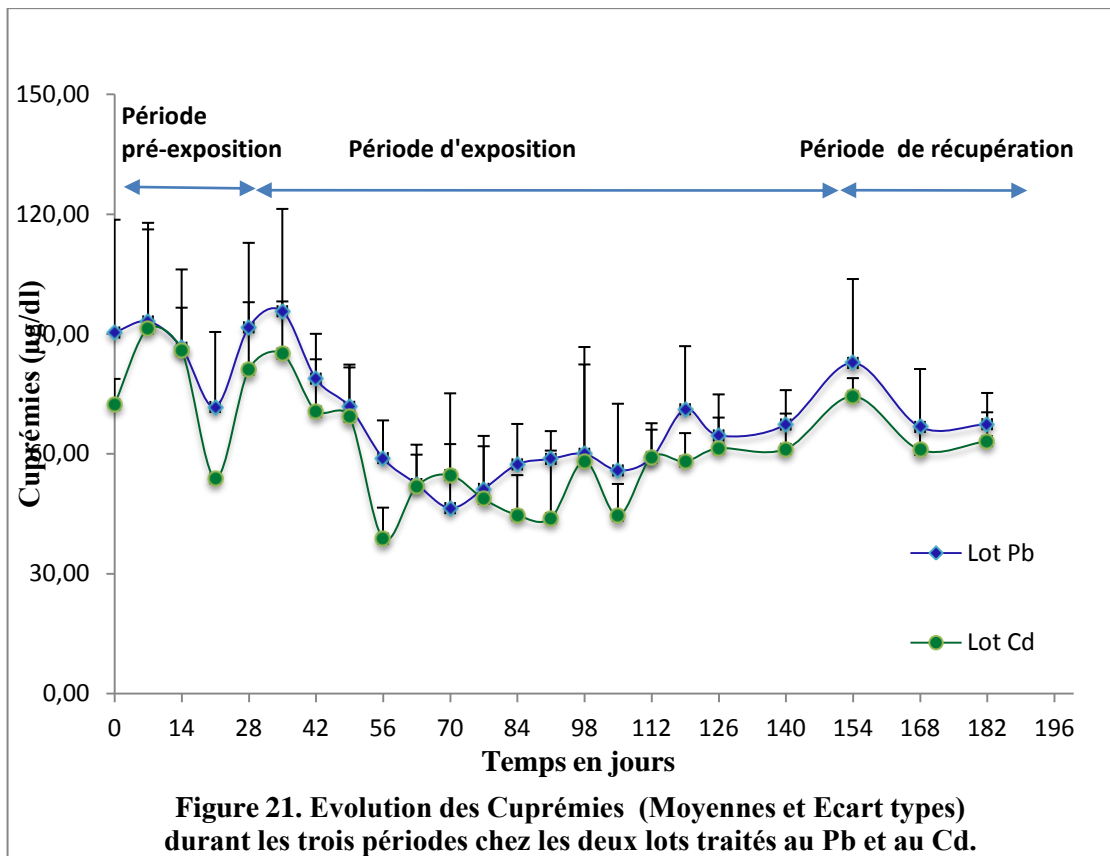
Chez le lot traité au Cd, la teneur la plus faible $38,79 \pm 7,75 \mu\text{g/dl}$ a été dosée à la 5^{ème} semaine du traitement. A la 9^{ème} semaine, les brebis ont révélé une cuprémie moyenne de $44,66 \pm 10,03 \mu\text{g/dl}$. L'évolution reste négative le reste de la période d'exposition.

Le lot traité avec la mixture Pb+Cd a présenté une décroissance nette des cuprémies, allant de $62 \pm 7 \mu\text{g/dl}$ la 1^{ère} semaine jusqu'à $39 \pm 13 \mu\text{g/dl}$ à la 9^{ème} semaine, cette dernière teneur représentait la valeur la plus faible de toute la période d'expérimentation chez les trois lots ; la décroissance était significative ($P < 0.001$).

Les teneurs faibles persistaient durant les quatre premières semaines de récupération chez le lot co-exposé. Les cuprémies commencent à revenir aux normes vers la fin de la période pour atteindre une moyenne de $62 \pm 7.21 \mu\text{g/dl}$.

Après arrêt du traitement métallique, une hausse des teneurs a été constaté pour atteindre une cuprémie moyenne de $67 \pm 8 \mu\text{g/dl}$ chez le lot Pb et une valeur de $63 \pm 7 \mu\text{g/dl}$ chez le lot traité au Cd.

L'analyse de la variance a révélé un effet temps ($P < 0.001$) dans l'évolution des concentrations plasmatiques du Cu, ainsi qu'une différence significative entre les trois groupes traités ($P < 0.05$).



5. Les paramètres hématologiques

Les valeurs obtenues des moyennes des taux de l'Hgb et de Hct chez les témoins étaient respectivement de 10.4 ± 0.2 g/dl et 32 ± 0.7 %. Les teneurs correspondaient aux normes physiologiques.

5.1. Hémoglobine

Après traitement, chez le lot Pb (figure 23), le taux d'Hgb était 11.3 ± 1.2 g/dl à la 1^{ère} semaine, puis, une diminution des teneurs a été constaté pour atteindre 9.3 ± 0.6 g/dl à la 9^{ème} semaine, le taux est inférieur aux normes ($P > 0.05$). Cette baisse atteint à la dernière semaine d'exposition la teneur de 7.5 ± 0.4 g/dl, la décroissance est significative ($P < 0.01$).

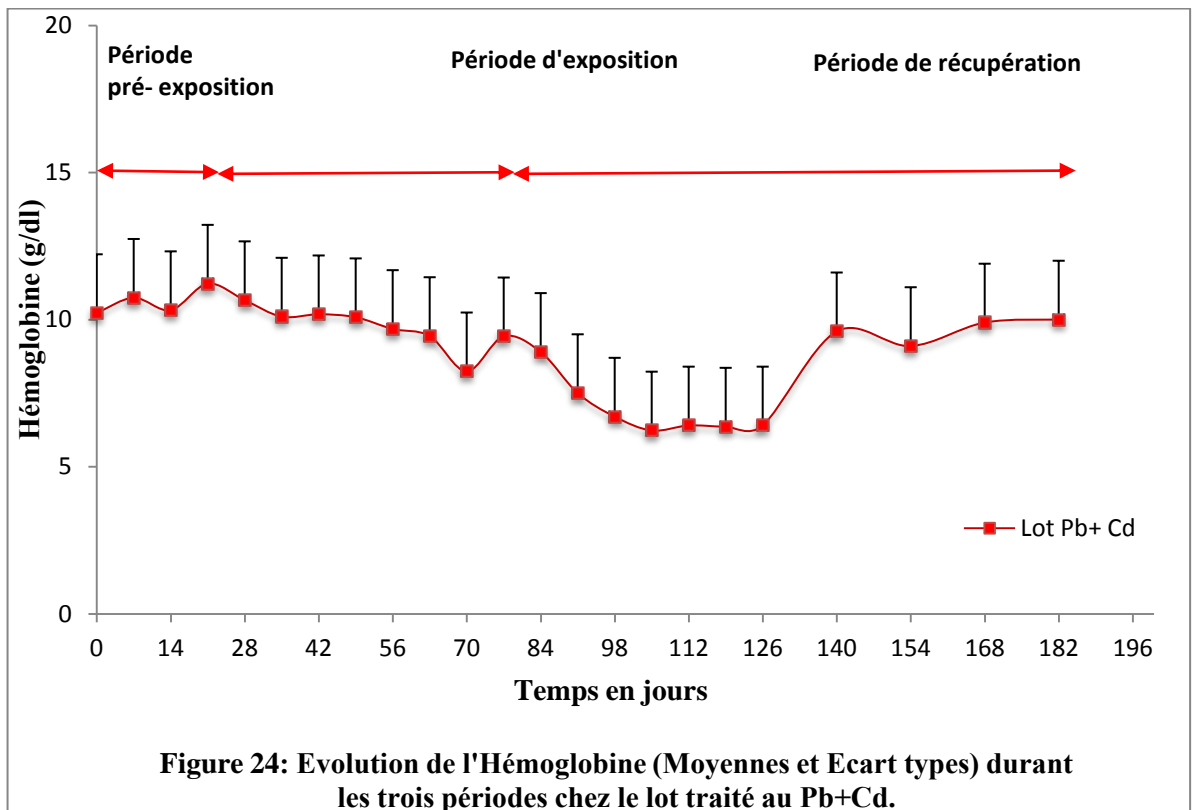
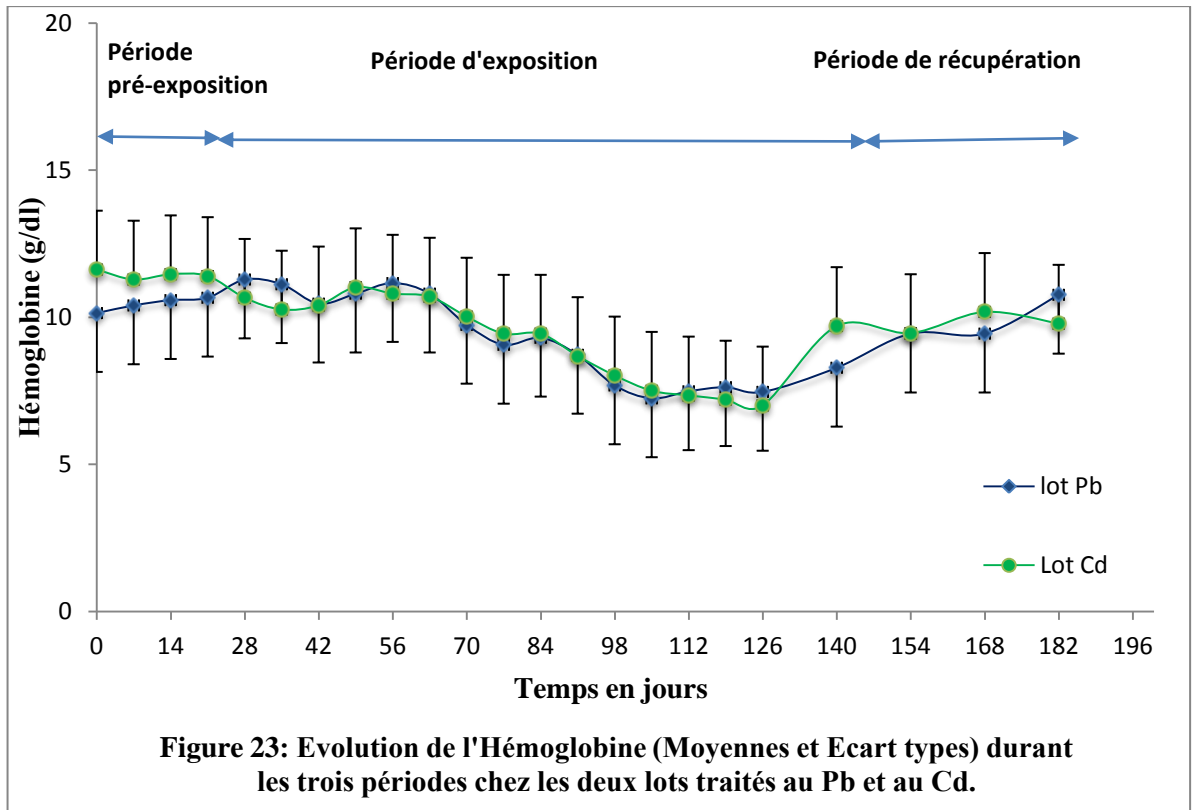
Concernant le lot Cd (figure 23), la diminution du taux d'Hgb n'est constaté qu'à partir de la 8^{ème} semaine avec un taux moyen d'Hgb est de 9.4 ± 0.95 g/dl. L'évolution vers la baisse a persisté pour atteindre la valeur de 7 ± 0.8 g/dl à la fin du traitement.

Cependant une diminution significative ($P < 0.05$) a été observée chez les animaux du lot Pb+Cd (figure 24) à 3^{ème}, 6^{ème} et 7^{ème} semaine. Cette décroissance restait significative ($P < 0.01$) à la 9^{ème} semaine avec la valeur de 8.9 ± 0.6 g/dl.

Le lot co-exposé a révélé les teneurs les plus basses. En dépit de l'arrêt du traitement le taux de Hgb continuait à baisser ($P < 0.001$) pour atteindre la concentration de 6.3 ± 0.35 g/dl à la 5^{ème} semaine de récupération. Les teneurs n'ont revenu aux normes qu'au bout de 4 mois après que les traitements ont été retirés pour atteindre la teneur de 10 ± 0.95 g/dl.

Chez les lots traités au Pb et au Cd individuellement, après arrêt du traitement, les teneurs en Hgb ont revenu aux normes au bout de 2 mois et demi, pour présenter les taux de 10.8 ± 0.4 g/dl, 10 ± 0.95 g/dl respectivement chez le lot Pb et le lot Cd.

L'analyse de variance (ANOVA) a révélé un effet temps ($P < 0.001$), un effet traitement ($P < 0.001$) et un effet combiné temps- traitement ($P < 0.05$) sur l'évolution du taux de Hgb chez les trois lots, pendant les traitements métalliques.



5.2.Hématocrite

Les résultats des moyennes des taux déterminés de l'Hct sont illustrés en figure 25 pour le lot Pb et le lot Cd et en figure 26 pour le lot co-exposé. Dès le début des traitements métalliques, l'évolution des teneurs de l'Hct dans le lot Pb ont révélé une décroissance significative ($P < 0,01$). Les brebis ont présenté un taux de $37,8 \pm 2,6$ % à la 1^{ère} semaine. Une progression vers la baisse ($P < 0,01$) a été constaté, une valeur de $28,8 \pm 1,3$ % à la 9^{ème} et en fin la valeur de $25,6 \pm 1,14$ % à la dernière semaine de traitement.

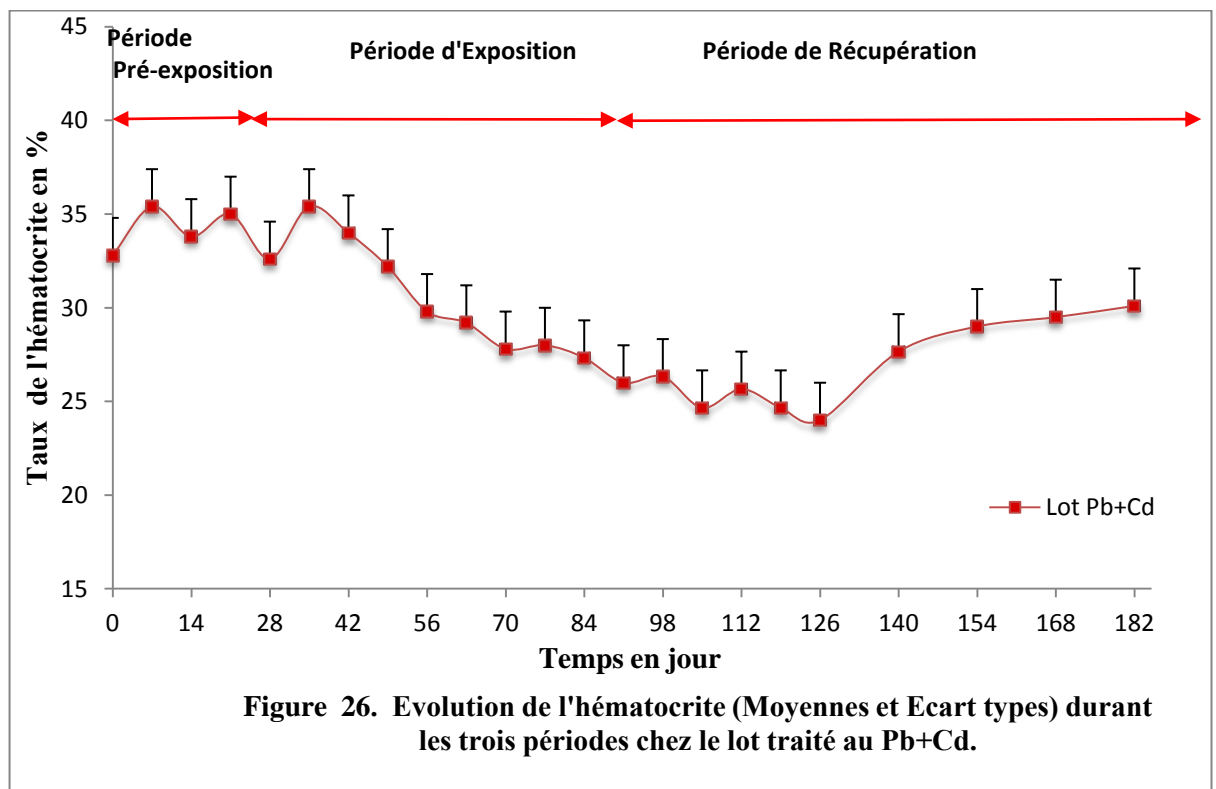
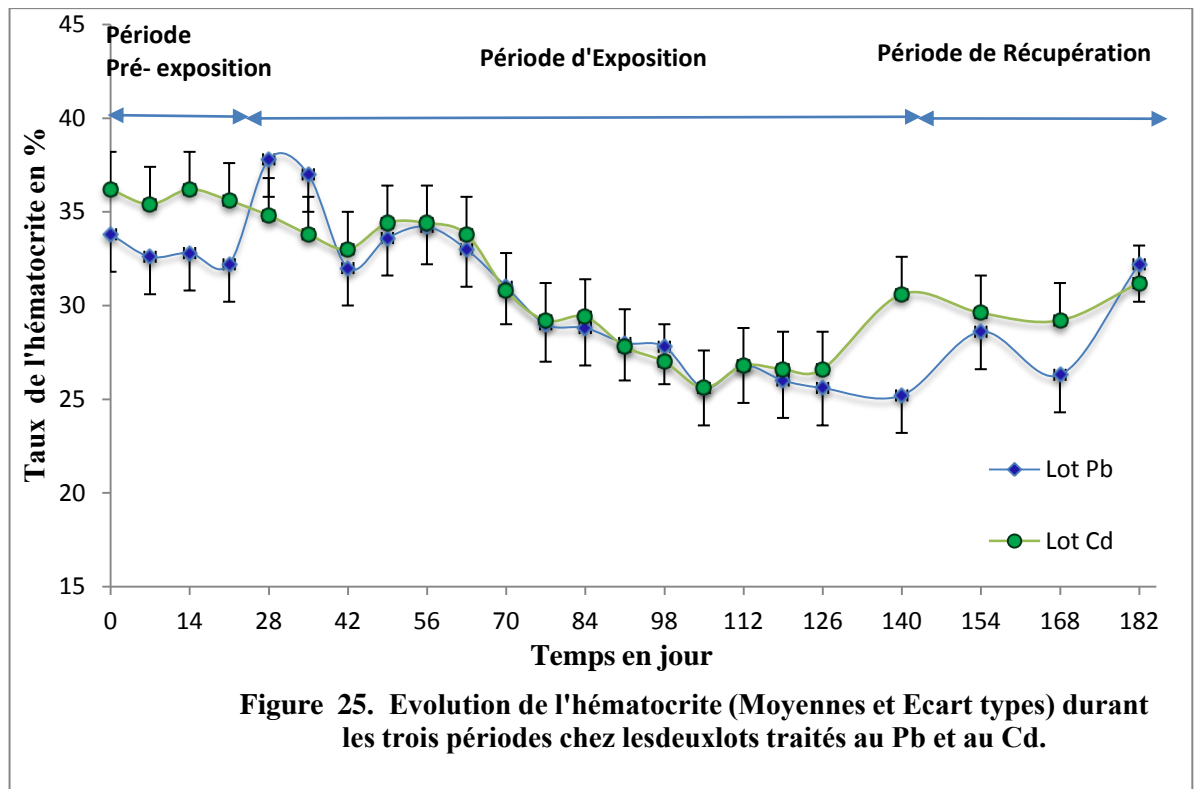
Les brebis appartenant au lot Cd ont présenté des teneurs de $34,8 \pm 1,8$ % à la 1^{ère} semaine de l'exposition. Une évolution significative ($P < 0,01$) vers la baisse a été notée le reste de la période de l'exposition pour atteindre à la 9^{ème} semaine la valeur de $29,4 \pm 1,1$ % et à la fin de cette période $26,6 \pm 1,14$ %.

Les niveaux observés chez les brebis du lot Pb+Cd étaient inférieurs à ceux observés chez les deux groupes précédents. Les moyennes des valeurs étaient situées entre $32,6 \pm 3,2$ % au début du traitement et $27,3 \pm 1,5$ % à la 9^{ème} semaine de la période d'exposition.

Le retrait du traitement n'a pas arrêté la diminution significative ($P < 0,001$) du taux de l'Hct. Au bout de 6 semaines de récupération, la teneur moyenne était de $24 \pm 1,7$ %. Néanmoins, le reste de la période, une récupération progressive des teneurs physiologiques a été notée pour atteindre vers la fin la valeur de $30,1 \pm 1,26$ %.

En outre, chez les deux autres lots, la période de récupération a révèlé des hausses des taux en Hct dès l'arrêt du traitement, pour atteindre au bout de 8 semaines les valeurs moyennes de $32,2 \pm 3$ % chez le lot Pb et $30,1 \pm 1,26$ % chez le lot Cd .

L'ANOVA a révèlé un effet temps ($P < 0,001$) et un effet traitement ($P < 0,05$) sur les brebis des trois lots traités et un effet combiné temps- traitement ($P=0,05$).



6. Analyses biochimiques

Les taux sériques en protéines totales, ALT, AST et CRE ont été déterminés chez les témoins. Les valeurs obtenues correspondaient aux normes physiologiques. On a déterminé un taux de $68,4 \pm 2,5$ g/l de protides totaux ; pour l'ALT et l'AST les taux de $15,6 \pm 1,1$ UI/l et $73,3 \pm 7,2$ UI/l respectivement et une valeur de $10,6 \pm 0,4$ mg/l pour la CRE.

6.1. Les transaminases

Le lot Pb a révélé des taux de transaminases situés entre $17,4 \pm 1,8$ UI/l et $38 \pm 2,55$ UI/l pour ALT (figure 27) et entre $73,3 \pm 7,2$ UI/l et $104,2 \pm 10,57$ UI/l pour l'AST (figure 29). Au début de l'exposition, on a noté une augmentation non significative des transaminases ($P > 0,05$). Par ailleurs, à la 5^{ème}, 6^{ème}, 7^{ème} et 8^{ème} semaine les niveaux ont crû significativement ($P < 0,05$)., à la 9^{ème} semaine l'augmentation du niveau de l'ALT était plus importante ($P < 0,01$), le taux a doublé pour atteindre le niveau de $34 \pm 1,6$ UI/l et $90,4 \pm 7,09$ UI/l pour l'ALT et l'AST respectivement. La dernière semaine d'exposition a révélé une évolution croissante, les taux étaient de $38 \pm 2,55$ UI/l en ALT et de $104,2 \pm 10,57$ UI/l en AST.

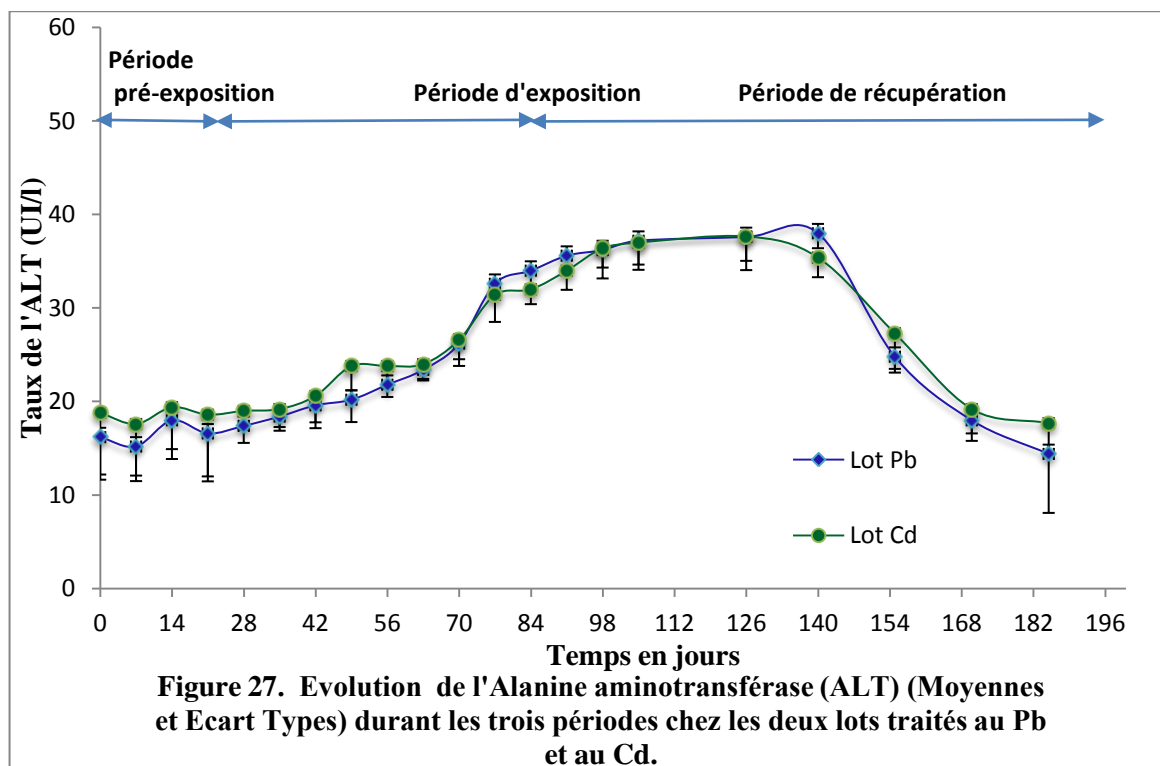
Le lot Cd a révélé aussi une augmentation des transaminases, notamment à la 6^{ème} semaine, les concentrations ont atteint $24 \pm 1,58$ UI/l pour l'ALT (figure 27) et $98,8 \pm 11,54$ UI/l pour l'AST (figure 29). Les valeurs ont progressé pour atteindre à la 9^{ème} semaine les teneurs de $32 \pm 1,58$ UI/l pour l'ALT et $114,6 \pm 25,5$ UI/l pour l'AST. A la fin de l'exposition, l'augmentation reste significative ($P < 0,01$) l'ALT était de $37 \pm 2,35$ UI/l et l'AST correspondait à la valeur de $129,8 \pm 27,66$ UI/l.

Chez le lot co-exposé, l'augmentation était plus importante, la progression des transaminases a été constatée dès la 1^{ère} semaine d'exposition pour atteindre à la 6^{ème} semaine les teneurs de $28,8 \pm 3,70$ UI/l en ALT (figure 28) et de $192 \pm 110,53$ UI/l en AST (figure 30); cette concentration représentait le niveau le plus élevé pendant toute la période d'exposition. A la 9^{ème} semaine, les teneurs restaient à la hausse avec une augmentation significative ($P < 0,01$), la concentration en ALT était en moyenne de $37,67 \pm 1,53$ UI/l et l'AST de $147 \pm 19,55$ UI/l.

Les taux de transaminases n'ont pas cessé de croître chez le lot co-exposé, alors que le traitement a été arrêté. L'évolution a révélé un taux de $42,67 \pm 2,52$ UI/l pour l'ALT (représentant le maximum des concentrations obtenues) et la teneur de $180 \pm 26,46$ pour l'AST à la 3^{ème} semaine de récupération. A la fin de la période, les teneurs ont commencé à diminuer pour atteindre la valeur de $20,3 \pm 5,6$ UI/l et $93,2 \pm 31,5$ UI/l pour l'ALT et l'AST respectivement.

Par ailleurs, une évolution nette des concentrations des transaminases vers la baisse a été constatée chez les deux lots Pb et Cd pendant la période de récupération. A la fin de la période, les teneurs en ALT ont atteint la valeur de $14,4 \pm 1,7$ UI/l chez le lot Pb et de $19,2 \pm 3,8$ UI/l chez les brebis traitées au Cd. Les teneurs en AST ont atteint la valeur de $72 \pm 10,5$ UI/l et de $84 \pm 21,3$ UI/l pour les lots Pb et Cd respectivement.

ANOVA a révélé un effet temps ($P < 0,001$), un effet traitement ($P < 0,001$) et un effet combiné temps-traitement ($P < 0,001$) sur l'évolution des concentrations sanguines des transaminases.



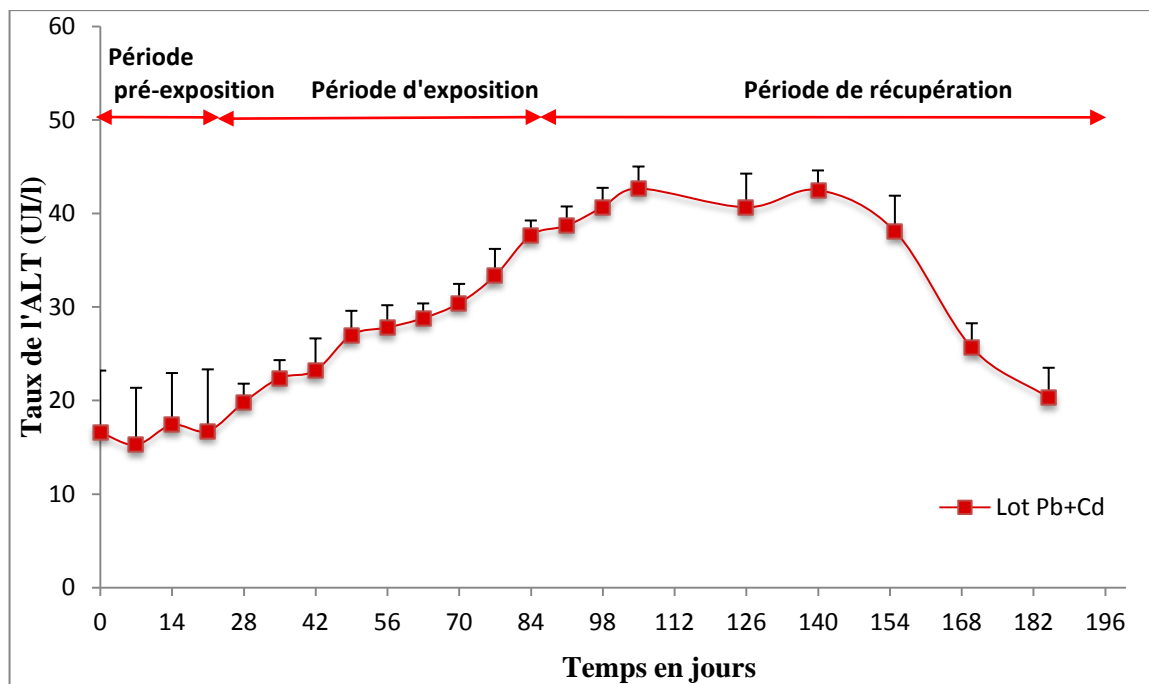


Figure 28. Evolution de l'Alanine aminotransférase (ALT) (Moyennes et Ecart Types) durant les trois périodes chez le lot traité au Pb+Cd.

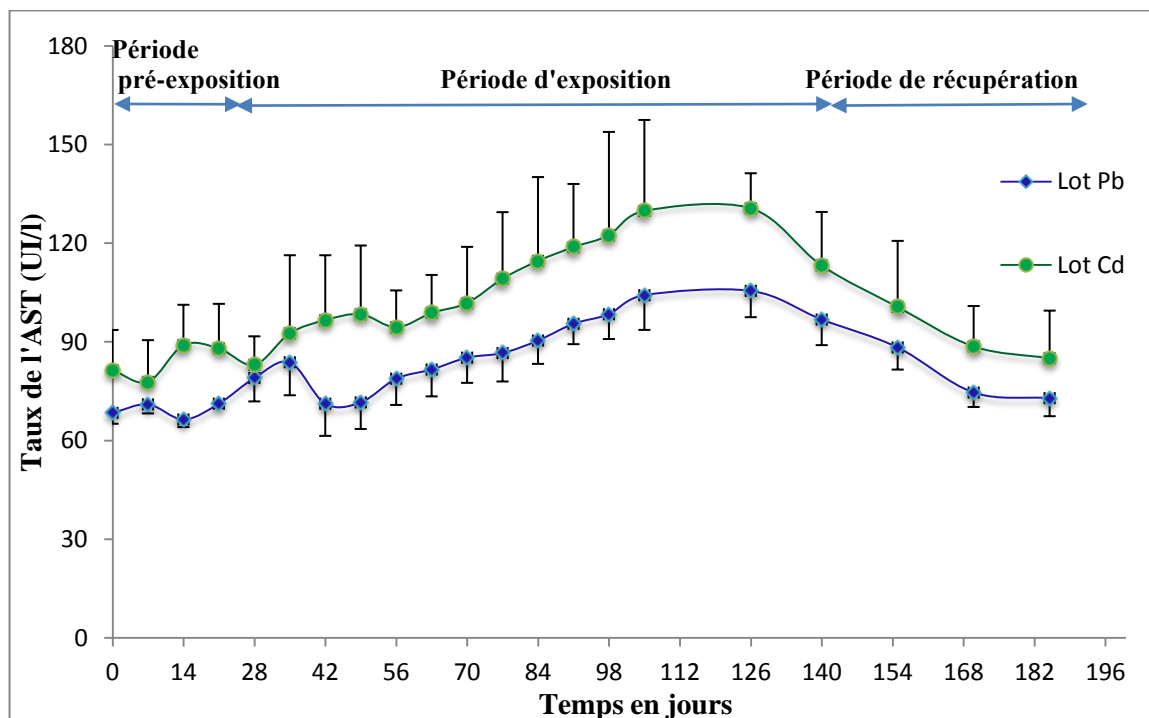


Figure 29. Evolution de l'Aspartate Aminotransférase (AST) (Moyennes et Ecart Types) durant les trois périodes chez les deux lots traités au Pb et au Cd.

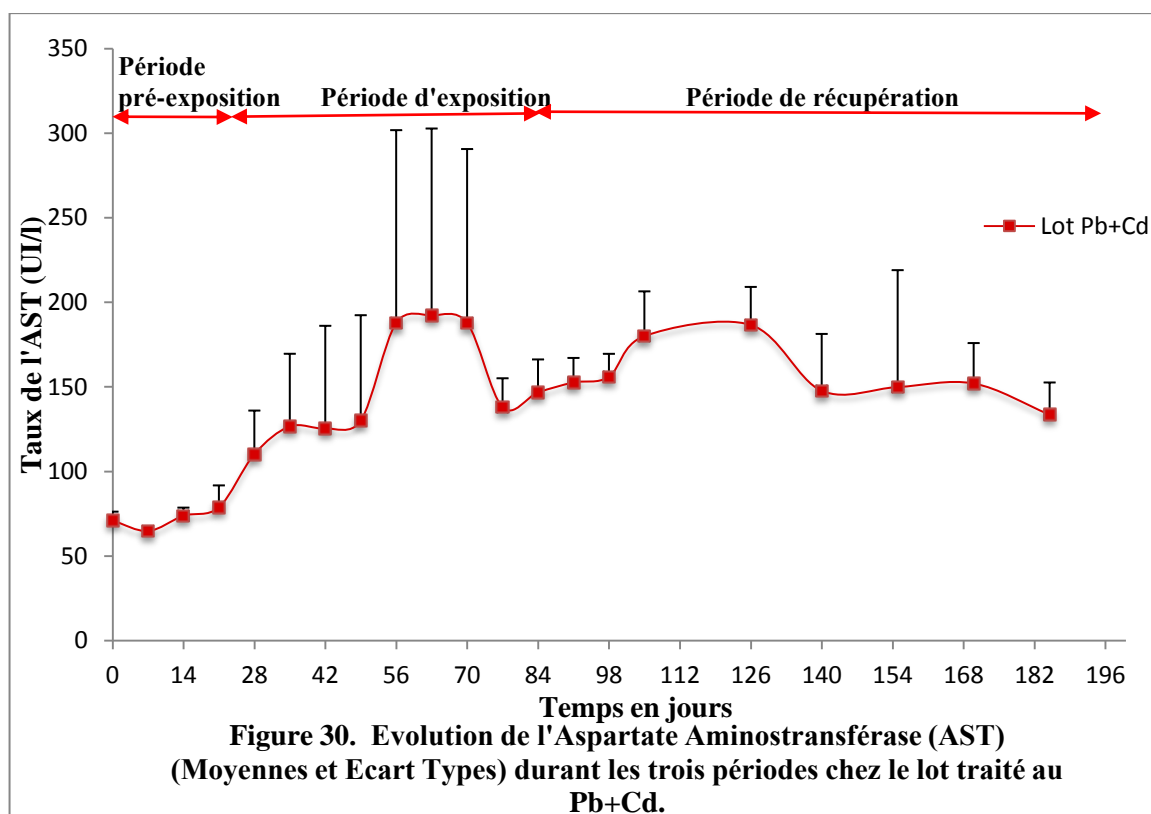


Figure 30. Evolution de l'Aspartate Amino transférase (AST) (Moyennes et Ecart Types) durant les trois périodes chez le lot traité au Pb+Cd.

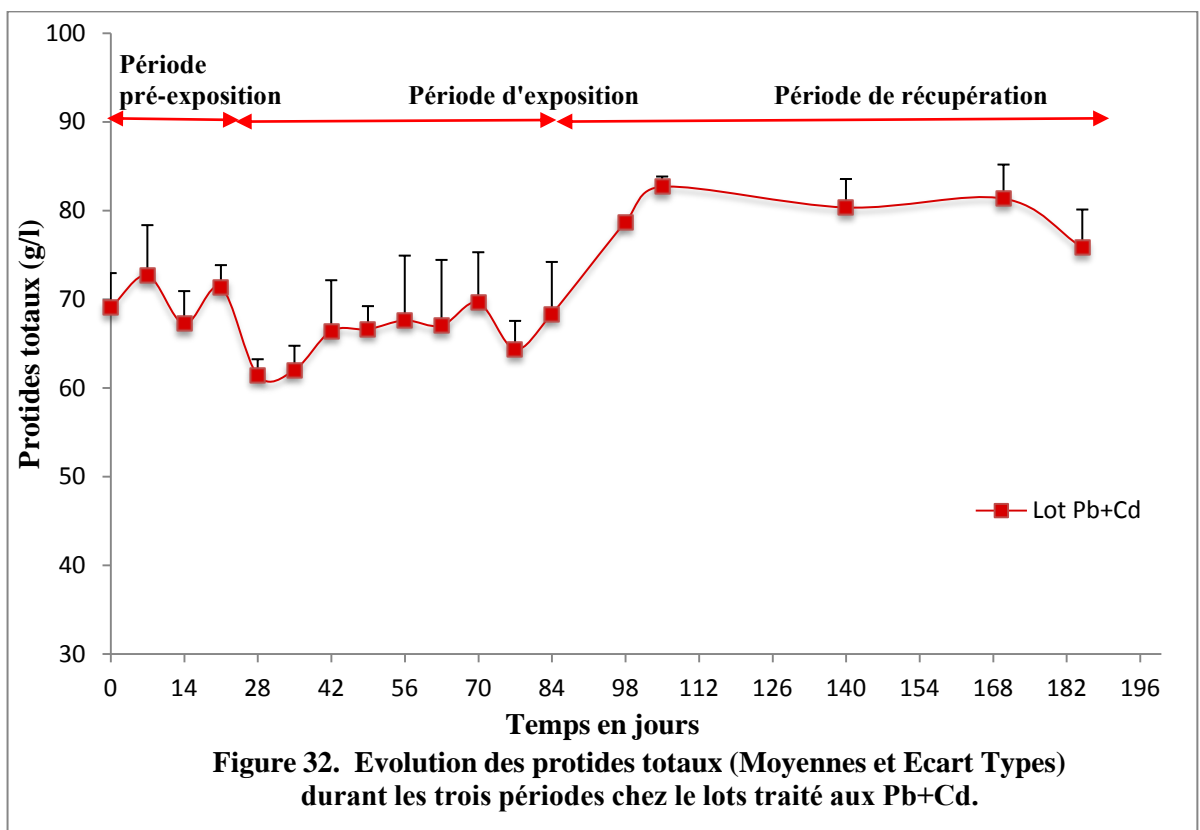
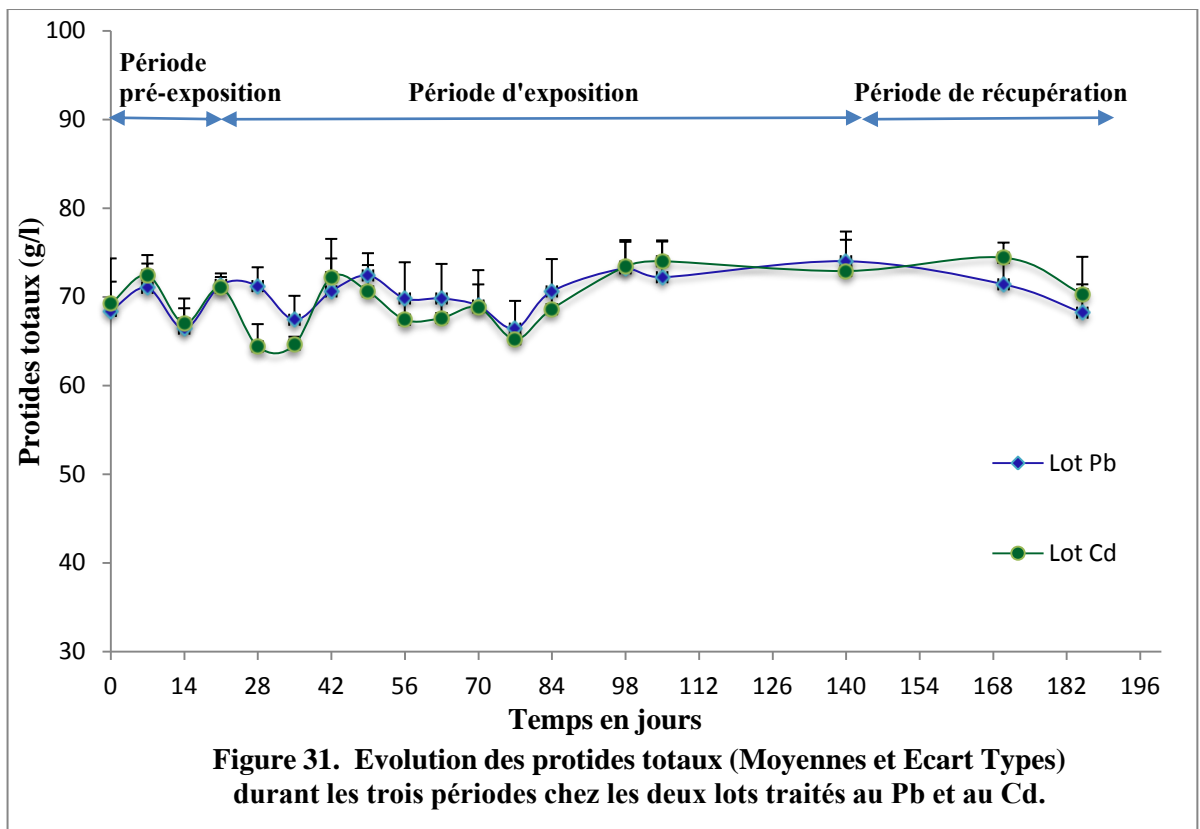
6.2. Les protides totaux et profils électrophorétiques

Avant les traitements, les niveaux des protides totaux chez les trois lots correspondaient aux normes physiologiques 60 – 79g/l (Kaneko *et al*, 2008). Les concentrations durant les deux périodes d'exposition et de récupération étaient fluctuantes. Pendant la première semaine de traitement, les valeurs étaient $71,2 \pm 2,12$ g/l, $64,4 \pm 2,51$ g/l et $61,4 \pm 1,82$ g/l respectivement chez les lots Pb, Cd (figure 31) et Pb+Cd (figure 32). A la 9^{ème} semaines les teneurs correspondaient aux valeurs de $70,6 \pm 3,6$ g/l, de $68,6 \pm 2,3$ g/l et la valeur de $68,3 \pm 5,8$ g/l chez les trois lots Pb, Cd et Pb+Cd respectivement.

A la fin de la période de traitement, les protides totaux ont atteint les teneurs de $73,2 \pm 4,02$ g/l et de $74 \pm 4,5$ g/l respectivement chez les lots Pb et Cd.

Pendant la période de récupération, le lot co-exposé a révélé une teneur de $82 \pm 3,2$ g/l, pour diminuer après et présenter la teneur de $72,5 \pm 3,84$ g/l à la fin de cette période. les deux lots Pb et Cd ont présenté les teneurs de $66,3 \pm 2,4$ g/l et de $64,6 \pm 1,7$ g/l à la dernière semaine.

ANOVA a révélé un effet temps ($P < 0,001$) et un effet combiné temps-traitement ($P < 0,001$) dans l'évolution des taux sériques des protides totaux.



Concernant le protéinogramme, on a noté que tous les profils obtenus avant l'exposition sont très proches les uns des autres et correspondent au profil physiologique (figures 50). Les différentes fractions protéiques ainsi que le rapport (Alb / Glob) sont normaux et correspondent aux normes qui sont: Albumines (24 – 30g/l), α 1-globuline (1,8 – 3,8 g/l), α 2-globuline (6,6 – 9,7 g/l), β -globuline (1,6 – 10,5 g/l) et γ -globuline (16,9 – 36,9 g/l) et pour le ratio Alb/Glob (0,42 – 0,76) (Kaneko *et al.*, 2008) (Tableau 18). A la 8^{ème} semaine d'exposition, après administration des sels métalliques, des changements sont apparus. Les proportions entre les différentes fractions n'ont pas été conservées chez toutes les brebis, spécialement chez le lot co-exposé avec des ratio Alb / Glob dans certains cas inférieures aux valeurs usuelles (Tableau 6).

6.3. Créatinine

La CRE a révélé des teneurs physiologiques pendant les huit premières semaines du traitement. A la 9^{ème} semaine, une augmentation significative ($P < 0,05$) a été notée avec les valeurs de $13 \pm 1,6$ mg/l pour le lot Pb, et $12 \pm 1,58$ mg/l pour le lot Cd (figure 33) et $13,67 \pm 1,5$ mg/l pour le lot Pb+Cd (figure 34). A la fin de la période d'exposition les concentrations en CRE avaient gardé une évolution à la hausse, les teneurs avaient atteint $16,2 \pm 1,64$ mg/l et $19,8 \pm 3,03$ mg/l chez les lots Pb et Cd, respectivement. L'augmentation était considérée comme significative ($P < 0,001$).

Chez le lot Pb+Cd, après arrêt du traitement, les teneurs ont continué à augmenter significativement ($P < 0,001$). On a noté la teneur de 23 ± 2 mg/l à la 3^{ème} semaine de récupération puis une évolution vers la diminution pour atteindre à la fin de cette période la teneur de $12 \pm 3,2$ mg/l.

La période de récupération a connu aussi un retour des concentrations de CRE aux normes physiologiques chez les deux lots Pb et Cd. Les valeurs déterminées étaient $10,98 \pm 0,54$ pour le lot Pb et $11,37 \pm 0,76$ pour le lot le Cd.

L'analyse de la variance (ANOVA) a révélé un effet temps ($P < 0,001$), un effet traitement ($P < 0,001$) et un effet combiné temps-traitement ($P < 0,001$) sur l'évolution de la créatinine.

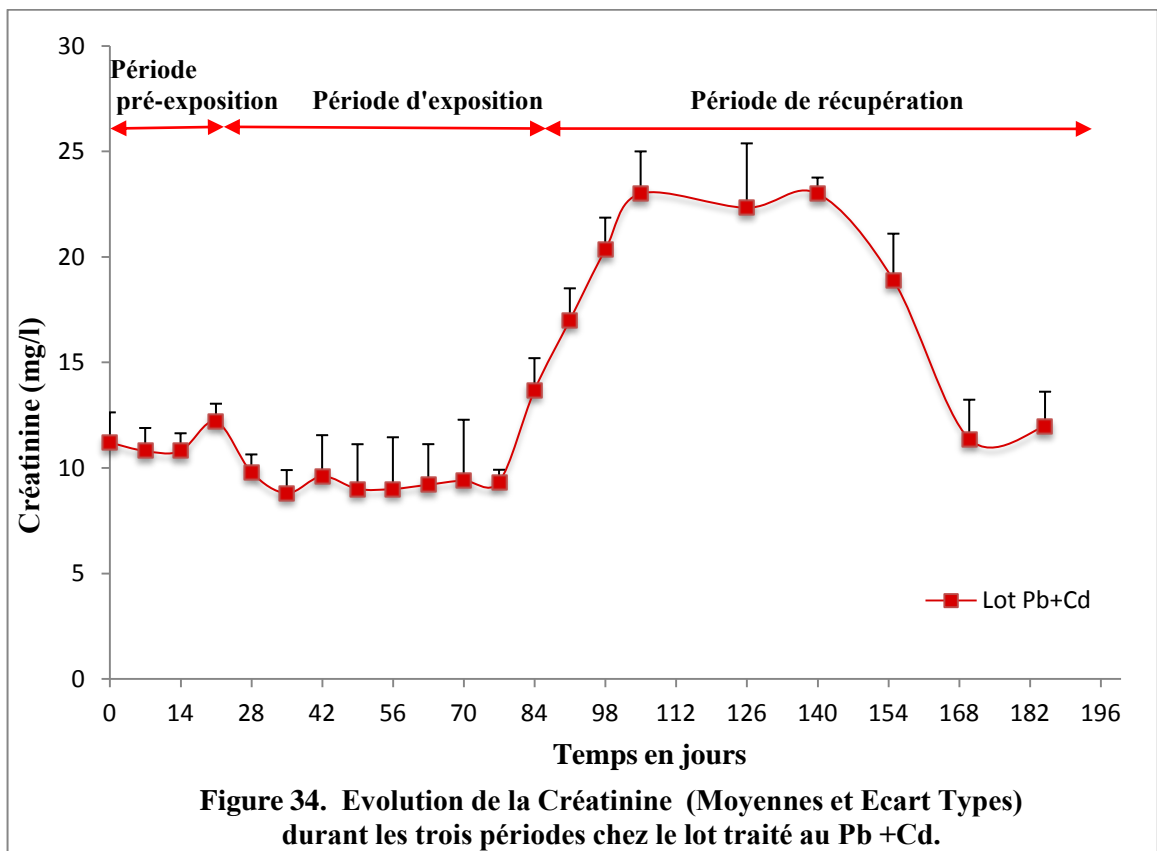
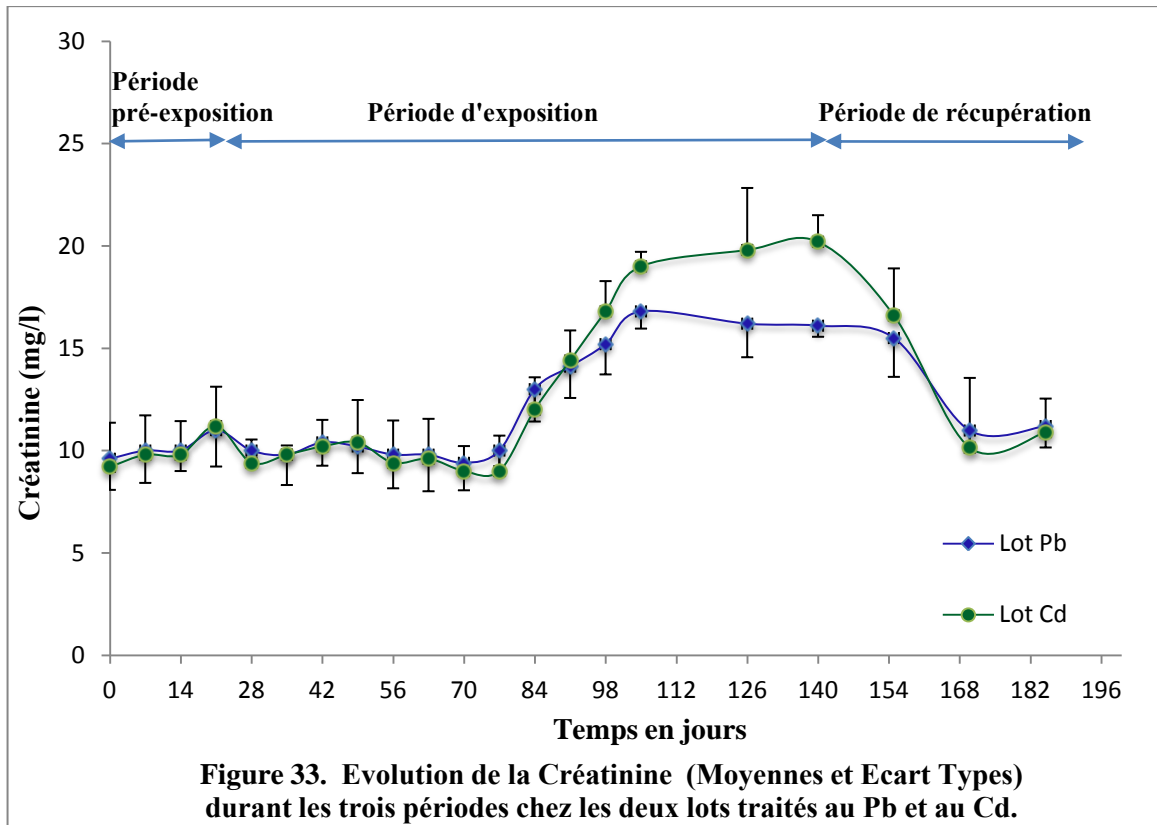


Tableau 6. Protides totaux et les différentes fractions protéiques (albumine, alpha1 globuline, alpha 2 globuline, bêta globuline et gamma globuline) (Moyennes et Ecart types en g/l) chez les différentes brebis des trois lots traités pendant la période de l'exposition.

Lots	N° des Brebis	TP	Albumine	α 1- globuline	α 2 - globuline	β - globuline	γ - globuline	Rapport Alb/Glob
Lot Pb	1	74± 3.9	25± 4.6	3.1± 1.1	7.7± 0.3	8.9± 0.1	36.4± 4.3	0.44± 0.01
	2	70± 2.64	15.4± 2.3	2± 0.2	8.5 ±0.3	6.6± 0.3	27.1± 6.7	0.35± 0.02
	12	71± 3.23	14.2± 3.5	2.8± 0.6	6.7± 3.2	5.8± 1.2	36.5± 8	0.33± 0.1
	13	66.5± 8.5	27.5± 2.1	4.2± 0.9	6.5± 0.1	3.4± 0.4	20.9± 3.6	0.48± 0.06
	15	68.5± 3.6	21.3± 3.2	4.8± 0.6	7.5± 3.1	4.2± 2.1	27.9± 2.1	0.41± 0.23
Lot Cd	3	68.5± 15.5	24.2± 3.6	5.6± 1.3	7± 2.1	3.6± 1.2	25.5± 2.2	0.38± 0.04
	4	69± 10.13	26.4± 1.6	5.1± 2.1	6.8± 0.8	7.1± 2.3	22.3± 3.8	0.40± 0.06
	5	70± 4.34	28.5± 1.8	3.5± 2.1	7.7± 1.2	6.4± 0.5	24.2± 4.7	0.48± 0.13
	10	68± 11.74	19.9± 5.1	4.3± 0.5	8.1± 4.3	3.8± 3.2	17.6± 1.5	0.58± 0.12
	11	68± 9.73	22.1± 7.2	4.3± 0.6	7± 3.2	6.1± 2.5	18.9± 2.1	0.6± 0.03
Lot Pb+Cd	6	62± 5.15	22.4± 3.2	4.1± 1.2	6.1± 0.2	5.3± 1.5	44.2± 3.4	0.33± 0.06
	7	71± 5.87	20.6± 1.1	4.5± 0.2	6.3± 0.2	4.2± 0.4	22.9± 9.1	0.4± 0.22
	8	68± 7.04	17.8± 4.2	3.1± 2.3	7.4± 1.2	5.6± 1.2	28.9± 5.2	0.37± 0.03
	9	70± 4.93	23.6± 1.2	3.2± 1.2	8.9± 2	7.9± 2.1	24.5± 7.5	0.26± 0.09
	14	66.4± 8.9	17.9± 2.3	3.1± 1.3	7.4± 0.3	5.9± 2.3	28.9± 10.2	0.39± 0.07

Tableau 7. Modifications hématologiques et biochimiques durant la période d'acclimatation et les 9 semaines d'exposition au Pb et au Cd chez les brebis des deux lots (Pb et Pb+Cd)

		Avant Exposition (jour)				Pendant 9 semaines d'exposition (jour)									ANOVA	
		0	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	TTT	Tps
Hb g/100ml	Pb (n= 5)	10,14 ±1,32	10,4 ±0,88	10,58 ±1,03	10,66 ±0,94	11,28 ±1,21	11,12 ±0,89	10,46 ±0,50	10,80 ±0,58	11,16 ±1,19	10,80 ±1,07	9,74 ±0,73	9,06 ±0,40	9,30 ±0,64	***	***
	Pb+Cd (n=5)	10,22 ±1,03	10,74 ±0,76	10,32 ±1,02	11,22 ±0,88	10,66 ±0,77	10,10 ±0,77	10,18 ±0,72	10,08 ±1,04	9,68 ±0,42	9,44 ±0,88	8,24 ±1,35	9,43 ±0,51	8,90 ±0,56		
Hct %	Pb (n= 5)	33,80 ±2,08	32,60 ±3,34	32,80 ±2,32	32,20 ±3,41	37,80 ±2,59	37,00 ±3,08	32,00 ±2,65	33,60 ±3,05	34,20 ±3,19	33,00 ±2,74	31,00 ±2,00	29,00 ±1,58	28,80 ±1,30	***	***
	Pb+Cd (n= 5)	32,80 ±1,98	35,40 ±3,3	33,80 ±2,38	35,00 ±3,29	32,60 ±3,21	35,40 ±4,28	34,00 ±3,81	32,20 ±2,68	29,80 ±1,48	29,20 ±1,48	27,80 ±0,84	28,0 ±1,00	27,33 ±1,53		
ALT UI/l	Pb (n= 5)	16,20 ±4,54	15,20 ±3,11	18,00 ±3,08	16,60 ±5,12	17,40 ±1,82	18,40 ±1,52	19,60 ±1,82	20,20 ±2,39	21,80 ±1,30	23,40 ±1,14	26,20 ±2,39	32,60 ±1,52	34,00 ±1,58	***	***
	Pb+Cd (n= 5)	16,60 ±4,88	15,26 ±3,64	17,40 ±2,79	16,73 ±3,21	19,80 ±3,96	22,40 ±3,36	23,20 ±4,44	27,00 ±4,18	27,80 ±1,92	28,80 ±3,70	30,40 ±3,21	33,33 ±2,89	37,67 ±1,53		
AST UI/l	Pb (n= 5)	71,53 ±4,82	70,35 ±4,75	77,33 ±8,95	57,82 ±40,09	79,00 ±7,11	83,80 ±10,03	71,20 ±9,78	71,60 ±8,08	78,80 ±7,98	81,60 ±8,17	85,20 ±7,66	86,60 ±8,65	90,40 ±7,09	***	NS
	Pb+Cd (n= 5)	71,00 ±5,24	64,80 ±2,86	73,80 ±4,81	78,80 ±12,94	110,20 ±25,79	126,60 ±42,97	125,40 ±60,69	130,00 ±62,37	187,80 ±113,96	192,20 ±110,53	187,80 ±102,79	138,00 ±17,09	146,67 ±19,55		
CREAT. mg/l	Pb (n= 5)	9,60 ±1,51	10,00 ±1,58	10,00 ±1	11,00 ±1,87	10,00 ±0,71	9,80 ±1,48	10,40 ±1,14	10,20 ±1,30	9,80 ±1,64	9,80 ±1,79	9,40 ±34	10,00 ±1,22	13,00 ±1,58	NS	***
	Pb+Cd (n= 5)	11,20 ±1,48	10,80 ±1,09	10,80 ±0,83	12,20 ±0,83	9,80 ±0,84	8,80 ±1,10	9,60 ±1,95	9,00 ±2,12	9,00 ±2,45	9,20 ±1,92	9,40 ±2,88	9,33 ±0,58	13,67 ±1,53		
TP g/l	Pb (n= 5)	68,40 ±3,28	71,00 ±2,73	66,40 ±2,30	71,33 ±1,30	67,00 ±2,12	67,40 ±2,70	70,60 ±3,71	72,40 ±2,51	69,80 ±4,09	69,80 ±3,90	69,00 ±4,00	66,40 ±3,13	70,60 ±3,65	***	NS
	Pb+Cd (n= 5)	69,00 ±3,92	72,66 ±5,67	67,20 ±3,70	71,33 ±2,46	61,40 ±1,82	62,00 ±2,74	66,40 ±5,73	66,60 ±2,61	67,60 ±7,30	67,00 ±7,42	69,60 ±5,68	64,33 ±3,21	68,33 ±5,86		

Tableau 8. Modifications hématologiques et biochimiques durant les 8 dernières semaines d'exposition au Pb et au Cd et la période de récupération chez les brebis des deux lots (Pb et Pb+Cd)

		Pendant les 8 dernières semaines de l'exposition (jour)						Période de récupération (jour)				ANOVA	
		91	98	105	112	119	126	140	154	168	182	TTT	Tps
Hb g/100ml	Pb (n= 5)	8,72 ±0,5	7,68 ±0,43	7,24 ±0,25	7,48 ±0,6	7,62 ±0,4	7,46 ±0,5	8,28 ±0,45	9,44 ±0,3	9,44 ±0,34	10,76 ±0,4	***	***
	Pb+Cd (n=3)	7,5 ±0,86	6,7 ±0,5	6,23 ±23	6,4 ±0,7	6,36 ±0,45	6,4 ±0,35	9,6 ±0,84	9,1 ±0,9	9,9 ±0,6	10 ±0,95		
Hct %	Pb (n= 5)	28 ±2,12	27,8 ±1,3	25,6 ±1,14	26,8 ±0,83	26 ±1,22	25,6 ±1,14	25,2 ±1,9	28,6 ±1,95	26,3 ±2,1	32,2 ±3	*	***
	Pb+Cd (n= 3)	26 ±1	26,33 ±0,6	24,66 ±0,6	25,66 ±0,23	24,66 ±1,15	24 ±1,7	27,66 ±3	29 ±1	29,5 ±1	30,1 ±1,26		
ALT UI/l	Pb (n= 5)	35,6 ±2,1	36,2 ±3,03	37,2 ±3,11	-	-	37,6 ±2,55	38 ±1,6	24,8 ±1,7	18 ±2,2	14,4 ±6,3	***	***
	Pb+Cd (n= 3)	38,7 ±14,5	40,67 ±13,53	42,67 ±26,46	-	-	40,66 ±22,48	42,5 ±33,6	38,1 ±69,1	25,66 ±23,9	20,3 ±19		
AST UI/l	Pb (n= 5)	95,5 ±6,2	98,4 ±7,54	104,2 ±10,57	-	-	96,8 ±8	88,3 ±7,8	74,6 ±6,73	78,80 ±4,4	72,9 ±5,5	***	***
	Pb+Cd (n= 3)	152,6 ±5,24	156 ±2,86	180 ±4,81	-	-	186,6 ±42,97	147,7 ±60,69	149,9 ±62,37	152 ±113,96	133,6 ±110,53		
CREAT. mg/l	Pb (n= 5)	14,1 ±1,51	15,2 ±1,53	16,8 ±2	-	-	16,2 ±3,05	16,1 ±0,76	15,5 ±2,2	10,20 ±1,86	11,2 ±1,65	***	***
	Pb+Cd (n= 3)	17 ±1,51	20,33 ±1,53	23 ±2	-	-	22,33 ±3,05	23 ±0,76	18,9 ±2,2	11,37 ±1,86	11,96 ±1,65		
TP g/l	Pb (n= 5)	73,2 ±3,19	-	72,2 ±4,02	-	-	74 ±2,42	73,5 ±36	71,40 ±2,4	-	68,2 ±3,2	***	NS
	Pb+Cd (n= 3)	78,67 ±0,58	-	82,67 ±1,15	-	-	80,33 ±3,21	81 ±4,4	81,33 ±3,84	-	75,8 ±4,3		

Tableau 9. Modifications hématologiques et biochimiques durant la période d'acclimatation et les 9 semaines d'exposition chez les brebis du lot Cd

		Avant Exposition (jour)				Pendant 9 semaines d'exposition (jour)									ANOVA	
		0	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	TTT	Tps
Hb g/100ml	Cd (n= 5)	11,62 ±0,82	11,28 ±1,13	11,46 ±1,17	11,4 ±0,8	10,66 ±0,7	10,26 ±0,8	10,4 ±0,95	11,02 ±1,22	10,8 ±1,3	107 ±1,17	10,02 ±0,83	9,44 ±0,95	9,44 ±0,48	***	**
Hct %	Cd (n= 5)	36,2 ±3,4	35,4 ±2,8	36,2 ±2,8	35,6 ±1,8	34,8 ±1,8	33,8 ±1,8	33 ±1,2	34,4 ±4	34,4 ±4,15	33,8 ±3,9	30,8 ±2,4	29,2 ±1,9	29,4 ±1,1	**	***
ALT UI/l	Cd (n= 5)	18,8 ±6,6	17,6 ±6,1	19,4 ±5,54	18,6 ±6,6	19 ±2	19,2 ±1,92	20,6 ±3,44	23,8 ±2,59	23,80 ±2,39	24 ±1,58	26,6 ±2,07	31,4 ±2,88	32 ±1,58	***	***
AST UI/l	Cd (n= 5)	81,4 ±12,22	77,8 ±12,72	89 ±12,27	88 ±13,56	83 ±8,69	92,6 ±23,73	96,6 ±19,73	98,4 ±20,89	94,4 ±11,24	98,8 ±11,54	101,8 ±17,08	109,2 ±20,23	114,6 ±25,5	***	NS
CREAT. mg/l	Cd (n= 5)	9,2 ±2,16	9,8 ±1,92	9,8 ±1,64	11,2 ±1,92	9,4 ±1,14	9,8 ±0,45	10,2 ±1,3	10,4 ±2,07	9,4 ±2,08	9,6 ±1,95	9 ±1,22	9 ±1,73	12 ±1,58	NS	***
TP g/l	Cd (n= 5)	69,2 ±5,12	72,4 ±2,3	67 ±2,8	71 ±1,22	64,4 ±2,51	64,6 ±0,89	72,2 ±4,32	70,6 ±2,97	67,4 ±2,51	67,6 ±1,82	68,8 ±2,59	65,2 ±1,48	68,6 ±2,3	*	***

Tableau 10. Modifications hématologiques et biochimiques durant les huit dernières semaines d'exposition et la période de récupération chez les brebis du lot Cd

		Pendant les 8 dernières semaines de l'exposition (jour)						Période de récupération (jour)				ANOVA	
		<i>91</i>	<i>98</i>	<i>105</i>	<i>112</i>	<i>119</i>	<i>126</i>	<i>140</i>	<i>154</i>	<i>168</i>	<i>182</i>	TTT	Temps
Hb g/100ml	<i>Cd (n= 5)</i>	8,68 ±0,7	8,02 ±0,6	7,5 ±3	7,34 ±0,4	7,2 ±0,6	7 ±0,8	9,7 ±1,5	9,46 ±1,5	10,18 ±1,4	9,78 ±2,7	***	***
Hct %	<i>Cd (n= 5)</i>	27,4 ±1,3	27 ±1,2	25,6 ±1,3	26,8 ±0,8	26,6 ±1,14	26,6 ±1,14	30,6 ±2,7	29,6 ±4,1	29,2 ±5,15	31,2 ±2,16	***	***
ALT UI/l	<i>Cd (n= 5)</i>	34 ±2,05	36,4 ±2,07	37 ±2,35	-	-	37,66 ±3,6	35,4 ±2,1	27,8 ±3,8	19,2 ±2,6	17,7 ±3,2	***	***
AST UI/l	<i>Cd (n= 5)</i>	118,8 ±19,2	122,4 ±31,43	129,8 ±27,66	-	-	130,6 ±10,66	113,2 ±16,3	100,6 ±20,1	88,6 ±12,1	85 ±14,5	***	NS
CREAT. mg/l	<i>Cd (n= 5)</i>	14,4 ±1,47	16,8 ±1,48	19 ±0,71	-	-	19,8 ±3,03	20,2 ±1,3	16,6 ±2,3	10,14 ±3,41	10,9 ±1,64	NS	***
TP g/l	<i>Cd (n= 5)</i>	73,4 ±2,79	-	74 ±2,35	-	-	72,9 ±4,45	74,4 ±36	70,3 ±1,7	-	72,2 ±4,2	NS	***

Hb: Hémoglobine, Hct: Hématocrite, ALT: Alanine aminotransférase, AST: Aspartate aminotransférase, CREAT: Créatinine

TP: Protéines Totales, TTT: Traitement, Tps : Temps, NS : Non significatif, P > 0,05, * : P<0,05, ** : P <0,01, * : P<0,001**

CHAPITRE III.

DISCUSSION

- **ARGUMENTATION DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL**
- **CONTRIBUTION DE L'ALIMENT DANS L'APPORT EN ETM**
- **EVALUATION DU PROFIL PLOMBEMIE/ TEMPS**
- **MODELISATION TOXICOCINETIQUE /
ANALYSE NON COMPARTIMENTALE**
- **EVALUATION DU PROFIL CADMIEMIE/ TEMPS**
- **HEMATOTOXICITE**
- **INTERACTION Pb /Cd- ELEMENTS ESSENTIELS (Zn-Cu)**
- **EVOLUTION TEMPORELLE DES MARQUEURS HEPATIQUES**
- **NEPHROTOXICITE LIEE AUX ETM**
- **ETUDE ANATOMOPATHOLOGIQUE**

I. Argumentation du Protocole Expérimental

Afin de simuler le niveau de contaminations des fourrages destinés aux animaux et dans le but de mimer une contamination chronique de l'organisme à une dose environnementale et d'examiner les effets d'une exposition prolongée sur l'organisme (organiques et fonctionnels), le modèle *in vivo* est basé sur une exposition de 17 semaines de brebis race Ouled Djellal aux sels métalliques : Nitrate de Plomb et Chlorure de Cadmium.

Dans notre travail, la contamination est expérimentale et la source de l'exposition est contrôlée. Les posologies administrées ont été définies afin de répondre au mieux aux objectifs suivants :

- ✓ Ne pas entraîner une intoxication clinique (aigüe ou subaigüe)
- ✓ Pouvoir réaliser des niveaux proches de la contamination des fourrages dans des zones polluées
- ✓ Atteindre des concentrations sanguines quantifiables et détectables en plomb et en cadmium avec suffisamment de précision pour permettre la réalisation d'une analyse toxicocinétique.

1. Choix du Modèle Animal

Pour évaluer le potentiel toxique d'un xénobiotique et procéder à des études en toxicologie et en écotoxicologie dans différents milieux, les chercheurs disposent de trois moyens d'investigation : les populations humaines et animales accidentellement exposées, les modèles animaux pour l'expérimentation et la culture cellulaire. Chacun des trois supports d'investigation est exploité pour aboutir dans la majeure partie des cas à des informations complémentaires.

Avec les avancées qu'a connues la recherche en toxicologie, dont la maîtrise de la culture cellulaire, l'utilisation des cellules cibles des différents xénobiotiques a connu une révolution. Diverses lignées cellulaires en culture fournissent des renseignements précieux sur les enzymes participant à la transformation métabolique d'un composé donné et des métabolites éventuellement toxiques. L'inconvénient de cette analyse au niveau cellulaire et moléculaire est le faible nombre de paramètres biologiques à prendre en compte et qui nécessite une grande maîtrise technique pour assurer la survie des cellules et conserver une réactivité

reproductible dans le temps. Malgré les avancées récentes, les techniques de culture cellulaire ne permettent pas d'appréhender un organisme vivant dans sa globalité.

Les études d'investigations en toxicologie ou en écotoxicologie chez l'homme sont plus rares et surviennent par accident. Les informations des différentes études sont issues d'études cliniques et épidémiologiques de populations exposées, le plus souvent dans un cadre professionnel. L'exploitation des données reste limitée.

Au contraire, le modèle animal, soit en laboratoire ou dans son milieu naturel, reste le support de recherche le plus utilisé.

Pour les animaux accidentellement exposés, il s'agit:

- ✓ des animaux vivant dans les milieux aquatiques
- ✓ des élevages proches des sources d'émissions des polluants
- ✓ des animaux qui pâturent sur des terrains contaminés
- ✓ de ceux dont l'alimentation provient d'une zone polluée

Grâce à des protocoles expérimentaux variés et élaborés, les résultats et les données obtenus à partir de modèles animaux présentent l'avantage d'être nombreux et de répondre à des objectifs bien déterminés, ce qui permet d'aboutir à des données de plus en plus précises et une exploitation statistique large.

Les modèles animaux présentent de nombreux avantages par rapport aux tests *in vitro*, les phases d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'élimination des xénobiotiques sont présentes et permettent d'observer leurs effets intégrés sur les différentes fonctions de l'organisme. Tous les organes impliqués étant présents et fonctionnels, la toxicité générale de la molécule peut être testée et les effets sur les paramètres circulants peuvent être mesurés.

Les pollutions des différents compartiments de l'environnement peuvent être des sources de contamination des chaînes alimentaires. Comme les métaux lourds ne peuvent être dégradés et que leur élimination est le plus souvent limitée, les organismes biologiques exposés les accumulent après absorption dans leurs tissus (Pareja-Carrera et *al.*, 2014 ; Mukesh et *al.*, 2008). Ce processus, appelé bioaccumulation, permet d'expliquer pourquoi les animaux, et par conséquent les produits qui en sont issus, peuvent présenter des niveaux de contamination plus

élevés que ceux mesurés dans leur milieu (Perrin, 2007). La bioaccumulation résulte de la balance nette des processus de capture, de stockage et d'excrétion d'une substance dans un organisme, due à une exposition dans l'eau, la nourriture, le sédiment et l'air (Neff, 2002).

Une exposition subchronique ou pendant une longue période des animaux aux métaux lourds peut causer des résidus dans les denrées animales pouvant excéder les limites légales tolérables, suite à l'accumulation des éléments traces dans les tissus (abats, muscles) surtout les organes cibles (foie et rein) et ainsi que leur excrétion dans les produits comme le lait et la laine (Mehennaoui *et al.*, 1995 ; Payne et Livesy.,2010).

La brebis Ouled djellal a été choisie comme modèle animal pour réaliser ce travail de recherche. Le mouton est moins cher que le bovin, c'est un animal dont la viande est très demandée et appréciée en Algérie, dans tout le Maghreb et même en méditerranée. Cependant, du point de vue de la santé de l'animal comme de la santé publique, le mouton comme tous les ruminants, accumule les métaux lourds dans différents tissus et organes. Ces derniers constituent une source significative d'exposition du consommateur aux métaux lourds.

Le mouton présente des particularités qui en font un modèle animal intéressant. Par sa docilité, le maniement et l'élevage de cet animal sont aisés. De plus, la longue durée de développement des organes (croissance) et la taille des ovins, comparativement aux rongeurs, autorise la répétition des mesures et la réalisation d'études longitudinales essentielles pour évaluer les effets à long terme, sachant que la chronicité des effets constitue un enjeu en toxicologie. Les prélèvements de liquides biologiques chez cet animal sont facilement réalisables. Ainsi, le mouton peut répondre au nombre de prélèvements sanguins programmés chaque fois pendant ce travail et fournir la quantité de sang nécessaire pour effectuer les différentes analyses du protocole expérimental. Aussi, les études réalisées chez la brebis sont une étape préliminaire intéressante pour des études réalisées chez les bovins (Mehennaoui, 1995).

Le mouton a fait ses preuves en tant que modèle animal, notamment dans les études sur les perturbateurs endocriniens. Cet animal a été utilisé afin de déterminer un schéma posologique capable de mimer chez les ovins l'exposition au fipronil (Leghait, 2008; Collet, 2012). Aussi, il s'avère un modèle expérimental intéressant pour la réalisation de circulations extracorporelles et de séances d'hémodialyse (Bonnet *et al.*, 2000). Le mouton présente des caractéristiques anatomiques et physiologiques cardio-vasculaires et respiratoires très proches de celles de

l'homme qui en font un excellent modèle en chirurgie cardiaque (Baudin Fayolle, 2001). Par ailleurs, Johnston et *al.* (1997) ont développé un modèle mouton pour la SUDEP (Sudden Unexpected Death in Epilepsy) sur lequel ils procèdent à des inductions pharmacochimiques de crises épileptiques. Enfin, en parasitologie, comme le mouton est réceptif à l'infection par *T. brucei*, ce modèle a pu être utilisé pour réaliser des expérimentations de molécules actives sur la trypanosomose humaine africaine (Bouteille et *al.*, 2002).

Chez l'animal, on connaît des différences radicales entre les sexes dans les effets toxiques engendrés par une exposition à certains xénobiotiques (Viau et Tardif, 2003). L'état physiologique de l'animal peut influencer la cinétique des xénobiotiques dans l'organisme (Pérez et *al.*, 2007; Madeddu et *al.*, 2011). La brebis en lactation paraît plus sensible aux effets métaboliques du Pb (Mehennaoui, 1995). Le sexe influence l'accumulation du Cd dans le rein, chez les bovins, les concentrations de cadmium rénales étant significativement plus importantes chez les femelles que chez les mâles (Lopez et *al.*, 2000). Des différences liées au sexe ont été rapportées dans des études chez l'homme et l'animal, le cadmium pourrait avoir une durée de demi-vie biologique longue chez les femelles comparativement aux mâles (Bremner, 1979).

Pour toutes ces raisons et afin de réaliser des lots homogènes, les animaux choisis pour l'expérimentation sont tous des femelles non gestantes et non lactantes. Il faut savoir aussi, que rassembler 15 béliers dans un même enclos est difficile à gérer. Les béliers mesurent leur force les uns aux autres par des duels. Il se produit souvent de violents coups de tête jusqu'à ce que le plus faible se détourne, prouvant par là sa soumission (Götz, 2011).

2. Choix de la Voie et de la Durée de Contamination

La voie d'exposition environnementale la plus importante aux Pb et au Cd est la voie orale. Cette dernière a été choisie pour réaliser les traitements aux sels métalliques, et nous nous sommes plus spécifiquement basés sur des études décrivant les effets d'une exposition chronique par la voie orale.

Les animaux peuvent se contaminer en éléments métalliques en ingérant des végétaux, soit directement au pré, soit des végétaux récoltés sur zone polluée puis distribués. Notons que les plantes utilisent leur système de racines pour assimiler des métaux jusqu'à une profondeur d'environ 1 mètre (Steketee, 2010). Les sols contaminés peuvent être une source d'exposition

directe pour le bétail notamment l'empoisonnement au Pb (Clegg, 1978). Le bétail qui pâit dans des zones contaminées assimilera proportionnellement davantage de métaux que l'homme. En effet, la matière contaminée qui se dépose sur l'herbe et les particules de sol adhérentes sont également assimilées (Steketee, 2010). L'ingestion de la terre au pâturage ou incorporée à la ration lors des récoltes est une source majeure de contamination. Selon Thornton et Abrahams (1983), la part de la terre peut atteindre jusqu'à 30% de la quantité totale de matière sèche ingérée pour les ovins qui arrachent les végétaux avec les racines et leurs dépôts terreux, sous des conditions défavorables (lors de sécheresse, d'herbe trop courte, de surcharge de pâturage). C'est une fraction normale du régime alimentaire de tous les animaux pâturant et une source notable d'éléments traces métalliques.

Les plantes peuvent se contaminer en métaux de deux manières : par absorption racinaire à partir de la solution du sol qui est la voie majeure et par absorption foliaire à partir de l'air atmosphérique contaminé. Plus généralement, les plantes à feuille peuvent accumuler de façon marquée le cadmium. Le transfert du cadmium présent dans le sol vers les plantes peut être rapide. Ultérieurement, le cadmium (sous sa forme ionisée Cd^{++}) passe facilement dans les animaux herbivores (bovins, moutons, chevaux...). La bioconcentration végétale du Cd peut être suffisante pour faire des plantes des sources de contamination importantes pour les animaux qui les ingèrent (Clegg, 1978). Le Pb reste en plus grande quantité dans les sols que dans les plantes.

L'eau peut représenter une source importante d'exposition pour les animaux quand elle est contaminée. Les ruminants peuvent absorber des doses toxiques de métaux par l'eau d'abreuvement, mais certains éléments donnent à l'eau une saveur désagréable. Si la consommation d'eau très contaminée peut, elle aussi, être une source d'exposition directe importante, la pollution atmosphérique intervient principalement de façon indirecte dans l'exposition des animaux, en contaminant les sols et les eaux.

Avec l'ingestion qui est la voie majeure de contamination par les ETM, l'exposition à long terme représente la durée la plus fréquente, aussi bien, dans l'environnement avec la contamination des organismes vivant dans différents milieux, que lors de l'exposition professionnelle chez l'homme.

3. Choix des Traitements (Métaux Lourds) : Plomb & Cadmium

Comme le montre l'abondante bibliographie, le Pb et le Cd sont des éléments chimiques considérés comme uniquement toxiques, et ce pour tous les organismes (Homme, animaux, plantes et micro-organismes). N'ayant aucune activité biologique bénéfique, Pb et Cd sont les plus importants des éléments toxiques non essentiels qui peuvent contaminer l'alimentation, l'eau et l'air. Leur présence est clairement impliquée dans l'apparition de beaucoup de maladies, touchant la quasi-totalité des organes. Autre propriété très néfaste de ces deux métaux lourds, leur capacité à s'accumuler dans la chaîne alimentaire. Ces deux éléments traces sont considérés comme de véritables enjeux de la santé publique.

Le Pb et Cd, par leurs propriétés physiques et chimiques, proches de celles de certains éléments essentiels leur permettent d'entrer en compétition avec d'autres métaux bivalents essentiels, notamment (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} ...). Par mimétisme au niveau de certains transporteurs membranaires, ces deux ETM traversent les barrières biologiques et s'accumulent dans les tissus. Tous les éléments, qui ont de l'affinité avec le soufre, sont bioaccumulables et toxiques (Viau et Tardif, 2003; Xiao et *al.*, 2014).

Dans la réalité, les organismes sont rarement exposés à une seule substance, Pb et Cd sont souvent simultanément libérés dans l'environnement à partir de nombreuses sources naturelles et anthropogéniques. Différents effets néfastes sont liés à l'exposition combinées aux deux métaux Pb et Cd, en provoquant un problème réel de santé publique (Wang et *al.*, 2011a).

II. Contribution de l'Aliment dans l'Apport en Eléments Traces

Durant les quelques dernières années, de plus en plus de considération a été donnée aux interactions entre le statut nutritionnel de l'organisme et la toxicité des métaux lourds. Ces derniers contaminent l'aliment et par leur caractère bioaccumulateur, causent un risque à long terme pour la santé des animaux et de l'homme aussi.

L'analyse de l'aliment des brebis par la détermination des deux ETM Pb et Cd et des éléments essentiels (Zn, Cu, Ca, Fe) dans la ration nous a permis d'une part d'évaluer l'apport alimentaire en ces éléments et déceler les carences, d'autre part et comme les végétaux sont susceptibles d'absorber les métaux lourds par voie racinaire (diffusion à partir d'un sol contaminé) ou foliaire (déposition à partir de l'atmosphère), ils peuvent être source de contamination des animaux (Perrin, 2007).

L'analyse de l'aliment a révélé que la nourriture des brebis n'est pas contaminée. Les teneurs en Pb et Cd sont très faibles par rapport aux posologies administrées et correspondent aux teneurs habituellement retrouvées dans une alimentation non contaminée. En se basant sur les recherches menées à-propos des fourrages des zones non contaminées, les teneurs en Pb et Cd étaient inférieures à 1 mg /kg de MS (Mehennaoui et *al.*, 1988 ; Underwood et Suttle, 1999). Les teneurs négligeables de Pb et de Cd déterminées ont fait que l'apport alimentaire en éléments traces n'a pas pu contribuer à un changement de la posologie définie pour le traitement. Selon Liu (2003), les niveaux tolérés en éléments traces dans l'aliment pour bétail sont de 30 mg/kg pour le Pb et de 0,5mg/kg pour Cd. Dans notre étude, les doses administrées de 2,5mg/kg de poids vif pour le Pb et 2 mg/kg de poids vif pour le Cd correspondaient à une teneur de 50 mg/kg et de 40 mg/kg de Cd respectivement pour le Pb et le Cd, niveaux déterminés dans des fourrages contaminés destinés aux ruminants; des doses relatives à une consommation quotidienne de 2kg de fourrage pour les ovins.

Dans notre étude, la détermination du Zn dans l'aliment concentré a révélé des niveaux qui correspondaient aux valeurs courantes évaluées à 25- 50 ppm (Coïc et Coppenet, 1989), néanmoins les teneurs de cet élément essentiel dans le foin et la paille sont faibles. La valeur moyenne du zinc est au-dessous de la limite de carence pour les animaux estimées à 45 mg /Kg MS révélée par Lamand (1978). Comparativement aux données indiquées par Blood et

Henderson (1976) et Lamand (1978), les teneurs en Zn et en Cu dans l'aliment étaient au dessous de la limite de carence et inférieures aux références. Les teneurs obtenues en Ca et en Fe dans le foin et l'aliment concentré (maïs et orge) correspondaient aux normes.

L'épithélium intestinal est la principale voie de passage des éléments traces, aussi bien pour ceux sollicités par l'organisme comme le Zn, Cu, Fe, Ca que pour les éléments toxiques. C'est la première barrière à traverser par les éléments métalliques toxiques comme le Pb et Cd suite à une ingestion orale. L'absorption intestinale est influencée par le type de nourriture et le statut nutritionnel de l'animal (OMS, 1993). Plusieurs constituants de l'aliment sont connus pour influencer la biodisponibilité du Pb et Cd. Une carence en Ca et en Fe peut augmenter l'absorption du Pb et du Cd et aggraver la toxicité de ces deux métaux (Lin et *al.*, 2011(a) ; Madeddu et *al.*, 2011), ce qui favorise des interactions avec les éléments essentiels au niveau de la minéralisation de l'os (Xiao et *al.*, 2014). Les éléments traces peuvent interférer avec le métabolisme du Pb et du Cd et réduire la biodisponibilité de ces deux métaux et agir surtout au niveau des sites de liaison (Nzengue, 2008).

Le plomb modifie le métabolisme du Ca; un régime alimentaire carencé en Ca fait augmenter l'absorption du Pb inorganique et la toxicité du Pb. Ce dernier se comporte en compétiteur du calcium et bloque certains échanges cellulaires et les réactions intracellulaires calcium dépendantes (Pearl, 1983; Xiao et *al.*, 2014). Le Cd affecte la distribution du Zn et le Zn réduit la toxicité du Cd. Le Pb modifie le métabolisme et augmente l'excrétion urinaire du Zn. Un régime alimentaire carencé en Zn fait augmenter l'absorption et la toxicité du Pb (Noël et *al.*, 2004 ; Lin et *al.*, 2011(a)).

III. Evaluation du profil Plombémie / Temps

L'empoisonnement au Pb est l'une des causes d'intoxications les plus fréquemment rapportés, chez le bétail au pâturage sans préjuger de l'origine principale de l'exposition (fourrages contaminés, ingestion d'effluents liquides ou de sols contaminés (Smith et *al.*, 2010 ; Pareja-Carrera et *al.*, 2014). Ainsi, le Pb est le premier métal impliqué dans des cas d'intoxication aiguës ou chroniques chez les ruminants.

Dans notre protocole expérimental, l'indicateur retenu pour évaluer l'imprégnation par le Pb est sa concentration mesurée dans le sang, ou plombémie. Selon Gloennec (2015), la plombémie reflète un équilibre entre une contamination en cours, le stockage ou le déstockage du plomb osseux et son élimination. Etant donnée la linéarité de la relation Pb sanguin et concentration en Pb atmosphérique (Bonnard et Falcy, 2006), la plombémie est un bon indicateur du pool de Pb biologiquement actif dans l'organisme. Le dosage du plomb sanguin correspond à une évaluation directe du risque, qu'il faut privilégier aux évaluations indirectes comme le dosage des protoporphyrines (Noble, 1993).

La plombémie (sur sang total) est un indicateur fiable d'une récente exposition, lorsqu'elle est stable. C'est le résultat d'une mesure ponctuelle, ne mesurant pas la charge en plomb de l'organisme, mais reflète le Pb contenu dans le compartiment sanguin (Fussler Bagur, 2011). Elle constitue d'ailleurs, le test le plus communément utilisé pour évaluer l'intoxication pour le Pb chez l'homme et les animaux (Mehennaoui et *al.*, 1988 ; Bonnard et Falcy, 2006). Ainsi, une part importante des données disponibles ne sont pas exprimées en fonction de la quantité ingérée ou inhalée, mais en fonction de la plombémie (concentration sanguine en Pb). Selon Perrin (2007), la plombémie est un bon bio-indicateur de la dose de toxique absorbée.

Les variations des plombémies observées durant ce travail sont liées au métabolisme individuel. L'analyse des concentrations plasmatiques et des graphiques représentatifs des cinétiques durant et après traitement, a révélé une hausse dans les niveaux des concentrations sanguines en Pb chez les deux lots traités au Pb et au Pb+Cd sans atteindre un état d'équilibre. Ces résultats sont en accord avec une exposition répétée à des doses faibles d'éléments traces, isolément ou en combinaison (Pb+Cd) (Mehennaoui et *al.*, 1997). Une augmentation graduelle des teneurs sanguines en Pb a été observée.

Les ruminants absorbent 3 à 10% du Pb ingéré, néanmoins, un apport alimentaire élevé en Ca, P, Fe, Zn et en protéines diminue l'absorption et la rétention du Pb (Bampidis., 2013).

Nous suggérons qu'une augmentation de l'absorption du Pb et par conséquent une détermination de plombémies élevées ont été favorisé par la carence alimentaire en éléments essentiels révélée par l'évaluation de l'apport alimentaire des brebis. Peraza et *al.* (1998) ont noté dans une review que les facteurs nutritionnels jouent un rôle important dans le saturnisme et que les carences en éléments essentiels peuvent accroître la sensibilité à l'intoxication au Pb.

Les concentrations moyennes en plomb dans le sang déterminées chez le lot Pb à la 7^{ème} semaine soit $114,28 \pm 39,60 \mu\text{g/l}$ sont inférieures à celles calculées par Mehennaoui (1995) à savoir $122 \pm 36 \mu\text{g/l}$ chez des brebis traitées au Pb pendant 52j. Par ailleurs, les moyennes des plombémies chez le lot co-exposé sont supérieures à celle du même auteur, $183,58 \pm 82,83 \mu\text{g/l}$ vs $110 \pm 49 \mu\text{g/l}$. Notons que cet auteur avait administré la dose de $2,3 \text{ mg/kg/j}$ de Pb sous forme de chlorure chez les deux lots; tandis que, chez le co-exposé la dose de $2,5 \text{ mg/kg}$ de chlorure de Cd pendant 21j, puis $1,5 \text{ mg/kg}$ pendant 31j.

Si on prend en considération la période de contamination de 9 semaines, le lot Pb a présenté un taux de 11,11% des échantillons dosés, appartenait à la catégorie du saturnisme clinique ($>350 \mu\text{g/l}$) (Rodrigues-estival et *al.*, 2011), ce seuil a été observé à la 9^{ème} semaine de l'exposition, le reste des échantillants appartenait à la catégorie du saturnisme subclinique ($60-350 \mu\text{g/l}$) (Rodrigues-estival et *al.*, 2011). Le lot co-exposé a présenté la teneur la plus importante ($445 \pm 293 \mu\text{g/l}$) et que 33% des plombémies déterminées chez ce lot ont dépassé le seuil du saturnisme clinique ($>350 \mu\text{g/l}$) (Rodrigues-estival et *al.*, 2011). Après arrêt du traitement métallique, le lot co-exposé a conservé des teneurs appartenant à la catégorie subclinique pendant 12 semaine, ce qui indique le caractère cummulatif des ETM. Un taux de 75% de l'ensemble des prélèvements sont classés dans la catégorie du saturnisme subclinique ($60-350 \mu\text{g/l}$) (Rodrigues-estival et *al.*, 2011), cette observation peut suggérer que l'exposition aux sels métalliques durant 9 semaines est favorable pour une biodisponibilité importante du Pb chez les brebis traitées et que l'administration conjointe du Cd a favorisé des plombémies élevées chez le lot co-exposé (Tableau.11).

Par ailleurs, durant les 17 semaines de traitements, nous avons noté précisément 41,18% de l'ensemble des échantillons de sang prélevés sur le lot Pb qui correspondaient au niveau du saturnisme clinique ($>350 \mu\text{g/l}$ (Rodrigues-estival et *al.*, 2011)) (Tableau.11). Ces seuils sans signes apparents de toxicité évoquent l'évolution silencieuse de l'imprégnation saturnine, ce qui rend l'exposition encore plus dangereuse notamment le risque de transfert du Pb aux descendants

ainsi que le passage de cet ETM dans la chaîne alimentaire et le risque que peut représenter pour le consommateur.

Lors d'une étude conduite à Sierra Madrona en Espagne touchant l'élevage ovin et bovin élevés auprès d'une ancienne mine, Rodríguez-estival et *al.* (2012) avaient noté des plombémies élevées chez les veaux et les moutons analysés, 91,4% des prélèvements chez le bovin (n = 58) appartenait à la catégorie associée au saturnisme subclinique et 13,5% des prélèvements chez l'ovine (n= 52) correspondaient à la même catégorie. L'étude avait noté que la contamination était plus importante chez les animaux jeunes. Cependant une autre étude a été réalisée dans la même zone ; c'était pour une évaluation du risque lié au transfert du Pb dans la chaîne alimentaires. Les concentrations du Pb dans le sang ont été déterminées, les moutons analysés n=61 avaient révélés 77.3% des plombémies associée au saturnisme subclinique (Pareja-Carrera et *al.*, 2014).

La nature des sels métalliques peut avoir une influence sur les niveaux des plombémies. Nitrates comme acétates possèdent une bonne solubilité ce qui peut favoriser la biodisponibilité du Pb. Selon Pearl et *al.* (1983), une biodisponibilité forte (5,8 à 8,5% ou 8,4 à 13,9%) a été calculée chez des agneaux suite à une administration du Pb sous forme d'acétates.

On peut également noter que les moyennes des concentrations des plombémies obtenues à partir de la 9^{ème} semaine chez le lot traité au Pb, avaient atteint des niveaux similaires ou supérieurs à ceux obtenue par Liu (2003), une moyenne de 370 µg/l lors de son travail conduit sur des moutons élevés en zones contaminées. Cependant, Phillips et *al.* (2011) avaient trouvé une moyenne des plombémies de 51,5 µg/l suite à une exposition expérimentale chez le mouton, sous forme d'une consommation d'ensilage contaminé, contenant 34 mg/kg de MS de Pb pendant 9 semaines. Smith et *al.* (2010) avaient détecté une moyenne de plombémies de 147 µg/l chez des moutons élevés sur des pâturages de plaines inondables contaminées par les ETM. On constate aussi que les plombémies obtenues durant ce travail sont supérieures à celles obtenues par Mehennaoui et *al.* (1995).

Afin d'évaluer les niveaux d'exposition au Pb du cheptel bovin en Espagne (Galicia), Lopez Alonso et *al.* (2000) ont réalisé une évaluation s'est basé sur la détermination des plombémies chez des veaux n= 438 (de 6 à 10 mois) et des vaches n= 56 (de 2 à 12 ans). Les plombémies déterminés étaient 5,30 µg/l (de ND à 40,9 µg/l) chez les veaux et 12,2 µg/l (de ND à 34 µg/l) chez les vaches. Nos résultats sont supérieurs à ces données considérées comme les plus basses de l'Europe, déterminées chez des bovin en bonne santé, élevés en zones non contaminées.

Les résultats que nous avons obtenus, avaient révélé que la concentration sanguine du Pb quand il est coadministré avec du Cd étaient augmentée, alors que, Nilson et *al.* (1990) ont observé une diminution significative de la biodisponibilité du Pb après l'administration simultanée des deux ETM (Pb+Cd). Les plombémies augmentées lors de coadministration du Pb et du Cd ne sont pas en accord avec les résultats obtenus par Mahaffey (1983). Mehennaoui et *al.* (1997) ont noté que le Cd modifie le devenir du Pb dans l'organisme, la distribution du Pb en présence du Cd semble plus rapide et son élimination est plus importante; ces auteurs ont constaté que pendant le traitement, les plombémies individuelles moyennes du lot co-exposé aux Pb+Cd sont légèrement plus faibles que celles du lot Pb. L'état physiologique des brebis lactantes pourrait influencer négativement les plombémies. Le Pb, en raison de sa similarité avec le calcium, est excrété dans le lait qui, représente une voie non négligeable pour l'excrétion du Pb, qui est éliminé proportionnellement à la concentration observée dans le sang mais sans vraisemblablement dépasser 1 ppm (Fussler Bagur, 2011).

La durée de l'exposition est cruciale pour l'évaluation des interactions de plusieurs métaux en mixture, particulièrement à des doses faibles (Gensheng et *al.*, (2008). Ces auteurs ont conduit une recherche chez le rat sur les biomarqueurs aidant à évaluer les interactions entre trois métaux lourds (Pb, Cd et arsenic (As)) administrés en mixture comparativement à leurs effets quand ils sont administrés seul pour une durée de 30, 90 et 180 jours. Ils ont constaté des interactions entre les différents éléments à différents stades de la biocinétique. Les études ont révélé des niveaux de Pb réduits quand l'administration a été concomitante avec celle du Cd. La cinétique du Pb a été affectée à différents stades surtout au niveau de l'absorption et de la rétention au niveau du rein. Le Cd semble augmenter la rétention du Pb dans les organes notamment l'intestin et le rein (Mehennaoui, 1995).

Plusieurs exemples d'interactions proviennent d'études toxicologiques de mélanges binaires. On observe un effet synergique entre deux produits lorsque l'effet (ou la réponse) obtenu lors d'une exposition mixte est plus grand que l'addition des effets (ou des réponses) obtenus lors d'expositions individuelles aux deux produits. Rappelons que la grande majorité des interactions qui ont été étudiées dans ce genre d'exposition s'est avérée être de nature toxicocinétique. Lors de telles interactions ce sont un ou plusieurs des processus toxicocinétiques (absorption, distribution, métabolisme et excrétion) d'une substance qui sont altérés (Haddad, 2000).

L'intensité des effets toxiques exercés par un xénobiotique est liée à la concentration de l'espèce toxique dans les tissus et organes cibles, or la durée au cours de laquelle ces effets se manifestent dépend de la période pendant laquelle l'espèce toxique est en contact avec le tissu ou l'organe (Viau et Tardif, 2003). Ce pendant, une période d'exposition de 17 semaines à des doses sublétales peut refléter une exposition environnementale au Pb seul ou combiné au Cd. Cette période a pu être d'un côté, suffisante pour établir la relation causale entre une exposition et l'observation d'effets toxiques, notamment vis-à-vis de certains paramètres (qui vont être discutés ultérieurement) considérés comme indicateurs d'une intoxication saturnine, et d'un autre côté, favoriser une interaction binaire entre le Pb et le Cd chez le lot où ces deux éléments ont été coadministrés. Par ailleurs, nous suggérons que la période de co-exposition de 9 semaines à des doses infratoxiques est insuffisante pour mettre en évidence une interaction entre les deux ETM.

Les effets résultant de l'exposition aux deux éléments traces concomitants sont intéressants. Les animaux appartenant au lot co-exposé aux deux métaux ont révélé des paramètres intensément changés et affectés comparativement aux résultats obtenus chez le lot à exposition individuelle (Pb). Selon des études conduites par Nilson et *al.* (1990), les interactions binaires Pb-Cd ont été confirmées et le niveau des plombémies a été significativement réduit avec une exposition concomitante au Cd. Le Cd modifie le devenir du Pb dans l'organisme notamment une augmentation de son élimination dans le lait chez les brebis lactantes ; le pourcentage du Pb excrété par le lait est plus élevé de 0,15% de la quantité totale administrée (Mehennaoui, 1995). Toute fois, de telles observations pharmacocinétiques n'excluent pas une augmentation de la toxicité démontrée par Mahaffey (1981) sur le système hématopoïétique.

Nos résultats suggèrent une synergie entre le Pb et le Cd dans l'altération des indicateurs explorés lors d'une exposition prolongée.

L'ingestion de Cd en même temps que l'ingestion du Pb augmenterait le danger du Pb, surtout pour le lait (Mehennaoui, 1995). C'est pourquoi, le risque de contamination des agneaux pourrait augmenter ainsi que celui en relation avec la santé publique.

Notre étude a révélé un taux de 25% $>350\mu\text{g/l}$ des échantillons prélevés sur l'ensemble des animaux des deux lots confondus appartenant à la la catégorie du saturnisme clinique (Tableau.11). Or ces animaux aux plombémies élevées n'avaient pas révélé des signes apparents de toxicité au moment où les plombémies avaient atteint le maximum, sauf, une anémie modérée. Il faut noter que les paramètres hématologiques et biochimiques ainsi que l'homéostasie des éléments essentiels (Zn et Cu) ont été altérés en fonction de l'augmentation

des plombémies et de la durée de l'exposition. Ceci explique que les signes cliniques chez les animaux exposés ne sont pas toujours corrélés aux concentrations sanguine en Pb (Waldner et *al.*, 2002), sachant que les bovins et les ovins peuvent tolérer des concentrations allant jusqu'à 5 mg/kg poids vif, durant une exposition d'au moins une année sans manifester de signes cliniques (Payne et Livesy, 2010). Selon Mehennaoui (1995), la posologie susceptible d'entraîner une intoxication au Pb chez les ruminants est de 6 à 7 mg/kg/j et aucun effet n'est observé avec une posologie de 3 à 3,5mg/kg/j pendant 30 mois.

Chez le mouton le saturnisme chronique se manifeste par de l'anorexie, de la dépression, des tremblements musculaires, de la faiblesse, de l'ictère, une atonie du rumen et des troubles respiratoires (Pinault et Milhaud, 1998).

Selon Perrin (2007), l'exposition chronique à de petites doses de plomb a des effets nocifs qui ne sont pas toujours cliniquement évidents, néanmoins la teneur maximale tolérable en Pb dans l'alimentation a été fixée à 100 mg / kg MS chez les bovins et les ovins (NRC, 2007).

Les résultats démontrent que les effets nocifs du plomb sur la santé sont corrélés à l'importance de l'imprégnation dans l'organisme. Alors que, cette dernière est liée à la durée et à l'importance de l'exposition.

L'exposition chronique du bétail au Pb, même à des niveaux subcliniques, pourrait conduire à l'accumulation des résidus de Pb dans la viande et les abats à des niveaux supérieurs aux limites légales établies pour la consommation humaine. Il a été constaté que les ovins accumulent moins de Pb comparativement au bovin (Rodríguez-Estival et *al.*, 2012).

Les deux brebis (n° 6, n°9) mortes durant ce travail appartenant au lot Pb+Cd ont respectivement présenté au dernier dosage des plombémies de 271 µg/l et 471µg/l. Il est difficile de définir une valeur seuil de la plombémie à partir de laquelle apparaissent des signes d'effets toxiques. En effet des animaux peuvent supporter des concentrations sanguine en Pb très élevées sans signes cliniques et d'autres pourront développer des manifestations cliniques avec des plombémies faibles (Waldner et *al.*, 2002).

Tableau 11. Classement des prélèvements dans les deux catégories du saturnisme (subclinique et clinique) selon les lots et la durée de l'exposition

Exposition	Nombre de prélèvements	Catégorie		Références
		60-350 µg/l Subclinique	>350µg/l Clinique	
Lot Pb (9 Semaines)	45	89,89%	11,11%	
Lot (Pb+Cd) (9 Semaines)	45	67%	33%	
Lot (Pb+Cd) (Récupération)	60	100%	00%	
Lot Pb (17 Semaines)	85	58,82%	41,18%	
Lot Pb (Récupération)	50	100%	00%	
Lot Pb (Période 2 et 3)	135	70,37%	29,63%	
100% des prélèvements	240	75%	25%	
Zone polluée	52	13,5%	86,5%	Rodríguez-estival et al. (2012)
Zone polluée	61	77.3%	23,7%	Pareja-Carrera et al., (2014)

Après arrêt du traitement, la période de récupération a révélé une tendance vers la baisse des plombémies chez les deux lots exposés. Les plombémies avaient atteint le niveau de 76 ± 26 µg/l chez le lot Pb et le niveau de $67 \pm 8,93$ µg/l chez le lot co-exposé. Néanmoins une mobilisation secondaire peut avoir lieu et le Pb peut alors être mobilisé du foie, de l'os et des autres organes de stockage et redistribué. L'os constitue le réservoir principal pour le Pb dans l'organisme (80 à 90 % du Pb total présent dans l'organisme) (Glorennec et Chanel, 2000). Des processus physiologiques peuvent induire cette redistribution, c'est le cas de la gestation et de la lactation (Mehennaoui, 1995 ; Fussler et Bagur, 2011), ainsi que les carences nutritionnelles où

l'apport calcique ne couvrant pas les besoins de l'animal en Ca. Milhaud et Enriquez (1981) ont noté une augmentation de la plombémie au moment de la mise bas chez des génisses laitières qui avaient été exposées au Pb 7 mois auparavant. Les bovins et les ovins ont une capacité supérieure à l'homme pour mobiliser les éléments minéraux à partir de l'os, au sein duquel a lieu une ostéolyse, surtout de l'os profond, libérant conjointement Pb et Ca dans le sang, en particulier en période de lactation (Mehennaoui, 1995). Après la fin d'une exposition, la plombémie diminue en un ou deux mois jusqu'à un nouvel équilibre dont le niveau est fonction du stock osseux (Glorennec, 2015).

IV. Modélisation Toxicocinétique par Approche Non Compartimentale

Le principe de la modélisation est de s'arrêter au modèle le plus simple qui ne soit pas en contradiction avec les relations expérimentales (Bois, 1999). D'après la synthèse bibliographique précédemment exposée, il s'agit du principe de parcimonie. Pour rappel, le modèle doit être le plus simple possible (nombre minimum de paramètres) tout en répondant aux objectifs de la modélisation et permettant de décrire le plus adéquatement possible nos données (Grenier, 2009 ; Moksassi, 2012).

Cette formulation quantitative donnant des modèles mathématiques de la réalité se base sur un ensemble d'équations mettant en relation des variables connues et mesurées (dose, temps écoulé et concentrations sanguines) au moyen de paramètres toxicocinétiques, qui sont en fait des variables biologiques à résoudre. Selon Zhang et *al.* (2010), l'analyse des données du profil concentration-temps d'un xénobiotique joue un rôle important dans la recherche en toxicocinétique.

Pour sa simplicité, l'analyse non compartimentale est l'un des outils de modélisation les plus utilisés en pharmacocinétique et en toxicocinétique (Zhang et *al.*, 2010). Son principal avantage est qu'elle donne les propriétés générales du système pharmacocinétique (dimension en terme de séjour : MRT (Mean Residence Time: temps de résidence moyen), volume de distribution, clairance) sans considération de la structure du système et les résultats restent interprétables physiologiquement.

Cette analyse est basée sur le temps moyen de séjour d'un xénobiotique étudié à l'intérieur de l'organisme (MRT) et permet notamment de déterminer l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps depuis le moment de son administration et l'infini ($AUC_{0 \rightarrow \infty}$), qui est un indicateur de la quantité de xénobiotique absorbé par l'organisme.

L'application de cette méthode d'analyse dépend de deux conditions. Tout d'abord tous les phénomènes de transfert sont d'ordre 1 et l'élimination se fait à partir du compartiment de transfert (le sang), ce qui a pour conséquence l'additivité des clairances. Deuxièmement, le temps de séjour moyen à l'intérieur du système toxicocinétique est indépendant de la voie d'administration.

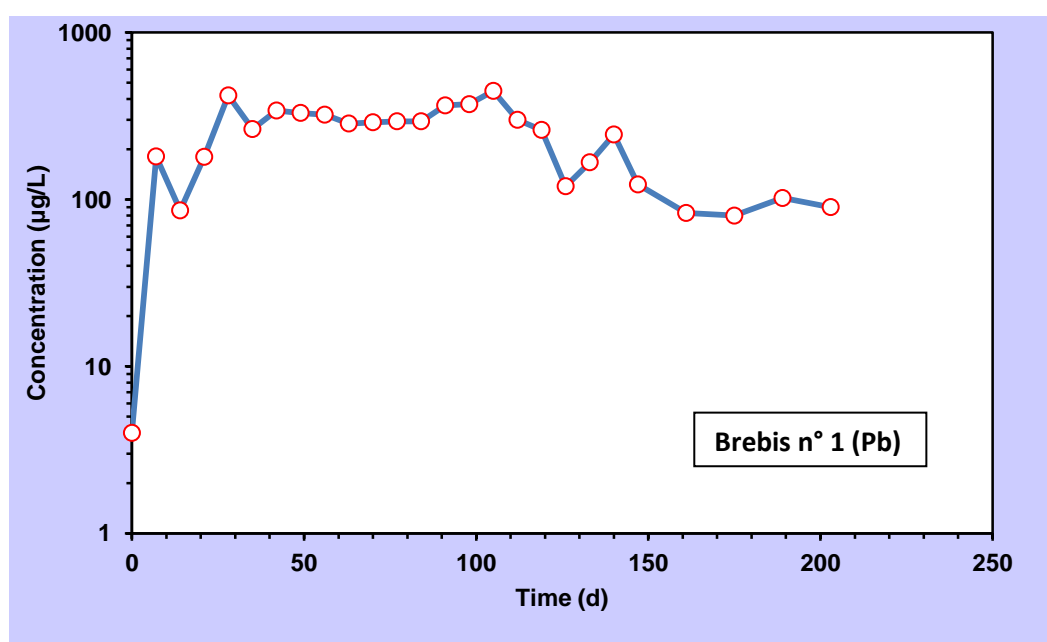
L'étude toxicocinétique du Pb nécessite à la fois la mesure des concentrations sanguines par une technique analytique validée (spectrométrie à absorption atomique), et la quantification du devenir de cet ETM dans l'organisme par des méthodes mathématiques. Les calculs de cette analyse toxicocinétique ont été réalisés à l'aide du logiciel « PK Solver » version 2.0, utilisant un programme d'analyse de régression linéaire adapté, basé sur des équations mathématiques simples permettant une approche descriptive des phénomènes cinétiques.

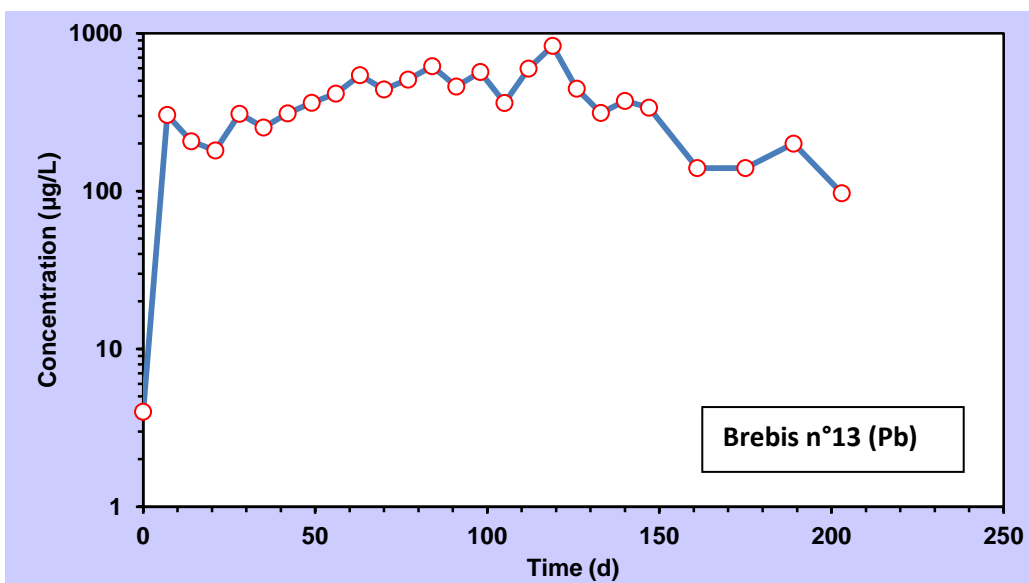
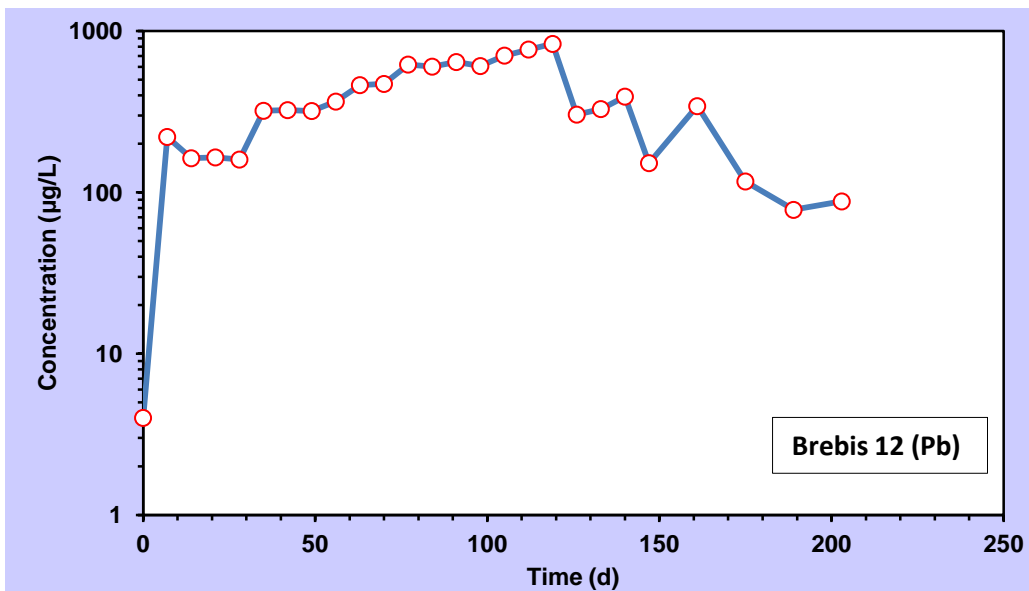
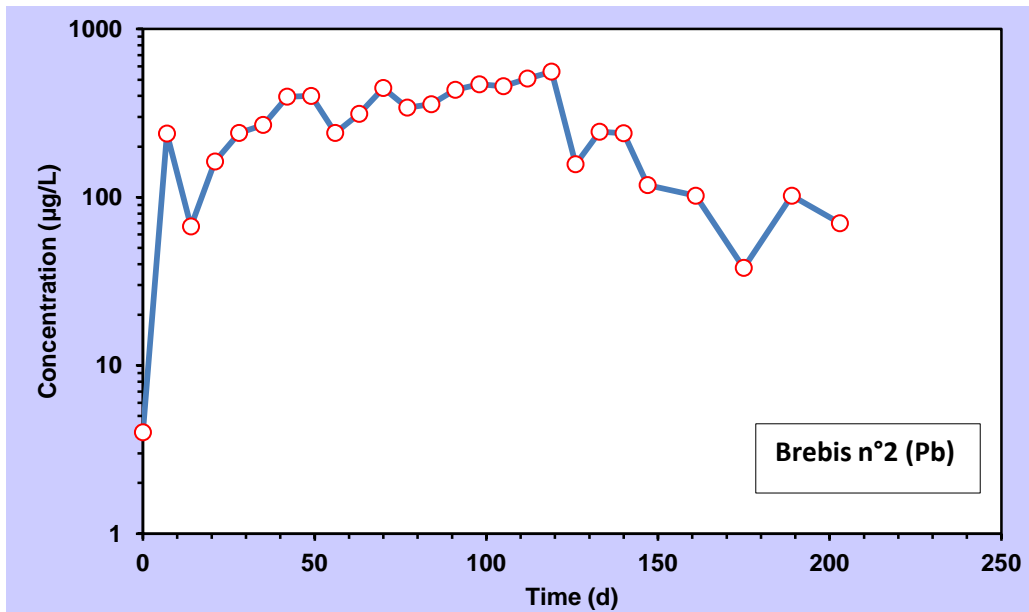
La première partie de l'analyse non compartimentale sera consacrée à la période d'exposition entière ainsi que la période de récupération chez les deux lots (Pb et Pb+Cd). La deuxième partie de cette approche se limitera à la période de 9 semaines de l'exposition, une comparaison entre les deux lots sera réalisée.

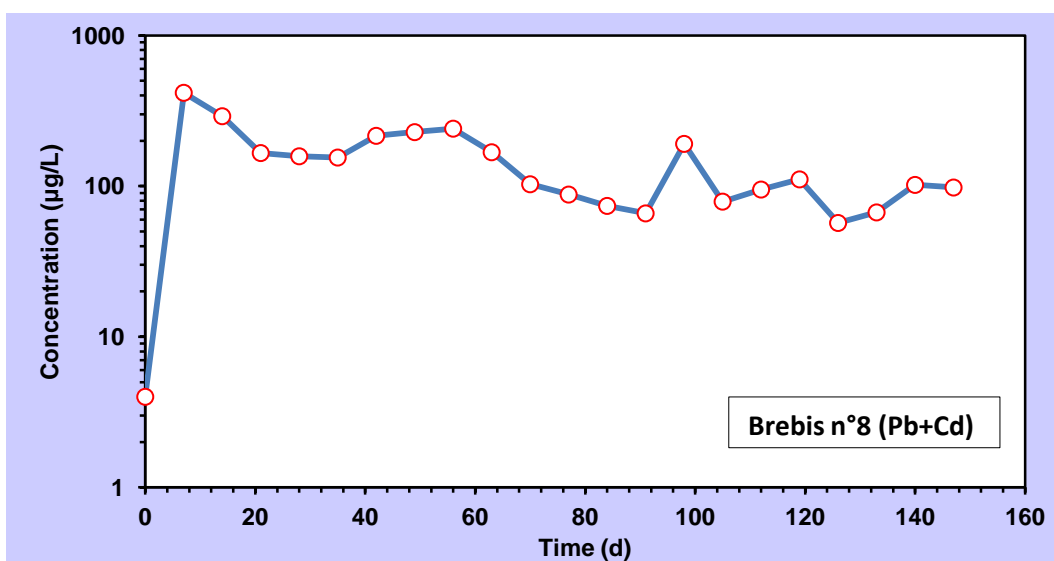
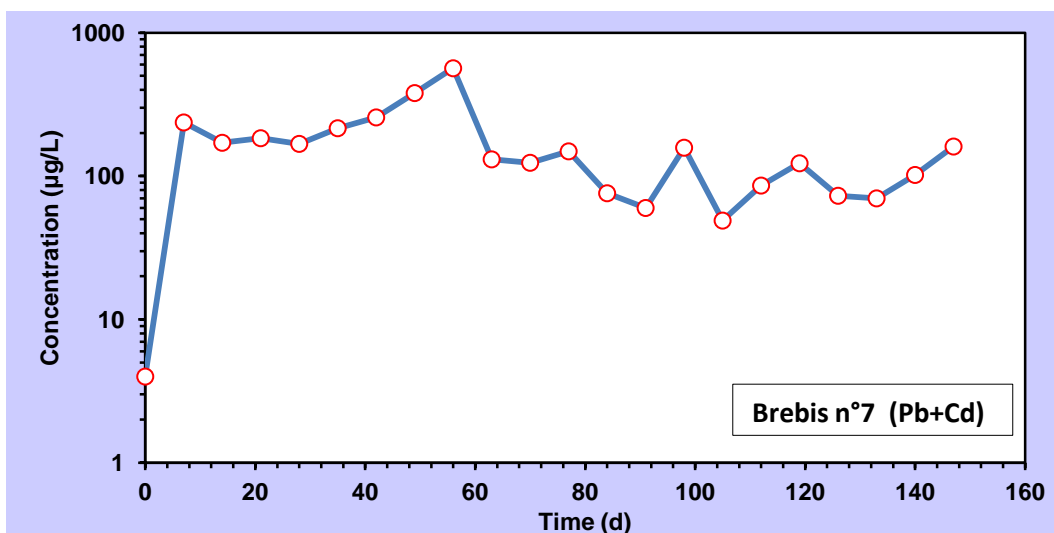
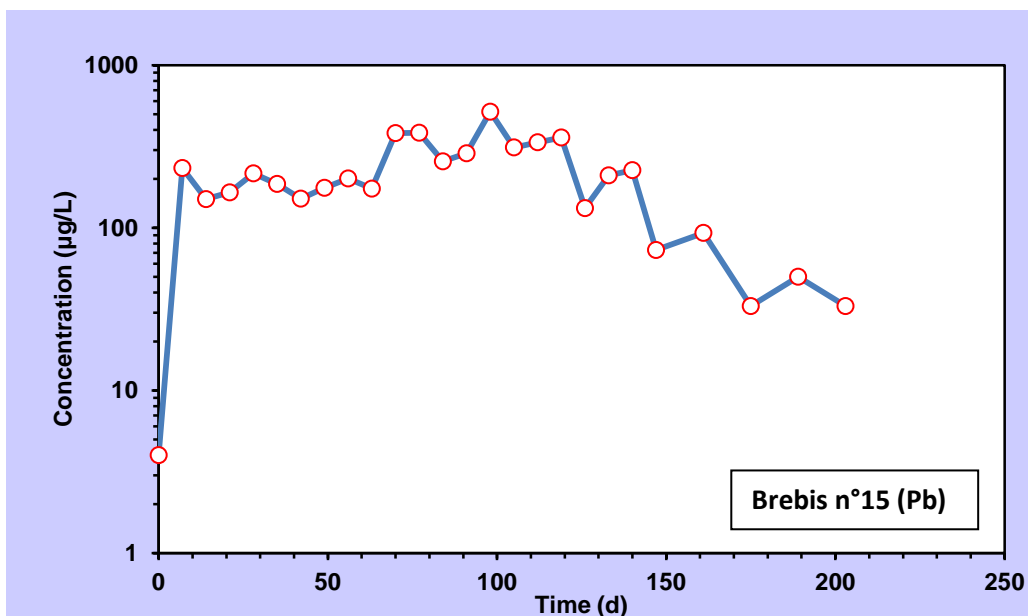
1. Analyse non compartimentale globale chez les deux lots (Pb et Pb+Cd)

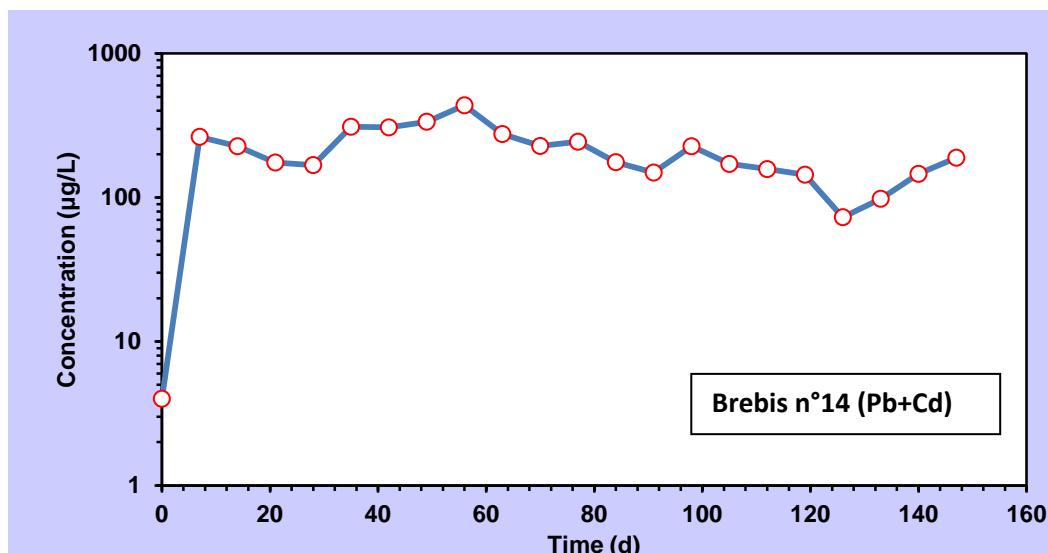
Dans un premier temps, l'évolution des concentrations sanguines en fonction du temps sera présentée sous forme de graphiques illustrant les variations de ces dernières en coordonnées semi-logarithmiques (Figures. 36). Ces figures décrivent l'évolution des plombémies pour chaque brebis en fonction du temps. Ensuite, une adaptation des courbes obtenue par lissage aux points expérimentaux, destinée à passer au mieux par ces points.

Comme les posologies et le rythme d'administration sont bien adaptés, une approche non compartimentale selon la méthode trapézoïdale linéaire après une perfusion constante par voie intraveineuse a été réalisée pour l'analyse de la cinétique du plomb à l'intérieur de l'organisme.









Figures 36. Evolution des plombémies individuelles (exprimées en $\mu\text{g/l}$) présentées en coordonnées semi-logarithmiques chez les brebis des deux lots (Pb) et (Pb+Cd) pendant et après exposition.

Le mode d'administration réitéré, continu et par voie orale a été adopté durant cette expérimentation. Avant l'exposition des brebis, les plombémies étaient non détectables. Les concentrations ont révélé une montée progressive et irrégulière après l'administration du nitrate de Pb. La cinétique évolue en dessinant des oscillations (Figure. 37) entre les concentrations maximales et minimales.

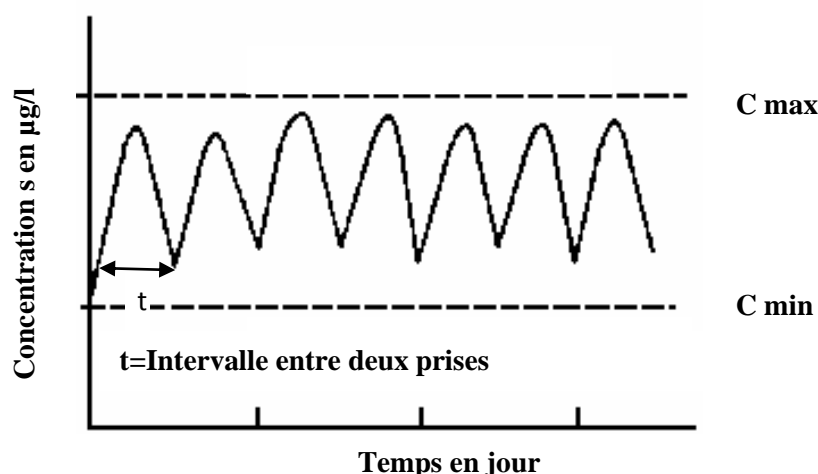
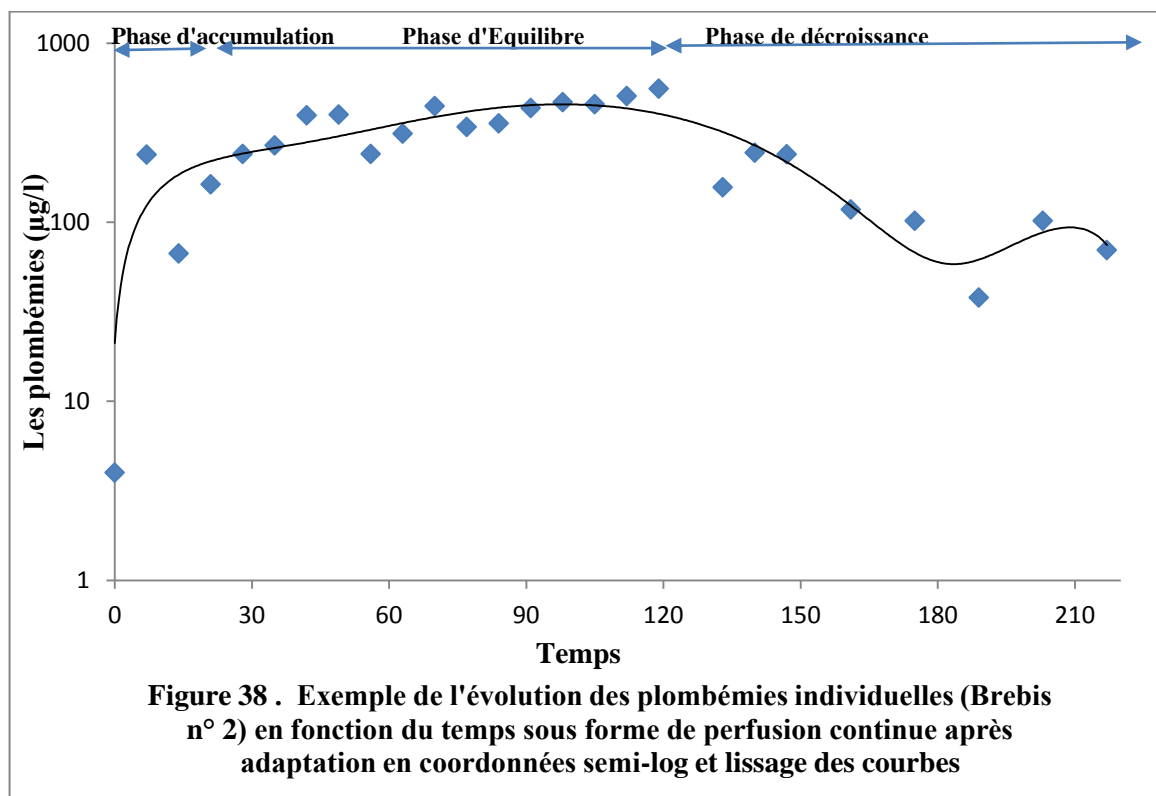


Figure 37. Plombémies en plateau (Oscillations entre les concentrations maximales C_{max} et minimales C_{min} après administration répétées de la même dose de Pb.

Le taux sanguin en Pb est variable et représenté par une courbe continue qui serait obtenue par perfusion à débit constant de la même dose journalière sur 24 h.

Lors d'une administration multiple, l'amplitude des oscillations est conditionnée par l'effet dose, effet élimination et effet intervalle (temps). Avec lissage des oscillations, la courbe prendra l'allure d'une cinétique relative à une perfusion continue (figure. 38).



La description graphique de l'évolution de la cinétique du Pb chez les deux lots présente une courbe en trois phases.

- **Une phase d'accumulation :**

Caractérisée par un débit d'entrée ou vitesse de perfusion supérieure à la vitesse d'élimination, néanmoins, selon Zmudzki (1985), seulement $1,3 \pm 0,85\%$ du plomb administré oralement est absorbé chez le mouton adulte. Les plombémies évoluent vers la hausse en fonction de l'administration des sels métalliques. Dans un premier temps, après son administration, le Pb se répartit dans tout l'organisme alors que débute l'élimination urinaire, une première, rapide, correspondrait à l'élimination du plomb non fixé.

Autant de processus toxicocinétiques peuvent s'accorder à cette phase ascendante, les trois étapes de la cinétique, absorption, la distribution tissulaire et l'élimination urinaire du Pb

qui débutent quasi simultanément. Il est à noter qu'il n'y a pas d'effet de premier passage dans la cinétique du Pb (métabolisation).

- **Une phase d'équilibre (plateau) :**

Caractérisée par des concentrations sanguines moyennes stationnaires, la vitesse d'entrée du Pb est égale à la vitesse de sortie et la vitesse (ou la clairance) d'élimination est proportionnelle à la concentration, ce qui caractérise les cinétiques dites d'ordre 1. Pendant cette phase, les tissus durs (os) s'enrichissent de façon plus lente au détriment des tissus mous (foie, rein, système nerveux central...) et de la teneur sanguine. En même temps l'élimination urinaire se poursuit. Il faut noter que le temps nécessaire pour atteindre un plateau est 5 fois le $t_{1/2}$ (temps de demi-vie), donnant ainsi un état d'équilibre (Gibaldi et Perrier, 1982 ; Schorderet et al., 1989). L'état d'équilibre réel n'étant pas atteint, les plombémies sont en phase de croissance rapide ; une durée d'exposition plus longue est nécessaire pour atteindre le plateau. Cette phase correspond à l'absorption, distribution et élimination.

- **Une phase de décroissance:**

Caractérisée par l'arrêt de l'administration du Pb qui correspond à la distribution et à l'élimination; les concentrations sanguines du Pb diminuent. Cependant, il pourrait y avoir une redistribution moins importante à partir des tissus (foie, rein et os) grâce aux échanges avec le sang. Notons que la vitesse d'élimination est faible pour le Pb; elle est en relation avec la concentration sanguine.

Le squelette de la brebis représente 20% du poids vif, la quantité totale de plomb stockée dans l'os 81 jours après la fin du traitement est de 109 mg, soit 74% de la dose disponible (absorbée). Le foie et le rein pèsent respectivement en moyenne 700g et 270g. Les quantités totales fixées dans ces organes sont de l'ordre de 0,5 mg de Pb dans le foie et 0,15 mg de Pb dans le rein, soit un pourcentage respectif de la dose disponible de 0,34% et 0,1%, 81 jours après arrêt du traitement (Mehennaoui et al., 1995).

A long terme, on aura dans l'organisme, 25% de Pb dans le foie, 4% dans les reins, 3% dans la paroi digestive, 3% dans le système réticulo-endothélial et 4% dans les autres tissus du corps, y compris les dents et les poils, alors qu'il y aura 60% dans les os (Humphreys, 1991 ; Bismuth et al., 2002).

Il existe un équilibre entre les taux de plomb osseux et sanguin, qui peut être rompu en diverses circonstances, en particulier toutes celles à l'origine d'une déminéralisation osseuse (gestation, lactation) ou de modifications de l'absorption. La résorption massive du plomb depuis ses zones de stockage peut avoir pour conséquence une exposition endogène d'autres tissus suivie de l'apparition de signes de toxicité (Mushak, 1993), liés à une élévation de la plombémie.

L'analyse toxicocinétique des concentrations en Pb dans le sang a été effectuée pour chaque animal des deux lots traités au Pb et au Pb+Cd. Les paramètres toxicocinétiques individuels sont rapportés dans le tableau n°11, pour le lot Pb et dans le tableau n°12 pour le lot Pb+Cd.

Tableau 12. Paramètres toxicocinétiques individuels chez les animaux traités au Pb

Animaux du Lot Traité au Plomb					
Paramètres	N° 1	N°2	N°12	N°13	N°15
λ_z (1/j)	0,0151	0,0212	0,0237	0,021	0,0284
$t_{1/2}$ (j)	46	33	29	38	26
T_{max} (j)	105	119	119	119	98
C_{max} ($\mu\text{g/l}$)	447	558	834	833	517
AUC_{0-t} ($\mu\text{g/l.j}$)	44600,5	50921,5	71260	69821,5	38843
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g/l.j}$)	50551	54225	74977	74487	40076,5
$AUMC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g/l.j.j}$)	5472422,29	5354050,54	7775359,46	7837678,49	3684374
$MRT_{0-\infty}$ (j)	49	39	44	46	32,5
V_{ss} l/kg)	0,0024	0,0018	0,0015	0,0015	0,002
Cl (mg/kg)/j	0.000049	0.000046	0.000033	0.000033	0.000062

l'approche non-compartmentale permet d'extraire rapidement et simplement les paramètres PK du xénobiotique étudié à partir du profil de concentration plasmatique (Jianghong et al., 2014).

Tableau 13. Paramètres toxicocinétiques individuels chez les animaux traités aux Pb+Cd

Paramètres	Animaux du Lot traité aux Pb+Cd		
	N°7	N°8	N°14
λ_z (1/j)	0,00845	0,0096	0,011
$t_{1/2}$ (j)	82	72	63
T_{max} (j)	56	7	56
C_{max} ($\mu\text{g/l}$)	566	417	437
AUC_{0-t} ($\mu\text{g/l.j}$)	24237,5	21875	30870
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g/l.j}$)	43286	32115	48036
$AUMC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g/l.j.j}$)	6531260,38	3830664	6113171,5
$MRT_{0-\infty}$ (j)	91	60	68
V_{ss} (l/kg)	0,00528	0,00465	0,00353
Cl (mg/kg/j)	5,77554E-05	7,78446E-05	5,2045E-05

λ_z : constante d'élimination d'ordre 1

$t_{1/2}$ (j) : temps de demi-vie

T_{max} (j) : temps de la concentration maximum

C_{max} ($\mu\text{g/l}$) : concentration maximum

$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g/j}$): aire sous la courbe

$AUMC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g/l.j}$): Moment d'ordre 1 de la courbe des concentrations en fonction du temps

$MRT_{0-\infty}$ (j): temps de séjour moyen (Mean Residence Time)

V_{ss} (l/kg): volume de distribution à l'état d'équilibre

Cl (mg/kg/j): clairance totale

Les résultats des plombémies ont révélé une grande variabilité individuelle pour les animaux des deux lots. Les conséquences de l'exposition à une substance varient d'un individu à l'autre (Adamou, 2008) et les caractéristiques individuelles modulent le devenir des substances dans l'organisme (toxicocinétique (TK)). A travers la comparaison des paramètres individuels on a pu constater que, trois animaux sur cinq du lot Pb (n°2, n°12, n°13) et deux animaux sur trois dans le lot co-exposé (n°7 et n°14) ont présenté des C_{max} à la dernière semaine de

l'exposition (T_{\max}). Par ailleurs, la plombémie a atteint un pic dès la première semaine d'exposition (T_{\max}) chez la brebis n°8 (Lot Pb+Cd).

Le pic de concentration reflète un point d'équilibre entre les phases de l'absorption et la phase de l'élimination, sachant que dès la phase de l'absorption, une fraction du Pb est déjà éliminée. T_{\max} est le temps nécessaire pour obtenir la plombémie maximale et reflète approximativement la phase de l'absorption. Sur les graphiques de l'évolution des plombémies individuelles après adaptation en coordonnées semi-log et lissage, le pic est remplacé par un plateau (Figure 38).

λ_z est une constante d'élimination correspondant à la pente de décroissance terminale, sa valeur est estimée par régression linéaire en utilisant au moins le logarithme des 3 dernières concentrations mesurées en fonction du temps. Cette constante d'élimination d'ordre 1 est proportionnelle à la concentration plasmatique du Pb, à la clairance et inversement proportionnelle aux $t_{1/2}$, MRT et au volume de distribution V_s .

La valeur de cette constante est faible dans les deux lots. Quand il s'agit d'un ETM comme le Pb, la phase de l'élimination est très lente. Ceci est dû au caractère cumulatif du Pb et sa persistance dans l'organisme.

Il est à noter que λ_z est utilisée pour calculer le $t_{1/2}$ par l'équation :

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{\lambda_z} = \frac{\ln(2) V_s}{Cl} \quad (1)$$

$$\ln(2) = 0.693$$

Les temps de demi-vie ($t_{1/2}$: temps nécessaire pour que la plombémie décroisse de moitié) sont variables entre les animaux du même groupe. Ce paramètre est le plus classiquement utilisé pour quantifier l'élimination ou la rémanence du Pb dans l'organisme.

La brebis n°1 a révélé une demi vie la plus grande (46j) et la brebis n° 15 la demi vie la plus petite (26j) dans le lot Pb. La brebis n°7 (lot Pb+Cd) a révélé un $t_{1/2}$ le plus important (82j) de tous les animaux des deux lots.

Quand le temps de $t_{1/2}$ est faible le Pb s'élimine rapidement et ne persiste pas longtemps dans l'organisme. Au contraire, quand $t_{1/2}$ est grand cela traduit une élimination faible et par conséquent un temps de séjour (MRT) grand.

Pour rendre compte du véritable niveau d'exposition chez les brebis, la règle linéaire des trapèzes a été utilisée pour le calcul du premier moment statistique S_0 (AUC: Area Under the Curve versus time) qui correspond à l'aire ou la surface sous la courbe des plombémies, reflétant ainsi la quantité de substance ayant atteint la circulation systémique.

AUC_{0-t} du temps zéro jusqu'au temps 'n=203 jours' de la dernière concentration mesurable (AUC_t) est calculée par la méthode linéaire des trapèzes dans la portion ascendante du profil des concentrations par l'équation suivante où C_i est la concentration mesurée au temps t_i et t_n est le temps correspondant à la dernière concentration mesurée:

$$AUC_t = \sum_{i=1}^n \frac{(C_i + C_{i-1})(t_i - t_{i-1})}{2} \quad (2)$$

L'exposition totale des brebis est estimée par l'AUC extrapolée à l'infini ($AUC_{0-\infty}$), correspondant à la somme de l' AUC_{0-T} et l' $AUC_{last-\infty}$ (extrapolée). Cette dernière correspond à la dernière concentration plasmatique mesurée divisée par la constante de vitesse terminale d'élimination ($ke = \lambda_z$).

$$AUC_{last-\infty} = \frac{C_{last}}{\lambda_z} \quad (3)$$

$AUC_{0-\infty}$ est calculé par l'équation:

$$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + \frac{C_{last}}{\lambda_z} \quad (4)$$

L'AUC extrapolée à l'infini est inversement proportionnelle à la clairance d'élimination (CL).

Bien que les écarts-types associés à AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$, soient importants, les brebis traitées ont présenté des valeurs moyennes AUC_{0-t} et $AUC_{0-\infty}$ élevées. Cela s'explique par les plombémies élevées déterminées lors de ce travail, et la période de l'exposition assez longue notamment chez le lot Pb.

Il faut noter cependant, l'importance des écarts-types qui avoisine le quart de la valeur de l'AUC, soit un coefficient de variation de 26.8% et de 19,86 % respectivement chez le lot Pb et le lot co-exposé. Cette variation interindividuelle est due certainement au comportement métabolique propre à chaque brebis. L'AUC permet une description précise pour chaque sujet, même si la variabilité interindividuelle des paramètres estimés est grande (Azzopardi et al., 2011).

Le deuxième moment statistique représente la surface sous la courbe des moments statistiques, S_1 (AUMC: (Area Under the first Moment of the Concentration versus time curve). La fraction extrapolée est obtenue par l'équation:

$$AUMC_{0 \rightarrow \infty} = \frac{t_n C_n}{\lambda_z} + \frac{C_n}{\lambda_z^2} \quad (5)$$

Les valeurs des AUC et AUMC servent au calcul du MRT (Mean Residence Time). Ce paramètre se calcule à partir du profil des concentrations en fonction du temps obtenu suite à une administration intraveineuse du Pb sur un temps d'infusion t_{inf} , par l'équation:

$$MRT = \frac{AUMC_{0-\infty}}{AUC_{0-\infty}} - \frac{t_{inf}}{2} \quad (6)$$

Le calcul du MRT est un autre moyen de mesurer le temps passé par le Pb dans tout l'organisme. Il prend donc en compte l'ensemble des processus cinétiques et reflète la vitesse de l'absorption globale. Le MRT individuel varie dans le lot Pb du plus faible chez la brebis n°15 (32.5j) au plus élevé révélé par la brebis n°1(49j). Les brebis du lot co-exposé ont révélé un MRT le plus élevé notamment chez la brebis n° 7 (91j). Le MRT est proportionnel au $t_{1/2}$ et inversement proportionnel à la clairance.

Ainsi on pourra également estimer le volume de distribution total apparent du Pb (V_{ss}) par l'équation :

$$V_{ss} = \frac{Dose \cdot AUMC}{AUC^2} = CL \cdot MRT \quad (7)$$

Le volume de distribution (V_{ss}) permet d'apprécier la diffusion du Pb dans l'organisme, sa valeur est inversement proportionnelle à la concentration sanguine. Plus ce volume est important, plus le xénobiotique se distribue dans les tissus; plus il est petit, plus la substance va rester dans le compartiment sanguin (Schorderet et al, 1989 ; Jianghong et al., 2014).

Etant données les valeurs faibles de V_{ss} , cette analyse a révélé une distribution étroite et limitée du Pb à l'intérieur de l'organisme. Ceci s'explique par l'absence d'affinité du Pb pour le tissu adipeux, il demeure en grande partie dans la circulation sanguine avant d'être réparti entre les tissus mous et durs. C'est le cas des substances possédant une affinité pour les constituants sanguins (protéines et globules rouges). La distribution faible du plomb explique les plombémies élevées durant les traitements métalliques chez les deux lots.

L'élimination du Pb s'effectue généralement via plus d'un organe, qui sont tous reliés par le système sanguin, la clairance (Cl) totale doit donc être égale à la somme des clairances des différents organes. Ce paramètre est calculé par l'équation :

$$Cl = \frac{D}{AUC_{0-\infty}} = \frac{V_s}{MRT} \quad (8)$$

Cl permet de quantifier la capacité de l'organisme à éliminer le Pb. La détermination des paramètres toxicocinétiques a révélé des Cl faibles chez les deux lots, ce qui explique une élimination faible du Pb. La distribution très étroite ainsi que les AUC et MRT importants expliquent les faibles capacités d'épuration de l'organisme.

Les valeurs moyennes et écart-types des paramètres toxicocinétiques relatifs aux deux lots sont rassemblées dans le tableau n°14.

Le calcul des moyennes des paramètres toxicocinétiques dans chaque lot et la comparaison entre les deux lots ont montré qu'en dépit de la différence du temps d'exposition, la cinétique du Pb a été modifiée par la présence du Cd.

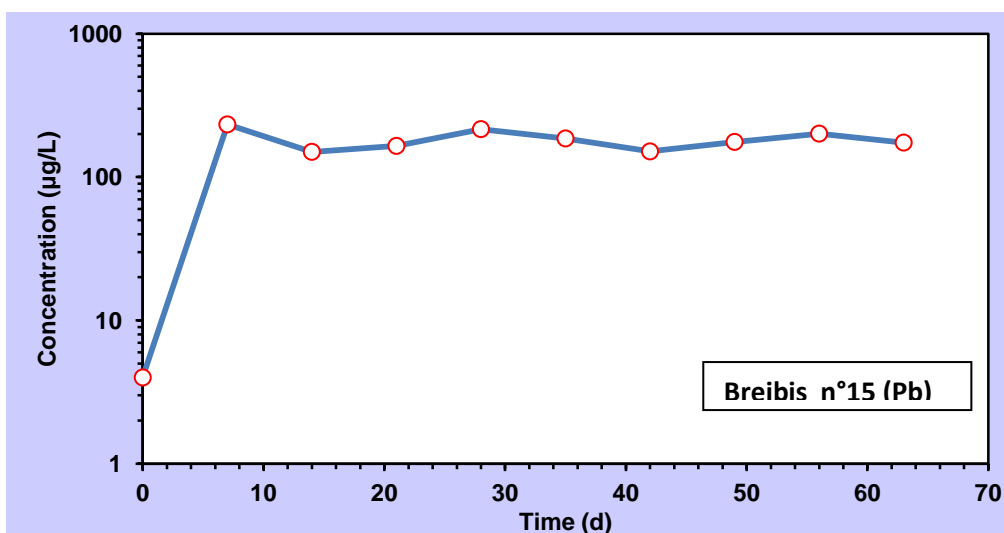
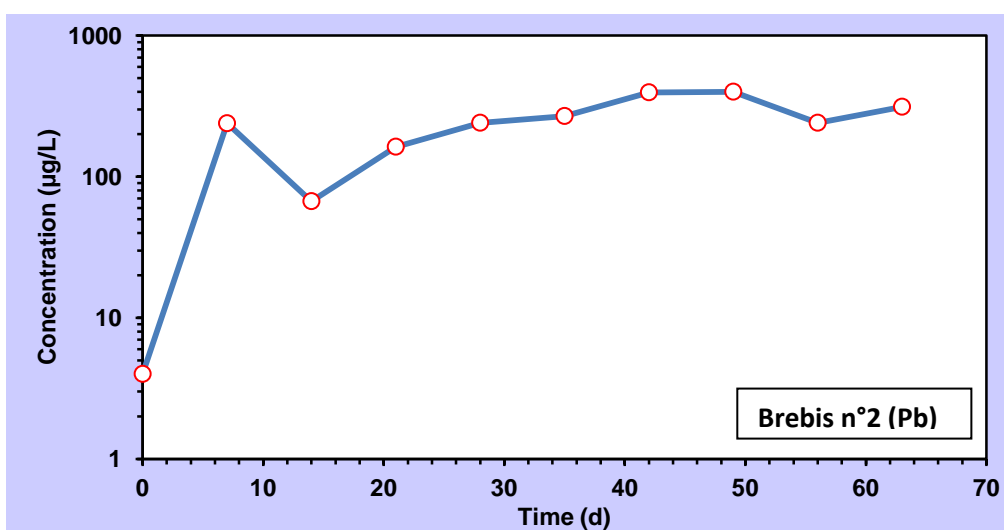
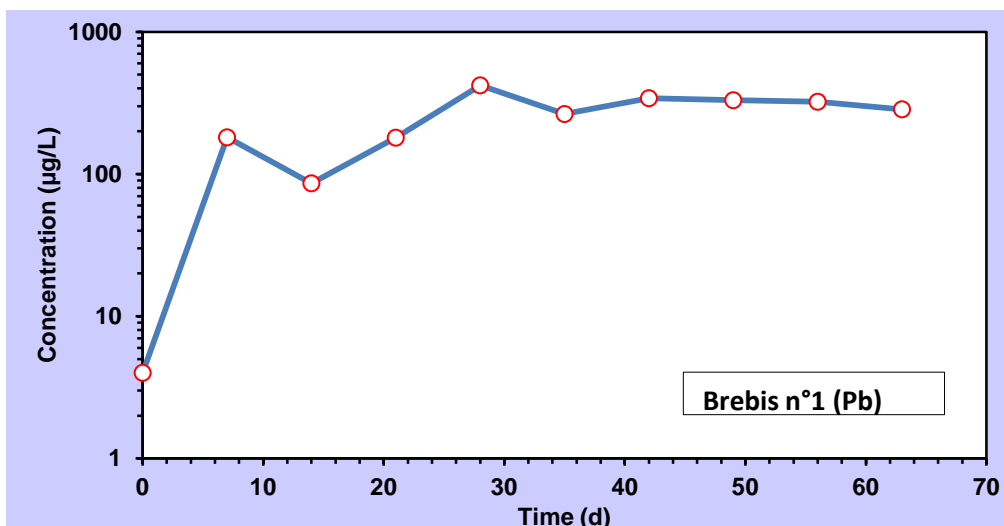
Notons que, λ_z est plus faible ($p < 0,05$) dans le lot co-exposé comparativement au lot Pb ($0,0097 \pm 0,0013$ 1/j vs $0,0215 \pm 0,0043$ 1/j). Ceci suggère que le Cd prolonge la persistance du Pb dans l'organisme. Nous avons constaté qu'en présence du Cd la valeur moyenne du $t_{1/2}$ a doublé ($34 \pm 7,8$ j vs $72,5 \pm 9,5$ j) $P < 0,005$ et la durée moyenne du MRT est plus élevée $P < 0,05$ chez le lot co-exposé ($73 \pm 16,5$ j vs $42 \pm 6,4$ j), malgré un temps d'exposition plus court.

Tableau 14. Paramètres toxicocinétiques (Moyennes \pm Ecart types) chez les deux lots traités

Paramètres	Lot Pb	Lot Pb+Cd
λ_z (1/j)	0,0215 \pm 0,0043	0,0097 \pm 0,0013
$t_{1/2}$ (j)	34 \pm 7,8	72,5 \pm 9,5
T_{max} (j)	112 \pm 9,9	40 \pm 28,29
C_{max} (μ g/l)	637,8 \pm 183	473,33 \pm 80,9
AUC _{0-t} (μ g/l.j)	55089 \pm 14747	25661 \pm 4663
AUC _{0-∞} (μ g/l.j)	58863 \pm 15389	41146 \pm 8173
AUMC _{0-∞} (μ g/l.j.j)	6024777 \pm 1773669	5491698,5 \pm 1453608
MRT _{0-∞} (j)	42 \pm 6,4	73 \pm 16,5
V_{ss} (l/kg)	0,0019 \pm 0,00038	0,0049 \pm 0,00089
Cl (mg/kg/j)	0,0000457 \pm 0,000012	0,0000625 \pm 0,000014

2. Analyse non compartimentale durant les 9 semaines d'exposition et comparaison entre les deux lots Pb et (Pb+Cd)

Une analyse non compartimentale des 9 première semaines de l'exposition aux sels métalliques a été réalisée chez les brebis des deux lots. L'évolution des plombémies est illustrée en coordonnées semi-logarithmiques par les figures 39 et 40 pour les deux lots Pb et (Pb+Cd) respectivement. Les paramètres toxicocinétiques sont présentés dans le tableau n°15 pour le lot Pb et dans le tableau 16 pour le lot co-exposé.

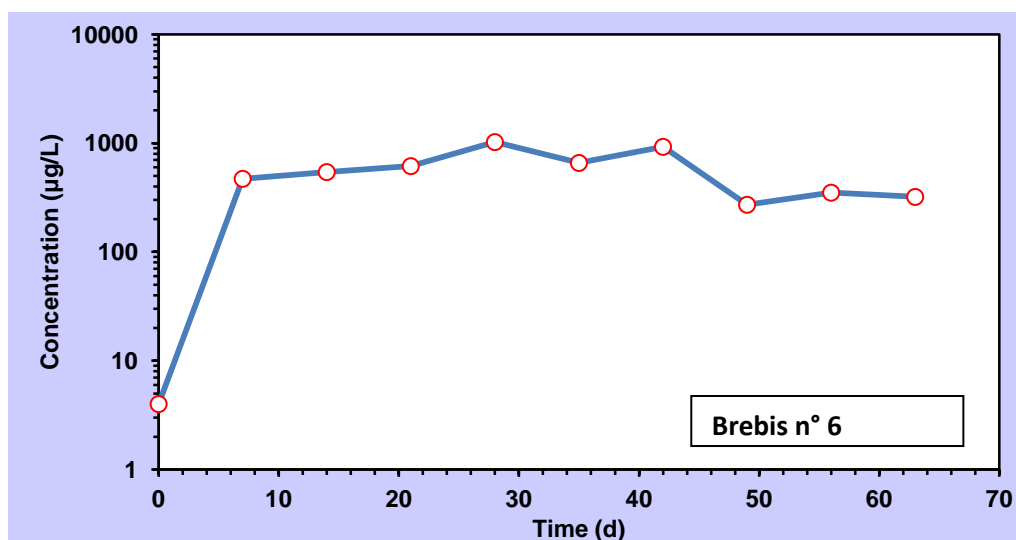


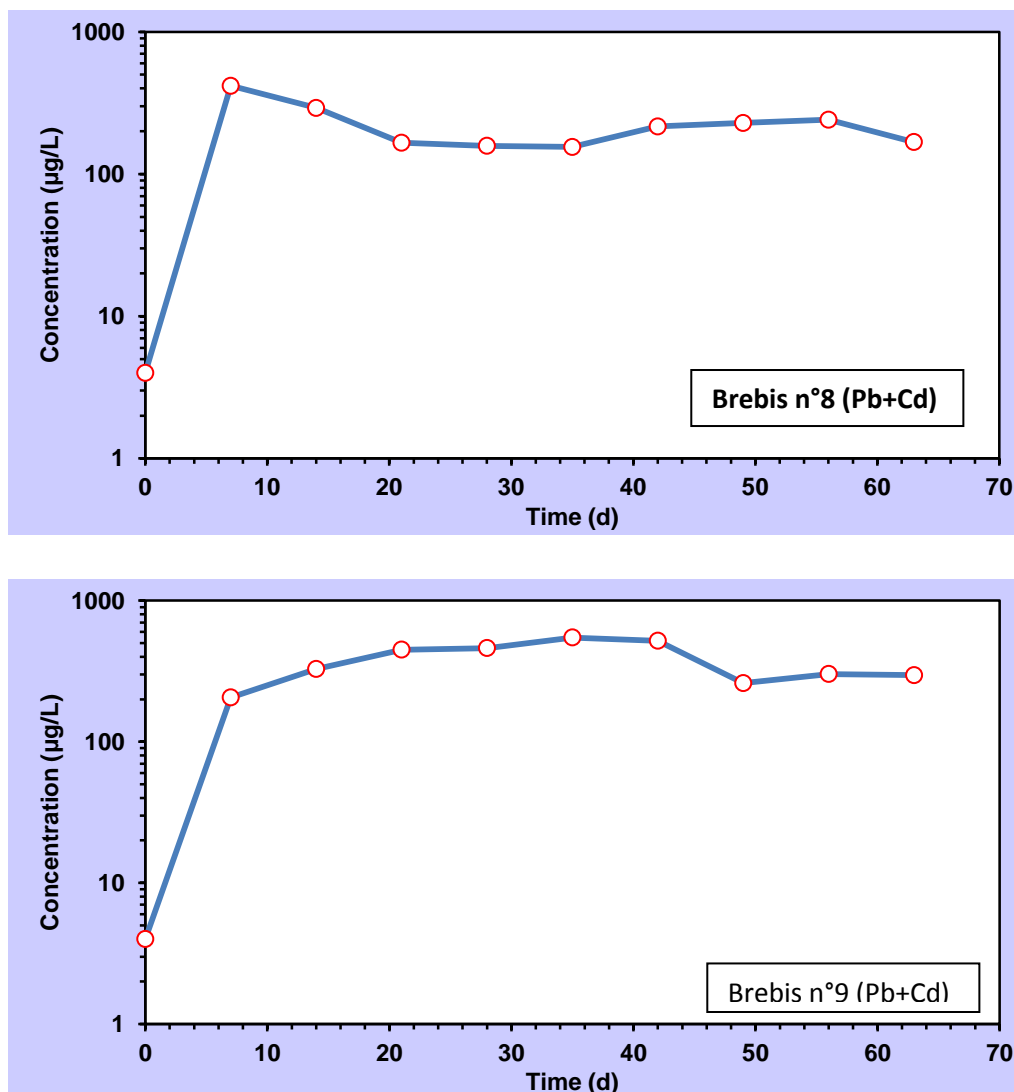
Figures 39. Evolution des plombémies individuelles (exprimées en µg/l) présentées en coordonnées semi-logarithmiques chez les brebis du lot (Pb) pendant les 9 semaines de l'exposition.

Tableau 15. Paramètres toxicocinétiques chez les brebis du lot Pb après 9 semaines d'exposition.

Paramètres	Animaux du Lot Traité au Plomb				
	N° 1	N°2	N°12	N°13	N°15
T_{\max} (j)	28	49	63	63	7
C_{\max} ($\mu\text{g/l}$)	420	400	543	463	233
AUC_{0-t} ($\mu\text{g/l.j}$)	15879,5	15221,5	18315,5	15914,5	10969
V_{ss} (l/kg)	0,00533206	0,00382636			0,01284949

Après 9 semaines d'exposition, l'évolution des plombémies révèle une phase dynamiques de croissance, l'absorption et la distribution peuvent être décrites par l'analyse; la phase de l'élimination est négligeable. Les paramètres relatifs aux capacités de l'épuration de l'organisme (λ_z , $t_{1/2}$, Cl) ne feront pas l'objet d'une description analytique.





Figures 40. Evolution des plombémies individuelles (exprimées en µg/l) présentées en coordonnées semi-logarithmiques chez les brebis du lot (Pb+Cd) pendant les 9 semaines de l'exposition.

Le volume de distribution (V_{ss}), paramètre caractérisant la distribution ne peut être calculé chez les brebis n°12 et 13 du lot Pb et les brebis n°7 et 14 du lot (Pb+Cd) (Figures 39,40) pour les raisons suivantes: comme l'élimination est infime pendant cette période, il y a moins de 3 points à la phase terminale (la phase log-linéaire de décroissance terminale des concentrations est inexistante), en outre, la tendance ascendante de l'évolution des concentrations révélée à la phase terminale. Néanmoins, la comparaison entre les deux lots peut toucher ce paramètre.

Tableau 16. Paramètres toxicocinétiques chez les brebis du lot (Pb+Cd) après 9 semaines d'exposition

Paramètres	Animaux du Lot traité aux Pb+Cd				
	N°6	N°7	N°8	N°9	N°14
T_{max} (j)	28	56	7	35	56
C_{max} (µg/l)	1025	566	417	548	437
AUC_{0-t} (µg/l. j)	35185,5	15725,5	13713	22557,5	16548
V_{ss} (l/kg)	0,00066482		0,00313828	0,00186983	

La comparaison entre les paramètres toxicocinétiques (Moyennes et Ecartypes) calculés chez les deux lots (tableau. 17) révèle un changement dans le devenir du Pb dans l'organisme quand il est combiné au Cd, mais sans signification statistique ($P \geq 0,1$). Chez le lot co-exposé la C_{max} est plus grande que chez le lot Pb et ce pic a été atteint plus tôt (T_{max}) que chez le lot Pb.

La distribution du Pb chez le lot co-exposé est plus étroite comparativement au lot Pb, ceci suggère des interactions entre les deux ETM au niveau des sites de fixation tissulaires. Le Cd empêche la distribution du Pb au niveau des tissus et favorise sa persistance dans le sang.

Les AUC_t élevées chez le lot co-exposé sont le reflet d'une exposition totale plus importante que chez le lot Pb. Il faut noter que la même dose ne conduit pas aux mêmes expositions. En plus de la variabilité individuelle influençant le devenir du Pb à l'intérieur de l'organisme, il existe des variations exogènes liées notamment aux interactions entre les deux ETM, c'est le cas de la co-exposition Pb+Cd.

Tableau 17. Paramètres toxicocinétiques chez les deux lots de brebis traités Pb et (Pb+Cd) après 9 semaines d'exposition (Moyennes±Ecartypes).

Paramètres	Lot Plomb	Lot Plomb-Cadmium
T_{max} (j)	42±24	36,4±21
C_{max} (µg/l)	412±102	598,6±247
AUC_{0-t} (µg/l.j)	15260±2672	20746±8719
V_{ss} (l/kg)	0,007336±0,004834	0,001891±0,001237

Les valeurs moyennes de l' AUC_{0-t} calculées chez les deux lots traités sont supérieures aux valeurs trouvées par Mehennaoui (1995), 5940±1487j/µg/l et 2567±4663 j/µg/l respectivement, chez des brebis exposées au Pb et co-exposées aux Pb+Cd. Cet auteur a mené l'expérimentation sur des brebis lactantes. Notons que le Cd semble augmenter l'excrétion du Pb par le lait (Mehennaoui., 1995). Toutefois, cela ne porte pas des changements aussi importants, sachant que l'excrétion du Pb par le lait est de l'ordre de 0.1% de la dose totale administrée (Humphreys., 1991; Mehennaoui et *al.*, 1997 ; Picot., 2010). Il faut noter, d'une part la durée de l'exposition de 52j (Mehennaoui et *al.*, 1997) est inférieure à la durée de 9 semaines d'exposition de cette étude et d'autre part, ce sont en effet les plombémies élevées déterminées chez les brebis traitées pendant ce travail qui ont favorisé les grandes AUC calculées pendant cette analyse.

Nous suggérons que l'exposition importante chez le lot co-exposé est liée aussi aux lésions rénales (La néphropathie) décelées par l'étude anatomopathologique des reins des animaux morts. Une lésion rénale, même minimale, tendra à favoriser une accumulation tissulaire du Pb (Caubet et *al.*, 1999) par une diminution de la filtration glomérulaire.

Conclusion : L'analyse non compartimentale a permis la description quantitative des différents mécanismes intervenant *in vivo* entre l'administration du Pb et son élimination. Cette approche a permis aussi une description optimale des courbes de concentrations en Pb en fonction du temps et de déterminer les paramètres toxicocinétiques descriptifs du devenir du Pb administré par voie orale d'une façon réitérée chez les brebis. A travers le calcul de ces paramètres d'abord individuels, puis relatifs au lot, nous avons pu apprécier le degré d'exposition des brebis dans les deux lots, notamment par le calcul des AUC, MRT, $t_{1/2}$ et Cl. Ces paramètres ont montré que le Pb demeure longtemps dans l'organisme et que son élimination est très faible.

La cinétique du Pb qui montre une augmentation des plombémies après arrêt du traitement, nous laisse considérer les concentrations sanguines comme la résultante de deux voies d'expositions de l'organisme au Pb: la voie exogène et la voie endogène (suite à la mobilisation du Pb stocké dans les différents organes).

Cette synthèse opératoire nous a permis par la structure la plus simple imaginable, d'interpréter les relations plombémies/temps et aboutir à une formulation des variations des concentrations circulantes du Pb pour la dose prédéfinie en fonction du temps. Le calcul des AUC chez les deux lots traités, durant les 9 semaines et les 17 semaines d'exposition à la dose sublétales prédéfinies de Pb a révélé une proportionnalité durée d'exposition /exposition plasmatique

En outre, le Cd a constitué une source de variabilité de la relation dose-concentration et concentration-exposition. Une même dose de Pb ne conduit pas aux mêmes expositions quand il est associé au Cd.

V. Evaluation du profil Cadmiémie/Temps

Le Cd pose un vrai problème de toxicité du fait que ce ne soit pas un élément indispensable à l'organisme mais qu'il soit électrophile, qu'une fois absorbé, il ne subisse aucune dégradation métabolique et que par sa forte rétention dans l'organisme il soit très faiblement éliminé résultant en une longue demi-vie biologique (Bonet, 2011).

La dose choisie, 2 mg/kg/j pour une administration réitérée et prolongée correspond à l'ingestion de deux kilos de fourrage contaminés contenant de 40 mg/kg de Cd.

Le cadmium est un toxique cumulatif : l'élimination très lente du produit explique l'évolution progressive des manifestations pathologiques, même après l'arrêt de l'exposition (Faiz, 2011). Etant donnée, la stabilité du dosage du cadmium sanguin total après plusieurs mois d'exposition (Falcy, 2013), la cadmiémie est un indicateur d'imprégnation récente des 3 à 4 derniers mois, également de la charge corporelle après arrêt de l'exposition. La surveillance biologique basée sur le cadmium sanguin reflète la vitesse d'augmentation de la charge corporelle en cadmium (Qian et *al.*, 2013).

Il est difficile d'évaluer la concentration à effet et la concentration sans effet pour le cadmium. Selon (Mehennaoui, 1995), la posologie susceptible d'entraîner des manifestations cliniques est difficile à fixer avec précision chez les ovins. Chez l'homme, le niveau au-dessus duquel les premiers effets se produisent est inconnu et les effets à des niveaux d'exposition relativement faibles, ne sont pas bien établis (Faiz, 2011). Selon Bampidis et *al.* (2013), un apport de 5 mg de cadmium/ kg d'aliment est supposé être le seuil auquel l'expression clinique est le plus susceptibles d'être constaté chez la plupart des espèces animales domestiques. La toxicité de ce métal varie en fonction de la voie d'administration, de la forme chimique et de la durée d'exposition. Dans ce travail, le Cd a été administré sous forme de chlorure, avec l'oxyde cette forme représentent les composés les plus hydrosolubles, ce qui rend facile leur absorption (Faroon et Ashizawa, 2012). Il faut noter que contrairement aux éléments essentiels tels que le Zn dont l'absorption intestinale peut atteindre 50%, le transport du Cd à partir de la muqueuse intestinale vers la circulation sanguine est beaucoup moins important (environ 1%) (Phillips et *al.*, 2005).

Chez les ruminants un apport alimentaire supérieur à 30 mg Cd/kg a provoqué de l'anorexie, une croissance faible, une diminution de la production laitière et des avortements (Bampidis et *al.* 2013). Le mouton est le mammifère de ferme le plus sensible à

l'empoisonnement par le Cd. Un retard pondéral (20 %), soit l'indicateur le plus sensible, a été enregistré chez cette animal après administration d'une dose orale quotidienne de cadmium de 1,87mg/kg P.V (Doyle et *al.*, 1974). Reis et *al.* (2010) ont décrit des symptômes liés à l'exposition au Cd par apport alimentaire supérieur à 40 mg /Kg, les moutons ont présenté une parakératose, l'anorexie, une diminution du gain de poids et une atteinte testiculaire chez les mâles.

Toute fois un seuil minimal de toxicité ou maximal de tolérance pour des concentrations alimentaires en Cd ne peut être estimés avec précision puisque la cinétique du Cd est significativement influencée par les interactions avec des apports alimentaires en éléments essentiels (Zn, Cu, Fe et Ca) (Bampidis et *al.* 2013). Ainsi, dans certains cas, des concentrations de Cd inférieures à 1 Mg / kg dans l'alimentation ou l'eau potable a induit des effets indésirables chez les animaux. Une insuffisance fonctionnelle rénale, hypertension, perturbation du métabolisme minéral et une dégénérescence aiguë des villosités intestinales (EFSA, 2004).

Les animaux traités n'ont pas présenté de signes cliniques liés à l'exposition au Cd, sauf chez le lot co-exposé qui a manifesté des signes relatifs au traitement combiné (Pb+Cd) (cités précédemment). Houpert et *al.* (1995) n'ont pas observé de manifestations toxiques chez le mouton avec une posologie de 2 mg/kg pendant 21 jours, suivie de 1.5 mg/kg pendant 19 jours. Par ailleurs avec des posologies de 4 mg/kg de sulfate de cadmium pendant 8 jours Stoev et *al.* (2003) ont noté des signes cliniques chez les moutons traités. Au bout de 4 jours d'administration, les animaux ont présenté une perte de l'appétit et une soif intense. Une atonie du rumen, une tachycardie et une respiration accélérée et difficile ont été observés. En plus, une douleur a été révélée à la palpation pression au niveau des reins. Enfin les fèces étaient molles avec une odeur fétide. Les signes avaient persisté jusqu'à 30 jours d'expérimentation, néanmoins ils devenaient moins prononcés durant les derniers jours. Selon Qian et *al.* (2013), des rats traités au chlorure de Cd à des doses différentes mais inférieure à 1.225 mg/kg P.V n'avaient pas montré de différence de poids comparativement aux témoins.

Pendant ce travail, Les concentrations sanguines en Cd chez les deux lots traités ont augmenté d'une façon modérée durant les 4 premières semaines, les concentrations obtenues étaient de $1.4 \pm 0.81 \mu\text{g/l}$ à $5.88 \pm 2.17 \mu\text{g/l}$ chez le lot Cd et chez le lot Pb+Cd de 2.54 ± 1.16 à $8.4 \pm 3.37 \mu\text{g/l}$. Ces résultats étaient proches de ceux obtenus par (Houpert et *al.*, 1994). L'évolution croissante des cadmiémies avait atteint un pic au bout de la 5^{ème} semaine $43.6 \pm 5.73 \mu\text{g/l}$ chez le lot Cd et $46.8 \pm 9.6 \mu\text{g/l}$ chez le lot co-exposé. A la 6^{ème} semaine une baisse a été

notée, le niveau restait plus au moins stationnaire le reste de la durée à savoir 15 semaines (pendant laquelle les dosages ont pu être effectués). Les cadmiémies évoluent vers la hausse en suivant l'administration ou l'apport exogène (Lane et *al.*, 2015). Qian et *al.* (2013) ont constaté que l'augmentation des niveaux du Cd dans le sang, les urines et dans les tissus mous est dose-dépendante.

Une supplémentation quotidienne de 15 mg de Cd à des taurillons (Holstein) avait provoqué une hausse des concentrations sanguine en Cd de $21 \pm 0.85 \mu\text{g/l}$, comparativement à $10 \pm 0.46 \mu\text{g/l}$ déterminée chez les témoins (Lane et *al.*, 2015).

Selon Houpert et *al.* (1997), chez le mouton, l'augmentation des cadmiémies après traitement est variable. Ces auteurs ont rapporté qu'une administration par voie orale du chlorure de Cd (25mg/kg sous forme de gélules) a donné des concentrations sanguines en Cd allant de 2.5 à 80 $\mu\text{g/l}$.

Nos résultats sont proches de ceux révélés par des prélèvements sur des vaches issues de différentes zones non polluées (n=30) en Inde ; la moyenne des concentrations sanguines de Cd était 28 $\mu\text{g/l}$ (allant de ND à 50 $\mu\text{g/l}$), néanmoins inférieures aux concentrations de Cd déterminées chez des vaches élevées à côté d'une fabrique d'acier (n=46). La moyenne des concentrations était de 127 $\mu\text{g/l}$ (allant de ND à 410 $\mu\text{g/l}$); c'était les cadmiémies les plus élevées relevées chez des ruminants dans des zones polluées (Patra et *al.*, 2006).

Le même groupe de chercheurs avait rapporté dans des travaux complémentaires une moyenne de concentrations sanguine de cadmium de 230 $\mu\text{g/l}$ (entre 90 et 410 $\mu\text{g/l}$), chez des vaches adultes élevées à coté d'une usine de transformation d'acier.

Nos résultats sont supérieurs à ceux déterminés au cours d'une étude réalisée par Lopez Alonso et *al.* (2000), afin d'évaluer les niveaux d'exposition au Cd du cheptel bovin en Espagne (Galicia) en se basant sur la détermination du Cd sanguin chez des veaux n= 438 (de 6 à 10 mois) et des vaches n= 56 (de 2 à 12 ans). Les cadmiémies déterminés étaient 0,361 $\mu\text{g/kg}$ (de ND à 17,2 $\mu\text{g/kg}$) chez les veaux et 0,449 $\mu\text{g/kg}$ (de ND à 1,65 $\mu\text{g/kg}$) chez les vaches. Les résultat obtenus étaient inférieurs à ceux déterminés en Australie, aux USA et à certain pays de l'Europe. L'étude a été réalisée chez des bovin en bonne santé, élevés en zones non contaminées, sachant que les concentrations sanguines de Cd de plus de 50% des animaux analysés étaient situées au dessous de la limite de détection.

Durant une administration orale de chlorure de Cd chez un 1^{er} groupe de rats d'une dose de 50 mg/kg d'aliment et chez un 2^{ème} groupe une dose de 200 mg/kg d'aliment, pendant 13 semaines, Noël et *al.* (2004) ont noté à la 8^{ème} semaine d'exposition, une augmentation de la moyenne des concentrations sanguines pour atteindre $41 \pm 10 \mu\text{g/l}$ chez le 1^{er} groupe et $137 \pm 26 \mu\text{g/l}$ chez le 2^{ème} groupe, puis un déclin des concentrations à la 13^{ème} semaine chez les deux groupes.

Chez des rats exposés au chlorure de Cd, Qian et *al.* (2013) avaient obtenu les concentrations sanguines en Cd de $128,63 \pm 8,71 \mu\text{g/l}$ pour la dose de 0,306 mg/kg P.V, $210,72 \pm 11,64 \mu\text{g/l}$ pour la dose de 0,612 mg/kg P.V et la concentration de $313,25 \pm 28,81 \mu\text{g/l}$ pour une dose de 1,225 mg/kg P.V comparativement aux témoins qui avaient une moyenne de $0,50 \pm 0,04 \mu\text{g/l}$.

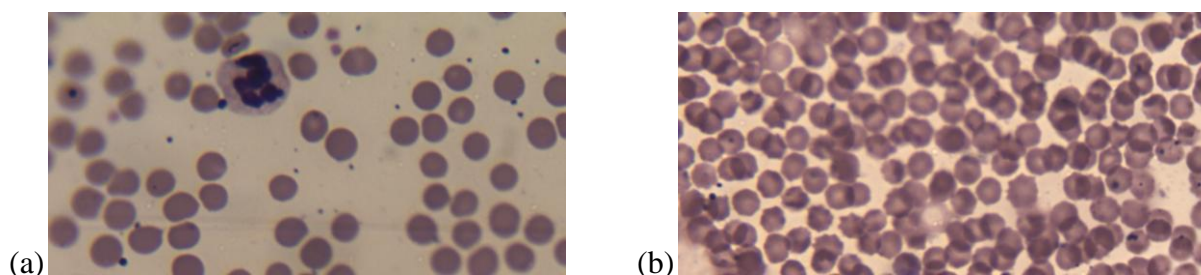
L'exposition au Cd n'est pas toujours associée aux cadmiémies élevées, Miranda et *al.* (2001), ont rapporté des concentrations sanguines en Cd similaires chez des génisses des zones industrielles et rurales (Espagne), les résultats étaient respectivement ($0,40 \mu\text{g/l}$; de ND à $1,91 \mu\text{g/l}$) et ($0,40 \mu\text{g/l}$; de ND à $2,25 \mu\text{g/l}$). Des concentrations de $0,37 \mu\text{g/l}$ et de $0,45 \mu\text{g/l}$ ont été déterminées par Lopez et *al.* (2000) chez des génisses et vaches dans des régions non polluées (Galicia : Espagne) ; les animaux ne présentaient pas de signes cliniques relatifs à un empoisonnement par le Cd.

Par ailleurs, notons qu'un déficit alimentaire en éléments traces essentiels, sans supplément exogène pourrait avoir un effet positive sur l'absorption du Pb et Cd ainsi que leur toxicocinétique. L'absorption intestinale des métaux divalent comme Pb et Cd est facilitée par le transporteur divalent metal, une diminution dans l'apport en Fe, en Ca et en Zn est corrélée à une augmentation en transporteur, ce qui favorise une absorption accrue du Pb et Cd (Sabath et Robles-Osorio, 2012). Le statut nutritionnel en éléments essentiels influence fortement l'absorption gastrointestinale du Cd, son excrétion et sa rétention au niveau des tissus et les concentrations sanguines en Fe, Zn et Ca sont négativement corrélées aux cadmiémies (Madeddu et *al.*, 2011).

VI. Hématotoxicité

L'accumulation du Pb et du Cd dans différents organes et tissus causent de nombreux changements métaboliques et histologiques notamment des dommages membranaires. Ces deux éléments traces inactivent divers systèmes enzymatiques par fixation sur les groupes SH (mécanisme thioloprive) ou par déplacement d'autres métaux, d'où la diversité de leur effets. Au plan hématologique, l'anémie est une manifestation classique de l'intoxication chronique au plomb. A dose d'exposition faible mais prolongée, le Pb et le Cd portent essentiellement sur l'érythropoïèse et l'hémoglobino-génèse (inhibition de la synthèse de l'hème) (Ognjanovic et *al.*, 2008; Lane et Canty, 2012). Pour évaluer la toxicité des mélanges de métaux à des niveaux très bas, la détermination des paramètres hématologiques s'avère efficace (Gensheng et Bruce, 2008).

Dans notre étude, à partir de la 8^{ème} semaine, le lot co-exposé au Pb+Cd a révélé une pâleur des muqueuses correspondant à une anémie. Les frottis sanguins de deux brebis (n° 6 et n° 9) ont révélé la présence de poikilocytes (Acanthocytose) (Figures. 21). L'anémie induite par le Pb résulte premièrement du trouble de la synthèse de l'hème par inhibition enzymatique et deuxièmement de la diminution de la durée de vie des erythrocytes.



Figures n°21. (a) Frottis sanguin normal (avant exposition). (b) Globules rouges déformés avec spicules et projections de la surface (poikilocytes /Acanthocytose) (Brebis n°6) (X100).

Le plomb interfère avec la synthèse de l'hème en inhibant la déshydratase de l'acide delta-aminolévulinique (ALAD), la ferrochelatase, l'hème synthétase et, à un moindre degré, la coproporphyrinogène décarboxylase. L'ALAD est très précocement inhibée: la diminution de son activité est déjà décelable alors que la plombémie est inférieure à 100 µg/L (Bismuth, 2000 ; Schwartz et *al.*, 1990 ; Patil et *al.*, 2006).

La diminution de la durée de vie des erythrocytes est due principalement à la grande fragilité membranaire (Randa et *al.*, 2012). La fixation du plomb à des groupements thiols et phosphates des membranes entraîne une augmentation de la fragilité membranaire et une

modification de la perméabilité. Cet effet, accompagné d'une inhibition du transport actif par inhibition de l'ATPase Na⁺/K⁺ dépendante membranaire qui entraîne une accumulation de K⁺ intracellulaire, ce qui agit sur la viabilité des érythrocytes (Goyer, 1993 ; Bonnard et *al.*, 2006). Ognjanovic, et *al.* (2003) ont rapporté que la fragilité membranaire des érythrocytes est due aussi à la perte de la fonction membranaire par une peroxydation des lipides de la membrane et augmentation de la concentration en peroxyde lipidique. Ils ont rapporté aussi que les dommages oxydatifs des érythrocytes et l'anémie ont été induits par un traitement au Cd chez les rats.

Terayama (1993) a spéculé que la diminution de la teneur en acide sialique membranaire et la déformation des globules rouges induisent une diminution de la durée de vie des érythrocytes dans l'anémie causée par l'exposition au Pb. Il a également été rapporté que le squelette de la membrane érythrocytaire est d'abord altéré par l'exposition au Cd chez le rat, suivi par une déformation des cellules, favorisant ainsi l'hémolyse intrasplénique entraînant une anémie (Hamada et *al.*, 1998). Les auteurs cités précédemment ont suggéré qu'une baisse des valeurs de l'hématocrite chez les rats traités au Pb et au Cd est un indicateur de l'hémolyse.

Le plomb peut provoquer aussi une hyperstimulation de l'érythropoïèse objectivée par des érythroblastes de tailles variable avec des anomalies nucléaires, d'où une production accrue d'érythrocytes anormaux (Goyer, 1993 ; Bonnard et *al.*, 2006). Hans et *al.* (1999) ont décrit que l'accumulation du Pb dans les érythrocytes, interagit avec les différentes étapes de la synthèse de l'hémoglobine et inhibe l'activité de la ferrochelatase. Cette enzyme catalyse l'incorporation du fer dans le noyau de porphyrine pour former l'hème. Son inhibition contribue au développement de l'anémie et entraîne une augmentation de la concentration des protoporphyrines dans les érythrocytes.

Etant donné tous ces changements et altérations, il est prévisible que le Pb et le Cd soient à l'origine de l'anémie. L'évaluation des effets hématologiques a révélé une diminution significative de la concentration de Hgb et notamment du taux de l'Hct spécialement chez le lot co-exposé sachant que les doses administrées sont sublétales. Selon Danel (1997) la détermination de ces deux paramètres est un reflet indirect d'une imprégnation saturnine et traduit le degré de l'altération hématologique, ce sont deux tests intéressants lors d'une intoxication chronique

De nombreuses études conduites chez les bovins et les rats avaient comme résultat, des effets hématologiques suite à une exposition à des doses faibles de Cd comparativement à une exposition à des doses fortes, sachant que la durée de l'exposition est cruciales pour l'apparition

de ces dommages, qui peuvent mener à une anémie (Lane et Canty, 2012). Kostic *et al.* (1993). Le Pb ralentit le transfert du fer nécessaire à l'élaboration de l'hème (Perrin, 2007; Portier, 2012), et l'anémie induite par l'ingestion de Cd semble résulter également d'une réduction de l'absorption intestinale de fer (entrant dans la composition de l'hème des érythrocytes) par une diminution du niveau du fer dans le sang spécialement chez les sujets dont l'apport alimentaire en fer est faible. En effet cette anémie se corrige lorsqu'on apporte un supplément de cet élément à la ration des animaux exposés (Faroon et Ashizawa., 2012).

Plusieurs études avaient pour opinion que la baisse des valeurs de l'hématocrite lors de l'hémolyse chez les rats exposés au Cd indiquait une destruction des érythrocytes (Hamada *et al.*, 1998 ; Pratap, 2014).

Lors de ce travail, dès la première semaine de l'exposition aux sels métalliques, les moyennes des deux paramètres Hgb et Hct ont montré une baisse chez les trois lots. Des résultats similaires ont montré une réduction du niveau de l'Hgb et du taux de Hct chez des rats traités avec de l'acétate de Pb. Et que l'hémolyse est considérée comme le résultat final de l'effet néfaste du Pb sur les globules rouges (Pratap, 2014).

Cette baisse a atteint à la dernière semaine son niveau le plus bas 6.4 g/dl pour l'Hgb chez le lot co-exposé. Chez le même lot et pendant la même période, l'évolution de l'Hct a révélé des taux encore plus bas, une réduction nette des valeurs moyennes (24%) comparativement à celle déterminée chez les témoins.

Ces données suggèrent que l'effet combiné des deux éléments traces sur les marqueurs hématologiques est plus important ($P < 0,001$) que leurs effets quand ils sont administrés séparément. L'administration concomitante des deux éléments peut être incriminée pour ces effets hématologiques, et compte tenu du caractère cumulatif de ces deux métaux au niveau du rein, de la rate et du foie, l'activité hématopoïétique de ces organes pourrait être supprimée (Yuan *et al.*, 2014) et causer indirectement l'anémie. Cette étude a mis en évidence un effet de synergie entre les deux éléments traces sur les paramètres hématologiques. Les changements notés durant ce travail peuvent être attribués à l'effet toxique direct des métaux lourds sur les érythrocytes ou à un effet indirect visant les organes hématopoïétiques.

La période d'exposition de 17 semaines à des doses sublétales de Pb était suffisante pour que cela provoque des effets et des changements décelables et mesurables chez les brebis.

Une tendance à la baisse de l'Hgb et l'Hct pour des valeurs croissantes de plombémies et de cadmiémies a été observée. L'évolution des deux paramètres a révélé une corrélation négative avec les niveaux du Pb et du Cd. Cette corrélation est forte dans le lot traité avec du Pb, $r=-0,82$ ($P<0,001$) pour l'Hgb et $r=-0,80$ ($P<0,001$) pour l'Hct. Chez le lot traité au Cd la corrélation est moins significative, $r=-0,49$ ($P >0,05$) pour l'Hgb et $r=-0,57$ ($P<0,05$) pour l'Hct.

Dans une étude réalisée par Rodríguez-Estival et *al.* (2012), chez des ovins et bovins dans une région d'une zone polluée en Espagne, les animaux avaient révélé des plombémies élevées, néanmoins, les taux de Hct chez les deux espèces étaient augmentés (de 28 à 47%) chez les veaux et (de 20 à 44%) chez les moutons, sachant que normalement ce paramètre avec l'anémie décelée aurait été diminuée. Les auteurs avaient expliqué ce résultat qualifié d'inattendu par le fait que l'effet d'hormèse peut exister aussi chez les animaux exposés aux ETM. Une régulation de l'Hct s'est produite afin d'optimiser le transport de l'oxygène. Cette augmentation de Hct chez les animaux exposés indiquait l'existence d'un mécanisme de compensation afin d'améliorer la capacité du sang à transporter de l'oxygène.

La période de récupération avait révélé une amélioration chez les trois lots de brebis. Après retrait de l'exposition métallique, les deux paramètres commençaient à revenir aux normes, pour atteindre au bout de deux mois et demi des valeurs physiologiques ; signe d'une réversibilité du désordre hématologique engendré par les traitements. L'évolution des valeurs moyennes des paramètres hématologiques durant cette période est en accord avec celle observée par Mehennaoui et *al.* (1995).

VII. Interaction Plomb/Cadmium-Éléments Essentiels

Les oligoéléments sont des substances qui, par leur présence ou leur action directe, permettent dans l'organisme animal une activité à dominante enzymatique. Les éléments essentiels comme le Zn, le Cu et le Fe sont intimement liés aux processus oxydatifs et /ou antioxydatifs. Ils peuvent directement ou indirectement protéger les cellules des mammifères des dommages oxydatifs (Moulis, 2010).

Les éléments traces ont un rôle important et indispensable dans le fonctionnement biologique normal des cellules, ils possèdent quatre fonctions majeures : ils agissent comme stabilisateurs, comme éléments de structure, éléments essentiels pour la fonction hormonale et comme cofacteurs d'enzymes (Gagan *et al.*, 2008 ; Soetan, 2010).

Ces éléments doivent faire partie de la ration des animaux au même titre que les éléments énergétiques, les matières azotées et les minéraux majeurs. En effet, tout déséquilibre de ces éléments peut provoquer, à partir d'un certain seuil, une perturbation du métabolisme qui sera à l'origine de plusieurs maladies nutritionnelles graves comme la fragilisation osseuse, les troubles digestifs, les troubles respiratoires (dyspnée), les troubles de reproduction (infertilité et rétention placentaire), les troubles des téguments et des phanères et une production insuffisante en lait et/ou en viande résultant d'une croissance insuffisante et d'un amaigrissement des animaux (Ismail *et al.*, 2011).

Dans ce travail, la relation entre le statut du Zn et Cu dans le sang et l'exposition aux Pb et au Cd a été évaluée. Comparativement aux témoins, l'exposition aux métaux lourds, simple ou combinée a provoqué une diminution significative des niveaux plasmatiques en Zn et Cu durant les 5 premières semaines de traitement métallique. Ce changement à la baisse des taux plasmatiques en ces deux éléments essentiels a persisté jusqu'à la fin de l'exposition chez les trois lots traités.

Nous avons également noté que l'augmentation des concentrations métalliques sanguines de Pb et Cd a provoqué une chute des concentrations plasmatiques en Zn et Cu, ce qui nous laisse suggérer que l'existence d'une interaction antagoniste est possible, confirmée par la corrélation négative entre l'évolution des concentrations sanguines du Pb et Cd d'un côté et les

concentration plasmatiques du Zn et Cu d'un autre côté. Une corrélation forte a été calculée dans le lot traité au Cd, $r = -0,76$ ($P = 0,001$) pour le Zn et $r = -0,84$ ($P < 0,001$) pour le Cu. Dans le lot traité au Pb la corrélation est moins significative $r = -0,37$ ($P > 0,05$) pour le Zn et $r = -0,32$ ($P > 0,05$) pour le Cu. Ce qui nous laisse suggérer que le Cd a un effet antagoniste plus important que le Pb sur la cinétique des deux éléments essentiels. Ces résultats sont en accord avec celles trouvés par Patra et *al.* (2006) chez des bovins élevés sur une zone polluée par le Pb et le Cd.

Toute fois, cette diminution a été trouvée plus importante chez le lot co-exposé ($P < 0,01$), ce qui suggère que le traitement combiné peut induire un effet synergique. Selon Wang et *al.* (2011a), en outre de la toxicité individuelle de chaque métal séparément, il existe un effet de synergie évident du Pb combiné avec du Cd sur les modèles de distribution de ces oligo-éléments essentiels, qui peut être lié à la gravité de la co-exposition. Ces auteurs ont noté que, comparativement aux sujets traités par un seul métal, la co-exposition a provoqué un effet synergique en diminuant significativement les teneurs en éléments essentiels chez les rats traités simultanément au Pb +Cd.

Il a été démontré qu'à la suite d'une exposition à des doses sublétales de Pb, des brebis lactantes ont présenté des zincémies normales. En revanche les animaux qui ont reçu du Cd en supplément voient leur taux de Zn plasmatique baisser (Mehennaoui, 1995).

Plusieurs études avaient démontré que le Pb et le Cd peuvent interagir avec les éléments traces essentiels. Cette interaction peut tenir place aux différentes phases de la cinétique, à l'absorption, à la distribution dans l'organisme et à l'excretion des deux éléments traces et au niveau de la phase où le Zn et le Cu assurent leurs fonctions biologiques (Noël et *al.*, 2004). Selon Barbier et *al.* (2005), comme les métaux lourds possèdent la capacité d'interférer avec les transporteurs métalliques divalents du Zn^{2+} et Fe^{2+} , ils diminuent l'absorption intestinale de ces oligo-éléments essentiels. Cette compétition peut induire des déficits sévères. Selon Pizent et *al.* (2003), une exposition chronique et modérée au Pb diminue les niveaux sériques en Zn, en Ca et en Cu.

Ce processus de toxicité est complexe du fait que le Cd et le Pb utilisent les voies physiologiques dédiées à plusieurs autres métaux indispensables à la cellule. Comme les ETM ne possèdent aucune voie d'influx qui leur soit propre, ils peuvent utiliser celles du Fe, de Ca ou de

Zn, par exemple. L'interférence des ETM avec les éléments essentiels peut causer une carence secondaire de ces éléments.

De plus, comme ces toxiques sont difficilement excrétés, leur long temps de séjour dans la cellule leur permet d'interferer avec de nombreuses protéines dépendantes de métaux essentiels.

Le rôle protecteur des éléments essentiels vis-à-vis de la progression de la toxicité métallique comprend, l'activation ou l'inhibition des réactions enzymatiques, la compétition avec les éléments toxiques au niveau des sites de fixation et par des modifications dans la perméabilité des membranes cellulaires (Wang *et al.*, 2011a).

L'exposition au Zn et au Cu diminue le statut cadmique de l'organisme (Ellis *et al.*, 1984 ; Lopeze *et al.*, 2000). Le Zn est un élément protecteur vis-à-vis du Cd et il prévient les effets inhébiteurs du Pb sur l'ALA-déshydratase érythrocytaire en favorisant la synthèse de cette enzyme pour laquelle il est indispensable (Ellis *et al.*, 1984). Selon Noël *et al.* (2006), un apport nutritionnel suffisant en Zn a un effet marquant sur l'absorption, l'accumulation et la toxicité du Cd. L'ajout de Zn, en plus de l'apport alimentaire semble favoriser l'élimination corporelle du Pb sans augmenter son excrétion par le lait (Mehennaoui, 1995).

Le statut des différents éléments essentiels dans l'apport nutritionnel peut influencer l'évolution des toxiques dans l'organisme. La ration des animaux de l'expérimentation avait présenté des carences en éléments essentiels, notamment, en Zn et en Cu (carence primaire). Les teneurs journalières étaient de 39.4 mg/kg MS pour le Zn et une teneur de 7.4 mg/kg MS pour le Cu. Ainsi, ces teneurs sont inférieures à l'apport recommandé (Zn : 50 mg/kg MS et Cu : 10 mg/kg MS) (Arnaud, 2012) et l'effet protecteur de ces éléments a été minimisé. Il faut noter qu'un apport alimentaire en Cd de 5 à 30 mg / kg, diminue généralement la performance des animaux en interférant avec l'absorption du Cu et du zinc, entraînant des symptômes généralement associés à la carence en ces deux éléments (NRC, 2007).

Le foie est un organe important pour l'homeostasie des éléments essentiels notamment le Cu et le Zn. L'exposition au Pb et au Cd peut provoquer des changements dans le stockage hépatique de différents éléments traces essentiels (Noël *et al.*, 2004). Par ailleurs, une régulation à la hausse des transporteurs métalliques divalents suite à une ingestion chronique du Pb et du Cd peut perturber l'homeostasie des éléments essentiels en illustrant ainsi l'interaction complexe

entre les métaux lourds et les éléments essentiels (Min et *al.*, 2008). Cet effet peut être causé par l'interférence du Pb et du Cd dans la synthèse des protéines ou leur liaison avec certaines protéines impliquées dans le transport des ions métalliques (Abdou et Newairy, 2006). Le Cd partage les propriétés d'induction de la synthèse de métallothionéines avec le Zn et le Cu (Noël et *al.*, 2004). Ces éléments sont en général mutuellement antagoniste.

Wang et *al.*, (2011a) ont rapporté que l'exposition au Pb et au Cd induit une augmentation de l'excrétion urinaire du Zn et du Cu, causée par une défaillance de la réabsorption tubulaire et à la diminution de la filtration glomérulaire suite à la néphrotoxicité liée aux métaux lourds.

Des résultats obtenus par Noël et *al.* (2006) suite à leur travaux sur des cellules épithéliales intestinales exposées à long terme au Cd en présence d'éléments essentiels Zn, Cu et Mn, décrivent l'effet inhibiteur du Zn et du Cu sur l'accumulation du Cd dans les cellules épithéliales. Ce travail *in vitro* a confirmé l'interaction négative entre l'accumulation du Cd et les éléments essentiels.

Phillips et *al.* (2005), ont suggéré des interactions antagonistes à différents niveaux de la cinétique entre le Cd et les deux éléments essentiels Zn et Cu chez le mouton exposé au Cd, notamment son impact négatif sur l'absorption des deux éléments au niveau intestinal.

Pendant notre travail, le retrait du traitement métallique pendant la période de récupération a laissé observer une évolution progressive à la hausse des deux éléments essentiels chez les trois lots exposés, ce qui confirme l'impact négatif de l'exposition des deux ETM Pb et Cd (doses et durée) sur la cinétique du Zn et Cu.

VIII. Evolution Temporelle des Marqueurs Hépatiques

Parmi les organes qui accumulent le plus de Pb et de Cd chez toutes les espèces sont le foie et le rein. Le foie reçoit par l'intermédiaire de la veine porte un grand nombre de molécules issues de la digestion. Le Pb et Cd liés aux protéines de transport dans le sang sont décomplexés dans le foie et deviennent hépatotoxiques. De plus, Les principales voies d'élimination des toxiques sont les voies hépato-biliaires et les voies rénales.

Un des objectifs de cette étude est d'évaluer l'effet d'une exposition orale et à long terme, au Pb et au Cd seuls ou combinés sur la fonction hépatique chez le mouton, notamment l'évaluation du rapport traitement métallique – certains marqueurs hépatiques.

L'aspartate aminotransferase (AST) est une enzyme largement distribué, se trouvant dans plusieurs tissus et organes, avec une forte activité au niveau hépatique (Zimmerman *et al.*, 1968). Une augmentation de l'activité sérique de l'AST est un marqueur sensible des dommages hépatiques (Meyer et Haryey, 1998 cité par Milinković-Tur *et al.*, 2005). Autre test courant de l'évaluation d'une agression hépatique, l'alanine aminotransférase (ALT), test sensible et spécifique de la cytolysse hépatique notamment chez les jeunes animaux (Braun *et al.*, 1978 ; Larry, 2004). Dans cette étude, le dosage des transaminases, indicateurs de la fonction hépatique a été réalisé ; selon (Qian *et al.*, 2013), c'est un examen très fréquemment prescrit lors d'atteintes hépatiques. Braun *et al.* (2010) considèrent qu'en routine le glutamate déshydrogénase comme étant le marqueur spécifique de l'exploration hépatique le plus utilisé. Les autres tests, phosphatases alcalines, bilirubine, sont moins sensibles. La gammaglutamyl- transférase (GGT), est sensible mais manque beaucoup de spécificité, pouvant être augmentée en dehors de toute atteinte hépatique (Larry, 2004). Nous avons aussi déterminé le taux sérique des protéines totales, de l'albumine, des globulines et le ratio ALB/ GLB durant les trois périodes de l'expérimentation.

Une augmentation modérée des niveaux des deux enzymes hépatiques (ALT, AST) a été constatée dès le début du traitement chez les trois lots. Vers la fin du traitement l'évolution de la moyenne en ALT sérique gardait une progression vers la hausse pour atteindre une augmentation de 218% chez les deux lots traités au Pb et au Cd. Par ailleurs, l'augmentation de la moyenne du niveau de l'ALT chez le lot co-exposé était plus significative ($P < 0.001$), la valeur avait augmenté de 253%. L'AST sérique a connu la même progression, l'augmentation était de 149% pour le lot Pb, de 186% pour le lot Cd et de 243% pour le lot co-exposé au Pb+Cd.

Cette augmentation des marqueurs de l'atteinte hépatique tels que l'ALT et l'AST durant la période d'exposition aux sels métalliques confirme les effets des deux éléments traces au niveau des cellules hépatiques. Une corrélation positive entre l'évolution des concentrations plasmatiques des transaminases et les niveaux sanguins des deux ETM a été observée. Chez le lot traité au Pb, $r = 0,77$ ($P = 0,001$) pour l'ALT et $r = 0,68$ ($P < 0,01$) pour l'AST et chez le lot traité au Cd $r = 0,60$ ($P = 0,01$) pour l'ALT et $r = 0,50$ ($P > 0,01$) pour l'AST, ce qui explique l'impact de l'exposition aux deux ETM sur l'homéostasie des transaminases.

Plusieurs auteurs ont rapporté des résultats similaires chez différentes espèces de mammifères (Karmakar et al., 2000 ; Randa et al., 2012) après des traitement métalliques (Pb, Cd). Selon Kapaki et al. (1998) et Nabil et al. (2011), cette tendance vers la hausse dans l'activité des enzymes hépatiques est spécialement due à la fuite des transaminases à partir du cytosol hépatique vers la circulation. Les dommages induits par les métaux toxiques sont fréquemment accompagnés par une augmentation de la perméabilité de la membrane cellulaire hépatocytaire. Cette altération est induite par initiation d'une lipoperoxydation (peroxydation lipidique) autrement dit l'oxydation des acides gras polyinsaturés des phosphomembranes lipidiques des hépatocytes. Une conséquence de cette activité radicalaire est la désagrégation des membranes des hépatocytes dont les enzymes intracytoplasmiques entre autres les transaminases vont se déverser dans le milieu extracellulaire (plasma sanguin).

Des résultats similaires de l'évolution des transaminases lors d'une exposition aux sels métalliques ont été rapportés chez le rat par Abdou et Newairy. (2006) et Mehana et al. (2012). Ces chercheurs ont confirmé que les dommages hépatocytaires notamment la cytolyse avait une bonne corrélation avec la fuite des enzymes hépatiques à travers la membranes cellulaire. Sachant que le syndrome de la cytolyse est une atteinte de la membrane de l'hépatocyte par une augmentation de la perméabilité membranaire avec relargage du contenu cellulaire dans les sinusoides et dans le sang périphérique. La cytolyse hépatique est caractérisée par une élévation des transaminases (ALT, AST) et accessoirement une élévation des GGT (Guyader, 2005).

Chez la brebis, des modifications biochimiques sans manifestations cliniques liés à la toxicité au Cd apparaissent avec des quantités ingérées comprises entre 0.3-3 mg /kg /j (Fassbender et Rang., 1975). Selon Lane et al. (2015), les premiers signes liés à la dégénérescence des cellules hépatiques ont été notés chez le mouton suite à la consommation de l'ensilage de maïs avec une teneur en Cd de 1,7 mg / kg de MS. En revanche, aucun signe de

toxicité n'a été observé chez des taureaux nourris par des concentrés et de l'ensilage de maïs avec 1,5-2,0 mg / kg de MS de Cd.

Une étude conduite par Nabil *et al.* (2011) a montré que l'administration orale de Pb^{2+} stimule fortement l'activité des transaminases chez le rat. Cette stimulation était dose-indépendante. Par ailleurs, Qian *et al.*(2013) ont trouvé que les niveaux de l'ALT et L'AST avaient significativement augmenté suite à une exposition au chlorure de Cd, ce qui indique que le Cd peut induire des dommages sérieux au niveau du foie. Ils avaient noté que l'augmentation de ces indicateurs hépatiques était dose- dépendante.

Selon nos résultats, cette cytolysse induite par le traitement métallique, est plus importante quand les brebis sont traitées aux Pb et Cd combinés. De plus une brebis (n°9) appartenant au lot co-exposé a développé des signes cliniques relatifs à une choléstase modérée accompagnant la cytolysse, notamment un subictère.

L'exposition concomitante au Pb et au Cd est décrite comme induisant une toxicité additive ou synergique notamment après exposition à de faibles doses (Rouas, 2010). Par ailleurs, le cumul d'exposition du plomb et du cadmium induit des modifications de molécules impliquées dans les mécanismes de toxicité de chaque métal telles que les métallothionéines, les protéines de liaison au plomb, ou encore le glutathion (Gensheng *et al.*, 2008).

Les résultats d'une étude conduite par Pillai et Gupta (2005), indiquaient que, malgré la capacité du Pb et du Cd de modifier différents paramètres biochimiques dans le foie, l'effet n'est pas intensifié par l'exposition combinée au Pb+Cd. Les altérations biochimiques observées dans le foie des rats co-exposés aux deux traces métalliques peuvent résulter d'un effet indépendant du plomb ou du Cd ainsi que de leur interaction. Cependant, ces résultats suggèrent que lorsque le Pb et Cd sont administrés ensemble dans des concentrations similaires, les principaux effets sont médiés par le cadmium.

Après autopsie des brebis mortes durant l'exposition aux deux ETM, des lésions hépatiques relatives à l'administration des métaux lourds ont été décelées. Ces lésions sont derrière les signes cliniques observés ainsi que les changements liés aux marqueurs hépatiques chez les animaux de l'expérimentation surtout ceux du lot co-exposé. Ceci confirme qu'un traitement chronique à de faibles doses de Pb et de Cd peut altérer l'intégrité tissulaire du foie et tend à perturber l'homéostasie des enzymes hépatiques.

Le foie est connu pour son rôle essentiel dans la synthèse des protéines plasmatiques et ses cellules de Kupffer sont connues pour leur rôle immunitaire surtout la phagocytose. Les protéines synthétisées par le foie, servent de marqueurs hépatiques notamment l'albumine et les différents groupes des globulines.

L'évolution des protéines totales a révélé une augmentation chez les trois lots. Cette évolution à la hausse est plus significative chez le lots co-exposé ($P < 0,01$). Même après retrait des traitements métalliques chez ce lot, les taux sériques des protéines ont continué à augmenter. La durée de l'exposition a favorisé cette augmentation étalée dans le temps, révélant un effet temps ($P < 0,001$) confirmé par le test ANOVA. Toutefois les valeurs des protéines totales déterminées pendant ce travail restent dans l'intervalle des valeurs usuelles.

Chez les ovins, une concentration de protéines totales supérieure à 65 g/l est hautement indicative d'une inflammation chronique quand l'index corporel est faible (Braun et al., 2010). C'est le cas de la brebis (n°6) qui a montré un retard de croissance.

Le protéinogramme du mouton se compose de 5 fractions (albumine, $\alpha 1$ -globulines, $\alpha 2$ -globulines, β - globulines, γ -globulines). La fraction β ne se divise pas en deux sous-fractions comme chez les autres espèces. La fraction γ pourrait être subdivisée en deux fractions $\gamma 1$ et $\gamma 2$, mais, cela ne présentant pas d'intérêts cliniques (Keay et Doxey., 1981 ; Kaneko et al., 2008). Tous les profils obtenus durant ce travail sont similaires et on a pu décrire un profil type du protéinogramme du mouton correspondant aux caractéristiques décrites.

L'électrophorèse des protéines totale sépare l'albumine du reste des fractions regroupées de globulines. Ces dernières sont séparées en trois grands groupes (α , β , γ). Cette séparation permet de différencier les protéines de l'inflammation des immunoglobulines. En effet, toutes ces protéines se répartissent dans les différentes fractions en fonction de leur migration dans le gel d'agarose. Les troubles pathologiques font varier les différentes concentrations des protéines. Ces variations peuvent être mises en évidence par des variations de la courbe électrophorétique et des concentrations des différentes fractions.

Une inflammation chronique est la cause d'une augmentation des protéines sériques, essentiellement de la globuline, et d'une diminution du taux d'albumine du fait de l'exsudation plasmatique et de la baisse de sa synthèse hépatique. Les brebis du lot co-exposé ont présenté vers la fin de l'exposition un ratio Alb/Glob inférieur aux normes usuelles. Notons que, lorsque le rapport Alb/Glob est normal, le tracé est très souvent normal. En effet, cela signifie que les

proportions entre les différentes fractions ont été conservées (Kaneko et al., 2008). Un ratio Alb/Glob bas est obligatoirement en relation avec un électrophorégramme modifié (figures 51). Cette modification a pour origine soit une baisse de la concentration en albumine soit une hausse de la concentration en globulines (Trumel et al., 1996). Un taux d'albumine bas peut être causé par un défaut de synthèse lors des maladies chroniques du foie ou lié à des pertes par fuite glomérulaire de molécules de petites tailles lors de syndrome néphrotique. Une augmentation du taux des globulines est en faveur des maladies inflammatoires aiguës ou chroniques et du syndrome néphrotique (avec augmentation de la synthèse hépatique de macro protéines pour limiter la diminution de la pression oncotique et formation d'œdèmes), quand c'est les α -globulines et les β - globulines qui sont augmentées. Une augmentation des γ -globulines particulièrement avec un pic large indique le développement de maladies inflammatoires chroniques notamment, une hépatite chronique (Trumel et al., 1996 ; Kaneko et al., 1998). L'étude des différentes fractions des profils atypiques chez les brebis des trois lots notamment celles du lot co-exposé ont révélé des pics des globulines notamment les γ -globulines souvent en association avec des pics des β - globulines néanmoins, d'une importance moindre. Nous suggérons que ces modifications des tracés électrophorétiques sont évocatrices de l'impact des traitements métalliques au niveau des organes cibles notamment le foie et le rein. Des lésions inflammatoires chroniques et des lésions dégénératives au niveau hépatique et rénal ont été confirmées par l'étude histopathologique.

Outre leur intérêt diagnostique autant que marqueur biologique pour évaluer l'exposition métallique chez les brebis traitées, les tracés électrophorétiques réalisés durant cette étude notamment ceux de la période pré-exposition peuvent servir de base de données des profils électrophorétiques chez l'espèce ovine (la race Ouled djellal).

Après retrait du traitement chez les trois lots de brebis, une baisse significative des niveaux des transaminases a été constatée. Les teneurs ont revenu à la normale, synonyme d'une baisse de la cytolyse et de la libération des enzymes à travers les membranes hépatocytaires. Selon (Guyader, 2005), les taux des transaminases reviennent rapidement à la normale lorsque la cause de l'atteinte hépatocytaire est supprimée.

La même tendance pour les protides totaux a été observée pendant la période de récupération, confirmant ainsi l'effet néfaste de l'exposition aux ETM en induisant les changements biochimiques observés durant cette expérimentation.

IX. Néphrotoxicité Liée aux ETM : Plomb et Cadmium

La toxicité du Cd la plus marquée relevée tant chez les modèles animaux que chez l'homme est celle concernant la fonction rénale. Chez les ruminants, les reins ont un rôle important dans l'excrétion du Pb et Cd et représentent l'un des organes où on note l'accumulation la plus importante des métaux lourds notamment lors d'exposition prolongée.

La néphrotoxicité induite par le Pb ou / et le Cd a été largement étudiée et largement rapporté dans la littérature. La majorité de ces rapports a été menée avec le traitement au Pb ou au Cd séparément ; très peu de travaux se sont intéressés à l'exposition concomitante des deux métaux et à leur effet simultané (Wang *et al.*, 2011(b))

Il est concevable que si la concentration de cadmium dans les cellules rénales, après une exposition aiguë ou chronique, dépasse la capacité de protection intracellulaire constituée par les métallothionéines et le glutathion, le cadmium libre pourra interagir avec les organites cellulaires et perturber des processus biochimiques (Faiz, 2013). Des lésions importantes peuvent résulter de l'exposition à ces deux éléments traces et l'augmentation de l'urée et de la CRE indique un mauvais fonctionnement du rein.

La CRE est un indicateur de la fonction rénale (Qian *et al.*, 2013). Dans des conditions non pathologiques, la CRE plasmatique est filtrée mais non réabsorbée au niveau rénal. La valeur de la concentration plasmatique de créatinine dans le plasma est inversement liée au débit de filtration glomérulaire donc à la fonction rénale. Ainsi, plus la fonction rénale est altérée, plus la créatininémie augmente.

L'urée ne reflète que partiellement le fonctionnement rénal puisque l'équilibre de l'urée dans l'organisme est conditionnée par sa production endogène et par son excrétion rénale (Rouas, 2010). Des variations de l'urémie ne sont observées qu'en cas de perturbation importante de la fonction rénale. Il serait donc plus approprié de considérer l'urémie comme un biomarqueur de l'insuffisance rénale sévère (Romanetto, 2011).

La néphropathie chronique conduisant à la défaillance rénale est une manifestation classique de la toxicité au plomb. Épidémiologiquement, des études ont montré chez l'homme, une relation forte entre l'exposition aux métaux lourds et la présence de lésions rénales

chroniques. Un dysfonctionnement rénal se produit la plupart du temps à des niveaux élevés d'exposition au plomb ($> 60 \mu\text{g}/\text{dL}$), mais des dommages à des niveaux inférieurs ont aussi été rapportés ($10 \mu\text{g}/\text{dL}$) (Gagan *et al.*, 2012).

Une étude longitudinale à la Normative Aging Study, d'une exposition faible au Pb comprenant 459 participants avait révélé que la concentration sanguine du plomb était positivement associée et de façon significative à la concentration de créatinine sérique. Cette association était également retrouvée parmi les sujets dont la plombémie n'avait jamais été supérieure à $100 \mu\text{g}/\text{l}$. Certaines des études environnementales suggèrent que le plomb, même à des niveaux faibles (plombémie $< 100 \mu\text{g}/\text{l}$), pourrait exercer un effet négatif sur la fonction rénale (Gonick, 2008). Une autre étude a révélé des effets toxiques au niveau rénal avec des concentrations sanguines moyennes en Pb inférieures à $50 \mu\text{g}/\text{l}$ et que la dose cumulative du Pb est également associée à un mauvais fonctionnement rénal. La même étude a montré que des taux élevés de CRE (15 à $39\text{mg}/\text{l}$) étaient associés à des doses élevées de Pb ($\leq 80 \mu\text{g}/\text{l}$ et $< 600 \mu\text{g}/\text{l}$) (Ekong *et al.*, 2006).

Notre étude a révélé une tendance à la hausse de la CRE, chez les trois lots, pour atteindre à la fin de l'exposition les teneurs de $16.8\text{mg}/\text{l}$ chez le lot Pb, $19\text{mg}/\text{l}$ chez le lot Cd et $23 \text{mg}/\text{l}$ chez le lot co-exposé. Cette évolution est corrélée aux concentrations sanguines croissantes en ETM. Une corrélation significative a été déterminée chez le lot Pb $r= 0,61$ ($p < 0,01$) ainsi que chez les lots Cd $r=0,67$ ($p < 0,01$), et le lot co-exposé $r=0,72$ ($p < 0,001$). Ce qui est suggestif d'une altération lésionnelle au niveau rénal chez les brebis traitées.

Avec les doses métalliques prédéfinies, considérées comme infratoxiques, l'évolution de la CRE vers la hausse n'était significative qu'à partir de la 8^{ème} semaine d'exposition pour révéler un effet temps ($P<0,001$) confirmé par le test ANOVA. Notons que, de faibles variations de la créatininémie au début de la maladie rénale chronique témoignent déjà d'une perte importante de fonction rénale (et du nombre de néphrons fonctionnels) (Sabath *et al.*, 2012).

Des altérations des paramètres biochimiques notamment de la CRE ont été observées chez des veaux ayant reçu de l'acétate de Pb sur une période de 40 jours. L'augmentation des teneurs en CRE a été observée pour atteindre à 30 j la valeur de $14,4 \text{mg}/\text{l}$ et à 40j la valeur de $17,1\text{mg}/\text{l}$. La CRE peut atteindre des niveaux élevés dans le cadre d'intoxication chronique par le Pb. Ceci reflète les effets néphrotoxiques du Pb (Dupont, 2002).

Par voie respiratoire, le Pb est également néphrotoxique. Une augmentation significative du taux de créatinine sérique a été notée chez des rats mâles et femelles durant la période d'exposition aux gaz d'échappement qui a duré 15, 30, 45 et 60 jours. Notons qu'une augmentation statistiquement significative de la plombémie dans les deux sexes a été observée (Smaoui et *al.*, 2000).

Toutes les expériences menées sur les rats et les souris confirment que l'exposition orale au cadmium provoque des dommages rénaux, et plus particulièrement des lésions tubulaires. Chez des rats traités au chlorure de Cd pendant 14 jours. Qian et *al.* (2013) avaient noté une augmentation des niveaux de CRE, indiquant l'effet néfaste du Cd au niveau du rein confirmé par l'histopathologie ainsi que le dosage du Cd dans le tissu rénal.

Les brebis exposées à la mixture des deux ETM ont montré des taux de CRE les plus élevés ($P < 0,001$) comparativement aux deux lots ayant reçus, le Pb ou le Cd séparément. Ceci laisse suggérer un effet synergique des deux métaux quand ils sont administrés conjointement. L'étude anatomopathologique sur les reins issus des animaux morts lors de l'expérimentation a révélé des lésions macroscopiques et microscopiques relatives au traitement métallique. Il faut noter aussi que la combinaison de différents métaux a été démontrée pour avoir un effet néphrologique cumulatif (Sabath et *al.*, 2012).

Une étude conduite par Wang et *al.* (2010) sur des rats exposés au Pb, au Cd et à la mixture des deux métaux pendant 8 semaines. Après l'exposition, les reins des animaux ont été prélevés pour évaluer l'activité des mitochondries du cortex rénal ainsi que les dommages induits par les traitements métalliques. Les résultats ont décelé que les dommages étaient plus importants chez le lot co-exposé, ce qui démontre que l'effet des deux métaux combiné est plus fort que leur effet séparément sur l'ultrastructure de la corticale rénale.

Le retrait des traitements métalliques chez les brebis co-exposées n'a pas empêché l'augmentation de la CRE sérique. Une progression vers la hausse des concentrations en CRE de plus en plus marquée et de plus en plus prolongée, puis un plateau à 23mg/l pendant 10 semaines après arrêt de la contamination. Ceci suggère l'effet cumulatif des deux ETM.

La période de récupération a observé une diminution progressive des créatininémies et leur retour aux valeurs physiologiques. Nous suggérons que même avec la perte d'une partie des

néphrons fonctionnels, le rein a continué à filtrer la CRE. Là, il ne s'agit pas de réversibilité des effets toxiques mais de réponse adaptative via des mécanismes de compensation dont disposent les reins. Selon Fourcade (2006), ces mécanismes sont de deux types, soit par des processus d'adaptation passifs aident les reins à maintenir longuement un équilibre suffisant malgré la réduction progressive du capital néphrotique. Soit par phénomènes d'adaptation actifs consistant en l'augmentation du pouvoir fonctionnel des néphrons encore intacts. Il constitue un phénomène retardateur qui contribue au maintien prolongé de l'homéostasie. La filtration glomérulaire individuelle des néphrons augmente, ce qui leur assure un pouvoir maximal et ralentit la dégradation de la fonction rénale.

X. Anatomopathologie du Foie & du Rein

(Prélevés sur les animaux morts)

Pour se protéger des éventuels effets toxiques des xénobiotiques, l'organisme est muni de deux organes clés. Le premier est le foie qui dispose de nombreuses enzymes qui permettent le métabolisme des xénobiotiques, le deuxième est le rein, du fait de son rôle de filtration, il est continuellement exposé à leur toxicité.

Une exposition subchronique au nitrate de Pb et au chlorure de Cd séparément ou associés, peut causer des dommages au niveau du foie et du rein. Les marqueurs de l'intégrité structurale des deux organes l'ont révélé à la biochimie.

Les doses administrées étaient en dessous du seuil d'hépatotoxicité et de néphrotoxicité. Selon (Noël et *al.*, 2004), la toxicité des métaux lourds ne dépend pas seulement de la dose mais aussi de la durée d'exposition, de la nature des sels et de la mixture (combinaisons de plus d'un métal).

L'histopathologie est un marqueur important de toxicité, quand il s'agit de contamination aux métaux lourds (Shatha, 2011). En plus des signes cliniques et des marqueurs biologiques dosés au niveau sanguin, cette étape constitue un complément important dans la démarche diagnostique.

A. Foie

La grande susceptibilité du foie aux xénobiotiques est la conséquence de sa disposition anatomique et de son rôle prépondérant dans le métabolisme et la détoxification. Le foie, via la veine porte, est le premier organe exposé aux composés absorbés par les voies digestives. Il est donc soumis à l'action toxique de très nombreux xénobiotiques.

La répartition du plomb varie avec le mode d'absorption. Ainsi, les taux hépatiques et intestinaux sont trois fois plus importants en cas d'absorption digestive que par voie pulmonaire (Flora, 2012). La toxicité du plomb est étroitement liée à son accumulation dans certains tissus tels que le tissu hépatique et cependant, elle cause des modifications structurales et interfère avec les fonctions hépatiques (Shatha, 2011).

Approximativement la moitié du Cd absorbé par voie systémique est accumulée rapidement dans le foie, ce qui donne lieu à une disponibilité réduite du Cd dans d'autres

organes cibles tels que les reins et les testicules, qui sont plus sensibles à ses effets toxiques (Delraso et *al.*, 2003).

Lors de cette expérimentation, l'autopsie a été réalisée sur trois brebis, rappelons que deux (n°6, n°9) appartenaient au lot Pb+Cd mortes pendant la période d'exposition et la troisième (n°15) appartenait au lot Pb, morte pendant la période de récupération. Les deux premiers animaux ont présenté quelques signes de toxicité, un mauvais état général, une pâleur des muqueuses signe d'une anémie, confirmée par les changements des paramètres hématologiques (décrits précédemment) et une facilité anormale d'arrachement de la laine ainsi que la perte d'une incisive (figure 54). La brebis n° 9 avait présenté un ictère modéré, sachant que c'est l'animal qui à présentait le taux le plus élevé de transaminases sériques. Les teneurs en ces deux enzymes hépatiques (ALT, AST) ont presque triplées (ALT= 33 U/l, AST=301 U/l).

1. La brebis n° 6

- Aspect macroscopique :

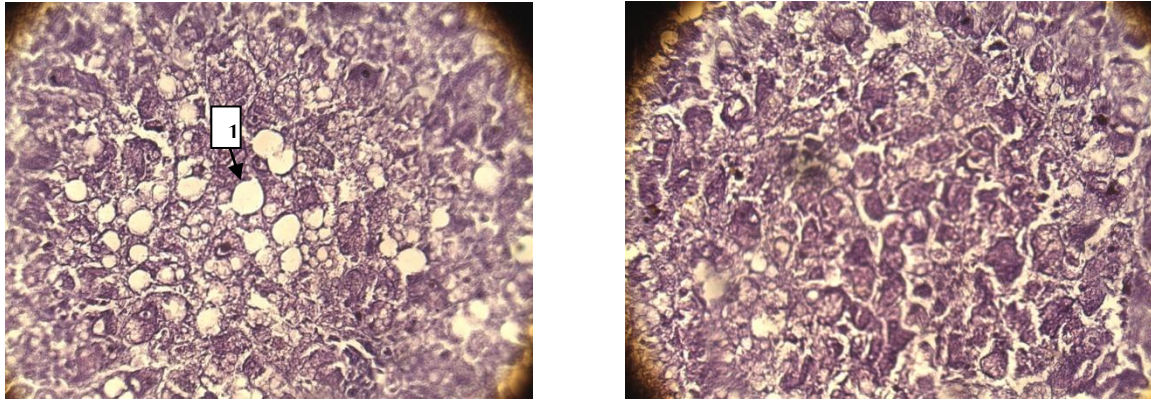
Le foie de la brebis n° 6 (Figure 41) était hypertrophié de couleur en grande partie claire comparativement à la normale, avec bordures arrondies.



Figure 41. Foie de la brebis n° 6

- Aspect microscopique

La coupe histologique a révélé une congestion vasculaire (passive) et une stéatose modérée à abondante « lobulaires » (flèche.1), autour de la veine centrale. Une nécrose parcellaire irrégulièrement réparties dans le foie et un infiltrat portal mononuclé (Figures 42).



Figures 42. Microphotographies du foie de la brebis n°6 (X40)

2. La brebis n° 9

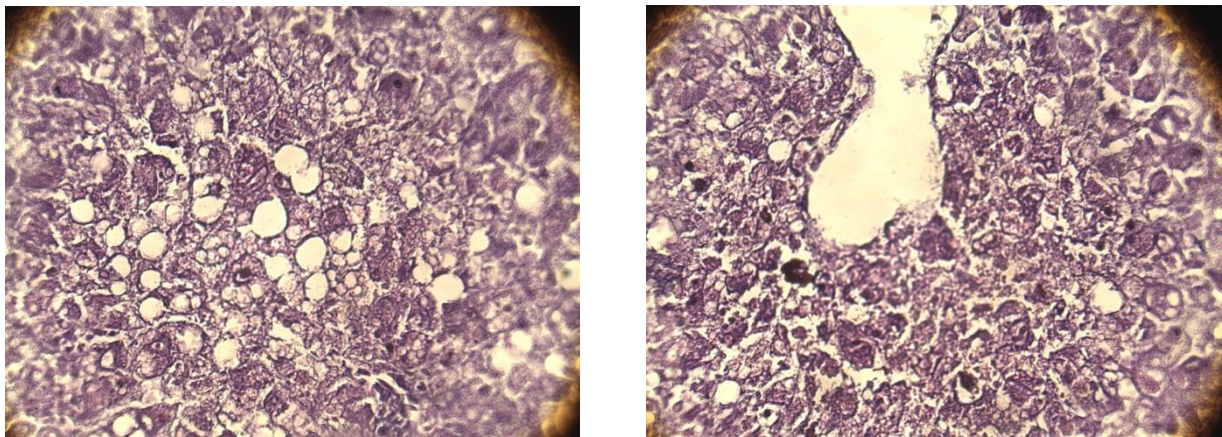
- **Macroscopique :** L'autopsie a révélé une imprégnation jaune généralisée (les muqueuses, la graisse...). Le foie est hypertrophié présentant une stéatose importante; sa consistance est molle et pâteuse, sa couleur est claire, laissant à la coupe une marque de dépôts graisseux. Le volume de la vésicule est augmenté (Figure 43).



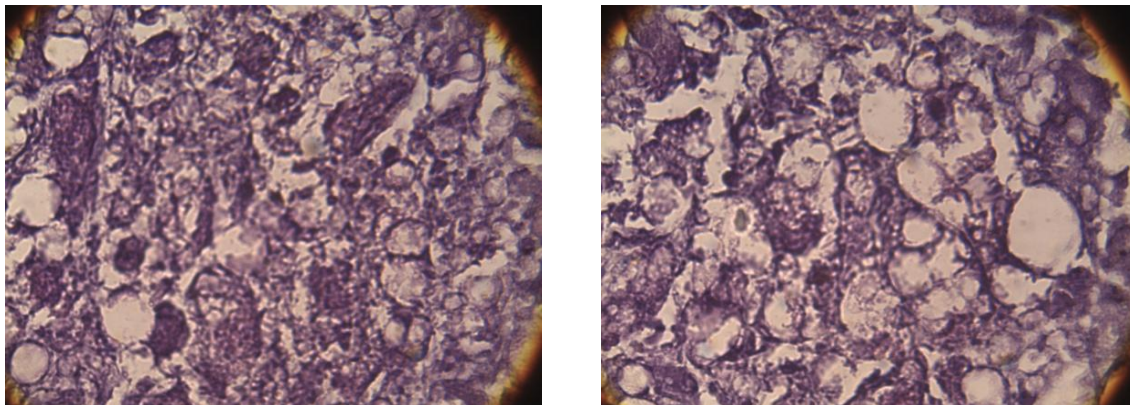
Figures 43. Aspect macroscopique du foie de la brebis n°9

- Microscopie

L'examen à faible grossissement confirme que le foie a perdu son architecture normale avec une répartition lobulaire de la stéatose hépatocytaire macroscopiquement observée. A l'échelle cellulaire, les hépatocytes surchargés paraissent plus volumineux contenant de petites à volumineuses enclaves (vacuoles) formées par accumulation de triglycérides. La stéatose est de nature dégénérative (dégénérescence intense des hépatocytes et perte de la structure normale du foie). On peut constater aussi la présence de foyers de nécrose parcellaire péri-portale et/ou péri-septale. Fibrose portale et centro-lobulaires avec hyperplasie kupfférienne (Figure 44, 45).



Figures 44. Microphotographies du foie n°9 (X40)



Figures 45. Microphotographies du foie de la brebis 9 (X100)

B. Rein

Les reins participent, dans une moindre mesure que le foie, à un processus de détoxification des xénobiotiques par métabolisation (Rouas, 2010). Du fait de la formation des urines, le rein est le second organe clé du processus. Il possède également un arsenal d'enzymes du métabolisme des xenobiotiques qui contribuent à l'épuration et la détoxification.

La néphropathie chronique conduisant à la défaillance rénale est une manifestation classique de la toxicité au plomb. Elle résulte généralement d'une exposition longue à une dose relativement élevée de plomb.

La toxicité du cadmium la plus marquée relevée tant chez les modèles animaux que chez l'homme est celle concernant la fonction rénale.

Les doses administrées sont en dessous du seuil de néphrotoxicité, mais la co-exposition du plomb et du cadmium est décrite comme induisant une toxicité additive ou synergique notamment après exposition à de faibles doses. L'exposition à un métal peut modifier la cinétique d'un second lors d'une exposition concomitante (Wang *et al.*, 2008; Rouas, 2010).

Comme les reins ont un rôle important dans l'excrétion du plomb et du cadmium, on observe surtout des changements lésionnels au niveau des tubules proximaux, inflammation, nécrose, dégénérescence et en fin les tissus interstitiels se fibrosent à leur tour et les tubules se dilatent puis s'atrophient. Un dysfonctionnement tubulaire proximal se développe dans le rein, entraînant une diminution de l'absorption d'acides aminés, du glucose, du Ca, du phosphate et des protéines à faible poids moléculaire (Phillips *et al.*, 2005).

Selon (Perrin, 2007), les deux marqueurs rénaux (la créatinine, urée) n'augmentent pas jusqu'à ce que 50% à 70% des néphrons soient détruits.

1. Aspect Macroscopique :

Brebis n°6 : L'autopsie n'a pas révélé de changements. Le rein avait un aspect normal

Brebis n°9: Le rein est marqué par des pétéchies

Brebis n°15: Le rein présentait des zones de dégénérescence au niveau de la corticale (Figure 46)

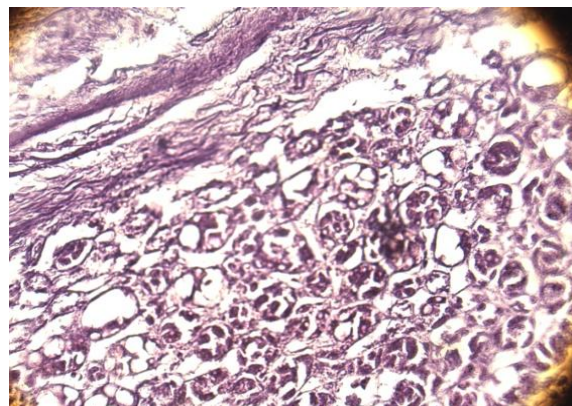
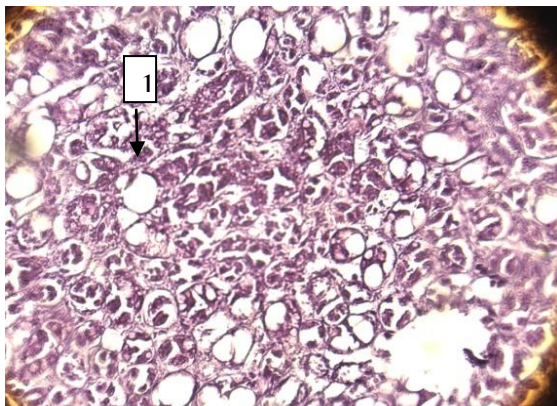


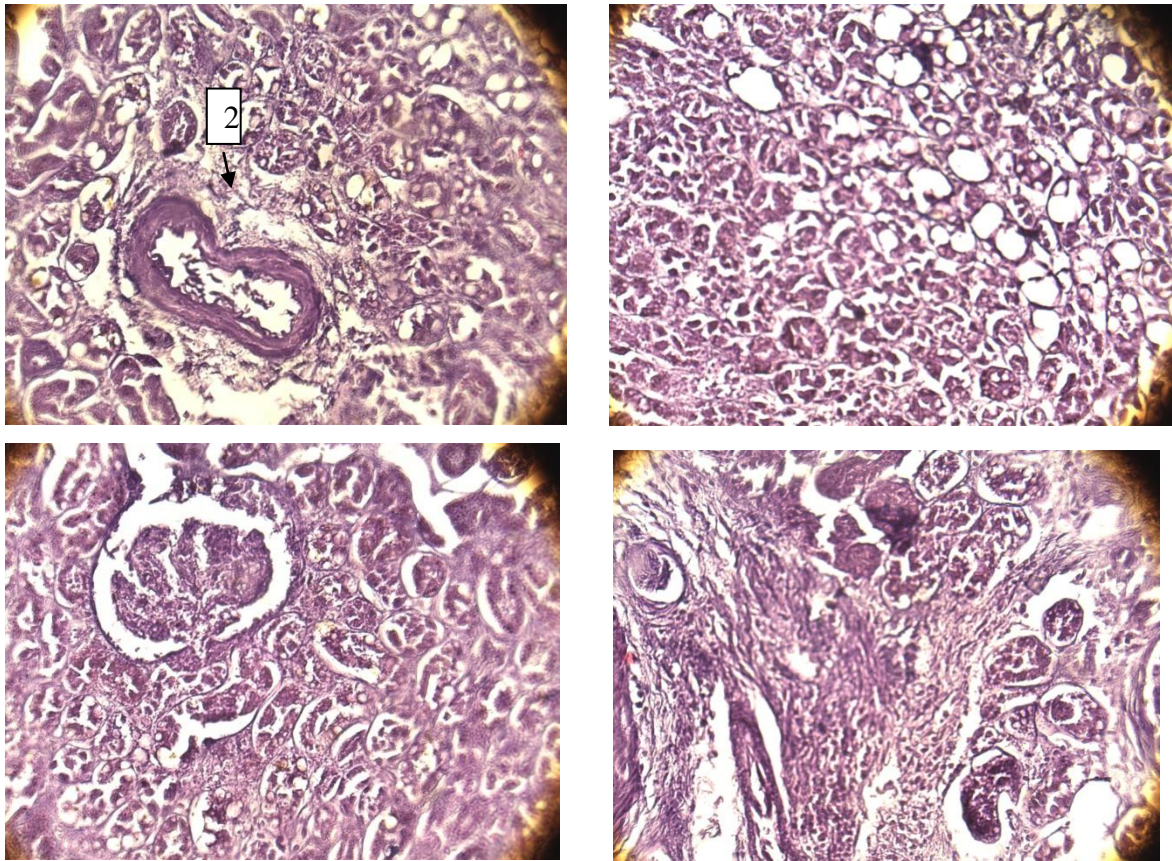
Figures 46. Les deux reins de la brebis n°15

2. Microscopie

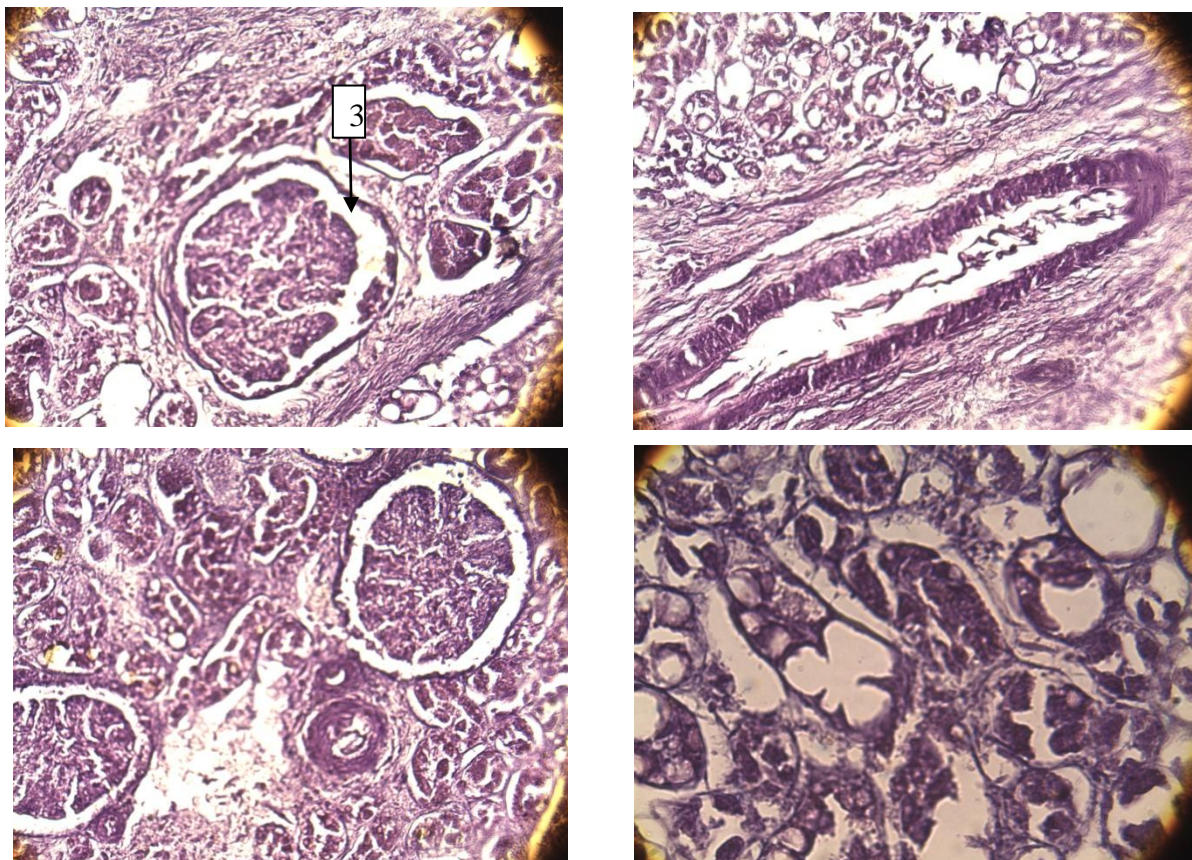
Les lésions microscopiques, peu spécifiques et non constantes sont observées. Les lésions tubulo-interstitielles sont dominantes. Les découvertes d'histologie montrent une inflammation des tubules rénaux (néphrite congestive dégénératives) avec épaissement de la membrane du glomérule (flèche.3) (Figures 48).

Des lésions focales de nécrose (légères à sévères) de l'épithélium des tubules proximaux autour des glomérules sont observées au niveau de la corticale. Les lésions comprennent aussi une néphrite interstitielle, elles sont caractérisées par la présence d'infiltrats inflammatoires de cellules mononuclées, principalement des lymphocytes et aussi une hyperplasie focale et modérée du tissu interstitiel (flèche.2). Une apparition de vacuoles adipeuses est constatée, il s'agit d'une « stéatose minimale » (flèche.1) (Figures 47).





Figures 47. Microphotographies des reins (X40)



Figures 48. Microphotographies des reins (X100)

La toxicité chronique des composés du Cd par voie orale a été étudiée chez le rat, le singe, particulièrement avec le chlorure. L'addition de ce sel dans la nourriture des animaux provoque, de façon caractéristique, des lésions rénales habituellement limitées aux tubules proximaux (nécrose focale des cellules épithéliales tubulaires, gonflement), nécrose des lobules centraux du foie, fibrose, hyperplasie biliaire (Falcu, 2013).

Nos résultats sont en accord avec les analyses histologiques menées dans des études relatives à la néphrotoxicité et à l'hépatotoxicité liées aux métaux lourds (Wang et al., 2008; Rouas, 2010 ; Shatha, 2011). Néanmoins, très peu d'études ont été réalisées chez les ruminants.



Figure 54 : Cadavre de la brebis n°6 (perte de l'incisive).

Conclusion & Perspectives

La prise de conscience de l'impact de la pollution environnementale sur la santé humaine et animale ces dernières années, a relancé l'intérêt de la toxicologie environnementale. En raison de la diversité des dommages biologiques que provoquent les métaux lourds, la compréhension des risques sanitaires liés à ces polluants constituent un déterminant majeur dans l'évaluation et la gestion de l'exposition à ces ETM.

Les risques toxiques auxquels sont confrontés les ruminants sont de nature très diverse. En effet, leur environnement, leurs conditions d'élevage et leur alimentation les exposent à de nombreux polluants notamment aux métaux lourds dont la présence peut être insoupçonnée. Le Pb et le Cd, comme la plupart des ETM, se transmettent et s'accumulent tout le long de la chaîne alimentaire, et ne sont que très faiblement éliminés, ce qui attire l'attention sur les contaminations chroniques.

Ce travail a permis l'identification et l'évaluation quantitative des conséquences liées à l'exposition aux deux ETM (Pb et Cd) et la mise en évidence de leurs effets néfastes à différents niveaux: hématologique, hépatique, rénal et au niveau de homéostasie des éléments essentiels (Zn et Cu) et suggèrent une interaction synergique à effet toxique entre les deux ETM (Pb et Cd). Le Cd a constitué une source de variabilité quant au devenir du Pb ainsi qu'à la relation dose-concentration et concentration-effet dans l'organisme chez les animaux co-exposés.

Le lien entre l'exposition à une dose infratoxique répétée de métaux lourds à long terme et les différents marqueurs biologiques explorés a été établi. Ceci nous laisse déduire que la toxicité est plus étroitement corrélée aux concentrations qu'aux doses. Les indicateurs de toxicité étaient corrélés aux concentrations sanguines croissantes en ETM en fonction de la durée de l'exposition.

Bien qu'il existe déjà certaines données toxicologiques et toxicocinétiques sur le plomb et le cadmium dans la littérature, les étudier séparément et combinés pendant une période aussi longue, avec la dose prédéfinie chez un modèle animal comme le mouton apporte certainement des données nouvelles et brutes sur lesquelles on peut se baser pour des études ultérieures. Ces données en toxicologie ouvrent des pistes de recherche diverses autant sur la

santé animale que sur l'exposition des populations aux différents polluants notamment aux ETM. Par ailleurs, à travers ce travail, on a démontré que le mouton est un excellent modèle expérimental qui se prête très bien à ce genre de recherche.

L'ensemble de tous ces résultats indique que les impacts du Pb et du Cd à des doses environnementales sont décelables en utilisant un ensemble de marqueurs biologiques spécifiques et non spécifiques. L'évolution des différents paramètres, considérés comme des réponses toxicologiques durant et après l'exposition corroborent l'hypothèse que l'exposition à ces deux ETM combinés suit un modèle d'additivité. Néanmoins, les effets de la contamination sont réversibles. Quand les ETM sont retirés, les paramètres reviennent aux normes physiologiques. Les effets néfastes des ETM sont dépendants du temps de l'exposition, plus la durée est longue plus les paramètres physiologiques sont altérés.

Ses résultats en recherche fondamentale ouvrent des perspectives pour des études plus approfondies, notamment dans l'identification d'indicateurs d'exposition et d'effets ; de nombreux autres peuvent être étudiés (marqueurs plus sensibles, plus spécifiques et plus précoces). Ces outils analytiques reposent sur l'utilisation de paramètres et d'indicateur de toxicité qui peuvent être plus ou moins spécifiques et qui sont associés à des lésions organiques affectant certains tissus et organes. Comme tout effet n'est pas clinique, le développement d'approches les plus précoces et spécifiques possibles s'impose.

Par ailleurs, un intérêt spécial doit être apporté à la relation dose/effet en expérimentant d'autres voies de contamination et d'autres marqueurs d'exposition et d'effets. Sachant que, l'induction d'effets individuels a été surtout démontrée en conditions contrôlées sous lesquelles des relations doses-réponses ont été établies.

En Algérie, des travaux de recherche dans le cadre de la préparation de thèse de magister et de doctorat sont entrepris en milieu aquatique. En milieu terrestre, notre étude expérimentale fournira une base pour des recherches futures en toxicologie et en écotoxicologie et permettra de porter un intérêt spécial à la qualité de l'environnement.

Dans le but de répondre à une problématique de contamination subchronique et chronique dans un contexte surtout de co-exposition, nos résultats attirent l'attention sur les dommages causés par les métaux lourds en mixture. Ces données vont permettre également d'ouvrir la voie pour des travaux similaires et à grande échelle, notamment, l'élaboration

d'un programme national de biosurveillance et de l'évaluation du risque liée à plusieurs polluants dans les différents milieux.

Enfin, il sera également intéressant de proposer un développement par la mise au point de stratégies préventives, par l'intermédiaire des techniques de modélisation et de simulation dans l'évaluation de la toxicité dans les différents milieux surtout ceux à risque. La construction d'un modèle permet à la fois une description des phénomènes observés à l'échelle d'un individu et par l'intermédiaire des méthodes de population, la description sera appliquée pour une population. Aussi, des données relatives à une espèce peuvent être via ces méthodes mathématiques extrapolées à une autre espèce en se basant sur des méthodes et outils validés. Les développements à venir, dans le champ de la toxicologie environnementale devront profiter de ces avancées pour réduire les impacts des différents polluants et optimiser au quotidien la sécurité des organismes.

Il apparaît donc clairement le besoin et la nécessité de ce genre de travaux de recherche pour attirer l'opinion scientifique et politique dans notre pays où les questions relatives à la pollution et à l'environnement malgré leur statut problématique restent secondaires.

Perspectives en relation directe avec le protocole expérimental

1. Dosage du Pb et du Cd dans le rein, le foie et l'os dont l'extraction est déjà réalisée
2. Réalisation d'une modélisation toxicocinétique compartimentale du Pb.
3. Réalisation d'une modélisation toxicocinétique du Cd.
4. Soumettre l'os long au duromètre

Références Bibliographiques

1. Abbara C. 2009. Modélisation appliquée à la pharmacocinétique de molécules médicamenteuses de molécules médicamenteuses indiquées en prévention ou en traitement d'atteintes neurologiques chez l'homme. Thèse de doctorat. Université d'Angers, 207 pages.
2. Abdou H M., Newairy A A. 2006. Hepatic and reproductive toxicity of lead in female rats and attenuation by flaxeed lignans. *Journal of the medical research institute JMRI*, 27(4):295-302.
3. Alkaddissi S. 2012. Comparaison de la réponse (en termes d'accumulation, d'impacts cellulaires et génétiques) de l'écrevisse *Procambarus clarkii* après exposition à un polluant métallique (cadmium) et un polluant radiologique (uranium 238 et 233). Thèse de doctorat en écotoxicologie. Ecole Doctorale Sciences et Environnements. Université Bordeaux1. 352 pages.
4. Amzal B., Julin B., Vahter M., Wolk A et Johanson G. 2009. Population Toxicokinetic Modeling of Cadmium for Health Risk Assessment. *Environmental Health Perspectives*, 117(8): 1293-301.
5. Arnaud E. 2012. Les intoxications chez les ovins – Les intoxications chimiques. Pôle santé animale. Vétérinaires et Laboratoires de l'Alliance Pastorale.
6. Auza N. 1983. Le cuivre chez les ruminants. Une revue. *Annales de Recherches Vétérinaires. INRA*. 14(1) : 21-37.
7. Azzopardi N., Lecomte T., Ternant D., Boisdrion-Celle M., Piller F., Morel A. 2011. Cetuximab pharmacokinetics influences progression-free survival of metastatic colorectal cancer patients. *Clinical Cancer Research*. 17(19) : 1-9
8. Baht R V., Moy G G. 1997. Monitoring and assessment of dietary exposure to chemical contaminants. *World Healths Stat Quarterly*, 50 (1-2) : 132-149.
9. Bampidis VA., Nistor E., Nitas D. 2013. Arsenic, Cadmium, Lead and Mercury as Undesirable Substances in Animal Feeds. *Animal Science and Biotechnologies*, 46 (1):125-136.
10. Bao-qiu Li., Gui-qin Yang., Shi-hong Fang., Ji-you Gao.2010. Effect of route of administration on the pharmacokinetics and toxicokinetics of cinnarizine in dogs, 40(3): 197-201.
11. Baudin Fayolle N. 2001. Intérêt du mouton en chirurgie cardiaque expérimentale. Application à l'étude d'une autoprothèse valvulaire mitrale. Thèse de doctorat vétérinaire. Ecole nationale vétérinaire d'Alfort. 89 pages.

12. Benyoussef S. 2013. Notions de pharmacocinétique vétérinaire. Pharmacie et toxicologie. Ecole nationale de médecine vétérinaire de Sidi Thabet (ENMVST). Tunisie.
13. Benyoussef S. 2012. Intoxications animales par les métaux et les metalloïdes/Intoxication par le plomb « le saturnisme ». Ecole nationale de médecine vétérinaire de Sidi Thabet (ENMVST). Tunisie.
14. Bernier D. 2010. Etude et modélisation de la cinétique orale de l'amoxicilline chez le poecelet sevré. Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.) en sciences vétérinaires, option biomédecine. Faculté de médecine. Université de Montréal. 167 pages.
15. Bismuth C., Baud F., Conso F. 2000. Toxicologie clinique. Flammarion Médecine-Sciences, 5ème édition, Paris. 1092 pages.
16. Bisson M., Houeix N. 2014. fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. Institut national de recherche et de sécurité (INRS)- France.
17. Blood DC., Henderson J.A. 1976. Médecine Vétérinaire, 2ème édition. Vigot Frères Editeurs, Paris. 1077 pages.
18. Bois FY. 1999. Modélisation de la toxicocinétique. Laboratoire de méthodologie d'évaluation des risques/ Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSRM).
19. Bonet A. 2011. Effets du cadmium sur l'expression d'enzymes de biotransformation au cours de la différenciation entérocytaire. Maîtrise en biologie. Université du Québec à Montréal. 131 pages.
20. Bonnard N., Falcy M., Hesbert A., Jargot D., Pillière F., Schneider O. 2006. Plomb et composés minéraux. Fiche toxicologique n°59. INRS (Institut national de la recherche scientifique) Canada.
21. Bonnet JM., Cornet AC., Crost T., Renaux JL et Boivin R. 2000. Modèle expérimental d'hémodialyse chez le mouton vigile. Revue Méd Vét, 151 (3): 221-230.
22. Boudebza A, 2015. Etude de la relation entre les paramètres sanguins et les performances de reproduction chez la brebis. Thèse de doctorat. Université des frères Mentouri. Constantine. 216pages.
23. Bouteille B., Millet PB., Enanga J., Mezui MN., Keita M. 2002. La trypanosomose humaine africaine, apport des modèles expérimentaux. Bull Soc Pathol Exot, 95 (5) 341-344.

24. Braun J P., RicoI, AG., Benard JP., Thouvenot JP., Bonnefis MJ. 1978. Tissue and blood distribution of gamma-glutamyl transferase in the lamb and in the ewe. *Res. Vet. Sci* (25): 37–40.
25. Braun JP., Trumel C., Bézille P. 2010. Clinical biochemistry in sheep: A select review. *Small ruminant research*, 92: 10-18. ELSEVIER.
26. Bremner I. 1979. Mammalian absorption transport and excretion of cadmium. The chemistry, biochemistry and biology of cadmium. Elsevier/ Topics in environmental health. North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 175-193.
27. Brochot C. 2006. Paramétrisation des modèles physiologiques toxico/Pharmacocinétiques. Thèse de doctorat. Université Pierre et Marie Curie – Paris 6.
28. Brulle F., Vandebulcke F. 2009. Développement de biomarqueurs d'exposition aux métaux basés sur les fonctions physiologiques de l'annélide oligochète *Eisenia fetida*. Université de Lille 1 – Laboratoire d'Ecologie Numérique et d'Ecotoxicologie. *Etude et Gestion des Sols*, 16: 159- 173.
29. Capowiez y. 2004. Ecotoxicologie terrestre et aquatique, Ecotoxicologie dans le milieu (gestion et évaluation du risque). Université d'Avignon.
30. Caubet A. 1999. Environnement professionnel et santé/ Prévention des risques professionnels. Organisation de la médecine de travail. Intoxication professionnelle par le plomb. Institut universitaire de médecine du travail (IUMT) Rennes. Revue N° 108.
31. Chaze E. 2004. Hépatopathie toxiques d'origine professionnelle. Thèse de doctorat en médecine. Université de Picardie Jules Verne/ Faculté de médecine d'Amiens. 195 page.
32. Clegg FG. 1978. Lead pollution in Derbyshire due to mining and industry. *State Veterinary Journal*, 33: 41-48.
33. Coïc Y., Coppenet M. 1989. Les oligo-éléments en agriculture et élevage / Incidence sur la nutrition humaine. Ed. INRA. Paris. 114 pages.
34. Collet S. 2012. Développement d'une approche toxicocinétique/toxicodynamique basée sur Des mécanismes physiologiques pour évaluer les effets oestrogéniques du Bisphénol A. Thèse de doctorat. Université de Toulouse. France. 218 pages.
35. Danel V. 1997. Intoxication par le plomb - Physiopathologie, épidémiologie, diagnostic. *Rev Prat*, 41: 1509-1512.

36. Depledge M H. 1994. The rationale basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. Non destructive biomarkers in vertebrates, in : Fossi M C and Leonzio C, Eds. Lewis Publishers, p : 271-296.
37. Djaalab I., Mehennaoui S., Lakhdar N., Haffaf S. 2011. Détermination des teneurs en cuivre et en zinc dans l'alimentation, le plasma et dans la laine des brebis reproductrices de l'Est Algérien. Conférence, 18^{ème} éditions congrès international francophone, 3R (Rencontres-Recherches- Ruminants). France.
38. Doyle, J.J., W.H. Pfander, S.E. Grebing et J.O. Pierce II. 1974. Effect of dietary cadmium on growth, cadmium absorption and cadmium tissue levels in growing lambs. *Journal of Nutrition*. 104 (2):160–164.
39. Dubreuil P, Arsenault J., Belanger D. 2005. Biochemical reference ranges for groups of ewes of different ages. *Veterinary Record* 156 (20):636- 638.
40. Dupont D. 2002. Intoxication par le plomb chez les bovins : Données bibliographiques et présentation des résultats du laboratoire de toxicologie de Lyon de 1998 à 2001. Ecole nationale vétérinaire de Lyon. 87 pages.
41. Ekong EB., Jaar BG., Weaver VM. 2006. Lead-related nephrotoxicity: A review of the epidemiologic evidence. *International Society of Nephrology*, (70): 2074–2084.
42. Ellis TM., Masters HG., Mayberry C. 1984. Examination of the susceptibility of different breeds of sheep to zinc intoxication. *Aust. Vet. J.*, 61(9): 296-297.
43. European Food Safety Authority (EFSA). 2004. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to cadmium as undesirable substance in animal feed. *EFSA Journal*, 72 : 1–24.
44. Faiz H. 2011. Etude par spectroscopie RMN du carbone 13 de la toxicité métabolique du cadmium dans les tubules rénaux proximaux murins et humains. Diplôme de doctorat. Ecole Doctorale Interdisciplinaire Science-Santé. Université Claude Bernard Lyon1. 95 pages.
45. Falcy M., Largot. D et al.2013. Cadmium et composés minéraux. Fiche toxicologique. INRS (Institut National de Recherche et de Sécurité)- France.
46. Faroon O, Ashizawa A. 2012.Toxicological profile for cadmium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR)/ Environmental Toxicology Branch and The American College of Occupational and Environmental Medicine (ACOEM). USA. 487 pages.
47. Fassbender C., Rang H. 1975. Experimental subclinical lead poisoning in sheep . Ezymic, chemical and morphological studies. *Zentralblatt Für Veterinarmededizin*, 22 (7): 553-548.

48. Fenneteau F. 2009. Prédiction des impacts pharmacocinétiques des interactions médicamenteuses impliquant les CYP3A et les glycoprotéines-P: Développement de modèles physiologiques et analyse de sensibilité. Thèse de doctorat. Faculté de Pharmacie. Université de Montréal. 307pages.
49. Ferraro MP., Costanzi S., Naticchia A., Sturniolo A et Gambaro G. 2010. Low level exposure to cadmium increases the risk of chronic kidney disease: analysis of the NHANES 1999- 2006. *BMC Public Health*, 10:304.
50. Flammarion P., Devaux A et Garric J. 2000. Marqueurs biochimiques de pollution dans les écosystèmes aquatiques continentaux/ Exemple d'utilisation et perspectives pour le gestionnaire. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* 357: 209- 226.
51. Fourcade J. 2006. Polycopies de Néphrologie : Insuffisance rénale chronique. Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes. 35 pages.
52. Fussler Bagur E. 2011. Rituels et intoxication au plomb chez l'adulte. Spécialité : Médecine générale Thèse de doctorat. Faculté de médecine Pierre et Marie Curie. Paris 120 pages.
53. Gaétan C. Robert C. Brunet M.B. 2005. Evaluation de l'exposition humaine aux organophosphorés et des risques associés à l'aide de biomarqueurs urinaires. Etudes et recherches. Département de santé environnementale et santé au travail. Faculté de médecine. Université de Montréal. 84 pages.
54. Gagan F, Gupta D, Tiwari A. 2012. Toxicity of lead: A review with recent updates. *Interdiscip Toxicol*, 5(2): 47–58.
55. Garric J., Morin S., Vincent-Huber F. 2010. Les biomarqueurs en écotoxicologie : définition, intérêt, limite, usage. *Sciences Eaux et territoire*, 1 :12-17
56. Gensheng W., Bruce AF. 2008. Roles of biomarkers in evalauting interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 233: 92-99. ELSEVIER.
57. Gibaldi M et Perrier D. 1982. Pharmacokinetic. 2end Edition. Ed. Marcel Dekker Inc. 494 pages.
58. Glorennec P., Chanel O. 2000. Plomb, données biologiques et cliniques. Ecole des hautes études en santé publique (EHESP) et Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM). 209 pages.
59. Glorennec P. 2015. Le saturnisme ou intoxication au plomb/ La plombémie, marqueur de l'intoxication par le plomb. École des hautes études en santé publique (EHESP) et Institut de recherche sur la santé, l'environnement et le travail (Irset, Inserm). <http://www.inserm.fr>.

60. Gonick H.C., 2008. Nephrotoxicity of cadmium & lead. *Indian J Med Res* 128: 335-352. Review Article.
61. Götz M. 2011. Le comportement des moutons. Animaux de rente. Feuilles d'information PSA. Edition, Protection Suisse des Animaux (PSA).
62. Goyer R.A. 1993. Lead toxicity: Current concerns. *Environmental health perspectives*, 100: 177- 18.
63. Goudah A., Sher Shah S., Shin HC., Shim JH., Abd El-Aty AM. 2007. Pharmacokinetics and mammary residual depletion of erythromycin in healthy lactating ewes. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 54(10):607-11.
64. Grenier J. 2008. Optimisation de l'utilisation des techniques de modélisation dans le passage de l'étape préclinique à clinique du développement d'un médicament. Thèse de doctorat. Faculté de Pharmacie. Université de Montréal. 225 pages.
65. Guyader D. 2005. Sémiologie Biologique Hépatique. Polycopie. Sémiologie du Foie et des Voies Biliaires. Médecine M2.Univ-Rennes1
66. Haddad S. 2000. Modélisation à base physiologique des interactions toxicocinétiques dans des mélanges complexes de polluants de l'environnement. Thèse de doctorat en santé publique. 203 pages.
67. Hamada t., Tanimoto A, Arima N., Ide Y. Sasaguri T., Shimajiri., S and SasaguriY. 1998 Altered membrane skeleton of red blood cells participates in cadmium-induced anemia. *Biochemistry and molecular Biology international*, 45(4): 841-847.
68. Hans M., Siegfried S., Roger M., Frank W. 1999. Toxicology.1ère édition. Hamburg University Medical School and Department of Toxicology and Environmental Medicine of the Fraunhofer Society, Hamburg, Germany. 1330 pages.
69. Hayes AW. 2008. Principles and methods of toxicology, 5ème édition, CRC Press. 2296 Pages.
70. Houpert P., Mehennaoui S., Enriquez BJ., Kolf-Clauw. M., Milhaud G.1997. Transfer of cadmium from feed to ewe food products: variations in transfer induced by lead and zinc. *Environ Sci*. 5(3) 127-138.
71. Hubert P. 2010. Effets des faibles doses: preuves et inférences. *Environnement Risques & Santé*. 9(4): 295-302.

72. Ismail S., Benromdane S., Ibnhadj Slama J et Romdane MN. 2011. Carences en cuivre et en zinc chez les bovins de la région de Béja : Relations sol-plante-animal. *Revue Méd. Vét.*, 162(10) : 468-474.
73. Jianghon F., Inés AM. 2014. Pharmacokinetics. Part of the special Issue- pharmacology in the 21st Century Biomedical Reseach. *ELSEVIER*. 87(1): 93–120.
74. Johnston SC., Siedenberg R., Min JK., Jerome EH., Laxer KD. 1997. Central apnea and acute cardiac ischemia in a sheep model of epileptic sudden death. *Ann Neurol*. 42 : 588-94.
75. Kaneko JJ., Harvey A JW., Bruss ML.1998. Serum Proteins and the Dysproteinemias. In : *Clinical Biochemistry of Domestic Animals 5th edition*, Academic Press, San Diego, 117-138.
76. Kaneko JJ., Harvey A JW., Bruss ML. 2008. *Clinical Biochemistry of Domestical Animals*, 6th edition, Academic Press, San Diego. 928 pages.
77. Kapaki EN., Verlas PN., Spanaki MV., Andreadou E.,Kakami AE et Papagiou C. 1998. Blood lead levels of traffic and gasoline-exposed professional in the city of Athens. *Ach Environ Health*, 53 (4): 287-291.
78. Karmakar R., Bhattacharya R et Chatterjee M. 2000. Biochemical, haematological and histopathological study in relation to time-related cadmium- induced hepatotoxicity in mice. *BioMetals* 13: 231-239.
79. Keay G., Doxey DL.1981. Species Characteristics of Serum Proteins Demonstrated after Agarose Gel Electrophoresis. *Vet. Res. Comm*, 5, 263-270.
80. Kostic, M., Ognjanovic., B et Zivkovic R. 1993. Cadmium induced changes of antioxidant and metabolic status in red blood cells of rats in vivo effects. *Eur Journal of Hematology*, 51 (2): 86-92.
81. Kouassi E., Fournier M., 2003. *Système immunitaire. Environnement et santé publique/ Fondements et pratiques*. Edisem/Tec et Doc, Acton Vale/ Paris.
82. Lagadic LT., Caquet J., Amiard C., Ramade F. 1997. *Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux*. Collection Écologie, Paris, Masson. 419 pages.
83. Lamand M. 1978. *Les oligo-éléments*. Dalfoz, Ed.Paris. 78pages.
84. Lane E A., Canty M J et More SJ. 2015. Cadmium exposure and consequence for the health and productivity of farmed ruminants (Review). *Research in Veterinary Science*. 101:132–139.

85. Lane EA., Canty MJ. 2012 Overview Appendix 7: Cadmium exposure in cattle: a review. Centre for Veterinary Epidemiology and Risk Analysis and Department of Agriculture, Fisheries and Food, Veterinary Sciences Centre, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Ireland.
86. Larry D. 2004. Analyse critique des biomarqueurs dans l'hépatotoxicité en pratique clinique. Service d'Hépatogastroentérologie et Transplantation. Hôpital Saint-Eloi - CHU Montpellier - Unité INSERM 632 – Montpellier). Congrès annuel SFT – Paris, 23-24 novembre « Biomarqueurs de Toxicité ».
87. Leghait J. 2008. Evaluation du potentiel perturbateur thyroïdien du fipronil chez deux espèces : le rat et le mouton. Thèse de doctorat de l'université de Toulouse. 230 pages.
88. Lévesque M. 2007. Cytotoxicité et voies d'entrée cellulaire du cadmium dans les ostéoblastes humains. Maîtrise en biologie. Université du Québec à Montréal. 132 pages.
89. Liu ZP. 2003. Lead poisoning combined with cadmium in sheep and horses in the vicinity of non ferrous metal smelters. *Sci. Tot. Environ.* 309: 117-126.
90. López Alonso U M., Benedito J L., Miranda M., Castillo C., Hernandez J et Shore R.F. 2000. Arsenic, cadmium, lead, copper and zinc in cattle from Galicia (NW Spain). *The Science of the Total Environment.* 246: 237-248.
91. Louchahi J. 2007. Bases de pharmacocinétiques (PK). *Roneo pharmacologie.*
92. Mahaffey KR., Capar SG., Gladen BC. 1981. Concurrent exposure to lead, cadmium, and arsenic : effects on toxicity and tissue metal concentrations in the rat. *J. Lab. Clin. Med.* 98, 463-481.
93. Madeddu R., Solinas G., Forte G, Bocca B., Asara Y., Tolua P. 2011. Diet and nutrients are contributing factors that influence blood cadmium levels. *Nutrition Research.* 31: 691–697.
94. Manet CE. 2012. Le chat sentinelle du risque d'origine environnementale pour la santé de l'homme. Exemples de contaminants de l'environnement intérieur et de l'alimentation. Thèse de doctorat. Ecole Nationale Vétérinaire D'Alfort. 202 pages.
95. Mehana EE., Meki AR et Fazil KM. 2012. Amelirated effects of green tea extract on lead induced liver toxicity in rats. *Exerimental and toxicologic pathology.* 64 : 291-295.
96. Mehennaoui S., Charles E., Joseph-Enriquez B., Clauw M et Milhaud G. 1988. I. Indicators of lead, zinc, and cadmium exposure in cattle . II. Controlled feeding and recovry. *Vet. Hum. Toxicol,* 30 (6): 550-555.

97. Mehennaoui S. 1995. Toxicité du plomb chez les ruminants; I. Surveillance biologique du saturnisme subclinique chez les Bovins. II. Toxicocinétique chez la brebis en lactation: modification provoquée par le zinc et le cadmium. Thèse de doctorat, université de Paris VII. 132pages.
98. Mehennaoui S., Houpert P., Federspiel B. 1996. Toxicokinetics of lead in the lactating ewe: variations induced by cadmium and zinc. *Environmental sciences*. 5 (2): 065- 078.
99. Melvin EA. 2003. Toxicokinetic modeling and its applications in chemical risk assessment. Department of Environmental health, International Center for Risk assessment. Colorado State University/ USA. *Toxicology Letters*. 138 : 9-27. ELSEIVIER.
100. Meyer D J., Harvey JW. (1998): *Veterinary Laboratory Medicine. Interpretation and Diagnosis*. 2nd ed., W. B. Saunders Company. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo. pp. 157-187
101. Micallef S., Bois FY. 2014. Application des modèles physiologiques à l'analyse de données de toxicocinétiques. *Journal de la Société Française de Statistique, Société Française de Statistique et Société Mathématique de France*. 145 (3): 15-32.
102. Milhaud G., Enriquez B. 1981. Elimination du Plomb par le lait chez les bovins. *Rec Méd.Vét.* 157: 291-296.
103. Milinković -Tur S., Perić V., Stojević Z., Zdelar -Tuk M., Pirsljin J. 2005. Concentrations of total proteins and albumins, and AST, ALT and GGT activities in the blood plasma of mares during pregnancy and early lactation. *Vet. Arhiv*, 75 (3) : 195-202.
104. Min K S., Heda H., Kihana T., Tanaka K. 2008. Increased hepatic accumulation of ingested Cd in associated with upregulation of several intestinal transporters in mice fed diets deficient in essential metals. *Toxicol Sci*. 106: 284-289.
105. Miranda M., López Alonso M., Castillo C *et al.* 2001. Cadmium levels in liver, kidney and meat in calves from Asturias (North Spain). *Eur Food Res Technol*, 212(4): 426–430
106. Moulis JM. 2010. Cellular mechanisms of cadmium toxicity related to the homeostasis of essential metals. *Biometal*, 23(5): 877-896
107. Moreau X. 2010. Utilisation de biomarqueurs animaux dans le diagnostic écotoxicologique précoce. *Journées ECCO REV*.
108. Mouksassi M S. 2012. Études pharmacocinétiques exploratoires de certains médicaments utilisés en analgésie post-opératoire. Thèse de doctorat. Université Montréal. 189 pages.

109. Mushak P. 1993. New directions in the toxicokinetics of human lead exposure. *Neurotoxicology*, 14: 29-42.
110. Mukesh KR, Puneet Kumar, Manoj Singh., Anand Singh. 2008. Toxic effect of heavy metals in livestock health. *Veterinary World*, 1(1): 28-30.
111. Nabil M I., Esam A E., Hossam SE., Yasmin EA. 2011. The effect of lead acetate toxicity on experimental male albino rat. *Biol Trace Elem Res*, 144: 1120-1132.
112. National Research Council (NRC). 2007. *Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids*. The National Academies Press, Washington, DC, USA. 384 page.
113. Nazanin K. 2012. Modélisation toxicocinétique d'un mélange de composés organiques volatils dans l'eau potable. Mémoire de maîtrise ès science en santé environnementale et santé du travail. Université de Montréal. 134 pages.
114. Neff JM. 2002. *Bioaccumulation in Marine Organisms: Effect of contaminants from oil well produced water*. Elsevier Science Publishers, 1ère édition. 468 pages.
115. Noble D. 1993. Blood lead measurement takes the direct approach. *Anal Chem*, 65: 265-267.
116. Noël L., Guérin T., Kolf-Claw M. 2004. Subchronic dietary exposure of rats to cadmium alters the metabolism of metals essential to bone health. *Food and Chem Toxicol*, 42: 1203-1210.
117. Noël L., Huynh-Delerme C., Guérin T., Huet H., Frémy JM., Kolf-Claw M. 2006. Cadmium accumulation and interactions with zinc, copper, and manganese, analysed by ICP-MS in a long-term Caco-2 TC7 cell model. *Pubmed. Biometals*, 19(5):473-81.
118. Nordberg GF., Nogawa K., Nordberg M., Friberg L. 2007. Cadmium, In : *Handbook of Toxicology of metals*, 3^{ème} édition. Elsevier Publishers, Amsterdam, chapitre 23: 445- 480.
119. Nzengue Y. 2008. Comparaison des mécanismes de toxicité redox du cadmium, du cuivre et du zinc : place des métallothionéines et de p53. Thèse de doctorat. Université Joseph Fournier. 300 pages.
120. Ognjanovic BI., Pavlovic SZ., Maletic Zikic RV., Stajin AS., Radojicic RM., Saicic ZS and Petrovic V M. 2003. Protective influence of vitamin E on antioxidant defense system in blood of rats treated with cadmium. *Physiological research*, 52 : 563-567
121. OMS. 1993. *Serie de rapports techniques*. N°3, 57 pages.

122. Ortiz Heredia R. 2014. Modélisation toxicocinétique du benzo(a)pyrène et 3-hydroxybenzo(a)pyrène pour l'interprétation des données de surveillance biologique de l'exposition chez les travailleurs. Thèse de doctorat. Département de santé environnementale et santé au travail Faculté de médecine. Université de Montréal. 268 pages.
123. Pareja-Carrera J., Mateo Rl., Rodrigues-Estival J. 2014. Lead (Pb) in sheep exposed to mining pollution: Implications for animal and human health. *Ecotoxicology and environmental safety*, Elsevier, 108: 210–216.
124. Pastor M. 2013. Modélisation pharmacocinétique/pharmacodynamique par une approche de population de l'effet du G-CSF chez des patients traités avec du carboplatine. Thèse de doctorat. Université de Toulouse. 145 pages.
125. Patil AJ., Bhagwar VR., Patil JA., Dongre NN., Ambekar JG., Jaiikhani R et Das K K. 2006. Effect of lead (Pb) exposure on the activity of superoxide dismutase and catalase in battery manufacturing workers (BMW) of western maharashtra (India) with reference to heme biosynthesis. *Int.J. Environ. Res. Public health*, 3(4): 329-337.
126. Patra RC., Swarup D., Sharma MC., Naresh R. 2006. Trace mineral profile in blood and hair from cattle environmentally exposed to lead and Cd around different industrial units. *J Vet Med*. 53: 511-517.
127. Payne J., Livesey C. 2010. High lead soils: a potential risk to animal and public health. *Chemical Hazards and Poisons Report*, Issue 17. Health Protection Agency UK. 72 pages.
128. Pearl DS., Ammerman C B., Henry P R et Littell RC. 1983: Influence of dietary lead and calcium on tissue lead accumulation and depletion, lead metabolism and tissue mineral composition in sheep. *J. of Animal science*, 56 (6): 1416- 1426.
129. Peraza MA., Ayala-Fierro B., Barber D S., Casarez E et Rael LT. 1998. Effects of micronutriments on metal toxicity. *Environmental health perspectives* , 106: 203-216.
130. Pérez R., Palma C., Núñez M J et Arboix M. 2007. Pharmacokinetics of Ivermectin in pregnant and non pregnant sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology & Therapeutics* is the property of Blackwell, 31: 71-76.
131. Perrin JB. 2007. Les plans de surveillance et de contrôle dans l'analyse du risque alimentaire lié aux métaux lourds en France. Thèse de doctorat. Université Claude-Bernard-Lyon I. 154 pages.
132. Peyret T. 2013. Développement de modèles prédictifs de la toxicocinétique de substances organiques. Thèse de doctorat. Département de santé environnementale et santé au travail. Faculté de Médecine. Université de Montréal. 357 pages.

133. Phillips C J C., Chiy P C et Zachou E. 2005. Effects of cadmium in herbage on the apparent absorption of elements by sheep in comparison with inorganic cadmium added to their diet. *Environmental Research*, 99: 224–234.
134. Phillips C J C., Mohamed M O., Chiy P C. 2011. Effects of duration of exposure to dietary lead on rumen metabolism and the accumulation of heavy metals in sheep. *Small Ruminant Research*, 100: 113-121.
135. Picot A. 2010. Les métaux lourds : de Grands toxiques/ Le trio mercure, plomb, cadmium Association de toxicologie et chimie (ATC) Paris. CNRS France.
136. Pillai A., Gupta S. 2005. Effect of gestational and lactational exposure to lead and/or cadmium on reproductive performance and hepatic oestradiol metabolising enzymes. *Toxicology Letters*. 155: 179–186.
137. Pinault L., Milhaud G. 1998. Intoxication des ruminants par le plomb. *Point Vét.* 29 : 105-111.
138. Pizent A., Jurasovic J., Telisman S. 2003. Serum calcium, zinc, and copper in relation to biomarkers of lead and cadmium in men. *Journ of Trace Elements in Medicine and Biolo.* 17 (3): 199–205.
139. Portier C J. 2012. Toxicological profile for cadmium. Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, US.
140. Pratap M. 2014. Lead toxicity on hematological changes and amelioration with ginger (*Zingiber officinale*) extract in male albino rats. *International Journal of Advanced Research*, 2(4): 23-28.
141. Qian Lu. Yi-Xiong Lei., Chao-cai He et Zi-Ning Lei. 2013. Blood translation elongation factor-1 δ is a novel marker for cadmium exposure. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (3): 5182-5197.
142. Randa AH., Dawlat MA., Nariman AR., Hatem M E et Dessouky M I. 2012. Clinicopathological, histopathological and immunological studies on animals exposed to lead and cadmium under experimental conditions. *New York science Journal*, 5(12): 120-136.
143. Reis LSL., Pardo PE., Camargos AS., Oba E. 2010. Mineral element and heavy metal poisoning in animals. *Journal of Medicine and Medical Sciences*, 1(12) : 560-579.
144. Ribera D., Taberly J. 2011. Mélanges de polluants, toxicité, écotoxicité et évaluation des risqué. *RECORD*, n°08-0668/1A. 295 pages.

145. Rodrigues-estival J., Barasona J A et Mateo R. 2011. Blood Pb and δ -ALAD inhibition in cattle and sheep from a Pb-polluted mining area. *Environmental Pollution*. ELSEVIER
146. Romanetto J. 2011. Intérêt des marqueurs biologiques dans les essais cliniques. Thèse de docteur en pharmacie. Faculté de pharmacie. Université Henri Poincare – NancyI. 122 pages.
147. Roquet-Noël V.2002. Neurotoxicité du plomb pendant le développement – Mise au point bibliographique. Thèse pour le doctorat vétérinaire. Ecole nationale vétérinaire d'Alfort. 109 pages.
148. Sabath E., Robles-Osorio M L. 2012. Renal health and the environment: heavy metal nephrotoxicity. *Nefrologia*, 32(3) : 279-286
149. Sakai T. 2000. Biomarkers of lead exposure. *Ind. health*, 38 (2) , 127-42.
150. Schorderet M. 1989. Pharmacologie (des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. 3^{ème} édition. Office des publications universitaires (Alger). 1032 pages.
151. Schwartz J., Landrigan PJ., Baker EL Jr., Orenstein WA., Lindern IH. 1990. Lead-induced anemia: dose –response relationships and evidence for threshold. *American Journal of Public Health*, 80: 165-168.
152. Shashi D. 2002. Immunotoxicity of soluble and in soluble salts of cadmium instilled intratracheally. *Industrial toxicology research center*. Lucknow,India. *Indian journal of experimental biology*, 40: 262- 267.
153. Shatha., M. H. 2011. Effect of Lead Toxicity on Liver of Male Albino Mice Ultrastructural Study. *Kufa Med.Journal* . 14(1).
154. Simon N. 2006. Pharmacocinétique de population: Introduction à Nonmem. Collection: Pharmacologie médicale. SOLAL Editeurs. France. 103pages.
155. Skerfving S., Nilson U., Schutz A., Gerhardsson L.1993. Biological monitoring of inorganic lead. *Scand Journal of Work Environment and Health*, 1: 59-64
156. Smaoui M., Ghorbel F., Boujelbene M., Makni -Ayad F., El fekil A. 2000. Impact de l'exposition chronique aux gaz d'échappement d'origine automobile sur certains biomarqueurs touchant la fonction hormonale sexuelle mâle, la fonction rénale et l'hémogramme chez le rat. *Pollution Atmosphérique* n°167.
157. Smith K M., M P. Dagleish P W. Abrahams. 2010. The intake of lead and associated metals by sheep grazing mining-contaminated floodplain pastures in mid-Wales, UK: II. Metal concentrations in blood and wool. *Science of the Total Environment*, 408(5) : 1035–1042

158. Soetan KO., OlaiyaC O., Oyewole O E. 2010. The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants: A review. African Journ of food sc, 4 (5): 200-222.
159. Steketee J. 2010. Métaux lourds. Cahiers SKB. La Fondation Développement et transfert de connaissances sur le sol (SKB). Pays-Bas. 40 pages.
160. Stoev SD., Grozeva N., Simeonov R., Borisov I., Hubenov H. 2003. Experimental cadmium poisoning in sheep. Exp Toxicol Pathol, 55(4):309-14.
161. Subramanian KS. 1989. Determination of lead in blood by graphite furnace atomic absorption spectrometry. A critique. Sci Total Environ, 89: 237-250.
162. Terayama K. 1993. Effects of lead on electrophoretic mobility, membrane sialic acid, deformability and survival of rat erythrocytes. Ind. Health, 31: 113-126.
163. Thornton I., Abrahams P. 1983. Soil ingestion--a major pathway of heavy metals into livestock grazing contaminated land. Sci Total Environ, 28:287-94.
164. Tomas M L., Beal SL., Sheiner LB. 1994. Comparison of Akaike Information Criterion, the Schwarz Criterion and the *F* Test as Guides to Model Selection. Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics , 22 (5): 431-445.
165. Toutain PL., Bousquet-Mélou A. 2007. Les modèles compartimentaux. UMR 181 Physiopathologie et Toxicologie Expérimentales INRA/ENV. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.(a)
166. Toutain PL., Bousquet-Mélou A. 2007. Le modèle monocompartimental : Administration du principe actif par voie extravasculaire. UMR 181 Physiopathologie et Toxicologie Expérimentales INRA/ENV. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (b).
167. Trumel C., Schelcher F., BraunJ P., Guelfij F. 1996. L'électrophorèse des protéines sériques : principes d'interprétation chez le chien, le chat et le cheval. Rev Med vét, 147 (02):123-130.
168. Verge G G. 2006. Evaluation et gestion du risque lié à l'ingestion de produits de la mer contaminés par le cadmium. Thèse de docteur vétérinaire. Université Paul Sabatier de Toulouse. 98 pages.
169. Viau C., Tardif R. 2003. Manuel de Toxicologie. Environnement et santé publique-Fondements et pratiques /Edisem/ T, 119-143.
170. Vigouroux E. 2010. Analyse des flux métaboliques : méthode des marqueurs, analyse compartimentale, pharmacocinétique. (http://www.vgxflux1.fr/ChIV_1.htm)
171. Underwood N., Suttle F. 1999. Mineral Nutrition of Livestock, CAB International. Université Claude Bernard- Lyon I. 87pages.

172. Waldner C., Checkley S., Blakley B., Pollock C et Mitchell B. 2002. Managing lead exposure and toxicity in cow-calf herds to minimize the potential for food residues. *Journ. Vet. Diag. Invest*, 14: 481-486.
173. Wang L., Jianji L., Jingui L., Zongping L. 2010. Effects of Lead and/or Cadmium on the Oxidative Damage of Rat Kidney Cortex Mitochondria. *Biol Trace Elem Res*. 137:69-78
174. Wang L., Xuelei Z., DubaoY., Zhenyong W. 2011. Effects of lead and /or cadmium on the distribution patterns of some essential trace elements in immature female rats. *Human and Experimental toxicology*, 30 (12) 1914-1923.(a)
175. Wang L., Heng W., Jingui L., Dawei C., Zongping L. 2011. Simultaneous Effect of lead and cadmium on primary cultures of rat proximal tubular cells: interaction of apoptosis and oxidative stress. *Arch Environ Contam Toxicol*, (61): 500-511.(b)
176. World Health Organisation (W.H.O). 1992. IPCS. Environmental health criteria 134 Cadmium. Geneva.
177. Xiao Chen., Keyue W., Zhongqiu W., Caohui G., Ping H., Yihuai L., Taiyi J et Guoying Z. 2014. Effect of lead and cadmium co-exposure on bone mineral density in a chinese population. *Elsevier: Bone*, 63:76–80.
178. Yuan G., Dai S., Yin Z., Lu H., Jia R., XuJ., Song X., Li L., Shu Y et Zhao X. 2014. Toxicological assessment of combined lead and cadmium: acute and sub-chronic toxicity study in rats. *Food Chem Toxicol*, 65: 260-268.
179. Zhang Y., Huo M., Zhou J., Xie S. 2010. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Computer methods and programs in biomedicine*, 99: 306–314.
180. Zimmerman, H J., Dujovne C A., Levy R. (1968): The correlation of serum levels of two transaminases with tissue levels in six vertebrate species. *Comp. Biochem. Physiol*. 25, 1081-1089.
181. Zmudzki J., Bratton GR., Womac C., Rowel LD. 1985. Low dose lead effects in calves fed a whole milk diet. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. 35(612-619).

Résumé

Afin de mimer une exposition environnementale à des doses infratoxiques de Pb (2,5 mg/kg pv) ou/et de Cd (2mg/kg pv), 15 brebis de la race (Ouled Djellel) ont fait l'objet de l'expérimentation. Les animaux ont été répartis aléatoirement en 03 groupes de 05 sujets selon la nature du traitement: un lot Pb, un lot Cd et un lot co-exposé (Pb+Cd). Le schéma expérimental a été conduit en trois périodes : - une période pré-exposition de 4 semaines :les brebis servaient de témoins durant cette période ; - une période d'exposition de 17 semaines : les sujets ont reçu par voie orale des doses uniques et journalières de sels métalliques sous forme de gélules, 159mg de nitrates de Pb ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) et 162mg de chlorure de Cd ($\text{CdCl}_2, 2.5\text{H}_2\text{O}$) ; - une période de récupération, étalée sur trois mois et demi après arrêt des traitements.

La quantification des ETM a été réalisée par spectrophotométrie à absorption atomique à four graphite et à flamme, respectivement pour (Pb - Cd) et (Zinc (Zn) - Cuivre (Cu)). Une étude toxicocinétique par approche non compartimentale du Pb a été réalisée à l'aide du logiciel utilisant un programme d'analyse de régression linéaire adapté « PK Solver » version 2.0. La méthode linéaire trapézoïdale a été choisie. Les paramètres hématologiques (Hémoglobine :Hgb et Hématocrite : Hct), biochimiques, transaminases (ALT : alanine aminotransferase, AST : aspartate aminotransferase), protides totaux, créatinine CRT et profils électrophorétiques ont été déterminés par automates. La méthode classique a été utilisée pour l'histopathologie. Enfin, la spectrophotométrie à absorption atomique a été utilisée pour la détermination du Pb et du Cd et des éléments essentiels (Zn, Cu, Ca et Fe) dans l'aliment.

Les niveaux du Pb et du Cd dans l'aliment sont non détectables. Avant les traitements les plombémies et les cadmiémies étaient inférieures à la limite de détection, 4 $\mu\text{g/l}$ pour Pb et 0,3 $\mu\text{g/l}$ pour Cd. Une augmentation des concentrations sanguines en ETM a été observée dès le début de l'exposition. Les plombémies sont situées entre 135 \pm 57 $\mu\text{g/l}$ à 569 \pm 264 $\mu\text{g/l}$ pour le groupe Pb et entre 192 \pm 75 $\mu\text{g/l}$ et 445 \pm 294 $\mu\text{g/l}$ pour le groupe co-exposé. A la 9^{ème} semaine, les moyennes des plombémies étaient plus élevées chez le lot Pb+Cd. Les cadmiémies ont évolué de 1,4 \pm 0,81 $\mu\text{g/l}$ à 44 \pm 6 $\mu\text{g/l}$ chez le groupe Cd et de 2,5 \pm 1,2 $\mu\text{g/l}$ à 47 \pm 10 $\mu\text{g/l}$ chez le group co-exposé.

Nos résultats confirment les effets néfastes des deux ETM au niveau hématologique par une diminution des taux de l'Hgb et de l'Hct et au niveau hépatique et rénal par une augmentation des niveaux sérique de l'ALT, L'AST et de la CRT. Des aspects lésionnels au niveau du foie et du rein ont été constatés. Une altération de l'homéostasie du Zn et du Cu a été observée

suggérant des interactions avec le Pb et le Cd. Les indicateurs de toxicité étaient corrélés aux concentrations sanguines croissantes en ETM en fonction de la durée de l'exposition. ANOVA a révélé au moins un effet, soit temps ou traitement pour tous les paramètres. Une interaction synergique à effet toxique entre les deux ETM (Pb et Cd) a été constatée.

L'analyse non compartimentale a permis la description quantitative de la cinétique du Pb. A travers le calcul des paramètres toxicocinétiques d'abord individuels, puis relatifs au lot, nous avons pu apprécier le degré d'exposition des brebis dans les deux lots, notamment par le calcul des AUC, MRT, $t_{1/2}$ et Cl. Ces paramètres ont montré que le Pb demeure longtemps dans l'organisme, que son élimination est très faible et que le Cd a constitué une source de variabilité de la relation dose-concentration et concentration-exposition.

Ce travail ouvre des perspectives pour des études plus approfondies, notamment dans l'identification d'indicateurs d'exposition et d'effets plus sensibles, plus spécifiques et plus précoces.

Mots clés : Brebis, Plomb, Cadmium, profil biochimique, toxicocinétique, toxicité orale subchronique,

SUMMARY

The aim of the study was to highlight the toxic effects after lead and lead-cadmium repeated oral exposure in ewes. An experiment was conducted using “OuledDjellal” ewes during three periods: before exposure: where ewes are considered as controls, during exposure and after exposure. fifty ewes were randomly divided in three groups of five; the lead group received lead nitrate at 2.5 mg of Pb/kg/day, the Cd group received Cd chloride at 2 mg of Cd/kg/day and the Pb+Cd group received Pb nitrate at 2.5 mg of Pb/kg/day +2 mg of Cd/kg/day orally during 17 weeks. Metallic salts were enclosed in gelatin capsules.

Lead and cadmium levels were measured by graphite furnace with deuterium background correction in pyrolytic heated graphite tube. Flame atomic absorption spectrometry (PerkinElmer Analyst, 100) was used for performing zinc and copper analysis in plasma. Total serum protein, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), electrophoretic protein profile and serum creatinin levels were measured by using Automatic biochemistry analyzer. Histopathological study was performed using conventional technique.

Before, during and after receiving treatment, all groups were tested for their blood Pb and Cd levels, hematological and biochemical parameters, essential elements (Zinc:Zn and Cooper: Cu) levels were also tested. Pb and Cd contents of the diet were below the detection limits. Before exposure, blood Pb and Cd levels were below the detection limit of 4 µg/l for Pb and 0,3 µg/l for Cd. Blood levels of Pb during 17 weeks of exposure varied from 135±57 µg/l to 569±264 µg/l for the Pb group and from 192±75 µg/l to 445±294 µg/l for the co-exposed group. At 9th week, mean blood Pb levels of lead-cadmium group were more elevated than the ones of the lead group. Blood levels of Cd varied from 1,4±0,81 µg/l to 44±6 µg/l in Cd group and from 2,5±1,2 µg/l to 47±10 µg/l in co-exposed group. The rates of hematocrit and hemoglobin decreased for all treated groups. The transaminases (ALT, AST) and creatinine revealed elevated levels at the end of exposure. Histopathology showed liver and kidney lesions. Altered Zn and Cu homeostasis was noted. Toxicity indicators were correlated with increasing blood levels of Pb and Cd depending on the duration of exposure. ANOVA revealed at least one effect (time or treatment) in all tested marks.

Non-compartmental estimation of toxicokinetic parameters has allowed a quantitative descriptive analysis of Pb fate in ewes bodies. « PK Solver » software 2.0 (Linear Trapezoidal method) was used for non-compartmental analysis of plasma data after intravenous constant infusion input.

Through the calculation of the toxicokinetic parameters, first individual, then relating to the group, the degree of ewes exposure was assessed. Determination of AUC, MRT, $t_{1/2}$ and Cl showed that Pb persists longtime in the body and its elimination is very low. Cd was a source of variability in dose-concentration relationship and concentration- exposure relationship.

This research opens up prospects for further studies, including the development of exposure and effect biomarkers more sensitive, more specific and earlier.

Keywords: Ewe, Cadmium, Lead, Serum biochemical profile, Subchronic oral toxicity, Toxicokinetic.

ملخص

الهدف من هذا البحث هو تقليد التعرض للملوثات البيئية و تقييم التسمم المزمن بالمعادن الثقيلة. 15 نعجة من سلالة اولاد جلال قسمت الى 3 مجموعات لخمسة حيوانات. مجموعة تتلقى جرعات الرصاص Pb 2.5 مغ/كغ و مجموعة تتلقى جرعات الكاديوم Cd 2 مغ/كغ و المجموعة الثالثة تتلقى مزيج من المعدنين (Pb 2.5 مغ/كغ و Cd 2 مغ/كغ). املاح المعادن الثقيلة (نترات الرصاص 159 مغ و كروميد الكاديوم 162مغ) حضرت على شكل كبسولات تأخذ عبر الفم. التجربة اجريت على ثلاث مراحل- المرحلة الاولى كانت للتأقلم وجعل الحيوانات مرجع للحالة الطبيعية -المرحلة الثانية كانت لأخذ الجرعات لمدة 17 أسبوع و المرحلة الثالثة كانت للاسترداد والانتعاش بعد التوقف عن التسمم.

خلال المراحل الثلاثة تم اخذ عينات الدم و اجراء مختلف التحاليل. البحث عن نسبة المعادن الثقيلة و العناصر الاساسية زنك و نحاس في الدم باستعمال مقياس الطيف الضوئي بالامتصاص الذري. المعلمات الدموية (Hgb و Hct) و الكيمياء الحيوية (الانزيمات الكبدية AST-ALT و البروتين الكلي TP و مؤشر الكلى كرياتنين CRT) تم قياسها اليا بأجهزة خاصة. دراسة الانسجة تمت بالتقنية التقليدية للتشريح المرضي. قياس كميات المعادن الثقيلة و العناصر الاساسية Fe - Ca- Cu-Zn في عينات العلف تمت باستعمال مقياس الطيف الضوئي بالامتصاص الذري.

قبل البدء في التعرض للمعادن الثقيلة كانت كل المؤشرات الحيوية لحيوانات التجربة طبيعية و عادية، نسبة Pb في الدم كانت اقل من 4مغ/ل ونسبة Cd اقل من 0.3 مغ/ل. مباشرة بعد اخذ جرعات المعادن اخذت نسبها في الدم بالارتفاع فكانت نسبة Pb تتراوح بين 135±57 مغ/ل و 569±264 مغ/ل في مجموعة Pb وقي مجموعة Cd + Pb النسب تتراوح بين 192±75 مغ/ل 445 ±294 مغ/ل. في الاسبوع التاسع نسبةPb كانت اعلى في المجموعة التي تلقت مزيج المعدنين. اما نسبة Cd فكانت تتراوح بين 1,4±0,81 مغ/ل و 44±6 مغ/ل في مجموعة Cd و في مجموعة Pb+ Cd فالنسبة كانت بين 2,5±1,2مغ/ل و 47±10مغ/ل.

هذا البحث العلمي اكد تأثير هذين المعدنين على كل المؤشرات الحيوية حيث تم ملاحظة انخفاض في مستوى المعلمات الدموية و كذا ارتفاع في انزيمات الكبد و مؤشر الكلى، كما تمت ملاحظة اصابة الخلايا الكبدية و الكلوية. نسبة العناصر الاساسية تأثرت كذلك حيث لوحظ انخفاض في نسبها الدموية مما يرجح وجود تفاعلات تنافسية مع المعادن الثقيلة. اتضح كذلك على ان كل مؤشرات التسمم كانت مرتبطة بالمستويات الدموية للمعادن الثقيلة و بالمدة الزمنية التي تعرضت فيها الحيوانات للتسمم. اختبار ANOVA اكد وجود تأثير الزمن او نوع الجرعة او الاثنان معا على كل المؤشرات الحيوية. تم ايضا ملاحظة تفاعلات بين المعدنين Pb و Cd مما ادى الى تأثير اقوى للتسمم.

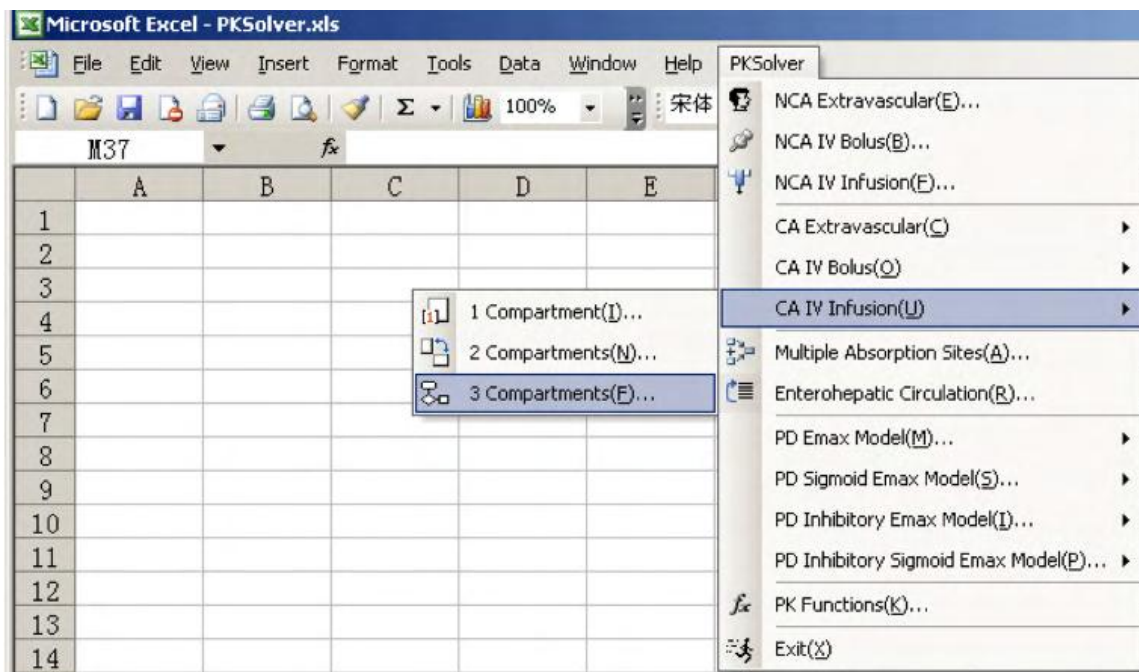
الوصف الكمي لحركية الرصاص داخل اجسام الحيوانات باستخدام التحليل الغير المجزئ اعتمادا على معادلات رياضية ومن خلال حساب المعلمات السمية CI- t_{1/2}- MRT- AUC الفردية ثم المتعلقة بالمجموعة، يمكننا أن نقدر درجة تعرض الأغنام للتسمم عند المجموعتين. فتأكد ان الرصاص يبقى طويلا في اجسام الحيوانات و ان طرحه ضعيف جدا. تأكد ايضا ان حركية Pb تآثرت بوجود معدن اخر حيث غير وجود Cd مجرى بعض المعلمات السمية. كان Cd مصدر تغيير بالنسبة للعلاقة بين جرعة Pb و تركيزه في الدم وكذا العلاقة بين تركيز هذا المعدن في الدم و التقدير الكمي للتعرض.

الكلمات المفاتيح : نعجة – رصاص- كاديوم - بيوكيمياء - الحركية السمية - التسمم المزمن عبر الفم

Annexes

Tableau 18. Références des paramètres biochimiques usuels chez le mouton

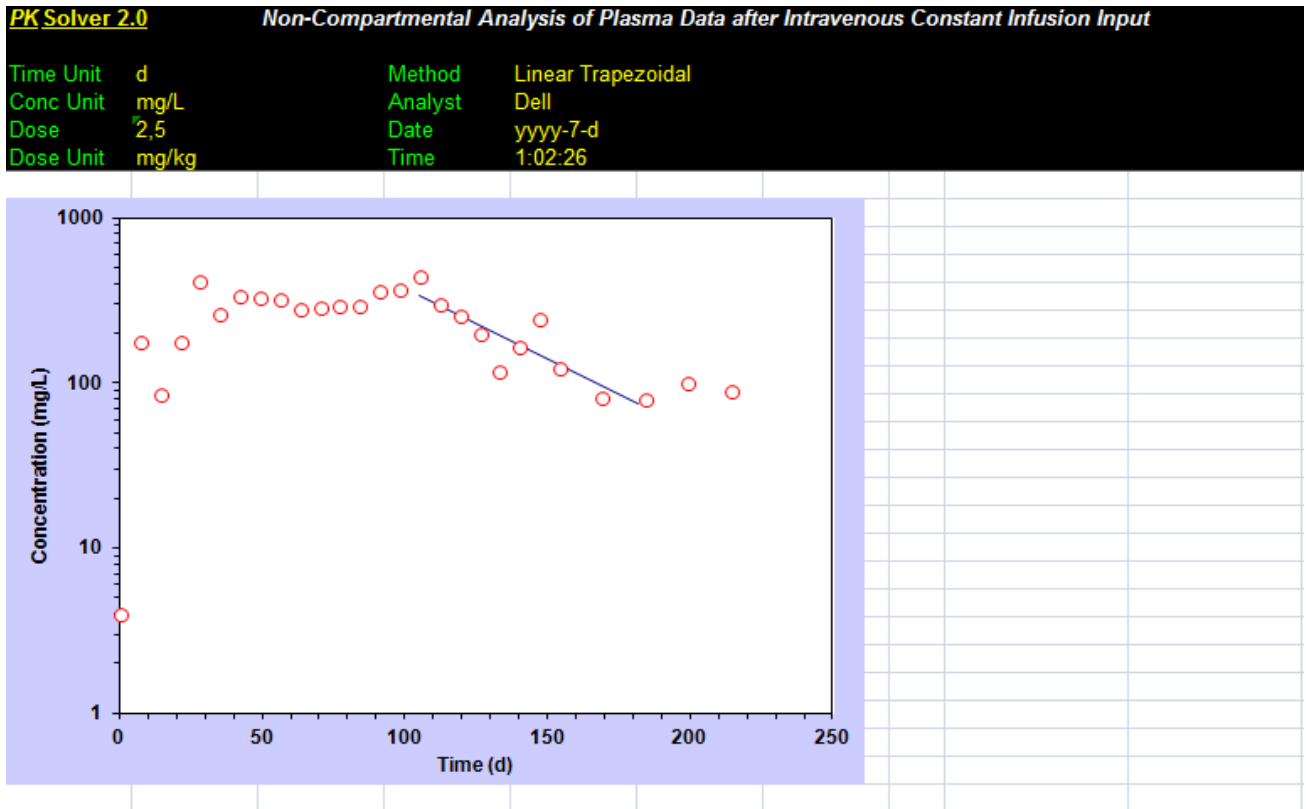
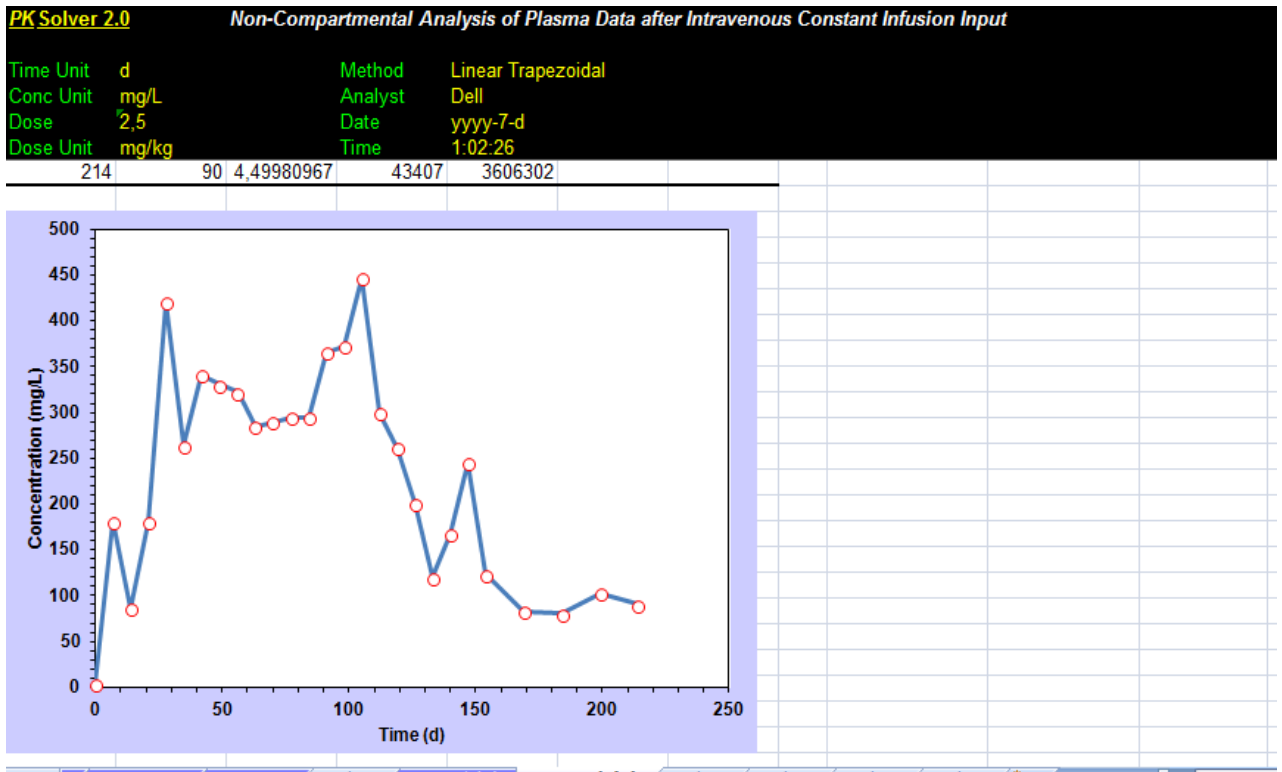
Auteurs	Dubreuil et <i>al.</i> (2005)	Kaneko et <i>al.</i> (2008)	Carlos et <i>al.</i> (2015)	Boudebza, (2015)
Paramètres				
Protides totaux (g/l)	61,0 - 71,2	60 - 79	57,7- 62,1	72,88 – 90
Albumines (g/l)	30,2 - 37,1	24 - 30	30- 30,2	23,04 – 33,92
Globulines (g/l)		35 - 57	24,8-29,2	
Ratio ALB/GLB		0,42- 0,76	1,41- 1,73	
ALT (UI/l)	9 - 22	6-20	29,04 – 31,56	10,02 - 26,42
AST (UI/l)	72 - 101	60 - 280	89,82 - 95,87	63,41-113,49
Créatinine (mg/l)	8 - 13	12 - 19	14,8 - 18	6,79 - 8,06



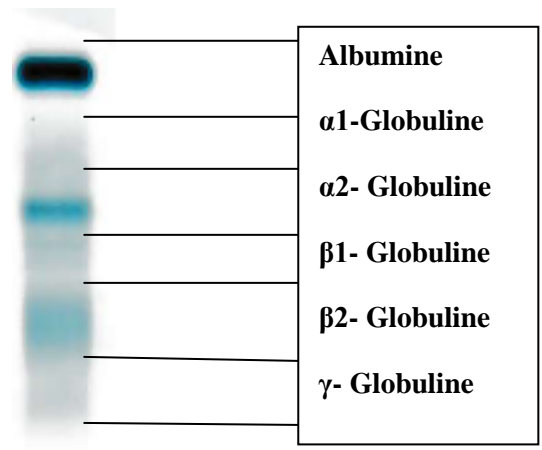
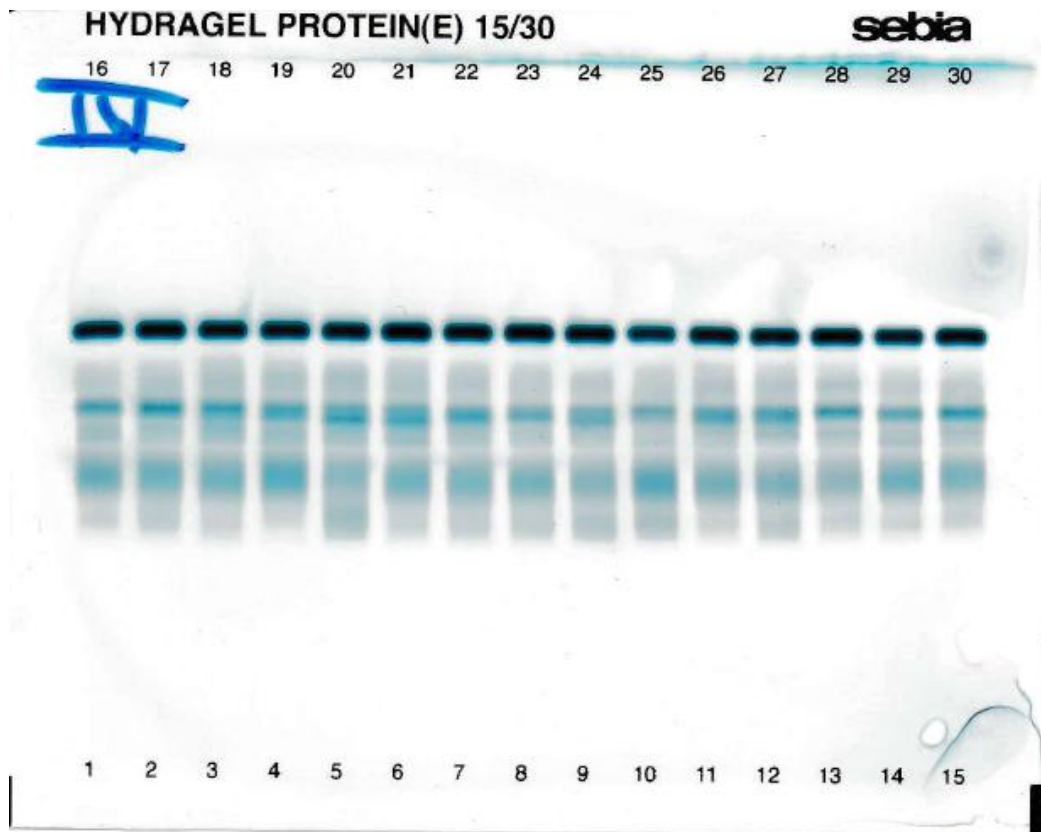
PK Solver 2.0 *Non-Compartmental Analysis of Plasma Data after Intravenous Constant Infusion Input*

Time Unit	d	Method	Linear Trapezoidal
Conc Unit	µg/L	Analyst	shift
Dose	2.5	Date	yyy-2-d
Dose Unit	mg/kg	Time	8:48:38

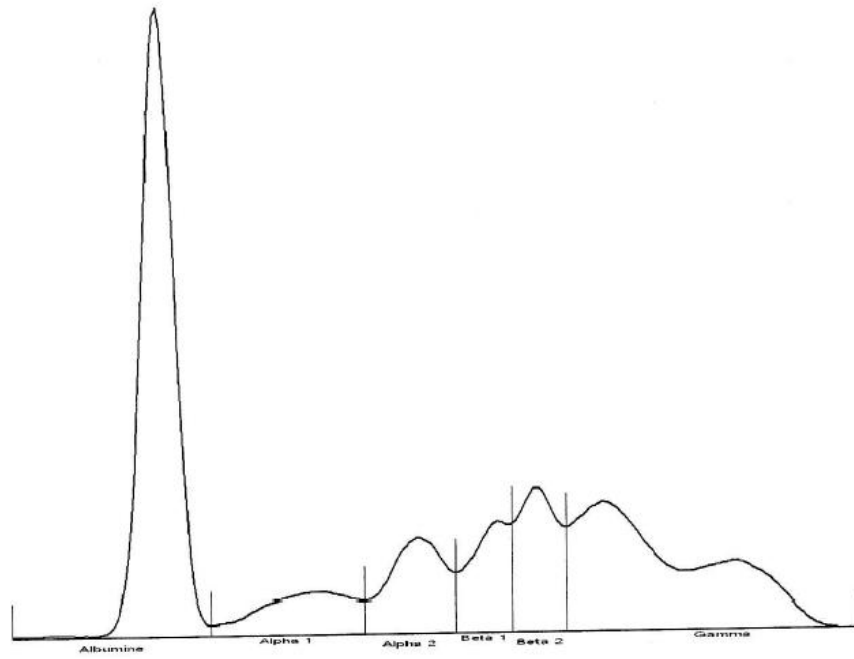
Time	Conc	ln(C)	AUC	AUMC	R	R_adj	Parameter	Unit	Value
0	4	1,3862944	0	0			Lambda_z	1/d	0,02367533
7	221	5,3981627	787,5	5414,5			t1/2	d	29,2771931
14	163	5,0937502	2131,5	18816			Tmax	d	119
21	165	5,1059455	3279,5	38930,5			Cmax	µg/L	834
28	160	5,0751738	4417	66738			T_infusion	d	119
35	321	5,7714411	6100,5	121740,5			Clast_obs/Cmax		0,10551559
42	324	5,7807435	8358	208691			AUC 0-t	µg/L*d	71260
49	320	5,768321	10612	311199			AUC 0-inf_obs	µg/L*d	74976,9494
56	366	5,9026333	13013	437815			AUC 0-t/0-inf_obs		0,95042544
63	463	6,1377271	15914,5	611642,5			AUMC 0-inf_obs	µg/L*d^2	7775359,46
70	471	6,1548581	19183,5	829129			MRT 0-inf_obs	d	44,2033318
77	621	6,4313311	23005,5	1111883,5			Vz_obs	(mg/kg)/(µg/L)	0,00140837
84	603	6,4019172	27289,5	1456525			Cl_obs	(mg/kg)/(µg/L)/d	3,3344E-05
91	644	6,4676987	31654	1838921			Vss_obs	(mg/kg)/(µg/L)	0,0014739
98	608	6,4101749	36036	2252579					
105	706	6,5596152	40635	2720578					
112	770	6,6463905	45801	3281873					
119	834	6,7262334	51415	3931074	-0,871317	0,7247922			
126	304	5,7170277	55398	4412499	-0,842053	0,6605626			
133	329	5,7960578	57613,5	4699712,5	-0,838366	0,6434286			
140	393	5,9738096	60140,5	5045432	-0,805469	0,5609751			
147	152	5,0238805	62048	5316206	-0,691143	0,3035707			
161	343	5,8377304	65513	5859175	-0,858619	0,6058404			
175	117	4,7621739	68733	6389061	-0,684044	-0,064166			
189	78	4,3567088	70098	6635580					
203	88	4,4773368	71260	6863822					



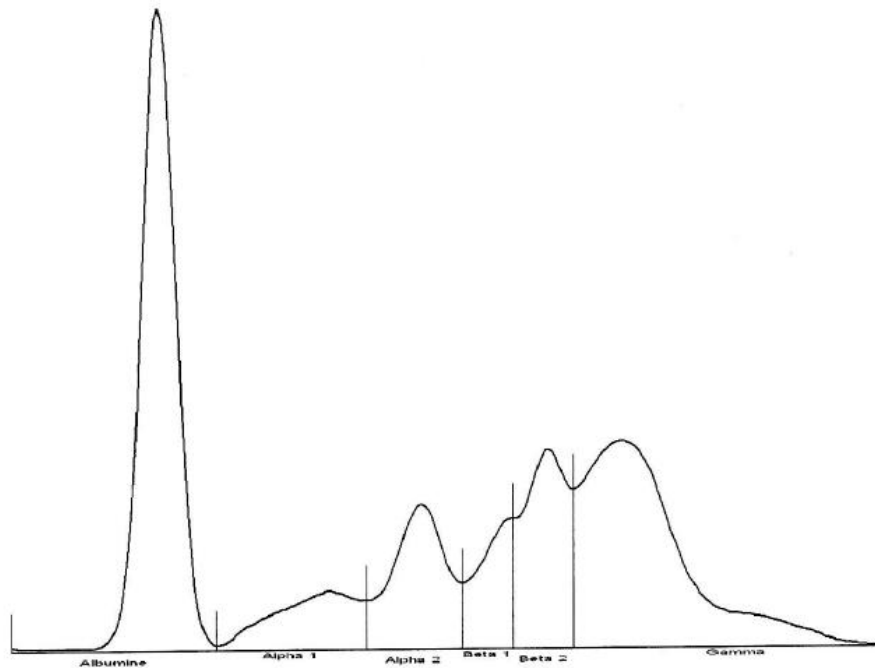
Figures 48. Le logiciel PK Solver 2.0 (plombémies saisies et paramètres toxicocinétiques calculés)



Figures 49. Membrane d'électrophorèse (gel après coloration, révélant la migration des différentes fractions protéiniques chez les 15 brebis de l'expérimentation)

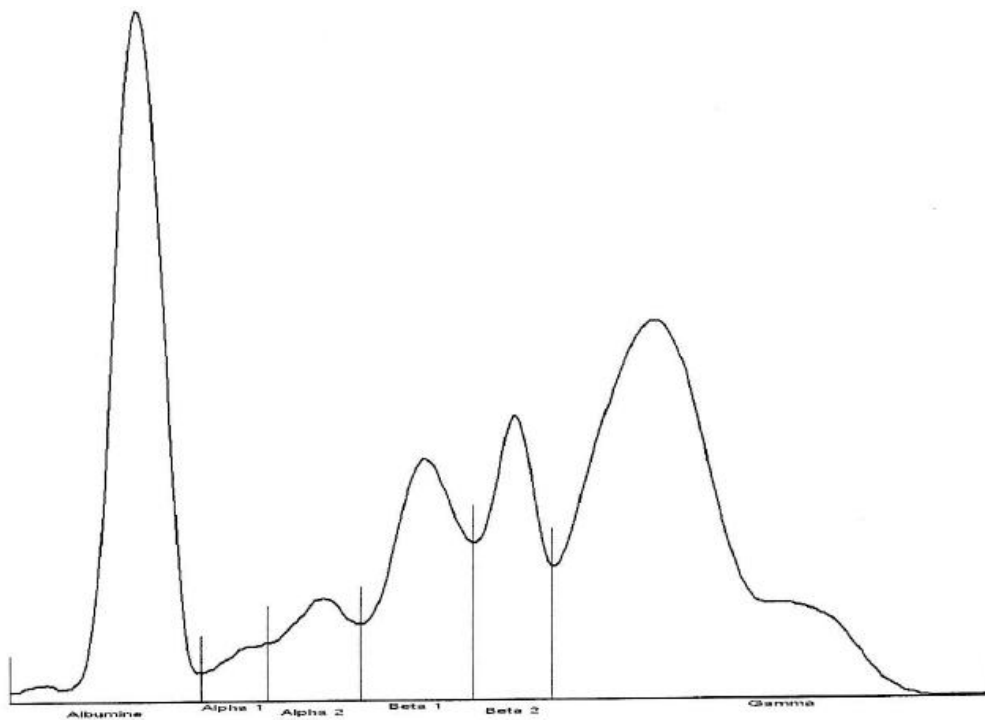


Protides totaux= 70.6 g/l A/G = 0.59

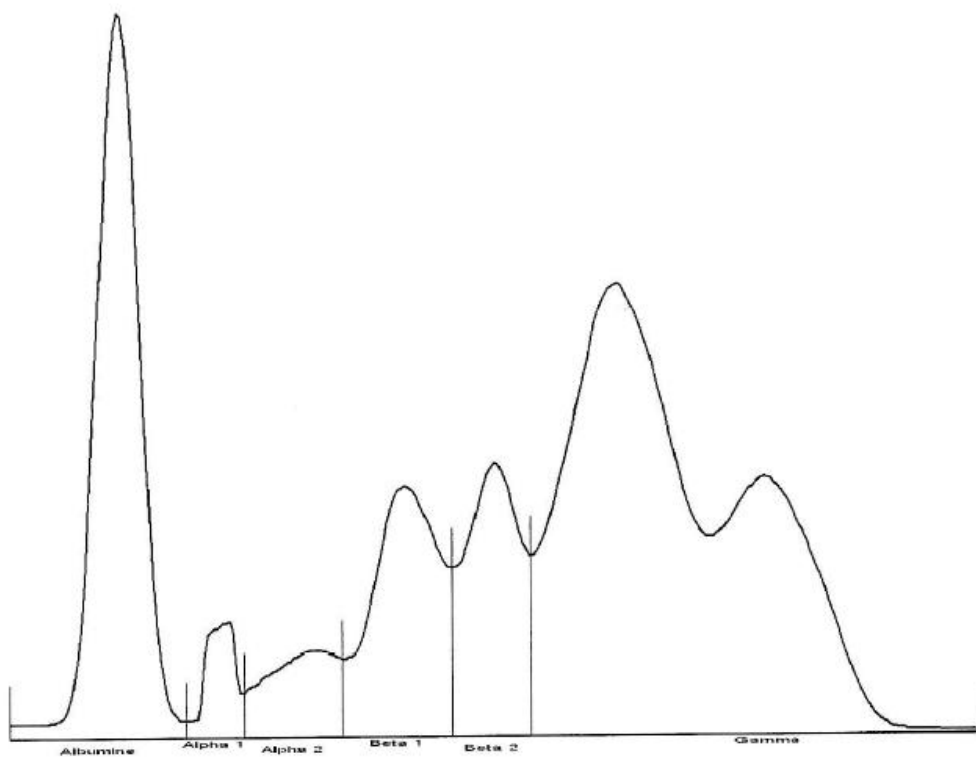


Protides totaux= 65.0 g/l A/G = 0.49

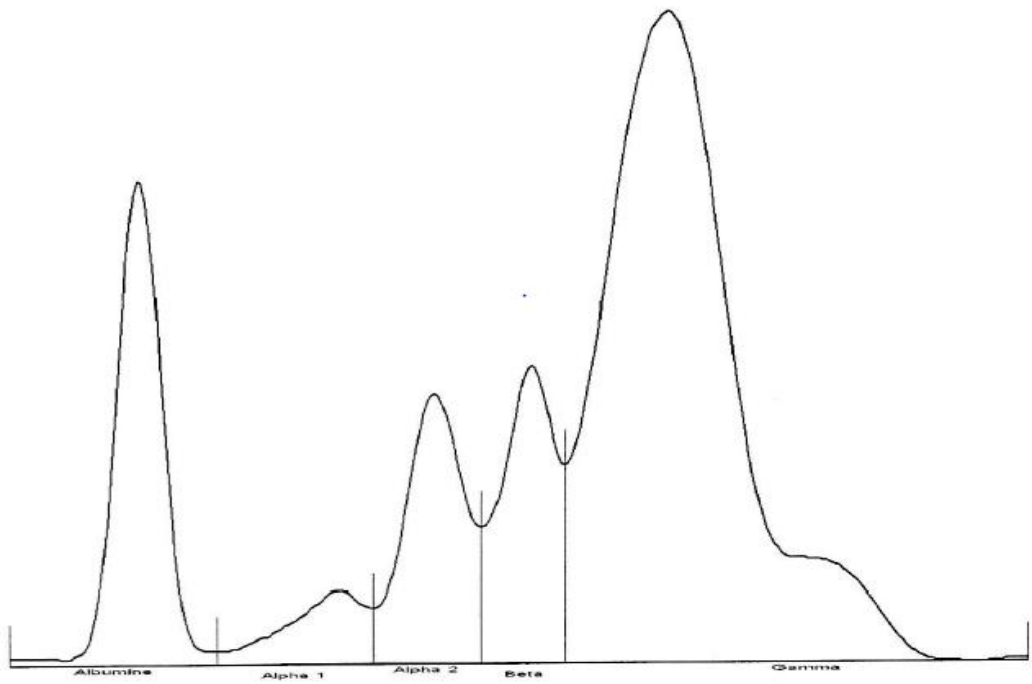
Figures 50. Exemples de profils électrophorétiques normaux chez les témoins (brebis avant l'exposition)



Protides totaux= 56.3 g/l A/G = 0.37

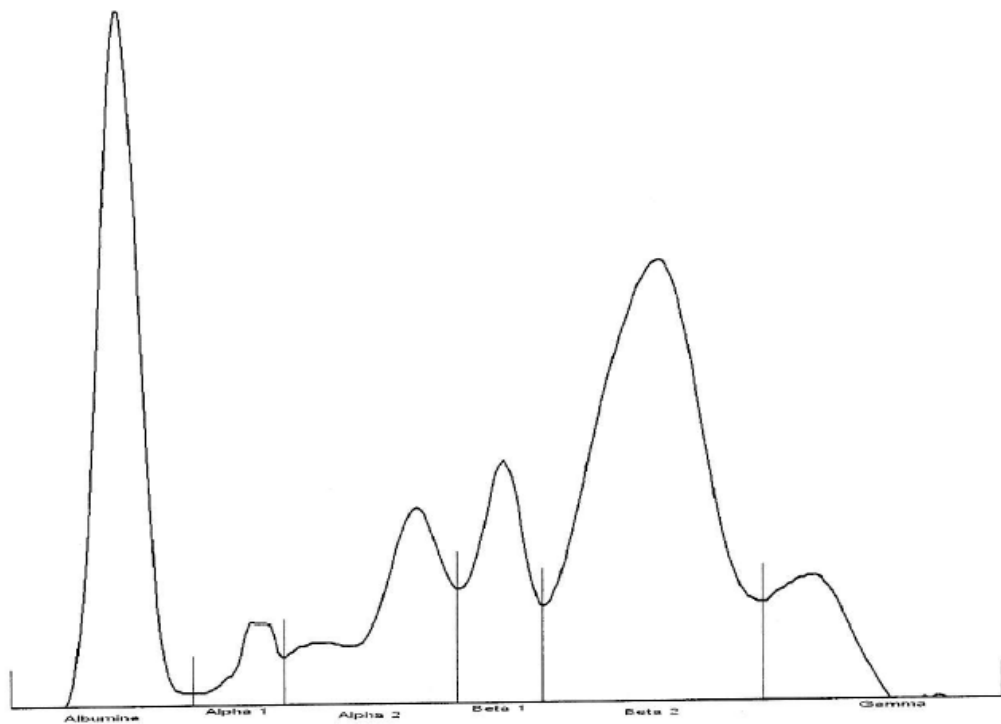


Protides totaux= 65.5 g/l A/G = 0.27



Protides totaux= 58.4 g/l

A/G = 0.18



Protides totaux= 64.6 g/l

A/G = 0.31

Figures 51. Exemples de profils électrophorétiques atypiques chez des brebis après traitements métalliques

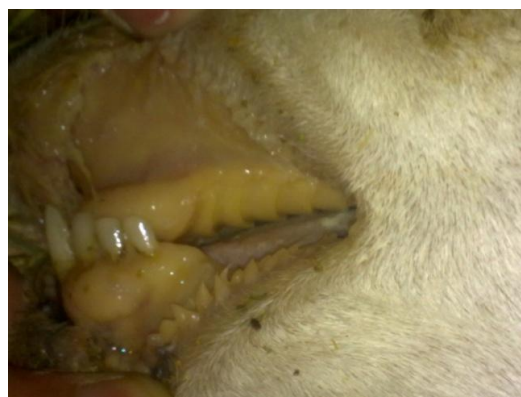


Figure 52. Pâleur des muqueuses (conjonctive et muqueuse buccale) chez la brebis n°6



Figure 53. Les brebis de l'expérimentation au sein de la bergerie



RESEARCH ARTICLE

Effects of Repeated Oral Administration of Lead Combined with Cadmium in Non Lactating Ewes

Sassia Sellaoui¹, Nadia Boufedda¹, Amine Boudaoud¹, Brigitte Enriquez² and Smail Mehennaoui^{1*}

¹ESPA Laboratory, Veterinary Department, University of Batna Algeria; ²Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, UMR 955, équipe 03 Inserm, France

*Corresponding author: lrespa@yahoo.fr

ARTICLE HISTORY (16-119)

Received: May 22, 2016
Revised: July 11, 2016
Accepted: July 19, 2016
Published online: August 23, 2016

Key words:

Ewe
Cadmium
Lead
Serum biochemical profile
Subchronic oral toxicity

ABSTRACT

The aim of the study was to highlight the toxic effects after lead and lead-cadmium repeated oral exposure for nine weeks in ewes. An experiment was conducted using "OuledDjellal" ewes during two periods: before exposure where ewes are considered as controls and during exposure. Ten ewes were randomly divided in two groups of five; the lead group received lead nitrate at 2.5 mg.Pb/kg/day and the lead-cadmium group received lead nitrate at 2.5 mg.Pb/kg/day + cadmium chloride at 2 mg Cd/kg/day orally during 63 days. Both groups were tested for their blood lead levels and hematological and biochemical parameters before and after receiving the treatment. Before exposure, blood lead levels were below the detection limit of 4 µg/l. Blood levels of lead during 9 weeks of exposure varied from 135±57µg/l to 356±147µg/l for the lead group and from 192±75µg/l to 445±294µg/l for the co-exposed group. Mean blood lead levels of lead-cadmium group were more elevated than the ones of the lead group. The transaminases (ALT, AST) are high for the Pb-Cd group during the two last weeks of exposure. The rates of hematocrit and hemoglobin decreased for the Pb-Cd group to reach a value of 28% and 8.9±0.6mg/100ml, respectively. The co-administration of Pb and Cd resulted in a significant reduction in zinc and copper plasma contents.

©2016 PVJ. All rights reserved

To Cite This Article: Sellaoui S, Boufedda N, Boudaoud A, Enriquez B and Mehennaoui S, 2016. Effects of repeated oral administration of lead combined with cadmium in non lactating ewes. Pak Vet J, 36(4): 440-444.

INTRODUCTION

Lead and cadmium have been recognized as the most important environmental and industrial pollutants. They are known for their cumulative properties in continental ecological cycling (Rodrigues-estival *et al.*, 2012; Javed, 2015). In many circumstances, Cd and Pb pollution co-exists and humans and mammals may be co-exposed to both toxics. It was shown that in blood, Cd and Pb levels may be positively correlated (Xiao *et al.*, 2014). The exposure to these metals induces various pathologies in specific target organs following their intestinal absorption and subsequent accumulation. Pb exposure may lead to alterations of some hematological parameters and cause disorders in the trace mineral profile especially by interfering with calcium (Pareja-Carrera *et al.*, 2014) and zinc metabolisms (Houper *et al.*, 1997). Biochemical modifications at low doses have been reported in humans (Sakai, 2000) and animals (Liu, 2003). Metals levels in blood and urine are used for biological monitoring of exposure and risk (Skerfving and Nilsson, 1993; Khan *et*

al., 2014). Lead chronic exposure in cattle and ewes can be monitored by measuring blood lead and blood Zinc-Protoporphyrins levels. (Mehennaoui *et al.*, 1997). In addition, several sensitive tests are used to control exposed animals and subsequent effects on a biomarker such haemoglobin concentration, hematocrit rate and hepatic enzymes. Relatively few experimental exposures to Pb and Cd have been carried out in ruminants. The present experiment aimed to highlight the toxic effects of a sub-chronic exposure to lead alone or combined to cadmium in sheep as it may be possible in different countries. To assess the health effects of the chemical mixture compared with single contamination, we focused on the determination of some indicators, biochemical and hematological changes, and the interactions of heavy metals with two elements: zinc (Zn) and copper (Cu).

MATERIALS AND METHODS

The experiment was carried out on ten OuledDjellal non-lactating, two years old ewes, with a mean weight of

40kg. The animals were housed in collective pens, under similar conditions at the sheepfold of the Veterinary Department (University of Batna 1, Route de Biskra, 05 Batna, Algeria). The animals were randomly separated into two distinct groups of five: group 1 (Pb): received Pb; the group 2 (Pb+Cd) received Pb and Cd. The study was conducted in two periods; during the period 1, for four weeks, the ewes were kept without contamination. The animals during this period acted as the control group for the entire study. In the nine weeks following exposure period, each of the five ewes in group 1 was given a daily single dose of 2.5mg of Pb/kg (as lead nitrate). The ewes in group 2 received a daily single dose of Pb and Cd mixture (as lead nitrate and cadmium chloride), bringing 2.5mg of Pb/kg and 2mg of Cd /kg. Lead and Cadmium oral administration was carried out every morning; metallic salts were enclosed in gelatin capsules and placed on the base of the tongue. The capsules were immediately swallowed. The administration of the capsules was carried without constraints according to animal welfare (Comité Consultatif d'Ethique, Centre de Recherche en Biotechnologie, Constantine). Lead, cadmium, zinc, copper, and calcium levels were determined in hay and granulated feed.

Sampling: Blood samples were collected (4 ml) from the jugular vein into vacutainer tubes guaranteed free of any trace of heavy metals. Sampling was performed before exposure on days 0, 7, 14, 21, and during exposure on days 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, and 84. Blood collection was carried in a similar way during both, pre-treatment and treatment periods and in the Pb and Pb-Cd groups. Four blood samples for each ewe were collected in heparinized tubes, EDTA tubes, citrate tubes and tubes without anticoagulant respectively for the Pb blood, hematology, biochemical parameters, and total proteins analysis.

Elemental analysis: The feed samples were mineralized at 450°C. The white ashes were dissolved in diluted nitric acid (5N). Lead and Cadmium concentrations were estimated by the flameless atomic absorption spectrometry (GF- AAS) and Calcium, Zinc and Copper were measured by flame atomic absorption spectrometry (Perkin Elmer Analyst 100).

Blood lead: The samples were diluted 1:10 in 0.05N ultrapure nitric acid in presence of Triton X at 0.5%. Analyses were performed using of atomic absorption spectrometer (PerkinElmer Analyst100). The lead levels were measured by graphite furnace with deuterium background correction in pyrolytic heated graphite tube, according to the technique described by Mehennaoui *et al.* (1997). The limit of detection was estimated to be 4 µg /l and the limit of quantification 12 µg/l. Calibration standards were prepared from non-exposed sheep blood.

Zinc and copper in plasma: Flame atomic absorption spectrometry (PerkinElmer Analyst, 100) was used for performing zinc and copper analysis in plasma. The determination was on 1 ml sample diluted 1:5 according to the technique described by Mehennaoui *et al.* (1997).

Hematology: Hemoglobin (Hb) and Hematocrit (Hct) were measured. The automated method (Blood Cell Analyzer, Beckman coulter) for the determination of Hb concentrations was used. The Hct values (%) were recorded using a capillary tube reader after centrifugation.

Biochemical parameters: Total serum protein, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and serum creatinin levels were measured by using Beckman Automatic biochemistry analyzer.

Statistical analysis: Two-way analysis of variance (MedCalc v12.7.1.0 software) was used to discriminate differences over the time (time effect) and between the two groups (treatment effect). When ANOVA was significant, Bonferroni test was used for mean comparison, significance was assessed at $P < 0.05$.

RESULTS

Diet mineral composition and total mineral intake are shown in Table 1. Pb and Cd contents of the diet were below the detection limits. Cu and Zn concentrations in hay were 4.7 and 19mg/kg, respectively. The granulated feed values (barley and maize) were 6.7 and 4mg/kg for Cu and 23 and 27mg/kg for Zn, respectively. Ca values in hay and granulated feed were high.

Before exposure, mean blood lead was below the detection limit in both groups. During the exposure period, the means blood concentration–time profile of Pb, after oral administration of 2.5mg/kg Pb for nine weeks were as shown in Fig. 1 for Pb and Pb+Cd groups. Pb blood concentrations increased during the first weeks to reach in (Pb) group a value of $305 \pm 92 \mu\text{g/l}$ in the 63 day whereas the values in (Pb+Cd) group varied from the lowest mean value $184 \pm 141 \mu\text{g/l}$ at 70 day to the highest level of $445 \pm 293 \mu\text{g/l}$ at 63day. Because ewes had very different Pb blood concentrations within the same group, the group mean lead levels was not significantly different among the groups ($P > 0.05$).

The mean values for Zn and Cu in controls plasma were $80 \pm 17 \mu\text{g/100ml}$ and $85 \pm 23 \mu\text{g/100ml}$ respectively (Fig. 2 and 3). Over the first four weeks, after treatment, Zn plasma values ranged from 79 to 96 µg/100ml in (Pb) group and 86 to 100µg/100ml in (Pb+Cd) group (Fig. 2). During exposure, the mean values were significantly decreased ($P < 0.001$), in the two groups. The patterns of variations in plasma Cu levels (Fig. 3) were similar to those for plasma Zn levels. Significant ($P < 0.01$) decrease of plasma Cu levels was observed in the two groups in the 9th week of exposure. ANOVA did not reveal a significant difference between the two treated groups in plasma zinc concentration whereas for plasma Cu there was a significant effect of treatment ($P < 0.01$) (Fig. 3).

Mean values of hemoglobin and hematocrit before exposure were within the physiological values (Table 2). In the (Pb) group a low decrease of Hb values was observed, but no significant change compared to controls ($P > 0.05$). However a significant decrease was observed in (Pb+Cd) group on day 84 ($P < 0.01$) (Table 2).

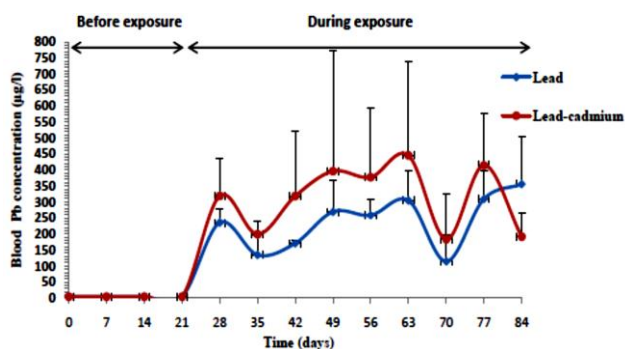


Fig. 1: Blood lead concentration (mean±SD) before and during exposure in the two groups.

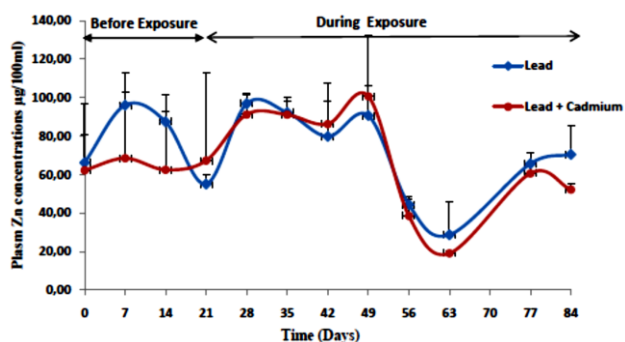


Fig. 2: Plasma Zinc concentrations (mean±SD) before and during exposure in the two groups.

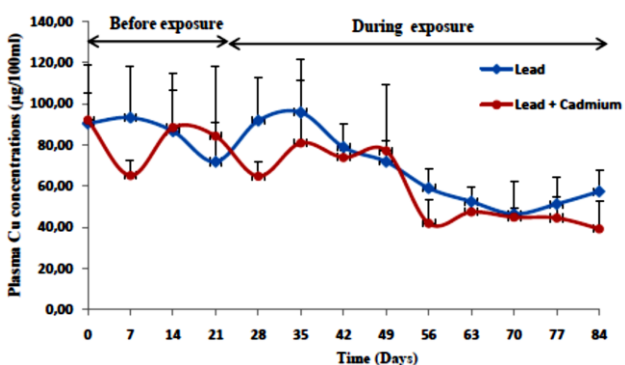


Fig. 3: Plasma Copper concentrations (mean±SD) before and during exposure in the two groups

Table 1: Mineral composition of the foodstuffs

	Hay	Maize	Barely	Bran	Total intake/day
Copper(mg/kg)	4.7	4	6.7	2.6	7.4 mg
Zinc(mg/kg)	19	27	23	51	39.2 mg
Calcium(g/kg)	26	3.8	3.5	6	29 g
Cadmium(µg/kg)	<DL	<DL	<DL	<DL	
Lead (µg/kg)	<DL	<DL	<DL	<DL	

DL: Detection limit.

Mean values of Hct in (Pb) group varied from $32.2 \pm 3.4\%$ before exposure to $28.8 \pm 1.3\%$ in the 9th week; the decrease was significant ($P < 0.01$). The Hct levels in (Pb+Cd) group were lower than those in the (Pb) group. The mean value in co-exposed ewes was $35 \pm 3.3\%$ at the start of treatment (Table 2). We observed a decrease of hematocrit levels to reach the value of $27.3 \pm 1.5\%$ at the end of the exposure. ANOVA revealed a significant effect of time and treatment for Hb and Hct ($P < 0.001$). Bonferroni test revealed a significant Htc decrease in (Pb+Cd) group on day 84 ($P < 0.001$) (Table 2).

Before exposure the values of serum protein, ALT, AST and CRE corresponded to the normal physiological range (Table 2). In the Pb group, ALT and AST values ranged from 16.6 ± 5.1 to 34 ± 1.6 UI/l and from 57.8 ± 4 to 90.4 ± 7.1 UI/l, respectively (Table 2). The increase of ALT level was significant ($P < 0.01$). The Pb-Cd co-exposure caused an intense increase of liver enzymes. ALT levels were 16.7 ± 3.2 UI/l before exposure and 37.7 ± 1.5 UI/l at the end of exposure. AST levels ranged from 79 ± 25.8 to 188 ± 103 UI/l. There was a significant difference between the two groups for AST and ALT levels ($P < 0.001$) (Table 2). The evolution of ALT values were changed and a significant increase was observed ($P < 0.01$) during the period of exposure. AST levels reached a mean level of 188 ± 114 UI/l with great variation in the co-exposed group in 8th week.

Serum creatinin and protein levels in Pb group corresponded to physiological values. We observed a significant increase of serum creatinin levels for the two groups ($P < 0.05$) mainly during the last week of exposure (Table 2). Total proteins ranged from 71.3 ± 1.3 to 70.6 ± 3.6 g/l in Pb group, and from 71.3 ± 2.5 to 68.3 ± 5.9 g/l in co-exposed group (Table 2).

DISCUSSION

We have designed our experimental conditions in order to simulate a repeated low feed exposure to provide detectable Pb blood concentrations and avoid a clinical intoxication: animals received daily low metallic salts doses orally to reproduce a diet exposure. The dosage of 2.5 mg Pb/kg body weight corresponds to contaminated ruminants forage of 50 mg Pb/kg , dose for a daily consumption of 2 kg of forage in sheep.

Lead poisoning is one of the most frequently reported causes of poisoning in livestock at pasture (Pareja-Carrera *et al.*, 2014). Ewes were selected as the experimental animals, as a good model for ruminants; it allows us to perform the necessary blood samplings.

The diet composition revealed that the animal feeding was uncontaminated. Forage in uncontaminated area contents of Pb and Cd were below 1 mg/kg of dry matter. Animal feed has not substantially contributed to any change in the exposure doses. Tolerate levels in animal feed is 0.5 mg/kg for Cd and 30 mg/kg for Pb (Liu, 2003). Our results showed that blood Pb levels increased in both groups during treatment. These results are in agreement with repeated oral low dose exposure of trace metallic, singly or in combination (Mehennaoui *et al.*, 1997). Gradual increase in blood Pb levels was recorded. In the (Pb+Cd) group, concentrations reached a greater level ($445 \pm 293 \mu\text{g/l}$) than that in the (Pb) group ($305 \pm 92 \mu\text{g/l}$). The levels indicative of clinical poisoning ($> 350 \mu\text{g/l}$) (Rodrigues-estival *et al.*, 2012) were observed in the (Pb) group in the 9th week and in the (Pb+Cd) group in the 4th week. Our results also showed that in the co-exposed group, Pb blood concentrations have exceeded the threshold base line (about 33% of all samples) while no external signs of apparent toxicity was observed in all corresponding ewes. Indeed, clinical signs are not always correlated to blood Pb concentrations (Waldner *et al.*, 2002). Cattle and sheep tolerated up to 5 mg/kg body weight for at least a year without showing any clinical signs (Payne and Livesy, 2010). Lane *et al.* (2015) reported that some co-exposed cattle to Cd and Pb had a poor general condition.

Table 2: Hematological and biochemical modifications before and during lead and cadmium repeated oral administration in ewes

Parameters	Groups	Before exposure	During exposure		ANOVA	
		Day 28	Day 56	Day 84	Treatment	Time
Hb (g/100ml)	Pb	11±0.9	11.2±1.2	9.3±0.6	***	***
	Pb-Cd	11.2±0.9	9.7±0.4	8.9±0.6		
Hct (%)	Pb	32.2±3.4	34.2±3.2	28.8±1.3	***	***
	Pb-Cd	35±3.3	29.8±1.5	27.3±1.5		
ALT (U/l)	Pb	16.6±5.1	21.8±1.3	34±1.6	***	***
	Pb-Cd	16.7±3.2	27.8±1.9	37.7±1.5		
AST (U/l)	Pb	57.8±4	78.8±8	90.4±7.1	***	NS
	Pb-Cd	79±13	188±114	147±20		
Creatinine (mg/l)	Pb	11±1.9	9.8±1.6	13±1.6	NS	*
	Pb-Cd	12.2±0.8	9±2.4	13.7±1.5		
Total Proteins (g/l)	Pb	71.3±1.3	69.8±4.1	70.6±3.6	***	*
	Pb-Cd	71.3±2.5	67.6±7.3	68.3±5.9		

In each group there was 5 animals. Hb=Hemoglobin; Hct=Hematocrit; ALT=Alanine aminoTransferase; AST=Aspartate aminotransferase; NS=Non Significant; P>0.05; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

It is known that the nature of metallic salts changes the metal level in blood. Nitrate as well as acetate had a good solubility which influence positively the bioavailability of Pb. Our results were not in agreement with those found by Mehennaoui *et al.* (1997); the mean concentrations reached 122±36µg/l in the Pb group during the plateau. Those authors used Pb as chloride and lactating ewes as animal model, knowing that the excretion of Pb in milk could influence negatively levels of Pb blood.

Previous studies showed that Pb blood level was significantly reduced with concomitant Cd exposure (Pb+Cd) (Mehennaoui *et al.*, 1997; Batool *et al.*, 2014). Toxicokinetic interactions were observed at high dose metal mixture exposures and the duration of exposure is critical in evaluating the interactions of metal mixtures particularly at low dose levels (Gensheng and Bruce, 2008), which could explain the elevated blood Pb levels detected in the co-exposed group. Additionally, dietary deficiency of essential trace elements without exogenous supplementation had a positive effect on Pb and Cd absorption, and therefore their toxicokinetics. Pb and Cd have long been known to alter the haematological system. From the 8th week of exposure, the co-exposed group revealed a paleness of the mucous membranes which could correspond to anemia. The anemia induced by lead results primary from both inhibition of heme synthesis and reduction of erythrocyte survival. Shortened life span of red blood cells is thought to be due to increased mechanical fragility of cell membrane (Randa *et al.*, 2012). As hematological effects we showed significant (P<0.05) decrease of Hb concentration and Hct mainly in the (Pb+Cd) group in the last week. This report suggests that, the administration of combined treatments of Pb and Cd may be accountable for these hematological effects and in addition the heavy metal accumulation in kidney, spleen, and liver might suppress the activity of these hematopoietic tissues (Yuan *et al.*, 2014) and lead indirectly to anemia. Co-exposure (Pb+Cd) induced significant elevations in serum transaminases (ALT, AST) levels at the three last weeks of exposure (Table 2). In the Pb group, in spite of the increase of enzyme serum levels, the values were still in the physiological ranges. The levels in the co-exposed group were higher than in the Pb group (P<0.01). The increase in ALT and AST serum levels confirmed the damaging effects of metallic salts on liver cells. Our results are in agreement with other works, which showed that Pb and Cd caused increases of

ALT and AST in exposed animals. This increment in enzyme activities is mainly due to the leakage of these enzymes from the liver cytosol into the blood stream. Similar findings of increased ALT and AST were reported by Mehana *et al.* (2012) who found that cell damage exhibited good correlation with the enzyme leakage. Experience also shows that total protein concentration higher than 65g/l is highly indicative of chronic inflammatory reaction when corporal index is low (Braun *et al.*, 2010). No change attributable to the administration of Pb and Cd in serum total proteins, in spite of the increase, values still in the standard ranges. This fact suggests that low- metallic trace elements exposure for 9 weeks, singly or combined, had not an adverse effect that could change protein and free amino acids metabolism and their synthesis in liver.

It is well established that kidneys represent the major targets of Pb and Cd toxicity (Ferraro *et al.*, 2010; Randa *et al.*, 2012). The serum creatinin corresponded to the normal physiological range until the last week where a low increase was detected. Creatinin is known as a good indicator of renal function, i.e., rises in creatinin means an obvious damage to functional nephrons (Yuan *et al.*, 2014) but not an early indicator of decreased kidney function (Braun *et al.*, 2010).

Relationship between the status of Zn and Cu in blood and the exposure to Pb and Cd was examined. Compared with the controls, Pb and Pb-Cd exposures resulted a significant decrease in plasma Zn and Cu levels following 5 weeks of exposure. It was also observed that increasing Pb blood concentration decreases Zn and Cu concentrations. The decrease was found higher for Cu level in the co-exposed group than that in Pb (Fig. 3). Several previous studies demonstrated that Pb and Cd can interact with essential trace element. These interaction can take place at different stages of absorption, distribution in the organism, and excretion of both essential elements and at the stage of Zn and Cu biological functions (Noël *et al.*, 2004). Because they have the ability to compete with the divalent metal carriers of Zn and Fe, toxic heavy metals decrease the reabsorption of these essential oligo-metals (Barbier *et al.*, 2005). Such competition could induce severe deficiency. Lin *et al.* (2011) reported exposure to Pb and Cd induced increase in urinary Zn and Cu excretion, which may be due to the impaired tubular capacity for the reabsorption and decrease of glomerular filtration. Chronic moderate exposure to Pb decreased serum Zn, calcium and, to a lesser extent, Cu levels

(Pizent *et al.*, 2003). At low-dose exposure, impaired metal homeostasis can be an important sensitive indicator of Pb and Cd exposure as this exposure increases the related variations in the hepatic storage of various essential trace element in rats (Noël *et al.*, 2004). Up-regulation of divalent metal transporters following chronic ingestion of Pb and Cd was found to disturb the homeostasis for essential metals, thus illustrating the complex interplay between heavy metals and essential metals (Min *et al.*, 2008). Renal excretion is one of the most important routes of elimination in essential trace elements and the exposure to Pb and Cd induced an increase in urinary Zn and Cu excretion, which may be due to the impaired tubular capacity for the reabsorption and decrease of glomerular filtration (Lin *et al.*, 2011).

Conclusions: The present research shows that elevated blood Pb was accompanied by changes in sensitive biologic markers of Pb poisoning, which also explains its impact on different organs and systems. The adverse effects induced by low oral Pb exposure for 9 weeks were increased with concomitant Cd exposure. Further investigations are needed to correlate the toxic effects when the animals are exposed for a long term and at low doses to more than two metallic traces.

Author's contribution: MS and EB conceived the study. SS, BA and BN executed the experimental design and analyzed the blood and plasma samples. All authors interpreted the data and approved the final version.

REFERENCES

- Barbier O, Jacquillet G, Tauc M, Coughon M and Poujeol P, 2005. Effect of heavy metals on, and handling by the kidney. *Nephron Physiol*, 99: 105-110.
- Braun JP, Trumel C and Bézille P, 2010. Clinical biochemistry in sheep: A select review. *Small Rumin Res*, 92: 10-18.
- Batool M, Abdullah S and Abbas K, 2014. Antioxidant enzymes activity during acute toxicity of chromium and cadmium to *Channa marulius* and *Wallago attu*. *Pak J Agr Sci*, 51: 1017-1023.
- Ferraro MP, Costanzi S, Alessandro N, Sturniolo A and Giovanni G, 2010. Low level exposure to cadmium increases the risk of chronic kidney disease: analysis of the NHANES 1999-2006. *BMC Public Health*, 10: 304.
- Gensheng W and Bruce AF, 2008. Roles of biomarkers in evaluating interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol*, 233: 92-99.
- Houpert P, Mehennaoui S, Enriquez BJ, Kolf-Clauw M and Milhaud G, 1997. Transfer of cadmium from feed to ewe food products: variations in transfer induced by lead and zinc. *Environ Sci*, 5: 127-138.
- Javed M, 2015. Growth and metals depuration in Zn plus Pb plus Ni mixture stressed fish grown under composite pond culture conditions. *Int J Agri Biol*, 17: 631-636.
- Khan A, Hussain HI, Sattar A, Khan MZ and Abbas RZ, 2014. Toxicopathological aspects of arsenic in birds and mammals: A Review. *Int J Agri Biol*, 16: 1213-1224.
- Lane EA, Cauty MJ and More SJ, 2015. Cadmium exposure and consequence for the health and productivity of farmed ruminants. *Res Vet Sci*, 101: 132-139.
- Lin W, Heng W, Jingui L, Dawei C and Zongping L, 2011. Simultaneous Effect of lead and cadmium on primary cultures of rat proximal tubular cells: interaction of apoptosis and oxidative stress. *Arch Environ Contam Toxicol*, 61: 500-511.
- Liu ZP, 2003. Lead poisoning combined with cadmium in sheep and horses in the vicinity of non ferrous metal smelters. *Sci Tot Environ*, 309: 117-126.
- Mehana EE, Meki AR and Fazil KM, 2012. Ameliorated effects of green tea extract on lead induced liver toxicity in rats. *Exp Toxicol Pathol*, 64: 291-295.
- Mehennaoui S, Houpert P, Enriquez BJ, Kolf-Clauw M and Milhaud G, 1997. Toxicokinetics of lead in the lactating ewe: variations induced by cadmium and zinc. *Environ Sci*, 5: 65-78.
- Min KS, Heda H, Kihana T and Tanaka K, 2008. Increased hepatic accumulation of ingested Cd in associated with upregulation of several intestinal transporters in mice fed diets deficient in essential metals. *Toxicol Sci*, 106: 284-289.
- Noël L, Guérin T and Kolf-Claw M, 2004. Subchronic dietary exposure of rats to cadmium alters the metabolism of metals essential to bone health. *Food Chem Toxicol*, 42: 1203-1210.
- Pareja-Carrera J, Mateo R and Rodriguez-Estival J, 2014. Lead (Pb) in sheep exposed to mining pollution: Implications for animal and human health. *Ecotox Environ Safe*, 108: 210-216.
- Payne J and Livesey C, 2010. High lead soils: a potential risk to animal and public health. Health Protection Agency. *Chem Hazards Poisons Report*, 17: 42-45.
- Pizent A, Jurasovic J and Telisman S, 2003. Serum calcium, zinc, and copper in relation to biomarkers of lead and cadmium in men. *J Trace Elem Med Biol*, 17: 199-205.
- Randa A, Dawlat M, Nariman A, Hatem ME and Dessouky MI, 2012. Clinicopathological, histopathological and immunological studies on animals exposed to lead and cadmium under experimental conditions. *New York Sci J*, 5: 120-136.
- Rodrigues-estival J, Barasona JA and Mateo R, 2012. Blood Pb and δ -ALAD inhibition in cattle and sheep from a Pb-polluted mining area. *Environ Pollut*, 160: 118-124.
- Sakai T, 2000. Biomarkers of lead exposure. *Ind Health*, 38: 127-142.
- Skerfving S, Nilsson U, Schutz A and Gerhardsson L, 1993. Biological monitoring of inorganic lead. *Scand J Work Environ Health*, 19 (suppl 1): 59-64.
- Waldner C, Checkley S, Blakley B, Pollock C and Mitchell B, 2002. Managing lead exposure and toxicity in cow-calf herds to minimize the potential for food residues. *J Vet Diag Invest*, 14: 481-486.
- Xiao C, Keyue W, Zhongqiu W, Caohui G, Ping H, *et al.*, 2014. Effect of lead and cadmium co-exposure on bone mineral density in a chinese population. *Bone*, 63: 76-80.
- Yuan G, Dai S, Yin Z, Lu H, Jia R, *et al.*, 2014. Toxicological assessment of combined lead and cadmium: acute and sub-chronic toxicity study in rats. *Food Chem Toxicol*, 65: 260-268.