

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche Scientifique

Université 08 Mai 1945 Guelma

Faculté de science de la nature et de la vie et de science de la terre et de l'univers

Département de science de la nature et la vie



Mémoire de Master

Domain : science de la nature et la vie

Filière : Biologie

Option: Biologie moléculaire et cellulaire/ immunologie approfondie

Thème

Epidémiologie et toxicité de brodifacoum in vitro

Présenté par :

-Chettibi Nassima

-Richi Ramzi

Membres du jury

Président : Dr Djekoun Mohamed.

Rapporteur : M elle Boumaza Awatif.

Examineur : Ms Bouden Ismail.

MC université de Guelma

MAA université de Guelma

MAA université de Guelma

Année Universitaire : 2013

Remerciements

Je tiens à remercier à Melle Boumaza Awatif, maître assistant à la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université de Guelma qui a dirigé notre travail de thèse. Je le remercie pour ses conseils scientifiques et le soutien qu'il a accordé à notre travail. Je la remercie pour sa gentillesse, sa disponibilité, sa patience pendant des intenses et rationnelles discussions qui m'ont permises de réaliser ce travail dans de bonnes conditions. Pour tout cela et aussi pour son aide, sa confiance et son soutien moral.

Je remercie monsieur Djekoun Mohamed, maître de conférences à la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université de Guelma, d'avoir accepté de faire partie du jury de thèse.

Je remercie monsieur Bouden Ismail, maître assistant à la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université de Guelma, d'avoir accepté de faire partie du jury de thèse.

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à l'encontre de toute personne qui a participé de près ou de loin directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Dédicace

*Je dédie ce travail à mes parents
Qu'ils trouvent ici toute ma
Gratitude pour leur
Soutien tout
Au long de
Mes
Etudes.*

*A mon oncle qui ma aidé
Pour réalisé notre mémoire*

*A mes sœurs et mon frère, que
Dieu les bénisses*

*A tous mes collègues et
Mes amies.*

*A tous ceux que
J'aime*

Ramxi

*Je dédie ce travail à mes parents
Qu'ils trouvent ici toute ma
Gratitude pour leur
Soutien tout
Au long de
Mes
Etudes.*

*A mes sœurs et mon frère, que
Dieu les bénisse*

*A tous mes collègues et
Mes amies.*

*A tous ceux que
J'aime*

Nassima

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I Généralités sur le système immunitaire

I- Composantes de l'immunité.....1

 I.1 Immunité naturelle.....1

 I.2 Immunité acquise2

II- Organisation du système immunitaire3

II.1 Organes4

 II.1.1 rate4

 II.1.2 Les ganglions périphériques4

II.2 Cellules du système lymphoïde6

II.2.1 La lignée myéloïde :6

1) Les macrophages.....6

2) Les mastocytes.....6

3) Les granulocytes6

4) Les cellules dendritiques6

II.2.2 La lignée lymphoïde :8

1) Les cellules NK8

2) Les lymphocytes B.....8

3) Les lymphocytes T8

II.3 Molécules impliquées dans système lymphoïde.....9

II.3.1 Immunoglobulines.....9

II.3.2 Le système du complément10

II.3.3 Cytokines.....10

II les pesticides et la santé

1-Définition11

2-Regroupement des pesticides :.....11

2-1Regroupement selon leur mode d'action.....11

2-2Regroupement des pesticides selon leur origine :.....12

1) Pesticides inorganiques :.....12

2) Pesticides organiques :.....12

3-Les principaux usages des pesticides :.....14

4-LES VOIES D'EXPOSITION AUX PESTICIDES.....14

4-1-EXPOSITION CUTANÉE.....14

4-2- EXPOSITION RESPIRATOIRE.....14

4-3-EXPOSITION ORALE.....14

III Les pesticides et la santé humaine

III-1. Toxicité des pesticides.....	15
III-1-1-toxicité aiguë	16
III-1-2-toxicité chronique	16
III-2.Maladies liées aux pesticides.....	17
4.1 Le cancer.....	17
4.2 Troubles du système nerveux.....	17
4.3 Les problèmes de la reproduction	17
4.4 Perturbation du système endocrinien	18
4.5 Perturbations du système immunitaire	18
III-3-L'immunotoxicité des pesticides par le biais du stress oxydant.....	19
CHAPITRE II-Matériel et Méthodes.....	20
Chapitre III-Résultats et Discussion:.....	24
Conclusions et perspectives.....	34
Annexe	
Références bibliographiques	
Résumés	

LIST DES ABREVIATIONS

BCR	Récepteur de l'antigène du lymphocyte B
CAT	Enzymatique du catalase
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellules présentatrices d'antigènes.
DL50	Dose létale 50%
D.O	Densité optique
H2O2	Peroxyde d'hydrogène
Ig	Immunoglobulines
GPx	glutathion peroxydase
GSH	Glutathion réduit
LPO	La peroxydation lipidique
MDA	Malondialdéhyde
NK	Naturel Killer
PAG PI	Peroxydation des acides gras polyinsaturés
SOD	Superoxyde dismutase
TBA	L'acide 2-thiobarbiturique
TBARS	L'acide thiobarbiturique
TLR	Récepteur des cellules T

LSTE DES FIGURES

Figure n°1 : les étapes de la réponse immunitaire non spécifique, puis spécifique.....	3
Figure2 : Organes du système immunitaire.....	5
Figure 3 : Différenciation des cellules.....	7
Figure 4 : L'organisation de base des immunoglobulines et les différentes activités biologiques dans l'organisme	10
Figure5 : nombre des cas intoxiqué par les pesticides à la région de centre Algérie (2005-2009).....	24
Figure6 : nombre des cas intoxiqué selon les cibles des pesticides la région du centre d'Algérie (2005-2009).....	25
Figure7 : nombre des cas selon l'âge à la région du centre d'Algérie (2005-2009).....	25
Figure8 : nombre des cas d'intoxication évalué à la région du centre d'Algérie (2005-2009)	26
Figure9 nombre des cas intoxiqué par les pesticides à la région de Guelma (2005-2012).....	26
Figure10 nombre des cas intoxiqué par les insecticides à la région de Guelma (2005-2012).....	27
Figure11: nombre des cas intoxiqué par les raticides à la région de Guelma (2005-2012).....	27
Figure12/ Evolution d'intoxication selon le sexe à la région de Guelma (2005-2012).....	28
Figure13: évaluation d'intoxication chronique à la région de Guelma (2005-2012).....	29
Figure14: Dosage de l'MDA au niveau des échantillons des érythrocytes.....	30
Figure15: Dosage de l'activité enzymatique du catalase tissulaire des échantillons des érythrocytes	31
Figure16: Dosage du GSH tissulaire au niveau des échantillons des érythrocytes.....	32

LIST DES TABLEAUX

Tableau n°1 : Résumé des défenses non spécifique de l'hôte	2
--	---

INTRODUCTION

Introduction

Les applications des pesticides sont augmentées de façon spectaculaire depuis les années 1960, et les effets néfastes sur la santé liés à l'Homme ainsi que chez les animaux sauvages et domestiques sont devenus une préoccupation publique sérieuse. Bien que l'utilisation des pesticides soit bénéfique pour augmenter la productivité agricole et la réduction des maladies transmises par les insectes, l'exposition humaine à ces substances chimiques toxiques est pratiquement inévitable en raison de la contamination de l'air, de l'eau, du sol et des aliments. La toxicité potentielle de la plupart de ces produits chimiques a été largement étudiée et plusieurs bases de données ont été développées. Les pesticides font partie des facteurs de risque pour l'Homme et l'exposition à ces composés est suspectée d'augmenter l'incidence de certains cancers, d'affecter l'immunité et d'induire des perturbations du fonctionnement hormonal.

Il y a une prise de conscience croissante que divers pesticides ont le potentiel de nuire à différentes composantes du système immunitaire. En outre, le système immunitaire est considéré comme sensible aux produits chimiques à des doses faibles. La modification du fonctionnement du système immunitaire par les pesticides a été proposée pour servir de base à une hypersensibilité, augmentation de l'allergie et de diminution de la résistance contre la formation de tumeurs par l'induction de stress oxydant qui est lié à une augmentation de la libération d'espèces d'oxygène en présence des pesticides.

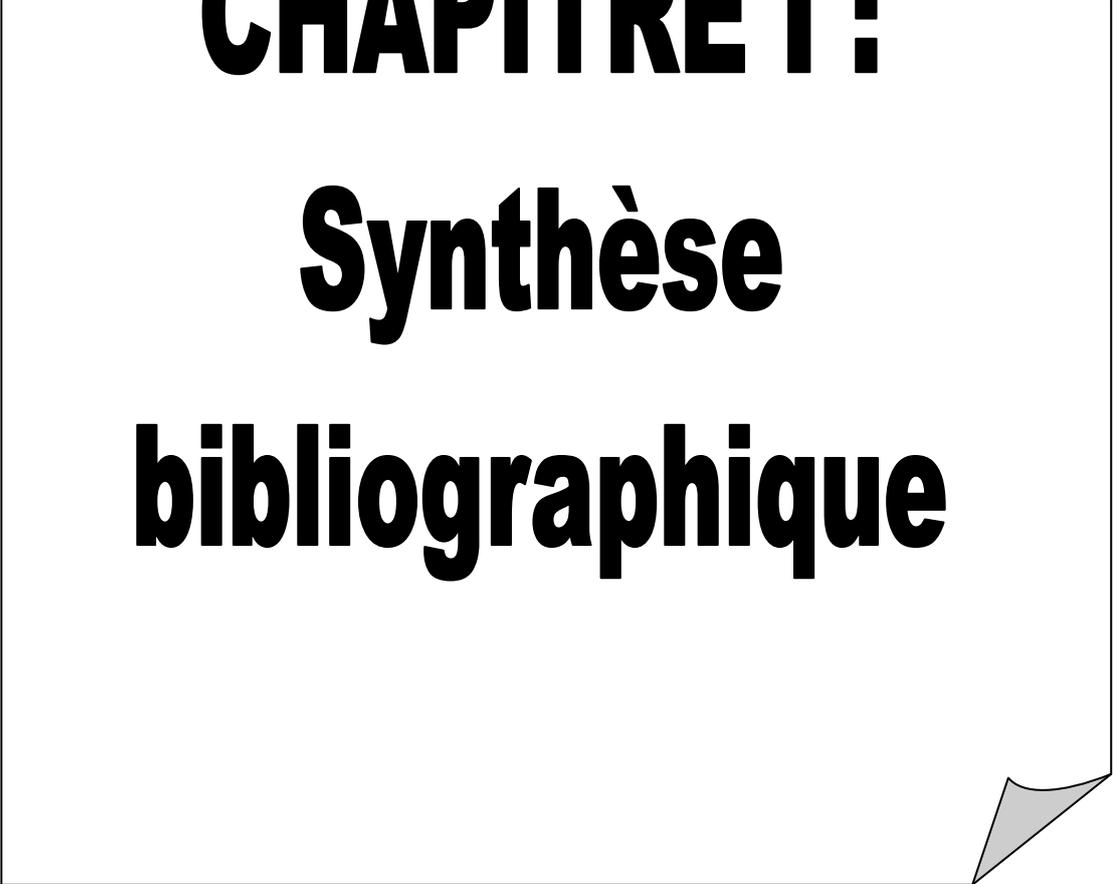
Pour les raisons citées ci-dessus, nous sommes intéressés de la prévalence des intoxications dues aux pesticides utilisés en Algérie et l'effet de l'un des pesticides en cause en adoptant le plan de travail suivant :

- Revue bibliographique permettant de comprendre la relation pesticides et système immunitaire.
- Une étude expérimentale portant sur l'effet d'un raticide sur quelques paramètres du stress oxydant en utilisant les érythrocytes humains comme modèle.

CHAPITRE I :

Synthèse

bibliographique



I-Généralités sur le système immunitaire

I-1 Composantes de l'immunité

L'immunité est la science qui traite des problèmes de distinction entre soi et non-soi. Elle participe donc à l'intégrité d'un organisme et à l'élimination de tout ce qui nuit à cette intégrité. La reconnaissance d'une structure moléculaire ou cellulaire comme étrangère conduit à sa neutralisation et à son élimination. Traditionnellement, on distingue deux types principaux de réponse : une réponse non spécifique et une réponse spécifique.

- ***La composante non spécifique (immunité naturelle)***, est un ensemble de mécanismes de reconnaissance et de destruction d'un pathogène par l'intermédiaire de récepteurs et de fonctions cellulaires non spécifiques de ce seul pathogène.

- ***La composante spécifique (immunité acquise)***, permet la reconnaissance et l'élimination de ce pathogène par l'intermédiaire de récepteurs qui sont spécifiques de ce pathogène et de lui seul. A cette spécificité s'ajoute un phénomène de mémoire immunitaire : l'organisme se souvient qu'il a déjà rencontré ce pathogène et réagit plus vite à une nouvelle rencontre (Goldsby et al. 2000).

En réalité, l'immunité acquise et l'immunité naturelle n'opèrent pas indépendamment l'une de l'autre ; elles sont intégrées et elles fonctionnent comme un système hautement interactif et coopératif. Elles produisent ainsi une réponse totale plus efficace comme si chacune d'elles était mise en œuvre séparément (Calder et Kew ; 2002).

I-1.1 Immunité naturelle

L'immunité naturelle apporte la première ligne de défense contre un pathogène avant qu'il n'ait activé le système immunitaire adaptatif (Ouellette. 1997). Elle peut être considérée comme constituée de quatre types de barrières défensives : anatomiques, physiologiques, phagocytaires et inflammatoires. Leurs composantes et mécanismes de fonction sont résumés dans le tableau n°1

Tableau n°1 : Résumé des défenses non spécifiques de l'hôte (Goldsby et al. 2000.)

Types	Mécanismes
<i>Barrières anatomiques</i>	
Peau	La barrière mécanique retarde l'entrée des microbes. L'environnement acide (pH 3~5) retarde la croissance des microbes.
Muqueuses	La flore normale entre en compétition avec les microbes pour les sites de fixation et pour les nutriments. Le mucus enrobe les micro-organismes étrangers. Les cils rejettent les micro-organismes hors du corps.
<i>Barrières physiologiques</i>	
Température	La température corporelle normale inhibe la croissance de certains pathogènes. La fièvre inhibe la croissance de certains pathogènes.
pH acide	L'acidité du contenu stomacal tue la plupart des micro-organismes ingérés.
Médiateurs chimiques	Le lysozyme clive la paroi cellulaire des bactéries. L'interféron induit un état antiviral dans les cellules non infectées. Le complément lyse les micro-organismes ou facilite la phagocytose.
<i>Barrières phagocytaires ou endocytaires</i>	Certaines cellules internalisent (endocytosent) et fragmentent les macromolécules étrangères. Des cellules spécialisées (monocytes du sang, neutrophiles, macrophages tissulaires) internalisent (phagocytosent), tuent et digèrent des micro-organismes entiers.
<i>Barrières inflammatoires</i>	L'atteinte cellulaire et l'infection induisent une fuite du fluide vasculaire qui contient des protéines sériques douées d'une activité antibactérienne ; elles induisent aussi un influx de cellules phagocytaires dans la zone affectée.

I-1.2 Immunité acquise

Pendant que l'immunité naturelle élimine les microorganismes, l'immunité spécifique se met en place par l'intermédiaire de cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Celles-ci sont constituées principalement par les cellules dendritiques, mais aussi par d'autres types cellulaires qui ont également cette propriété : les macrophages et les cellules B. (Roitt et al.1994) Elle aboutit à la mise en place de récepteurs cellulaires) et humoraux qui reconnaissent des structures spécifiques de ce microorganisme et de lui seul. Les complexes

formés à l'aide de ces récepteurs aboutiront à l'élimination du microorganisme (Kaminogawa, S. 1996). (Figure 1)

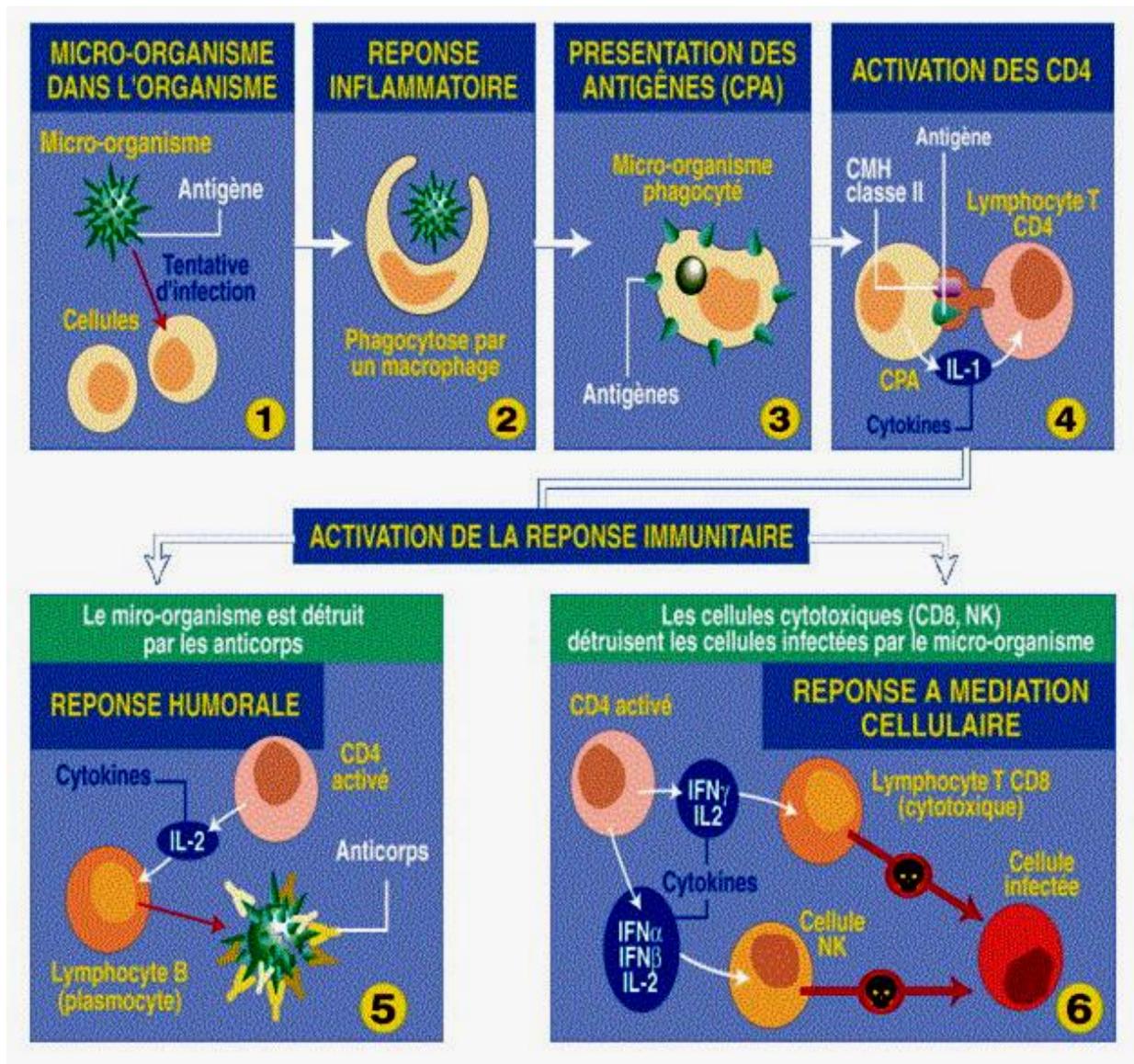


Figure 1 : les étapes de la réponse immunitaire non spécifique, puis spécifique

I-2 Organisation du système immunitaire

Le système immunitaire est un ensemble complexe de cellules, d'organes et de molécules.

L'organisation des cellules de l'immunité en tissus et organes favorise les interactions cellulaires et leur permet d'accomplir leurs fonctions le plus efficacement possible.

L'ensemble constitue le système lymphoïde. (figure 2).

I-2.1 Organes

Au sein du tissu lymphoïde, on distingue les organes lymphoïdes centraux ou primaires et les organes lymphoïdes périphériques ou secondaires

Les organes immunitaires primaires sont les organes de la lymphopoïèse et de la myélopoïèse, à partir des cellules souches. Dans ces organes ont lieu la différenciation, la prolifération et la maturation des différentes lignées qui participent au système immunitaire. Toutes les cellules souches sont issues de la moëlle osseuse. Chez les mammifères, les lymphocytes T terminent leur maturation dans le thymus. C'est dans cet organe qu'ils apprennent à distinguer le soi du non-soi. En quittant ces organes les cellules sont fonctionnelles et migrent dans les tissus dans l'attente d'une rencontre avec un antigène du non-soi.

Après cette rencontre, les cellules présentatrices d'antigènes (essentiellement lignée myéloïde) vont migrer dans les organes lymphoïdes secondaires. Ceux-ci comprennent des organes structurés et encapsulés (les ganglions lymphatiques et la rate) et des accumulations de tissu lymphoïde non encapsulé, distribuées à travers le corps, notamment en association avec les muqueuses. Ce sont dans ces organes que les cellules présentatrices d'antigène vont activer les cellules spécifiques de la lignée lymphoïde : les lymphocytes T et les lymphocytes B. Les organes lymphoïdes secondaires, dans lesquels se développent donc les réponses immunitaires cellulaires et humorales, peuvent être classés en organes systémiques et en organes muqueux. (Makoto Matsui et al 2004)

I-2.1.1 Rate

La rate est un organe lymphoïde secondaire volumineux, logé dans le quart supérieur gauche de l'abdomen, derrière l'estomac. Alors que les ganglions lymphatiques sont spécialisés dans la capture des antigènes venant des tissus environnants. La rate est spécialisée dans la filtration et la capture des antigènes présents dans le sang (artère splénique). Ainsi, elle peut répondre à des infections systémiques.

La rate est entourée d'une capsule qui envoie de nombreuses projections (trabécules) vers l'intérieur pour former une structure compartimentée. (Alam, M., et al.1994)

I-2.1.2 Ganglions périphériques

Disséminés dans tout l'organisme, le long des voies lymphatiques se trouvent les ganglions périphériques. C'est à leur niveau que se fait la présentation des antigènes par les CPA aux cellules immunocompétentes T ou B. Il en résultera une réponse immune qui peut prendre plusieurs formes : absence de réponse, tolérance, réponse active ou réponse exacerbée.

Au niveau de la muqueuse intestinale se situent deux types de ganglions : les plaques de Peyer qui ont la particularité de ne pas avoir de vaisseau lymphatique afférent et les ganglions mésentériques (Genetet, N. 2005).

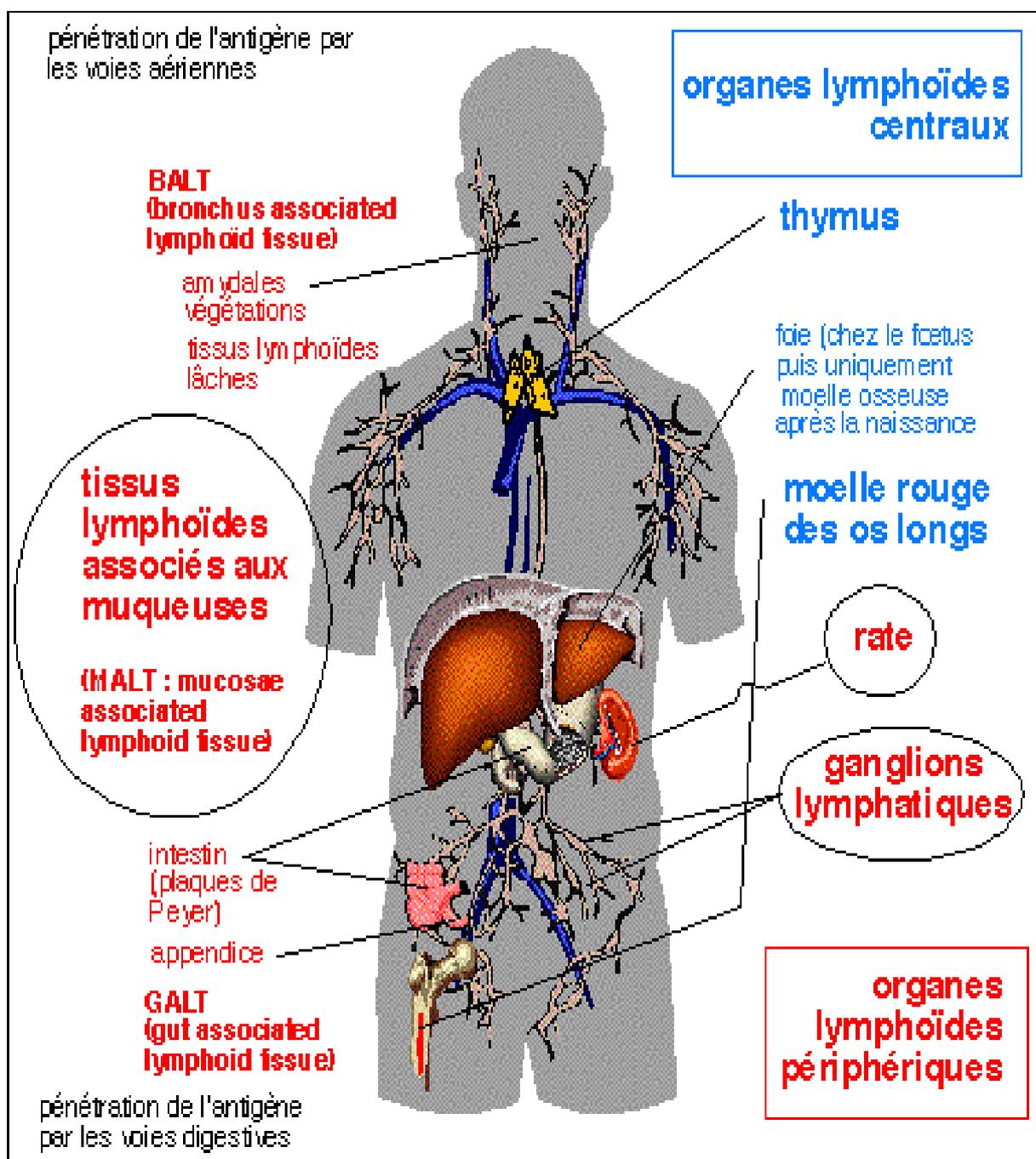


Figure2 : Organes du système immunitaire

I-2.2 Cellules du système lymphoïde

Les cellules du système immunitaire naissent dans la moelle osseuse, où beaucoup d'entre elles se différencient également. Elles migrent ensuite dans les tissus périphériques, afin de les protéger, en empruntant la circulation sanguine et les vaisseaux qui constituent le système lymphatique.

Tous les éléments cellulaires du sang, dont les globules, les plaquettes et les globules blancs du système immunitaire, dérivent des mêmes précurseurs : les cellules souches

hématopoïétiques de la moelle osseuse. Ces cellules souches pouvant générer tous les types de cellules intermédiaires au potentiel plus limité qui sont les progénitures directs des globules rouges, des plaquettes, et des deux catégories principales de globules blancs. Les différents types de cellules sanguines et les relations entre leurs lignées sont résumés dans la (Figure3)

1-2.2.1 Lignée myéloïde

La progéniture myéloïde est le précurseur des granulocytes, macrophages, cellules dendritiques et mastocytes du système immunitaire.

1) **Macrophages** : Les macrophages sont l'un des trois types de cellules phagocytaires du système immunitaire et sont présents dans la plupart des tissus, où ils jouent un rôle crucial dans l'immunité innée. Ils représentent la forme mature des monocytes, qui circulent dans le sang et se différencient en macrophages au cours de leur migration dans les tissus (Hatcher, et Lambrecht 1993).

2) **Mastocytes** : Les précurseurs des mastocytes sanguins sont mal connus. Ils se différencient également dans les tissus. Ils résident principalement près des petites vaisseaux sanguins et, lorsqu'ils sont activés, libèrent des substances qui affectent la perméabilité vasculaire. Bien qu'ils soient surtout connus comme responsables des réponses allergiques, ils seraient aussi impliqués dans la protection des muqueuses contre les pathogènes plus particulièrement les parasites (Kolter, et Sandhoff 2005)

3) **Granulocytes** : Les granulocytes sont appelés ainsi car ils contiennent des granules denses dans leur cytoplasme. Ils sont aussi appelés leucocytes polynucléaires à cause de la forme particulière de leur noyau qui est polylobé. Les granulocytes ont une durée de vie courte, mais lors d'une réponse immune, ils sont produits en quantité croissante et migrent du sang vers les sites d'infection ou d'inflammation. Il en existe trois types : les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles. (Goldsby et al. 2000).

4) **Cellules dendritiques** : Les cellules dendritiques possèdent à la fois des propriétés de phagocytose et de macropinocytose en ingérant une grande quantité de fluide extracellulaire. Elles ont la particularité de capturer, apprêter et présenter les antigènes aux lymphocytes. (Villadangos et Schnorrer 2007)

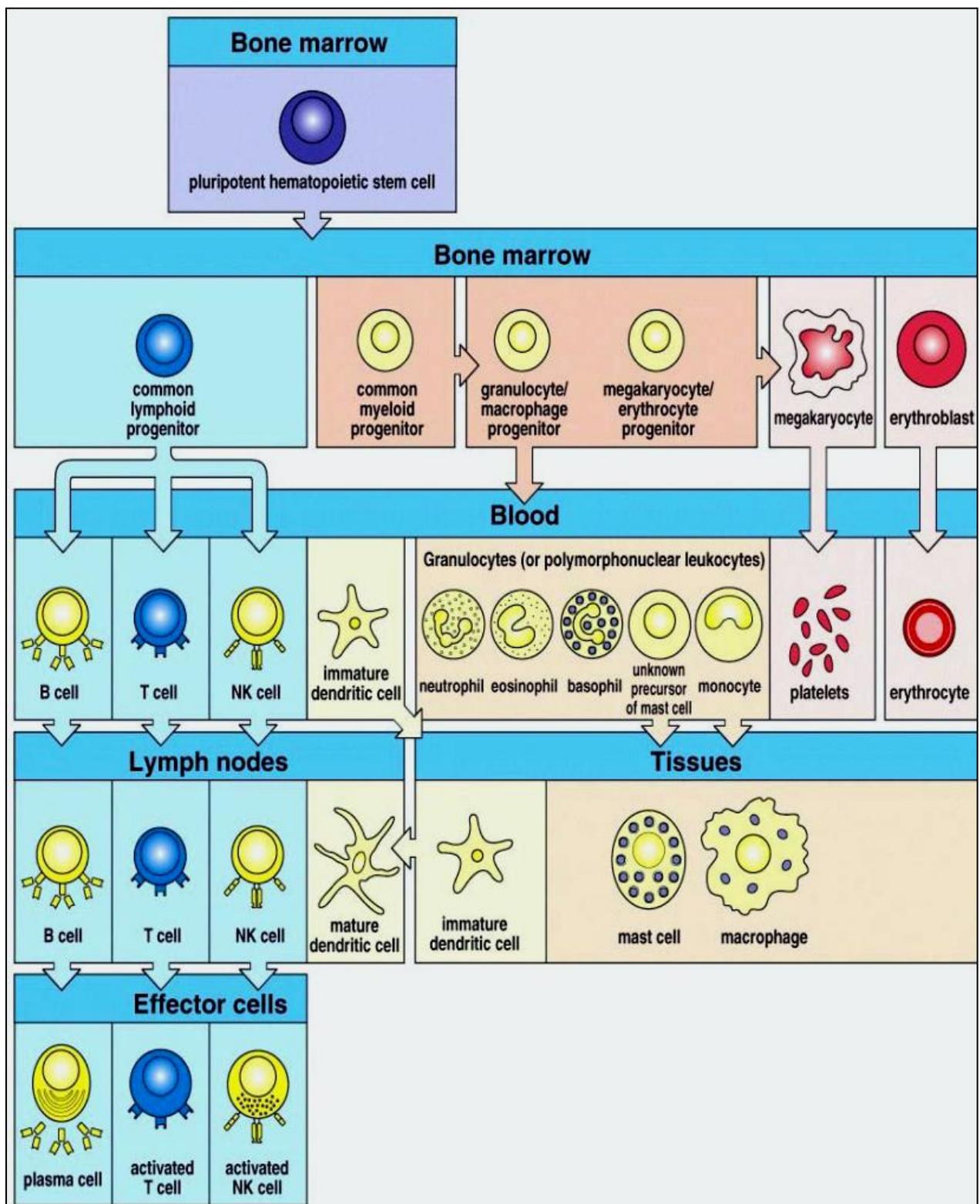


Figure 3 : Différenciation des cellules (Immunobiology, Garland Science 2005)

I-2.2.2 Lignée lymphoïde :

Il existe trois types principaux de lymphocytes : les lymphocytes B, les lymphocytes T et les cellules NK (*Natural killer*). Ils sont tous issus d'un même précurseur (Mossmann, et Coffman.1989).

1) **Cellules NK** : Les cellules NK sont des gros lymphocytes granulaires. Ces cellules constituent 5 à 10% des lymphocytes du sang périphérique humain. Elles jouent un rôle important dans la défense innée de l'hôte, tant contre les cellules tumorales que contre les cellules infectées par certains virus. (Horwitz, et al. 1984)

2) **Lymphocytes B**: Les lymphocytes B représentent 10 à 15% des lymphocytes circulants. Ils synthétisent les immunoglobulines (Ig) qui existent sous deux formes moléculaires. La forme soluble correspond aux anticorps ou immunoglobulines (Ig); la forme membranaire (mIg) ou de surface (sIg) au récepteur de l'antigène du lymphocyte B (BCR). L'activation de la cellule par liaison d'un antigène au récepteur B membranaire est nécessaire pour initier la sécrétion des immunoglobulines (Genetet 2005). Lorsqu'une cellule B naïve (non activée), qui n'a jamais été en contact avec un antigène, rencontre pour la première fois l'antigène qui correspond à son anticorps membranaire, la liaison de l'antigène et de l'anticorps provoque l'activation, la différenciation et la multiplication cellulaire. Deux types cellulaires en résultent : les plasmocytes sécréteurs d'immunoglobulines spécifiques et les cellules B mémoires qui ont la propriété de répondre rapidement à une nouvelle rencontre avec l'antigène (Freitas. et al. 1991)

3) **Lymphocytes T** : Les lymphocytes T proviennent eux aussi de la moelle osseuse. Contrairement aux cellules B qui arrivent à maturité au sein de la moelle osseuse, les cellules T migrent vers le thymus pour effectuer leur maturation. Lors de cette maturation, la cellule T vient à exprimer, à la surface de la membrane, une molécule de liaison à l'antigène spécifique, appelée récepteur des cellules T (TLRs). Les récepteurs des cellules T ne peuvent reconnaître l'antigène que lorsque ce dernier est lié à des protéines de la membrane cellulaire appelées molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Lorsqu'une cellule T naïve rencontre l'antigène combiné à une molécule du CMH à la surface d'une cellule, la cellule T prolifère et se différencie en cellules T à mémoire ou en différentes cellules T effectrices (Bettelli, et al. 2007).

I-2.3 Molécules impliquées dans système lymphoïde

Les cellules de l'immunité exercent leurs fonctions par l'intermédiaire de molécules qu'elles produisent. Certaines de ces molécules sont des protéines membranaires et servent «d'agents de liaison» intercellulaires, d'autres secrétées agissent dans l'environnement immédiat sur le site même de la réaction immunitaire (effets autocrine, paracrine), enfin d'autres diffusent à distance et sont des messagers de l'immunité (effet exocrine).

I-2.3.1 Immunoglobulines :

Les immunoglobulines sont des glycoprotéines présentes dans le plasma mais aussi dans les autres liquides biologiques de l'organisme et les sécrétions. Les immunoglobulines sont douées d'activité anticorps : elles représentent les agents de l'immunité humorale. Elles sont synthétisées par des plasmocytes en réponse à l'infection par un antigène. La principale caractéristique de cette réponse immunitaire est la très grande spécificité de l'immunoglobuline vis-à-vis de l'antigène qui a déclenché sa synthèse.

(Carlisle, McGregor et al. 1991). La figure 4 illustre de façon schématique l'organisation de base de cette macromolécule et des différentes activités biologiques dans l'organisme.

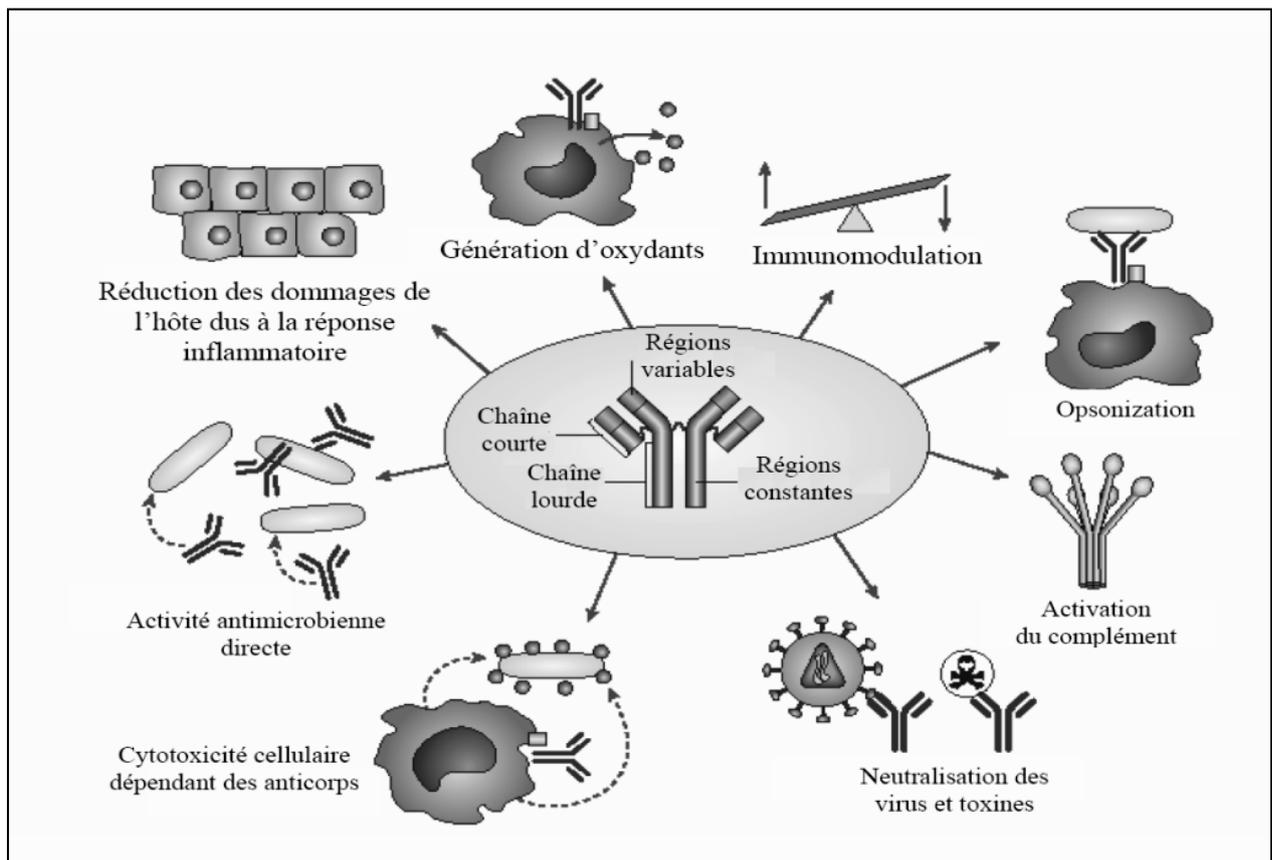


Figure 4 : L'organisation de base des immunoglobulines et les différentes activités biologiques dans l'organisme (Casadevall et al, 2004).

I-2.3.2 Système du complément :

Le système du complément est constitué par un ensemble de protéines plasmatiques et de protéines membranaires à fonctions régulatrices. Les protéines et les glycoprotéines sont synthétisées par les hépatocytes, les monocytes du sang, les macrophages des tissus et les cellules épithéliales des tractus gastro-intestinal et génito-urinaire. Les activités biologiques de ce système ont des impacts sur l'immunité naturelle et l'immunité acquise et vont bien au-delà des observations originales sur la lyse des bactéries et des cellules rouges du sang, méditées par les anticorps. (Michalek, et al. 1982).

Après une activation initiale, les différents composants du complément interagissent, au sein d'une cascade hautement régulée, pour effectuer un nombre de fonctions de base incluant :

- La lyse des cellules, des bactéries et des virus
- L'opsonisation, qui favorise la phagocytose des antigènes particuliers.

La liaison à des récepteurs du complément spécifiques de la surface des cellules du système immunitaire, déclenche : l'activation des réponses immunitaires, telles que l'inflammation et la sécrétion de molécules immunorégulatrices qui amplifient ou modifient les réponses immunitaires spécifiques, mais aussi l'épuration immunitaire qui élimine les complexes immuns de la circulation et les dépose dans la rate ou le foie.

I-2.3.3 Cytokines :

Les cytokines sont des glycoprotéines produites de manière inductive à la suite d'une stimulation antigénique (Roitt et al. 1994). Elles ont un faible poids moléculaire (15 - 25 kDa) et sont constituées d'un noyau polypeptidique de 120 - 180 acides aminés auquel se fixe un nombre variable de groupements glucidiques. Elles permettent la communication entre les cellules en se fixant sur des récepteurs de haute affinité à la surface de cellules cibles de l'organisme. Les cytokines peuvent être décrites comme les hormones du système immunitaire puisqu'elles interviennent dans le dialogue entre lymphocytes, macrophages et autres cellules intervenant au cours de la réaction inflammatoire et des réponses immunitaires. Elles exercent leurs effets sur les cellules qui les ont produites (effet autocrine), sur d'autres cellules (effet paracrine) ou encore agissent à distance sur des organes ou tissus (effet exocri). (Shau, et al. 1992).

II-Généralités sur les pesticides

1-Définition

Le terme pesticide est un anglicisme issu du latin *pestis* (épidémie, fléau) et *caedere* (tuer) qui traduit l'intention de lutter contre les nuisances d'origine biologique. Bien que majoritairement de synthèse, certains pesticides sont d'origine naturelle.

Le terme "**pesticides**" est une appellation générique couvrant toutes les substances (molécules) ou produits (formulations) qui éliminent les organismes nuisibles, qu'ils soient utilisés dans le secteur agricole ou dans d'autres applications. La substance ou le microorganisme qui détruit ou empêche les organismes nuisibles de s'installer sur les végétaux, parties de végétaux ou produits végétaux est dénommée substance active (anciennement dénommée matière active), à laquelle sont associés dans la préparation un certain nombre de «formulants» (mouillants, solvants, anti-mousses, ...) qui la rendent utilisable par l'agriculteur (ACTA, 2005).

2-Regroupement des pesticides

2-1.Regroupement selon leur cible

- **Les herbicides** : destinés à limiter l'installation d'espèces végétales adventices. Peuvent être sélectifs ou totaux. Les familles de substances les plus importantes sont les acides amino-phosphoriques (glyphosate), les urées (diuron, isoproturon), les triazines (atrazine, simazine).
- **Les insecticides** : destinés à tuer les insectes ou à empêcher le déroulement normal de leur cycle de vie. Les familles les plus rencontrées sont les organophosphorés (malathion), les carbamates insecticides (carbaxyl), les pyréthrinoïdes (deltaméthrine) et les organochlorés (endosulfan).
- **Les fongicides** : destinés à éliminer les champignons. On distingue trois modes d'action différents. Les multisites s'attaquent aux spores des champignons. Ils sont donc préventifs. Les unisites attaquent la perméabilité membranaire des champignons. Les antimitotiques bloquent la division cellulaire. La famille la plus présente est celle des carbamates.

- **Les molluscicides:** les molluscicides sont destinés à éliminer les escargots et les limaces. Ils sont épandus essentiellement sous forme de granulés.
- **Les rotenticides:** agissent contre les rongeurs.
- **Les anticoagulants :** représentent 85% du marché. Quelques produits de gazage sont encore utilisés
- **Les nématocides :** agissent sur les nématodes. (1)

2-2.Regroupement des pesticides selon leur origine :

- **Pesticides inorganiques :** Dérivés des minéraux (acide borique, cuivre, sels, soufre.
- **Pesticides organiques de synthèse :** On cite les acides phtaliques, les ammoniums quaternaires, les ryloxyacides, les carbamates, les nitrobenzènes, les organochlorésles pyréthriinoïdes, les organophosphatés et les triazines
- **Pesticides organiques naturels :** sont d'origine animale (œufs entiers déshydratés en putréfaction, phéromones, sang séché), d'origine microbienne (spinosad) ou d'origine végétale (nicotine, pyréthrine, roténone, etc).
- **Micro-organismes :** Certains champignons (*Pseudozyma flocculosa*), bactéries (*Agrobacterium radiobacter*, *Bacillusthuringiensis*, *Bacillus subtilis*) ou Virus (nucléopolyhédrovirus de la spongicus). (2)

3- Principaux usages des pesticides

Le principal usage des pesticides est la protection des cultures, on parle alors de pesticide à usage agricole. Toutefois, les pesticides sont aussi utilisés pour des usages non agricoles, dans des zones dites non agricoles (ZNA), afin de lutter notamment contre des espèces végétales jugées envahissantes pour des raisons de sécurité (infrastructures de transport) ou d'aménagements paysagers (parcs et jardins). (3)

4- Voies d'exposition aux pesticides

Les risques d'exposition aux pesticides sont multiples et plusieurs facteurs peuvent en être responsables. Ils apparaissent dès qu'une personne manipule des pesticides sans tenir compte des règles de base en matière de sécurité et ce, à l'étape de la préparation des mélanges, en cours d'application ou de pulvérisation ainsi qu'au retour sur le site traité. (4)

4-1-Exposition cutanée

Il a souvent été démontré que chez les utilisateurs professionnels, le contact cutané constitue généralement la principale voie d'exposition aux pesticides. Ce type d'exposition, bien que souvent insoupçonné, est aussi responsable de la plupart des intoxications accidentelles en milieu de travail. La peau constitue généralement une barrière relativement

imperméable aux substances chimiques. Toutefois, la majorité des pesticides peuvent être absorbés à travers toute la surface corporelle et ce, en quantité suffisante pour causer des effets systémiques tant aigus que chroniques. Voici quelques exemples de situations pouvant mener à une intoxication par la voie cutanée :

- Mélange à mains nues de la bouillie;
- Éclaboussures de produits sur la peau et dans les yeux;
- Application sans vêtements de protection;
- Contact des mains avec la région génitale;
- Renversement de liquide sur les vêtements;
- Pulvérisation en hauteur;
- Application de produits dans un espace confiné et clos.(4)

4-2- Exposition respiratoire

L'exposition par les voies respiratoires constitue la voie d'intoxication la plus rapide et la plus directe. Les pesticides qui sont normalement appliqués sous forme d'aérosol, de brouillard ou de gaz peuvent facilement être inhalés.

Ces produits peuvent aussi adhérer à des particules de poussières en suspension et parfois même à la fumée de cigarette. L'inhalation constitue souvent la principale voie d'entrée dans l'organisme pour les fumigeant et certains pesticides très volatiles. Le risque d'exposition par cette voie est normalement plus important lorsque les travaux sont effectués dans un espace fermé, comme une serre ou un tunnel de culture. Ce type d'intoxication peut se produire :

- Lorsqu'une personne respire des vapeurs lors de la préparation d'une solution avec des pesticides concentrés;
- Lors d'une pulvérisation en hauteur sans porter d'équipement de protection respiratoire approprié;
- Lorsque les applications sont effectuées dans un endroit où la ventilation est inadéquate;(4)

4-3-Exposition orale

Les pesticides peuvent aussi être absorbés par voie orale. Chez les travailleurs, l'absorption de pesticides par la voie gastro-intestinale se produit principalement par un contact de la bouche avec les mains contaminées.(4)

III-Pesticides et santé humaine

Les pesticides dangereux ne sont pas seulement un problème du monde en développement. Les pays fortement industrialisés continuent d'utiliser de grandes quantités de pesticides dangereux. Ces derniers continuent encore de causer des agressions sur la santé et l'environnement. Pratiquement tous les pays ont besoin de réformes supplémentaires pour réduire et éliminer les préjudices causés par l'exposition aux pesticides. Néanmoins, l'exposition à des pesticides dangereux est un problème particulièrement grave dans beaucoup de pays en développement. Dans de nombreux pays, l'exposition aux pesticides toxiques est un grave problème de santé avec des proportions épidémiques. (5)

III-1-Toxicité des pesticides

En dépit de leur sélectivité et mode d'action spécifique, les pesticides exercent leur nocivité envers les organismes involontairement exposés, suite à la contamination de l'environnement et de la chaîne alimentaire. Ils sont cytotoxiques, neurotoxiques, embryotoxiques, mutagènes, tératogènes ou carcinogènes. Ils exercent leur action toxique par génotoxicité directe, ils peuvent donc subir une activation métabolique et former des intermédiaires électrophiles capables d'interagir avec les acides nucléiques ; ou par d'autres moyens indirects tel que le stress oxydatif, l'inhibition de la communication intercellulaire, la formation de récepteurs activés ou autres (Fishbein, 1977 ; Rakitsky et al, 2000 ; Suwalsky *et al*, 2000 ; Lin *et al*, 2002 ; Hurst et Sheahan, 2003).

III-1-1-Toxicité aiguë :

Le pesticide Aldicarbe qui a été pris dans l'exemple ci-dessus est l'un des nombreux pesticides qui sont classés comme très dangereux. Cette classification remonte à une décision de 1973 de l'Organisation mondiale de la Santé de mettre au point un système de classification des pesticides en fonction des risques qu'ils posent. Dans cette décision, le terme «pesticides dangereux» est défini comme un pesticide qui fait peser un grave risque sur la santé, c'est-à-dire un pesticide qui peut causer des préjudices graves à la suite d'une exposition pendant une courte période. L'OMS tient une liste à jour des pesticides très dangereux qui sont très toxiques dans sa publication: *The Recommended Classification of Pesticides Hazard* (Hazard; 2004) L'OMS utilise comme principale méthode pour identifier les pesticides qui posent un risque grave pour la santé un test dans lequel les rats sont nourris avec le pesticide ou exposés à travers la peau. Ce test produit une valeur appelée DL50 (dose létale 50%), qui est une estimation statistique du nombre de milligrammes de la substance toxique par kilogramme de poids corporel qui va tuer 50% d'une population importante de

cobayes. Dans ce système, l'OMS considère un pesticide extrêmement dangereux (classe Ia) ou très dangereux (classe Ib) si elle a une valeur DL 50 faible. Une intoxication aiguë par les pesticides peut causer des blessures, des maladies et les symptômes qui suivent (Reigart, R. and J. Roberts 1999) :

- **Yeux** : larmoiement, irritation, conjonctivite
- **Peau** : éruption cutanée, boursoufflures, brûlures, sudation, dermite de contact, - jaunisse
- **Système nerveux** : maux de tête, étourdissements, sautes d'humeur, dépression, stupeur, contractions musculaires, manque de coordination, crises épileptiques, paralysie, évanouissement, coma
- **Appareil respiratoire** : maux de gorge, écoulement nasal, toux, oedème pulmonaire, difficulté à respirer, insuffisance respiratoire
- **Système cardio-vasculaire** : irrégularité du rythme cardiaque
- **Tractus gastro-intestinal** : nausée, vomissements, diarrhée, douleurs abdominales

L'intoxication aiguë par les pesticides peut avoir diverses causes, dont l'ingestion accidentelle de pesticides à la maison ou au jardin, la consommation d'aliments contenant des résidus de pesticides et l'exposition involontaire aux pesticides utilisés en intérieur, sur les pelouses, dans les jardins, dans les forêts et dans les fermes. Les enfants sont particulièrement sensibles à l'intoxication par les pesticides, surtout les très jeunes enfants dont le corps n'a pas encore développé la capacité de se défendre contre certains types de pesticides (Furlong, C. E., T.B. Cole, G.P. Jarvik et al. 2005). La majorité des intoxications par les pesticides chez les enfants ont lieu au domicile de l'enfant ou à celui d'un ami ou parent.

III-1-2-Toxicité chronique : Au cours des dernières années, le terme pesticide extrêmement dangereux a été élargi et est maintenant utilisé pour décrire non seulement les pesticides très toxiques, mais aussi les pesticides qui causent de graves effets chroniques sur la santé. Il est généralement beaucoup plus difficile de démontrer les effets chroniques sur la santé que de démontrer des effets toxiques aigus, mais d'importantes recherches sont en cours. Quand il y a une preuve sérieuse qui établit des liens entre un pesticide et un effet chronique grave sur la santé, ce pesticide est ainsi considéré comme un pesticide extrêmement dangereux. Les effets chroniques sur la santé liés aux pesticides concernent les cancers et tumeurs, les troubles du système nerveux, des problèmes de reproduction, les effets sur le système immunitaire, la perturbation du système endocrinien. (Watts MA 2009)

III-2.Maladies liées aux pesticides

✓ **Le cancer** : Il est connu que beaucoup de matières actives des pesticides sont à l'origine ou sont soupçonnés d'être à l'origine du cancer. Les pesticides sont associés, soit par des éléments de preuve en laboratoire ou des études épidémiologiques, à une longue liste de cancers, y compris le myélome multiple, les sarcomes des tissus mous, le sarcome d'Ewing, le lymphome, le lymphome non hodgkinien, la leucémie, le mélanome, le neuroblastome ou de la tumeur de Wilm, les tumeurs à cellules germinales, le rétinopathie (tumeur de l'oeil) et le cancer de l'oesophage, de l'estomac, de la prostate, du testicule, du sein, de l'ovaire, du col de l'utérus, de la vessie thyroïde, des poumons, du cerveau, des reins, du pancréas, du foie, du colon et du rectum.

✓ **Troubles du système nerveux** : L'exposition aux pesticides a été associée à l'altération du développement du système nerveux qui peut entraîner une baisse de l'intelligence et des troubles du comportement. (UNEP et al 2002) Il existe des preuves reliant divers pesticides aux effets sur le système nerveux central, le système nerveux périphérique et le développement prénatal du cerveau, notamment:

- Un développement plus lent des aptitudes et une augmentation de l'agressivité chez les enfants.
- Des effets dépressifs qui peuvent entraîner des suicides. Une neuropathie retardée, impliquant une dégénérescence des nerfs périphériques des membres avec des maux et des douleurs musculaires et des symptômes grippaux.
- Le changement de personnalité, les troubles de concentration et de mémoire, les troubles du langage, le sens de l'odorat très développé, la détérioration de l'écriture, une altération de la tolérance à l'exercice et les déficits neuromusculaires.
- La maladie de Parkinson et le parkinsonisme - des troubles avec des symptômes tels que la maladie de Parkinson qui peuvent toutefois être réversibles. (Watts M.A, 2009)

✓ **Problèmes de la reproduction** : Certains pesticides peuvent être liés à un certain nombre de problèmes de reproduction, y compris des anomalies congénitales, la stérilité, les grossesses prolongées, l'avortement spontané, les mort-nés, les naissances prématurées, le retard de croissance intra-utérin, mortalité périnatale, l'endométriose, et la baisse de spermatozoïdes. Des études épidémiologiques ont établi un lien entre l'exposition des parents à certains pesticides et des anomalies du tube neural, des malformations congénitales cardiaques, la fente labiale et la fente palatine, les malformations congénitales musculo-squelettiques, anomalies du tractus urinaire et anomalies des organes génitaux masculins.(Eddleston M,et al2004)

✓ **Perturbation du système endocrinien** : Certains pesticides, avec de très petites doses, peuvent imiter ou bloquer les hormones ou peuvent déclencher une activité hormonale inappropriée. Cela peut en rajouter aux effets nocifs sur la santé telle que la stérilité, la baisse du nombre de spermatozoïdes et le cancer du sein. (UNEP et al 2002) D'autres effets indésirables éventuels sur la santé incluent l'avortement spontané, la sex-ratio biaisée dans la descendance des communautés exposées, les anomalies du tractus reproducteur mâle et femelle, y compris des malformations génitales et d'autres anomalies congénitales, la puberté précoce, le syndrome des ovaires polykystiques, une atteinte de la fonction immunitaire ainsi qu'une variété de cancers. Une étude a identifié 127 pesticides soupçonnés d'avoir des effets perturbateurs sur le système endocrinien. (Watts MA 2009)

✓ **Perturbations du système immunitaire** : L'exposition aux pesticides peut compromettre le système immunitaire ce qui augmente le risque des maladies infectieuses et de cancer. Cela devient particulièrement préoccupant quand le système immunitaire est déjà compromis par d'autres facteurs, telle que la malnutrition. (UNEP et al 2002) Certains pesticides altèrent le développement des organes du système immunitaire comme le thymus et la rate et portent atteinte à la capacité des globules blancs et des lymphocytes à tuer les bactéries, les virus et les cellules cancéreuses. (Watts M.A, 2009)

III-3-L'immunotoxicité des pesticides par le biais du stress oxydant.

L'immunotoxicité d'une substance est sa capacité à causer des effets délétères sur le système immunitaire, qu'il s'agisse d'immunosuppression, d'hypersensibilité ou d'autoimmunité. L'immunosuppression est une altération du système immunitaire conduisant à une diminution de la réponse immune, l'hypersensibilité est un phénomène entraînant des symptômes ou signes reproductibles suite à une exposition à un certain stimulus qui est toléré chez des individus normaux, et l'auto-immunité est une réaction inappropriée du système immunitaire qui produit alors des lymphocytes T autoréactifs ou des auto-anticorps dirigés contre les antigènes du soi.

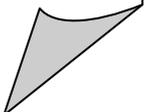
Le stress oxydatif dans le contexte du métabolisme des pesticides constitue une cause majeure de l'apparition des troubles du système immunitaire. C'est l'un des mécanismes possibles impliqués dans la régulation des voies de mort / survie (6). Il est important de se rappeler que l'apoptose joue plusieurs rôles importants dans des conditions normales et physiologiques, mais quand il est en dehors de la réglementation, l'apoptose peut contribuer à plusieurs maladies comme l'immunodéficience, les maladies d'auto-immunité et le cancer. Il semble évident que l'élimination incontrôlée des cellules du système immunitaire pourrait expliquer l'immunosuppression ou la dysrégulation immunitaire (Gougeon et al, 1996).

Partie expérimentale

CHAPITRE II :

Matériel et

méthodes



I-Enquête de morbidité/mortalité dues aux pesticides

Cette enquête est menée à partir des cas des décès et des intoxications enregistrés sur les registres de la Direction de Santé (DDS) de Guelma et le Centre National de Toxicologie (CNT), Département d'Analyse et d'Expertise Toxicologique, Région de centre, Alger. Les résultats obtenus ont subis une analyse descriptive.

II-Test de toxicité in vitro

Pour ce test, nous avons choisie les érythrocytes humains comme modèle d'étude de la toxicité d'un raticide impliqué dans les intoxications enregistrées.

1-Produits chimiques :

Le pesticide testé dans cette étude : Brodifacoum de raticide {3-[3-(4'-bromobiphenyl-4-yl)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthyl]-4-hydroxycoumarin} rencontré fréquemment dans les intoxications enregistrées est d'une qualité commerciale commercialisé par la **PelGar International Corporation** (Lyon. CEDEX 05 France).

2- Echantillons de sang :

Les échantillons de sang de dix donneurs sains sont fournis par le poste de transfusion sanguine (*PTS*) de **Guelma**. Selon le PTS, les donneurs étaient non-fumeurs, non buveurs d'alcool, n'y a aucune pathologie et aucun médicament ni apport alimentaire de suppléments sont enregistrés.

3- Préparation et traitement des érythrocytes

Après avoir centrifugés les échantillons du sang (prélevés sur tubes héparinés) à 3000 rpm pendant 10 min, le plasma et la couche leucocytaire sont enlevés. Les globules rouges sont lavés trois fois avec une solution saline isotonique froide. Après le lavage final, les érythrocytes sont remis en suspension dans un tampon phosphate (0,1 mol / L, pH 7,4) à raison de 1:9 ml/ml. (Rodrigues et Almeida, 1998)

Les érythrocytes sont exposés à des concentrations variables de Brodifacoum: 50, 100 et 200 mg/L pendant 1h à 37 °C avec agitation continue. Après incubation, les échantillons exposés au Brodifacoum sont stockés à -20 °C jusqu'à l'analyse des paramètres biochimiques.

4-Analyse des paramètres du stress oxydant :

✓ *Dosage de l'MDA*

La quantité des TBARS est exprimée en fonction d'un équivalent biochimique qui est le « Malonyl di aldéhyde : MDA », un des produits terminaux formés lors de la peroxydation des acides gras polyinsaturés (PUFA) méditée par les radicaux libres. La mesure de l'MDA à l'aide du TBA selon la méthode de [Okhawa et al, 1979] permet la quantification de la peroxydation lipidique qui constitue le marqueur majeur du stress oxydant.

- **Principe:** Le dosage de l'MDA repose sur la formation, en milieu acide et à chaud (100°C), entre une molécule d' MDA et deux molécules d'acide thiobarbiturique d'un pigment coloré absorbant à 530 nm et extractible par les solvants organiques comme le butanol.

- **Réactifs et solvants :**

- a- L'acide thiobarbiturique TBA 0.67 %.

- b- L'acide trichloroacétique TCA 20%.

- c- Le n-butanol.

- **Procédure :** La quantité de l'MDA est évaluée au niveau des érythrocytes selon la méthode de [Okhawa et al, 1979]. A 0.5 ml d'échantion, nous avons ajouté 0.5ml de TCA 20% et 1ml de TBA 0.67 %. Le mélange est chauffé à 100°C pendant 15 minutes, refroidis puis additionné de 4 ml de n-butanol. Après centrifugation de 15minutes à 3000 rpm, la densité optique est déterminée sur le surnageant au spectrophotomètre à 530 nm. L'MDA est exprimé en nmol/mg de protéines de l'organe étudié et calculé à partir d'une gamme préparée sous les mêmes conditions avec une solution de « 1,1,3,3-tetraetoxypropane » qui donne l'MDA après son hydrolyse.

✓ *Dosage de l'activité enzymatique du catalase*

L'activité enzymatique du catalase est déterminée dans les érythrocytes selon la méthode de [Clairborne, 1985].

- **Principe:** Le dosage de l'activité enzymatique du catalase est basé sur la diminution de l'absorbance à 240 nm qui est due à la décomposition du superoxyde d'hydrogène (H₂O₂) par la catalase.

- **Réactifs et solvants :**

- a- Tampon phosphate de potassium pH 7.4 (0.1M).

- b- Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) 19mmol/ml.

- **Procédure** : Dans une cuvette en quartz de 3 ml, 50µl d'échantillon sont mélangés avec 2.95 ml d'une solution de H₂O₂ à 19mmol/ml préparée dans le tampon phosphate de potassium pH 7.4 (0.1M). Le changement de l'absorbance est suivi pendant deux minutes en prenant les valeurs à t₀ et après chaque minute. L'activité enzymatique du catalase est exprimée en unité international UI/ mg de protéines sachant que UI est la quantité d'enzyme nécessaire pour consommer 1µmol de l' H₂O₂ par minute.

✓ *Dosage du glutathion réduit*

Le dosage de glutathion réduit est effectué selon la méthode de [Ellman, 1959]

- **Principe** : La méthode du dosage de glutathion est basée sur l'évaluation de la réduction du réactif d'Ellman par les groupes (SH) en formant l'acide 2-nitro-5- mercaptobenzoïque ; ce dernier est caractérisé par une coloration jaune intense, ce qui permet sa quantification spectrophotométrique à 412 nm.

- **Réactifs et solvants** :

- a- L'acide trichloracétique 10%.

- b- Tampon phosphate de potassium pH8 (0.1M).

- c- Réactif d'Ellman ; 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoïque) 0.396g/100ml de tampon.

- **Procédure** : Le dosage du glutathion réduit dans les érythrocytes s'effectue selon les étapes suivantes :

- a- 0.5 ml de TCA à10% sont mélangés avec 0.5 ml d'échantillon. Le mélange est agité de temps en temps pendant 15 minutes.

- b- Après 15 minutes, les tubes sont centrifugés 5minutes à 2000 tpm.

- c- D'autres tubes sont préparés pour le mélange réactionnel : 100µl de réactif d'Ellman sont ajoutés à 1.7 ml de tampon, ensuite, 200 µl de surnageant sont additionnés et la lecture se fait après 5minutes à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions. Les concentrations du glutathion réduit sont exprimées en µmol par mg de protéines. Elles sont déduites à partir d'une gamme étalon de glutathion préparée dans les mêmes conditions que le dosage.

✓ *Dosage des protéines*

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de [Bradford, 1976]

- **Principe** : Cette méthode consiste à utiliser un réactif spécifique : le bleu de Coomassie qui développe une coloration proportionnelle à la concentration en protéines en réagissant avec leurs acides aminés spécifiques.

- **Réactifs et solvants :**

a-Bleu Brillant de coomassie (BBC)

b-Albumine Borne

- **Procédure :** 4 ml de BBC sont ajoutés à 100 μ l de l'échantillon dans un tube propre, et ensuite agité au vortex. La lecture se fait dans intervalle de 2min et 1h à 595 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions.

La concentration en mg/ml est déterminée à partir de l'équation de régression.

II.4. L'étude statistique

L'étude statistique est réalisée à l'aide du système INSTAT2 MS-DOS en utilisant le test de variance univarié (one-way ANOVA). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm S.E.M et en comparant les échantillons exposés au raticide avec le témoin non exposé.

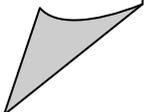
Ce test nous donne le degré de signification P où on dit que la différence :

- N'est pas significative si $p > 0.05$ (NS).
- Est significative si $0.05 > p > 0.01$ (*).
- Est hautement significative si $0.01 > p > 0.001$ (**).
- Est très hautement significative si $p < 0.001$ (***)).

CHAPITRE III :

Résultats et

discussion



I-Enquête de morbidité/mortalité dues aux pesticides

Après avoir consulté les données d'intoxications par les pesticides enregistrées par le Centre National de Toxicologie (CNT) pour la période 2005-2009 et les données enregistrées au niveau de la DDS de Guelma pour la période 2005-2012 nous avons pu suivre l'évolution de ces intoxications et les classées en fonction du type de pesticide en cause, les tranches d'âge, les conditions d'intoxication et leurs conséquences du point de vu mortalité ou guérison.

I-1-Enquête de la région du centre, Alger :

Statistique d'intoxications par les pesticides (2005-2009)

Un nombre total de **3532** d'intoxications est enregistré entre l'an 2005 et 2009 dans la région du centre. Dont on a remarqué une augmentation d'une année à une autre. Figure (5)

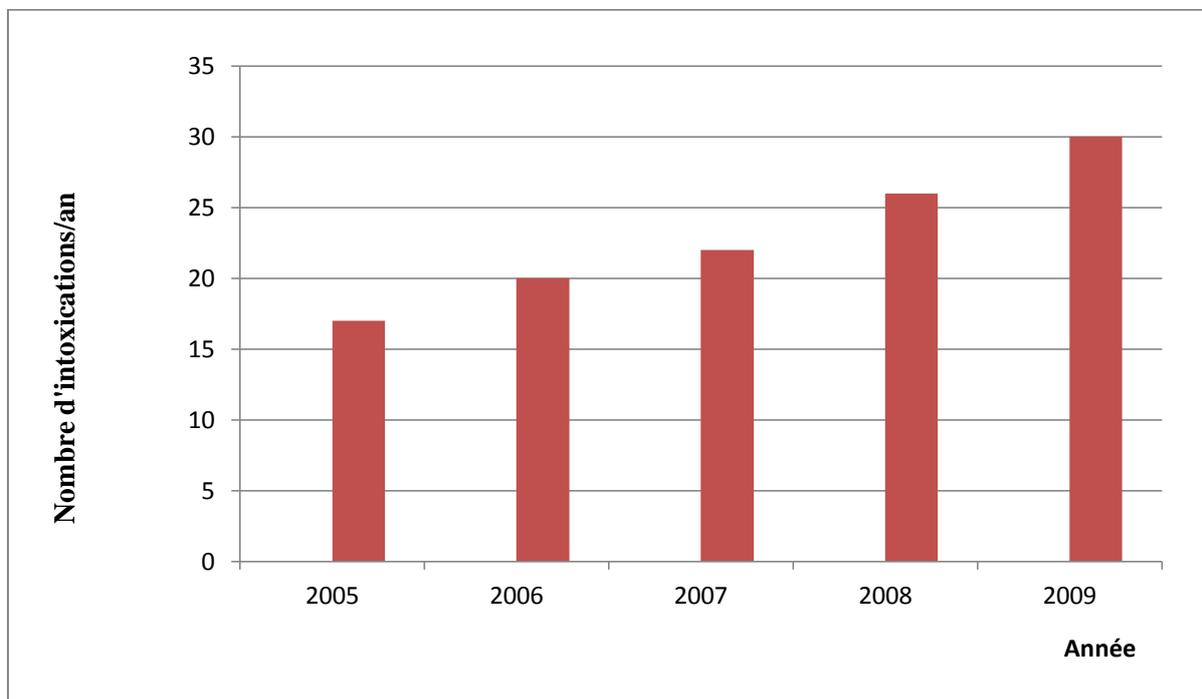


Figure 5: nombre d'intoxications par les pesticides dans la région du centre (CNT, 2005-2009)

- ✓ *Prenant en considération le type de pesticide en cause*, nous avons remarqué que les intoxications son dues principalement aux insecticides avec un pourcentage de 51%, suivi des raticides 42% (Figure 6). Cela peut être expliqué par le fait que ces deux types ont un large spectre d'utilisation : domicile, institutions publiques, milieu agricole, etc.

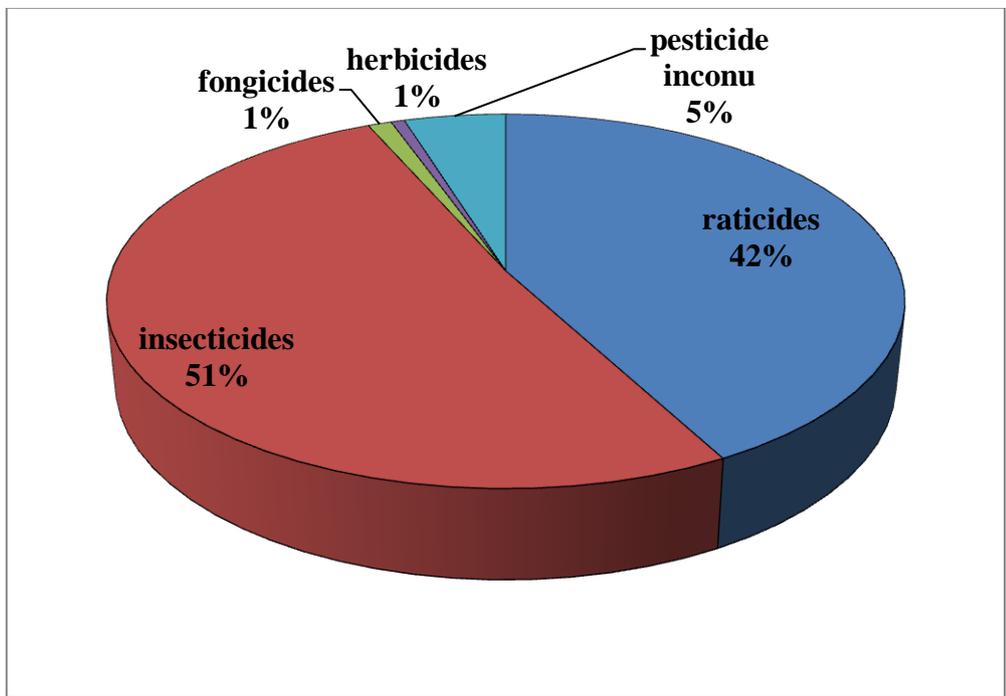


Figure 6: Répartition d'intoxications par type de pesticide (2005-2009)

- ✓ *Par tranche d'âge*, le nombre d'intoxications est plus élevé chez les enfants avec un pourcentage de 51% alors que chez les adultes, il était de 46% (figure 7).

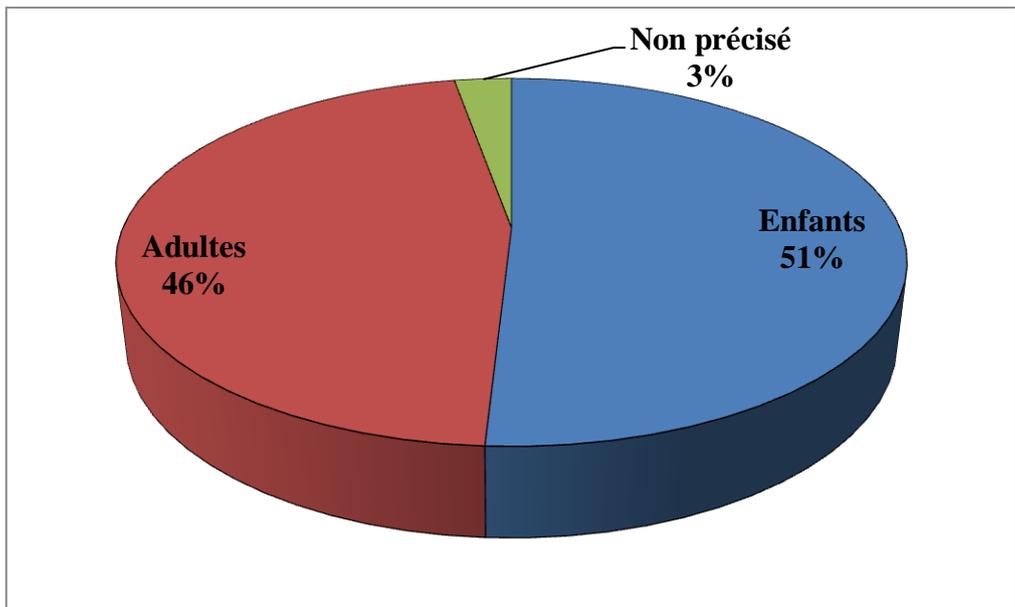


Figure 7: Répartition des intoxications par tranche d'âge. (CNT, 2005-2009)

- ✓ *Selon la conséquence des intoxications*, les statistiques ont montré que plus de 58% de personnes intoxiquées sont guéries mais malheureusement plus de 20% ont décédé, (Figure 8). On a noté aussi que les intoxications accidentelles sont le type majoritaire (67%) par rapport aux intoxications volontaires (31%)

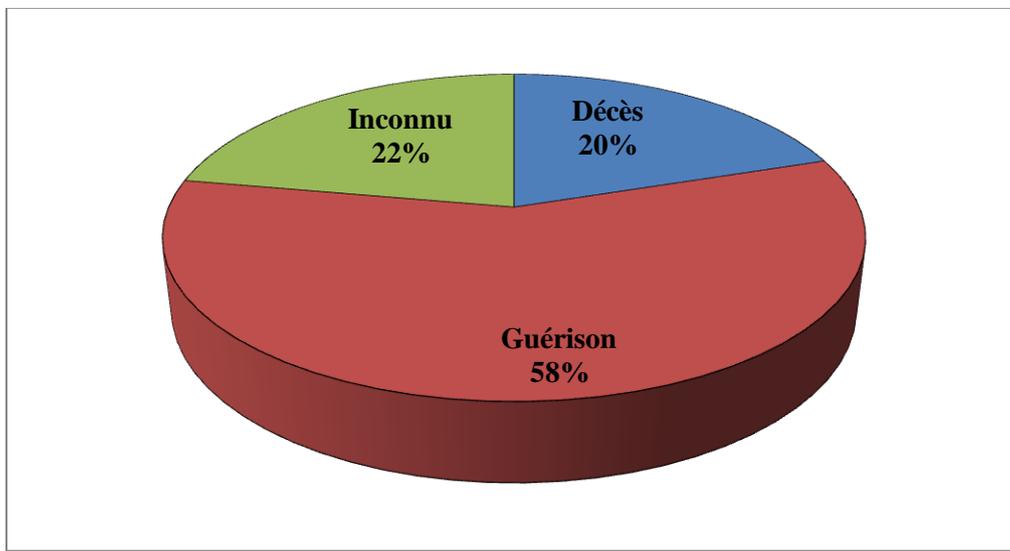


Figure 8: Répartition d'intoxications selon leurs conséquences (CNT,2005-2009)

I-2-Enquête de la DDS de Guelma :

Statistique d'intoxications totales par les pesticides (2005-2012)

Les résultats des statistiques d'intoxications sont présentés par la figure 9. On note que le nombre d'intoxications augmente annuellement.

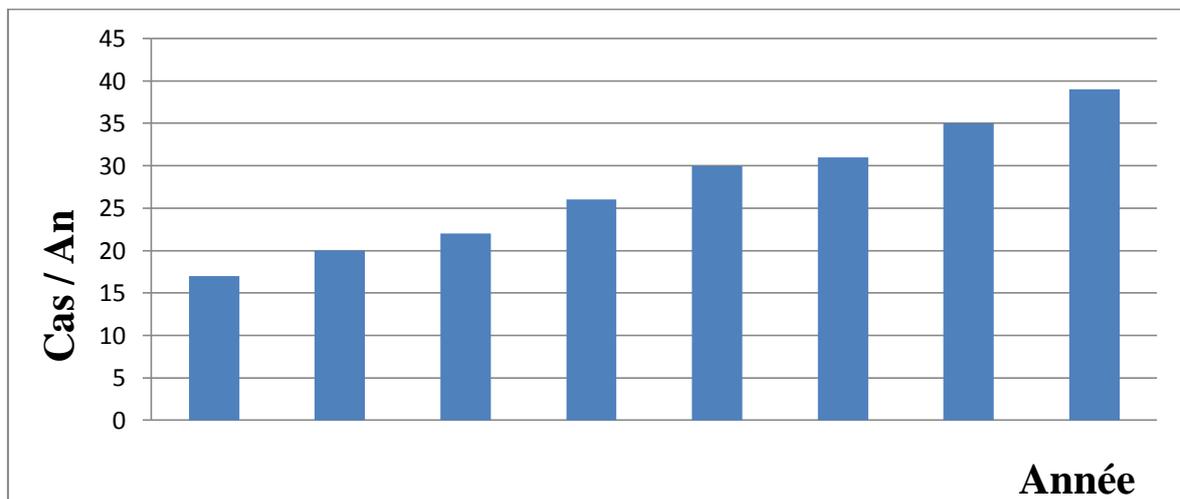


Figure 9: Nombre des cas intoxiqués par les pesticides à Guelma (DDS, 2005-2012)

1- Statistique d'intoxication par les insecticides :

D'après les cas d'intoxications enregistrés entre 2005 et 2012, on note les valeurs les plus élevées en 2006, 2009, 2011 et 2012 avec un maximum de 15 cas/an et un minimum de 6 cas/an enregistré en 2005.

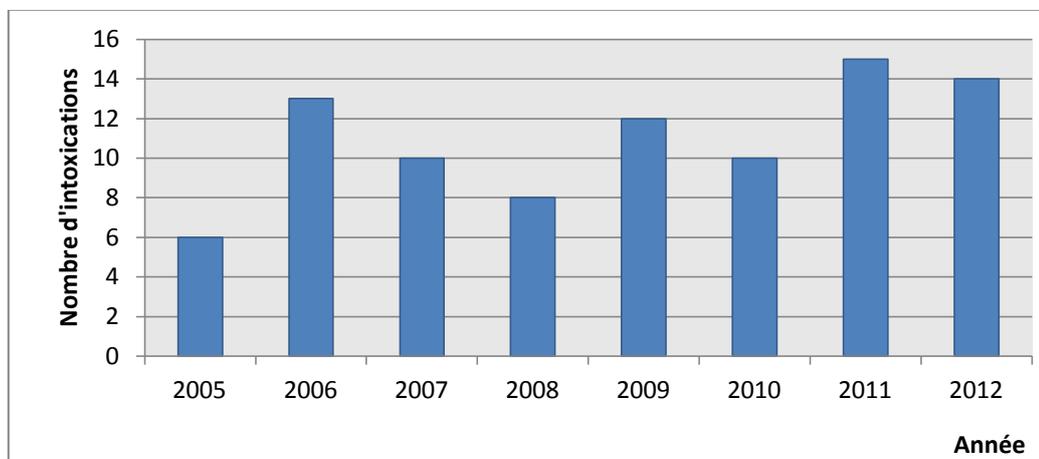


Figure 10: nombre des cas intoxiqués par les insecticides à la région de Guelma (DDS, 2005-2012)

2- Statistique d'intoxication par les raticides :

La figure (11) montre les intoxications par les raticides dont on note un nombre important en 2009, 2011 et 2012. Le raticide le plus fréquent et majoritaire en cause est le rat killer qui occupe un minimum de pourcentage de 20% par an en 2006 et un maximum 100% remarqué en 2007.

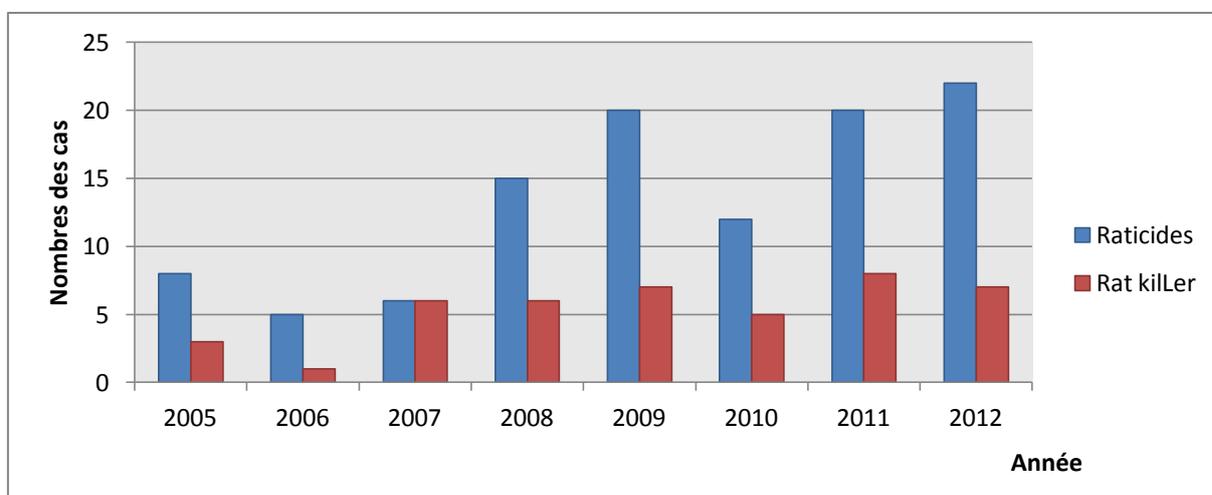


Figure 10: nombre des cas intoxiqués par les raticides à la région de Guelma (DDS, 2005-2012)

3- Evolution d'intoxication selon le sexe :

D'après la figure (12) l'intoxication Masculine au niveau des enfants est majoritaire (59%) par rapport aux intoxications féminines (41%), par contre pour les adultes les intoxications féminines sont les cas majoritaires (61%) par rapport aux intoxications masculins (39%).

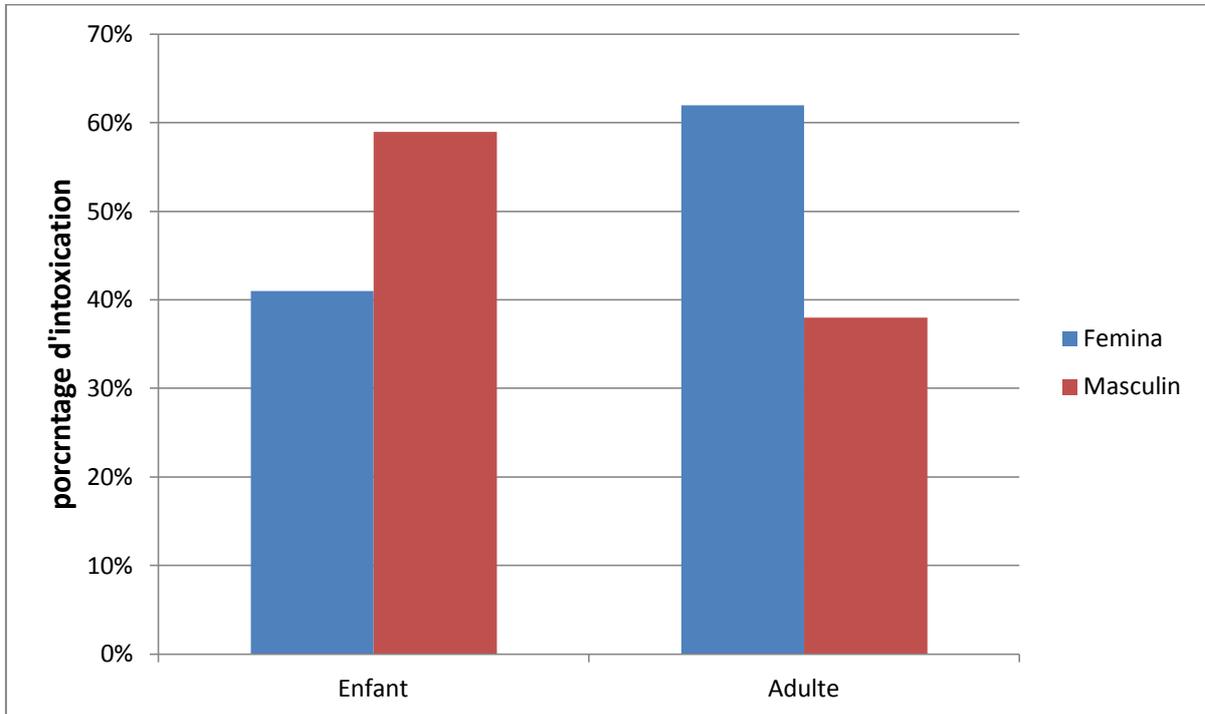


Figure 12: Répartition d'intoxications selon le sexe à la région de Guelma (DDS, 2005-2012)

4- Selon la conséquence des intoxications

les statistiques ont montré que plus de 52% de personnes intoxiquées sont guéries mais malheureusement plus de 18 % ont décédé, (Figure 13). On a noté aussi que (10%) des intoxications ont développé des complications.

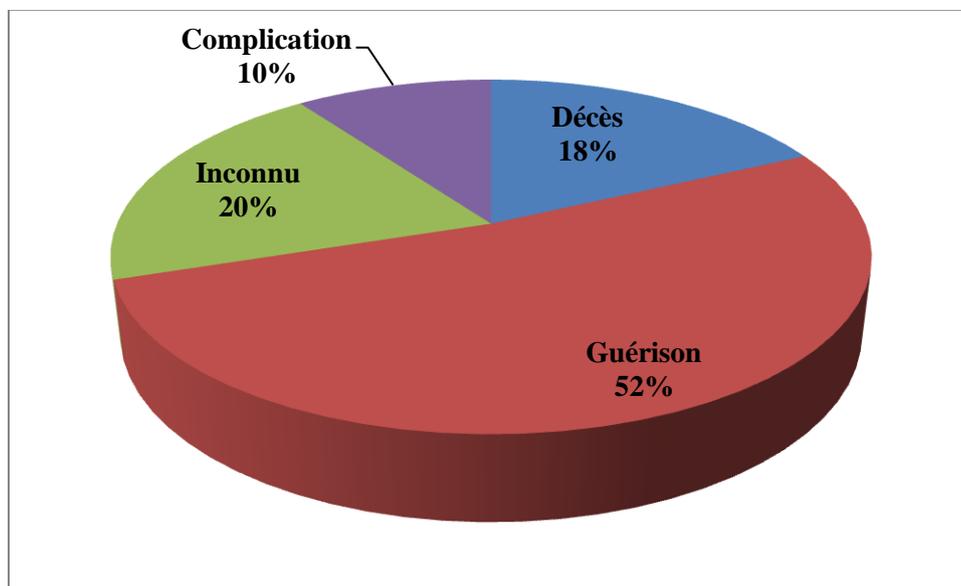


Figure 13: Répartition d'intoxications selon leurs conséquences à la région de Guelma (DDS, 2005-2012)

II-Test de toxicité in vitro

Le Brodifacoum, un raticide largement utilisé pour lutter contre les murins (rats et souris). Mais malheureusement et selon notre enquête il était à l'origine d'un nombre très élevé d'intoxications. Afin de mettre un spot sur l'un des mécanismes possibles de sa toxicité, des érythrocytes humains sont utilisés pour comprendre leur relation avec le stress oxydant.

✓ Dosage de l'MDA :

La figure (14) montre une augmentation remarquable de la peroxydation lipidique (le taux de l'MDA)

Elle était significative dans la série de concentration de 50mg/ml (+29.28%), la série de concentration de 100 mg/ml (+70.68%) et la série de 200 mg/ml (+79.71%).

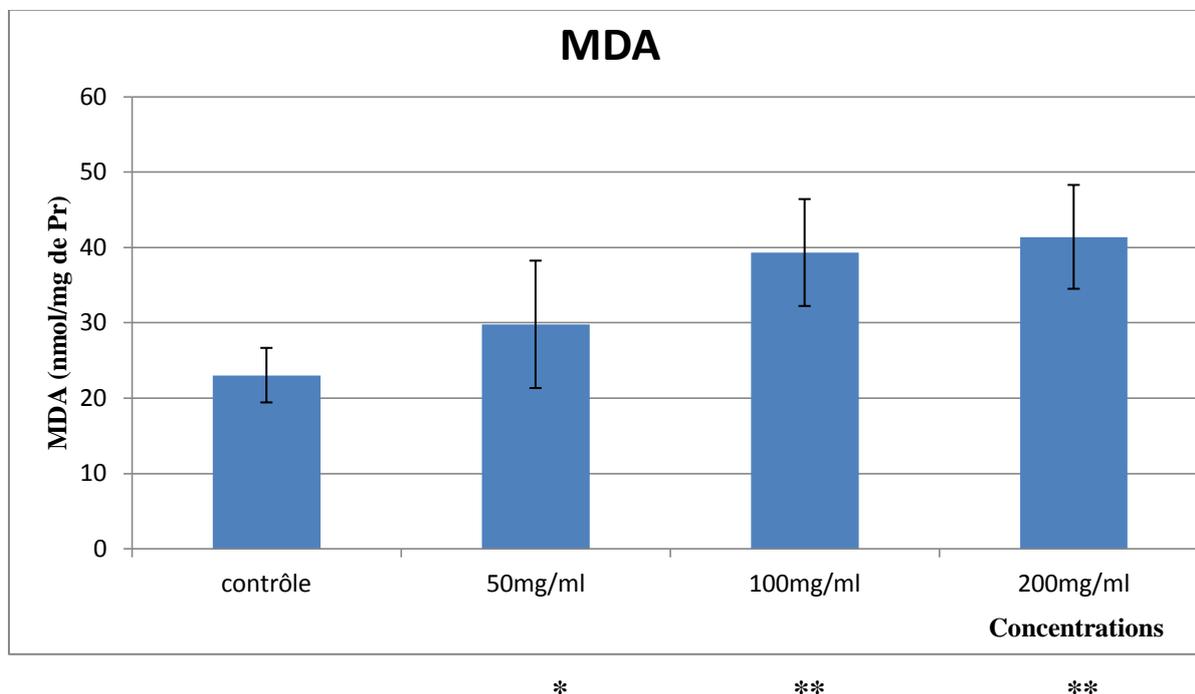


Figure 14: Dosage de l'MDA au niveau des érythrocytes

Chaque valeur représente la moyenne \pm S.E.M (n=10) * 0.05 > p > 0.01, **0.01>p>0.001,

La peroxydation lipidique a été largement utilisée comme un biomarqueur du stress oxydatif [Kochhann D et al 2009]. L'MDA produit suite à la peroxydation lipidique et considérés comme l'un des indicateurs du stress oxydant, qui résulte des dommages radicalaires, Le traitement avec brodifacoum (*in vitro*) dans toutes les concentrations a montré une augmentation de LPO dans les érythrocytes humains. Les acides gras polyinsaturés de la membrane, un milieu riche en oxygène, ainsi que en fer et en hémoglobine des globules rouges les rendent sensibles aux dégâts de peroxydation. (Çimen, 2008).

L'augmentation des niveaux de TBARS trouvés dans cette étude pourraient avoir résulté d'une augmentation des radicaux libres en raison de l'état de stress généré par l'exposition aux raticides. Ces résultats sont cohérents avec les résultats de plusieurs autres enquêtes récentes (Prashānti *et al*, 2005 ; Duchnowicz . *et al* , 2005).

Dosage de l'activité enzymatique du catalase :

La *figure (15)* montre l'activité enzymatique du catalase, en temps qu'une enzyme antioxydant, au niveau des érythrocytes incubés avec le brodifacoum pendant 1h à différentes concentrations.

-L'activité du catalase a significativement réduit (-28.32%) chez la série de 50mg/ml. Cette diminution continue à (-70.68%) chez la série de la concentration de 100mg/ml et (-79.71%) chez la série de 200mg/ml par rapport à la série de contrôle.

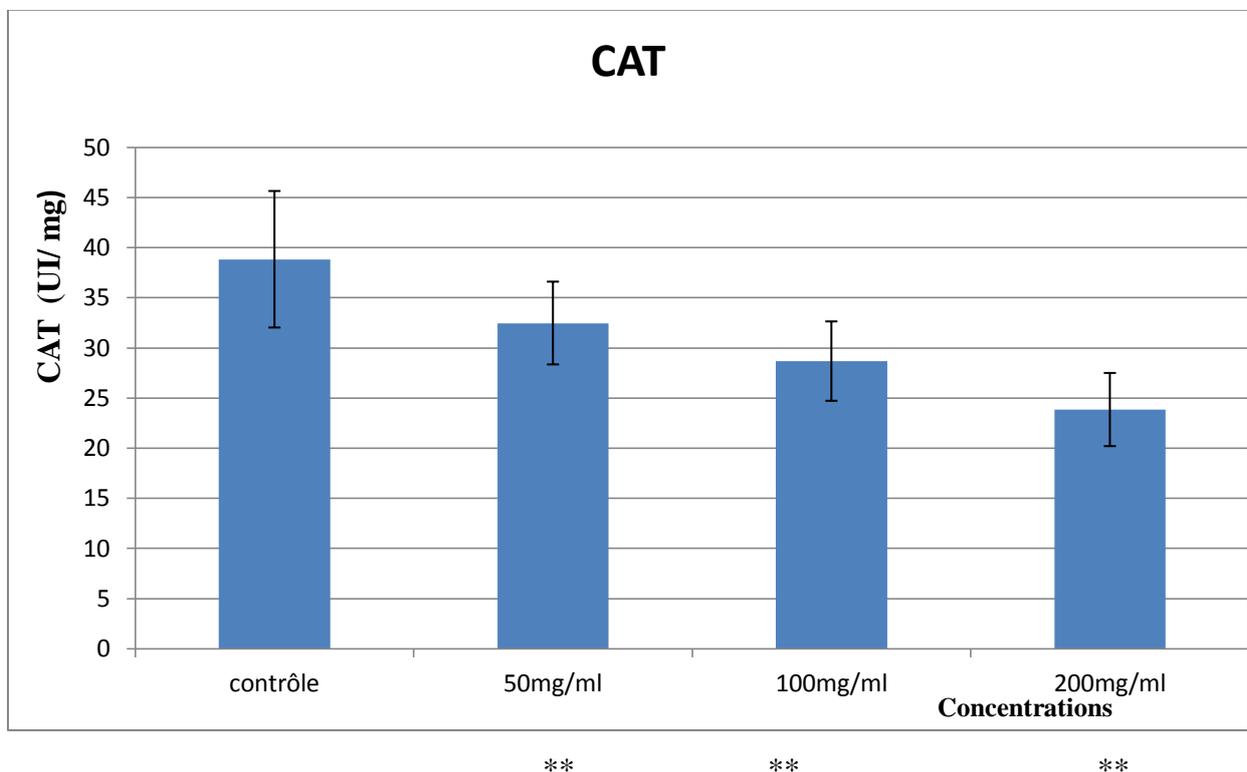


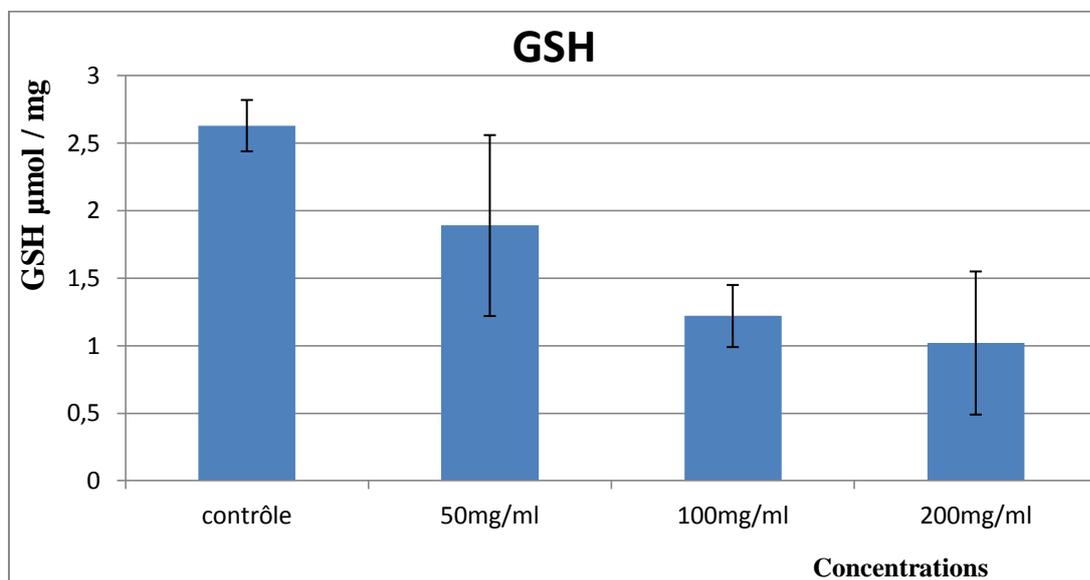
Figure 15: Dosage de l'activité enzymatique du catalase des échantillons des érythrocytes
 Chaque valeur représente la moyenne \pm S.E.M (n=10) * $0.05 > p > 0.01$,
 ** $0.01 > p > 0.001$,

La CAT est la principale enzyme qui joue un rôle dans le développement d'une réponse au stress oxydatif enzymatique provoqué par les raticides (Abdollahi et al. 2004, El-Demerdash 2007 et Yarsan et al. 2002)

L'activité CAT a diminué significativement dans les érythrocytes après l'exposition au brodifacoum d'une manière dose-dépendante. Une faible activité CAT peut aussi être attribuée à l'inactivation de l'enzyme par des dommages par les ROS (Nelson *et al*, 2006). Dans l'ensemble, nos résultats sont en accord avec d'autres études récentes qui ont montré que les raticides peuvent provoquer une diminution de l'activité CAT (Altuntas *et al*, 2002 ; Bukowska *et al*, 2000).

Dosage du glutathion réduit :

Le dosage de la forme réduite du glutathion tissulaire a montré qu'il a subi une baisse significative au niveau de série de concentration de 50mg/ml (-16.33%), De série de concentration de 100mg/ml (-26.17%) et de série de 200mg/ml (-38.62%) chez les échantillons incubés par rapport aux échantillons normaux contrôles (figure3).



**

Figure 16 : Dosage du GSH au niveau des échantillons des érythrocytes

Chaque valeur représente la moyenne \pm S.E.M (n=10) * $0.05 > p > 0.01$, ** $0.01 > p > 0.001$,

Le GSH est un inhibiteur de radicaux libres [Schulz JB et al 2000]. La diminution de GSH peut être expliquée par l'augmentation du stress oxydatif parce que le GSH est un moyen de détoxification dans les cellules. Ce résultat est en accord avec les résultats de (Luperchio *et al*, 1996 ; Gultekin *et al*, 2001).

CONCLUSION

Conclusion et Perspectives :

De nombreuses substances chimiques dans l'environnement, mais s'additionnent-elles ou se contrecarrent-elles ? Ces mélanges de composés présents dans l'air que nous respirons ainsi que dans l'eau et les aliments que nous consommons peuvent-ils avoir un impact sur notre santé ? Malheureusement, à l'heure actuelle, les réponses à toutes ces questions restent confuses, les connaissances permettant de répondre étant insuffisantes.

Parmi les contaminants environnementaux, les pesticides font partie des facteurs de risque pour l'homme et l'exposition à ces composés est suspectée d'augmenter l'incidence de certains cancers, d'induire des perturbations du fonctionnement hormonal et d'affecter l'immunité.

Dans notre étude nous avons tenté de présenter des statistiques de morbidité/mortalité dues aux intoxications par les pesticides, sorte d'étude épidémiologique, puis nous avons essayé de tester la toxicité de l'un des pesticides en cause qui s'agit d'un raticide à utilisation domestique et professionnelle, **le brodifacoum**, par le biais du stress oxydant en utilisant comme modèle expérimental les érythrocytes humains.

Cette étude montre bien que les intoxications par les pesticides est une situation alarmante vu le nombre croissant d'une année à une autre.

D'après le test de toxicité *in vitro*, le stress oxydant semble avoir un effet direct dans la toxicité du **brodifacoum**.

En perspective, des études *in vivo* et *in vitro* sont recommandées pour éclaircir le mécanisme de toxicité des pesticides en cause et leurs effets sur la santé humaine et les complications qui en résultent.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUE

Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., Rezaiee, A., 2004. Pesticides and oxidative stress: a review. *Med. Sci. Monit.* 10, RA141–RA147

Akiyama Y., Yoshioka N., Ichihashi K., 2005. Study of pesticide residues in agricultural products towards the “positive list” system. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 46, 6, 305-318

Alam, M., T. Midtvedt, et al. (1994). "Differential cell kinetics in the ileum and colon of germfree rats." *Scand J Gastroenterol* **29**(5): 445-51

Altuntas I, Delibas N, Demirci M, Kilinc I, Tamer N. 2002. The effects of methidathion on lipid peroxidation and some liver enzymes: role of vitamins E and C. *Archives of Toxicology.* ;76:470–47

Andersen, H.R.; Vinggaard, A.M.; Rasmussen, T.H.; Gjermansen, I.M. & Bonfeld-Jørgensen, E.C. (2002). Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 179., 1-12

Aulakh R. S., Gill J. P. S., Bedi J. S., Sharma J. K., Joia B. S., Ockerman H., 2006. Organochlorine pesticide residues in poultry feed, chicken muscle and eggs at a poultry

Bettelli, E., T. Korn, et al. (2007). "Th17: the third member of the effector T cell trilogy." *Curr Opin Immunol* **19**(6): 652-7.

Baskin, L.S.; Himes, K. & Colborn, T. (2001). Hypospadias and endocrine disruption: Is there a connection? *Environmental Health Perspectives*, 109., 1175-1183.

Bradford M 1976. A rapid and sensitive method for the microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, 72, 248, 254

Bukowska B, Chajdys A, Duda W, Duchnowicz P1976. Catalase activity in human erythrocytes: effect of phenoxyherbicides and their metabolites. *Cell Biol*

Cabras P., Angioni A., Garau V.L., Pirisi F.M., Farris G.A., Madau G., Emonti G., 1999. Pesticides in fermentative processes of wine. *Journal of agriculture and food chemistry*, 47, 3854-3857

Calder, P. C. and S. Kew (2002). "The immune system: a target for functional foods?" *Br J Nutr* **88 Suppl 2**: S165-77.

Carlisle, M. S., D. D. McGregor, et al. (1991). "The role of the antibody Fc region in rapid expulsion of *Trichinella spiralis* in suckling rats." *Immunology* **74**(3): 552-8.

Cimen MON. 2008. Le métabolisme des radicaux libres dans les érythrocytes humains. *Clin Chim Acta*; 390 :1-11. DDT in adult male rats. *Human and Experimental Toxicology*, 20., 393-397.

Ellman, G.I. (1959). Tissue sulfathyl groups. *Rech biochem biophys.* 20. 70 77 Haque, R et al (2003) aqueous extract of walnut (*Juglans regia* L) protects mice against cyclophosphamide-induced biochemical toxicity. *Hum. Exp. Toxicol* 22. 473. 480

Furlong, C. E., T.B. Cole, G.P. Jarvik et al. 2005. toxicité aigue of pesticides *Journal of Environmental Science and Health A72*, 283–297.

Freitas, A. A., A. C. Viale, et al. (1991). "Normal serum immunoglobulins participate in the selection of peripheral B-cell repertoires." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(13): 5640-4.

Hazard 2004. The Recommended Classification of Pesticides Hazard

Hatcher, G. E. and R. S. Lambrecht (1993). "Augmentation of macrophage phagocytic activity by cell-free extracts of selected lactic acid-producing bacteria." *J Dairy Sci* **76**(9): 2485-92.

Haque, R et al (2003) aqueous extract of walnut (*Juglans regia* L) protects mice against cyclophosphamide-induced biochemical toxicity. *Hum. Exp. Toxicol* 22. 473. 480

Horwitz, D. A., A. C. Bakke, et al. (1984). "Monocyte and NK cell cytotoxic activity in human adherent cell preparations: discriminating effects of interferon and lactoferrin." *J Immunol* **132**(5): 2370-4.

IFEN, 1998, *Les pesticides dans les eaux : Usages, origines, pertinence du suivi*, 15 p.

Genetet, N. (2005). *Immunologie (4^e Ed.)* Lavoisier.

Goldsby, R. A., T. J. Kindt, et al. (2000). "*Immunology*".

Giray, B., Gurbay, A., Hincal, F., 2001. Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by vitamin E or allopurinol. *Toxicology Letters* 118, 139–146

Gultekin F, Delibas N, Yasar S, Kilinc I. 2001. In vivo changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of vitamin C and vitamin E on oxidative damage in erythrocytes induced by chlorpyrifos-ethyl in rats. *Arch of Toxicol.* ;75:88–96

Kolter, T. and K. Sandhoff (2005). "Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids." *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 81-103.

Kochhann D, Pavanato MA, Llesuy SF, Correa LM, Konzen Riffel AP, Loro VL, Mesko MF, Flores EM, Dressler VL, Baldissarotto B: Bioaccumulation and oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to different thorium concentrations. *Chemosphere* 2009, 77:384–391. Liu, H., Zhao, M., Zhang, C., Ma, Y., Liu, W., 2008. Enantioselective cytotoxicity of the rodenticides on a human amnion epithelial (FL) cell line. *Toxicology* 253 (1–3), 89–96

Makoto Matsui, Keiko Tanaka, Fumio Nagumo, Yasuo Kuroda 2004. *Journal of the Neurological Sciences, Volume 227, Issue 1, 15 December, Pages 139-147*

Mossman, T. R. and R. L. Coffman. (1989). "Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." Annu. Rev. Immunol **7**: 145–173.

Michalek, S. M., H. Kiyono, et al. (1982). "Lipopolysaccharide (LPS) regulation of the immune response: LPS influence on oral tolerance induction." J Immunol **128**(5): 1992-

Nelson SK, Bose SK, Grunwald GK, Myhill P, McCord JM 2006. The induction of human superoxide dismutase and catalase in vivo: a fundamentally new approach to antioxidant therapy. *Free Radical Biol Med.* ;40:341–347.

Okhawa H., Ohishi N., Yagi K., (1979). Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *Anal biochem*;95:351-8.

Ouellette, A. J. (1997). "Paneth cells and innate immunity in the crypt microenvironment." Gastroenterology **113**(5): 1779-84.

Rakitsky V. N., Koblyakov V. A., Turusov V. S., 2000. Nongenotoxic (Epigenetic) Carcinogens: Pesticides as an Example. A Critical Review. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 20, 229-240

Roitt I., Brostoff J., et al. (1994). "Immunologie " (De Beck Université, Eds).

UNEP et al 2002. ecological risk assessment. Environmental Protection Agency, Washington, D. C, 173 p.

Villadangos, J. A. and P. Schnorrer (2007). "Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo." Nat Rev Immunol **7**(7): 643-55.

Watts MA 2009 A novel genotoxic aspect of thiabendazole as a photomutagen in bacteria and cultured human cells. *Toxicology Letters*, 158, 3, 262-278

Watanabe-Akanuma M., Ohta T., Sasaki Y. F., 2005. A novel genotoxic aspect of thiabendazole as a photomutagen in bacteria and cultured human cells. *Toxicology Letters*, 158, 3, 213-219

Webographie

(1) British Crop Protection Council, *The Pesticide Manual* (Twelfth Edition).

(2) Anonyme 06/11/2012, Origine <http://www.mddep.gouv.qc.ca/pesticides/origine.pdf>

- (3) *Jean-Philippe Camard, chargé d'études à l'ORS et Christophe Magdelaine, chargé d'études à l'IAU île-de-France, Mars 2010. Produits phytosanitaires risques pour l'environnement et la santé*
- (4) Commission européenne, 2003, *Les produits phytosanitaires, la santé et l'environnement*, 46p.
- (5) Anonyme . 2013. Pesticides.
<http://www.who.int/ceh/capacity/Pesticides.pdf>
- (6) Roberts DM, Karunarathna A, Buckley NA, Manuweera G, Sheriff MHR, Eddleston M: **Influence of pesticide regulation on acute poisoning deaths in Sri Lanka.** *Bull World Health Organ* 2003, **81**:789-798.

ANNEXE :

Les équipements utilisés :

- Centrifugeuse (Sigma)
- pH mètre (Hanna)
- Spectrophotomètre de type (Jenway 6305).
- Ban Marie agitateur, (Hair).
- Balance, (Ohaus).
- Agitateur, (TOPMIX).
- Vortex (TOPMIX Sigma)

Produits chimiques utilisés :

- -Le brodifacoum de raticide {3-[3-(4'-bromobiphenyl-4-yl)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthyl]-4-hydroxycoumarin} utilisé dans cette étude a été obtenue dans le commerce de la **PelGar International** Corporation (DMCI quai des Etroits 69321. Lyon. CEDEX 05 France).
- Malondialdéhyde (MDA).
- l'acide 2-thiobarbiturique (TBA)
- l'albumine.
- le peroxyde d'hydrogène sérum bovin (H_2O_2)
- Réactif d'Ellman (Sigma).
- TCA (Fluka chimica), Acide citrique, citrate de sodium, KCl(Panreact quimica SA, Espana)
- Autres réactifs ont été obtenus auprès de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Solution utilisés :

1. Brodifacoum en solution :

- Brodifacoum solide 4g
- Eau physiologique 15ml

2. Tampon phosphate PH=7.4:

- KH_2PO_4 0.1M (13.617g/l) 1ml

- Na_2HPO_4 0.1M (17.814g/l) 4ml

3. Bleu de Coomassie :

- BBC 100 mg

- Ethanol 50 ml

Acide phosphorique

Résumé :

Les pesticides sont des produits chimiques utilisés pour lutter contre les insectes, les rongeurs, les mauvaises herbes...qui peuvent avoir des effets néfastes sur nos récoltes et notre santé. Cependant, les pesticides peuvent aussi intoxiquer et tuer d'autres êtres vivants y compris les plantes utiles, les animaux et l'homme. Ils ont des effets cancérigènes, neurotoxiques ou perturbation endocriniennes. L'exposition ou pesticides provoque aussi des dommages irréversible au système immunitaire.

Dans ce contexte, l'objectif de notre étude est de connaître l'épidémiologie des intoxications de pesticides dans la région de Guelma et chercher le risque de l'exposition au Brodifacoum, un raticide utilisé pour lutter contre les rats et les souris.

Pour connaître sa capacité à induire un stress oxydatif sur les érythrocytes humains (in vitro), trois concentrations 50, 100, 250 mg/ml ont été testées. Les résultats obtenus ont mis en évidence une perte de l'intégrité de la membrane des cellules érythrocytaire humains, provoqués par la libération de ROS, traduite par le taux élevé de MDA et diminution du taux de GSH et l'activité de catalase d'une manière dose-dépendante.

Donc, on peut conclure que le raticide étudié induit un stress oxydant qui peut être considéré l'un des mécanismes de toxicité des pesticides.

Les mots clés : Pesticides, épidémiologie, stress oxydatif.

Abstract:

The pesticides are chemicals used to fight against insects, rodents, weeds ... that may have adverse effects on our crops and our health. However, the pesticides can poison and kill other living beings including useful plants, animals and humans. They have carcinogenic, neurotoxic or endocrine disruption. Exposure to pesticides also causes irreversible damage to the immune system.

In this context, the objective of our study is to know the epidemiology of pesticide poisoning and to seek the risk of exposure to brodifacoum, a rat poison used to fight against rats and a mouse in Algeria.

To know are able to induce oxidative stress on human erythrocytes (in vitro), three doses of concentration 50, 100, 250 mg / ml were tested. The results showed a loss of integrity of the human erythrocyte membrane cells caused by the release of ROS results in high levels of MDA and decrease in rates in a dose-dependent manner CAT and GSH plays a role in the decomposition of hydrogen peroxide.

Finally, exposure to brodifacoum induces oxidative stress that seems to be one of the toxicity mechanisms of pesticides

Keywords: Pesticides, epidemiology, oxidative stress.

ملخص

المبيدات هي مواد كيميائية تستخدم لمكافحة الحشرات والقوارض والأعشاب الضارة ... التي قد يكون لها آثار سلبية على المحاصيل وصحتنا. ومع ذلك يمكن المبيدات تسميم وقتل الكائنات الحية الأخرى بما في ذلك النباتات المفيدة والحيوانات والبشر. لديهم اضطراب مسرطنة، أو أعصاب الغدد الصماء. التعرض أو المبيدات يتسبب أيضا في أضرار لا رجعة فيها لنظام المناعة.

وفي هذا السياق فإن الهدف من هذه الدراسة هو معرفة علم الأوبئة من التسمم بالمبيدات في منطقة قالمة خطر التعرض لالبروديفاكوم، وهو سم الفئران المستخدمة لمكافحة الفئران وابتسم.

لمعرفة قدرته على حمل الاكسدة في كريات الدم الحمراء البشرية (في المختبر) ، تم اختبار ثلاثة تركيزات 50، 100، 250 ملغ / مل. وأظهرت النتائج وجود فقدان سلامة خلايا غشاء كرات الدم الحمراء البشرية، الناجمة عن إفراز إلى ROS. مما أدى إلى ارتفاع مستوياتMDA وخفضGSH والكاتالاز لذلك يمكننا أن نستنتج أن دراسة الاكسدة التي يسببها سم الفئران يمكن أن تعتبر واحدة من آليات سمية المبيدات.

كلمات البحث: المبيدات، وعلم الأوبئة، والإجهاد التأكسدي.