

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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

UNIVERSITE 08 MAI 1945-GUELMA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA
TERRE ET DE L'UNIVERS
DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité/Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire/Immunologie Approfondie

Thème

Toxicité de certains pesticides sur le thymus et la rate

Présenté par :

BOUBEKRI Sara

BOUACIDA Linda

Devant le jury composé de :

Président : Hemic Ahmed

(M.A.A. Université de Guelma)

Rapporteur : Boumaza Awatif

(M.A.A. Université de Guelma)

Examineur: Djebir Soumia

(M.A.A. Université de Guelma)

Juin 2013

REMERCEMENTS

J'exprime d'abord mes profonds remerciements à mon **DJEU** qui m'a donné le courage et la Volonté d'achever ce travail.

Je voudrais témoigner ma reconnaissance à Mme **BOUMAZA A** pour avoir encadré ce mémoire. Je la remercie particulièrement pour sa rigueur scientifique, son exigence, sa disponibilité et ses encouragements, en me faisant partager son expérience et ses connaissances scientifiques.

J'exprime ensuite mon estime et mes remerciements aux membres de jury :

A monsieur **HEMJOJ A**, maitre assistant au département de biologie, d'avoir accepté de présider le jury de ce modeste travail

A madame **DJJBJR S**, maitre assistant au département de biologie, de nous avoir accordé le privilège de participer à ce jury.

Je souhaite également remercier très chaleureusement tous les membres du laboratoire, et plus particulièrement: **Ratiba Himeur** et **Ghania Boughazi**.

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 a ceux qui me sont les cher au monde :

A l'âme de mon père que dieu le bénisse.

**A ma mère qui doits tous le respect pour sa noblesse et
son amour.**

A madame Boumaza pour ses conseils et son orientation.

A mes frères : Mounir, Hamouda, Farouk et nafé.

A mes sœurs : Mouna, Nawel et Abba.

A mes chers : Aimen, Shamsou et Jshak.

A ma grande mère paternelle.

**A Lolo, Noucha, Selwa, Sarra, Fatma et Rahma qui
considérés tout jour comme mes sœurs.**

Et bien sûr sans oublier Saleh et Bilal.

A tous ceux que j'aime

Sara

Didécasse

*J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail réalisé grâce à l'aide de dieu tout
puissant*

A

*Celui qui m'a toujours encouragé et soutenu durant toutes mes
années d'études. Merci pour ton amour et ta confiance totale...*

A toi très Cher papa.

A

*Celle qui m'a tant bercé, tant donné et tant enseigné, toi qui m'a guidé dans le
droit chemin, toi qui m'a appris que rien n'est impossible...A toi ma Maman.*

A

Mes chers frères : karim, abed alhalim

A

*Mes chères amies, pour tous les moments que nous avons partagés Lowlo,
Dakra, six, Sou, Saliba*

**Linda*

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

Chapitre I: Revue bibliographique

1. Généralité sur les pesticides.....	1
I.1. Définition et nomenclature.....	1
I.2. Composition.....	1
I.3. Regroupement des pesticides.....	2
I. 3-1- Catégorie d'usage.....	2
I. 3.2. Origine.....	3
I.3.3. Type de formulation.....	3
I.3.4. Mode d'action.....	4
I.4. Classification des pesticides.....	4
I.4.1. Classification selon le groupe chimique.....	4
I.4.1.1. Les organochlorés.....	4
I.4.1.2. Les organophosphorés.....	5
I.4.1.3. Les carbamates.....	5
I.4.2. Classification selon la dangerosité.....	5
I.5. Les voies de pénétration des pesticides.....	6
I.5.1. La voie cutanée.....	6
I.5.2. La voie respiratoire.....	7

I.5.3. La voie orale.....	7
I.6. Les effets des pesticides sur l'environnement.....	7
I.6.1. Les pesticides dans le sol.....	7
I.6.2. Les pesticides dans l'aire.....	7
I.6.3. Les pesticides dans l'eau.....	8
I.6.4. Les pesticides dans la chaine alimentaire.....	9
I.7. Les effets des pesticides sur la santé.....	9
II. Généralité sur le système immunitaire.....	10
II.1. Le système immunitaire.....	10
II.2. Les composants du système immunitaire.....	10
II.2.1. Les cellules immunitaires.....	10
II.2.1.1. La lignée myéloïde.....	10
II.2.1.2. La lignée lymphoïde.....	11
II.2.2. Les organes du système immunitaire.....	13
II.2.2.1. Les organes lymphoïdes primaires.....	13
II.2.2.2. Les organes lymphoïdes secondaires.....	14
II.2.3. Les substances solubles.....	16
II.2.3.1. Les immunoglobulines.....	16
II.2.3.2. Les cytokines.....	17
II.2.3.3. Le complément.....	17
II.3. La défense immunitaire.....	17
III. La toxicité des pesticides.....	20
III.1. Les principaux mécanismes de toxicité des pesticides.....	20
III.1.1. Le stress oxydant.....	20

III.1.2. Les effets immunotoxique des pesticides.....	21
III.1.2.1. L'effet des pesticides sur les organes du système immunitaire...	21
III.1.2.2. L'effet des pesticides sur les cellules immunitaires.....	21
III.1.2.3. L'effet des pesticides sur les substances solubles.....	24
III.1.3. Les effets neurologiques des pesticides.....	25
III.1.4. Les effets sur le système endocrinien et la reproduction.....	26
III.1.5. Les effets cancérigènes des pesticides.....	26

Chapitre II : Matériels et Méthodes

II.1. Matériel chimique.....	27
II.2. Matériel biologique.....	27
II.3. Méthodes.....	27
II.3.1. Traitement	28
II.3.2. Le sacrifice des animaux	28
II.3.3. Analyse des paramètres tissulaires.....	29
II.4. L'étude statistique.....	32

Chapitre III : Résultats et Discussion

III.1. Évolution du poids des souris.....	33
III.2. Evaluation de poids relatif du thymus et de la rate.....	33
III.3. Évolution l'effet des pesticides sur les lymphocytes de péritoine.....	34
III.4. L'analyse des paramètres du stress oxydant.....	35
III.4.1. Dosage des substances réactives de l'acide thiobarbiturique (TBARS).....	35
III.4.2. Dosage de l'activité enzymatique du catalase.....	37
III.4.3. Dosage du glutathion réduit.....	37

Conclusions et perspectives

Références bibliographiques

Résumés

Annexes

List des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

BBC : Bleu brillant de coomassie.

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2.

BCR : Récepteur des cellules B.

CAT : Catalase.

DDT : Dichloro-diphényl-trichloroéthane.

DL₅₀ : Dose Létale 50%.

DO : Densité optique.

EBDCs : Ethylène-bis-dithiocarbamates.

FAS: Apoptosis Stimulating Fragment.

Gr: Granstar.

GSH : Glutathion réduit.

GSSG : Glutathion oxydé.

IFEN : Institut Français de l'Environnement.

Ig : Immunoglobuline.

IgA : Immunoglobuline de classe A.

IgG : Immunoglobuline de classe G.

IgM : Immunoglobuline de classe M.

IL-10 : Interleukine 10.

IL-12 : Interleukine 12.

IL-2 : Interleukine 2.

IL-4 : Interleukine 4.

IL-6 : Interleukine 6.

INERIS : Institut National de l'Environnement et des Risques Industriels.

INF γ : Interférent γ .

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique.

KAR: Killer Activation Receptor.

KIR: Killer Inhibitory Receptor.

LB: Lymphocyte B.

LT: Lymphocyte T.

MAPkinase: Mitogen-Activated Protein Kinases.

MCPA: 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acide.

MDA: Malonyl di aldéhyde.

NK: Nature Killers.

OC : Organochloré.

OMS : L'Organisation Mondiale de la Santé.

PASP : Programme Africain relatif aux Stocks de Pesticides.

PBS : Phosphate Buffer Salin.

ROS : Réactive oxygène species.

SI : Système Immunitaire.

SOD : Superoxyde dismutase.

TM : Témoin.

TBA : Acide thiobarbiturique.

TBTO : Oxyde de Tributyl-étain.

TC : T cytotoxiques.

TCA : Acide trichloroacétique.

TCD4 ou T4 : Lymphocyte T porteur du marqueur membranaire CD4(T auxiliaire).

TCD8 ou T8 : Lymphocyte T porteur du marqueur membranaire CD8(T cytotoxique).

TCDD : 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- para-dioxin.

Th : Lymphocyte T auxiliaire ou T helper.

TI: Tilt.

TNF α : Tumor Necrosis Factor α .

tpm : Tour par minute.

Zo: Zoom.

2,4-D : Acide 2,4- Dichlorophénoxyacétique.

Liste des figures

Figure	Titre	Page
01	Les compositions d'un pesticide	02
02	Mécanismes de transferts des pesticides dans l'environnement	08
03	Hématopoïèse du système immunitaire originaire d'une cellule souche de la moelle osseuse	13
04	Les organes et les tissus lymphoïdes	16
05	Une immunoglobuline	17
06	Les étapes de la réponse immunitaire non spécifique et spécifique	19
07	La translocation génétique causée par les pesticides	22
08	L'induction de l'apoptose de cellule NK par le pesticide	23
09	Mécanisme d'action du pesticide sur les cellules NK	24
10	Schéma explicatif du Protocole expérimentale	27
11	Evolution du poids des souris témoins et traités durant les 3 jours de traitement	33
12	Evaluation de poids relatif du thymus et de la rate	34
13	La variation du taux des lymphocytes de péritoine sous l'effet des pesticides (Tilt, Zoom, Granstar)	34
14	Dosage de l'MDA au niveau de rate (A), de thymus (B) et du foie (C)	36
15	Dosage de l'activité enzymatique du catalase tissulaire au niveau de rate (A), de thymus (B) et du foie (C)	38
16	Dosage du GSH tissulaire au niveau de la rate (A), de thymus (B) et du foie (C)	39

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
01	Différents types des pesticides et leurs cibles	02
02	Les différentes formes des pesticides	03
03	Les différents modes d'action d'un pesticide	04
04	Classement des pesticides selon l'OMS	06

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 nous sommes intéressées à l'étude des effets de certains pesticides sur quelques paramètres immunologiques et biochimiques étudiés dans un modèle murin qui est la souris blanche en adoptant le plan de travail suivant :

- Revue bibliographique permanente de comprendre la relation pesticides, stress oxydant et système immunitaire.
- Une étude expérimentale portant sur l'effet de certains pesticides sélectionnés sur le foie, la rate, le thymus et quelques paramètres du stress oxydant.

Dans la partie théorique, nous avons essayé d'exposer l'effet des pesticides sur le système immunitaire, en évoquant des généralités sur les pesticides, décrire le système immunitaire, ses composants et son fonctionnement et on a terminé par une synthèse portant sur l'impact de l'exposition aux pesticides sur le système immunitaire.

REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralité sur les pesticides

I.1. Définition et nomenclature

L'étymologie du mot pesticide s'est construite à partir du suffixe « -cide » qui signifie tuer et de la racine anglaise « Pest » (animal, insecte ou plante nuisible) provenant du Latin « Pestis » qui désignait le fléau en général. [INRA Cemagref, 2006]

Le terme pesticide est une appellation générique pour toutes les substances (molécules) éliminant les organismes nuisibles, qu'ils soient utilisés dans le secteur agricole ou pour d'autres application. [INRA Cemagref, 2006]

Un pesticide est désigné par son nom commun, par son nom chimique ou par son nom commercial. Le nom commun fait référence à l'ingrédient actif. Le nom chimique désigne le nom de la structure chimique de l'ingrédient actif. Le nom commercial est le nom donné par le fabricant. [Mehmet et al, 2007]

Actuellement, les pesticides sont répartis en deux groupes selon leurs utilisation :

- **Les pesticides à usage agricole ou phytopharmaceutique** qui sont des substances chimiques, minérales ou organiques, de synthèse ou naturelles. Elles sont utilisées pour la protection des végétaux contre les maladies et contre les organismes nuisibles aux cultures. [OSM/IPCS .2005]
- **Les pesticides à usage non agricole ou biosides** qui sont similaires aux premiers, utilisés par exemple en hygiène publique et dans d'autres applications comme la conservation du bois, la désinfection, ou certains usages domestiques. [OSM/IPCS .2005]

I.2. Composition

Un pesticide est composé de deux types de substances :

- **Une ou plusieurs matière actives** : sont responsables de l'effet et de la toxicité intrinsèque d'un pesticid. [Ramade, 2002]
- **Un ou plusieurs additifs** : permettent l'utilisation de la formulation, assurent la stabilité des matières actives durant le stockage et /ou l'utilisation. Les matières additives sont souvent appelées des adjuvants. [Ramade, 2002] (**Figure 1**)

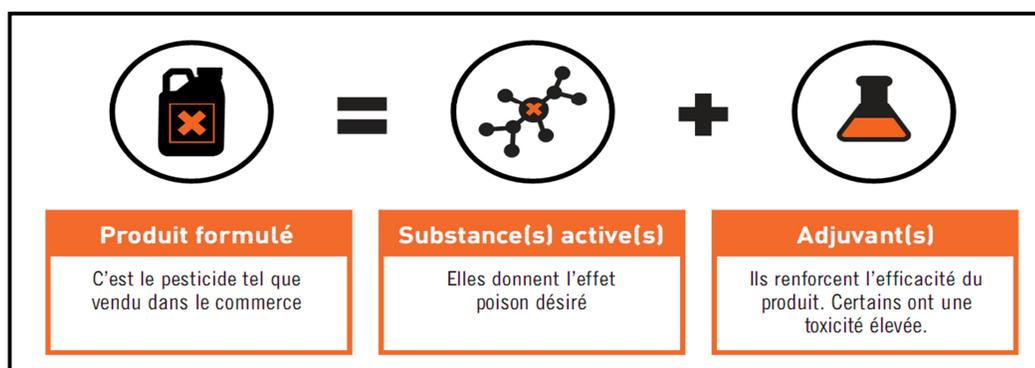


Figure 1 : Les compositions d'un pesticide. [Gautier, 2008]

I.3. Regroupement des pesticides : les pesticides peuvent être regroupés selon :

I. 3-1- Catégorie d'usage :

La plupart des pesticides peuvent être regroupés selon la cible qu'ils visent. (**Tableau1**)

Tableau 1 : Les différents types des pesticides et leurs cibles. [Fournier et Bonderf, 1983]

Catégorie d'usage	Cibles visées	Exemples des cibles
Acaricide	Acariens	Acarien des poussières
Avicide	Oiseaux	Pigeon
Insecticide	Insectes	Blatte
Herbicide	Plantes indésirables	Chénopode
fongicide	Champignons microscopiques causant des maladies des plantes	<i>Diplocarpon rosae</i> causant la tâche noire du rosier
Piscicide	Poissons	Meunier noir
Rodenticide	Rongeurs	Rat et Souris
Molluscicide	Mollusques terrestres	Escargot, Limace
Nématicide	Nématodes causant des maladies des plantes	<i>Meloidogyne hapla</i> causant la nodosité des racines chez la carotte

I. 3.2. Origine :

Les pesticides peuvent être regroupés en pesticides organiques ou inorganiques. Les pesticides organiques contiennent du carbon, alors que les inorganiques ne contiennent du carbon que sous forme de carbonate ou cyanure. Ces dernières sont des dérivés à base d'arsenic, de mercure, de fluor, et de cuivre, ainsi que des dérivés du cyanure.

Les pesticides organiques peuvent être divisés en 3 groupes : pesticides de synthèse (développés en laboratoire et produits en usine), pesticides naturels (d'origine animale, microbienne ou végétale) et micro-organismes. Les pesticides inorganique sont dérivés essentiellement de minéraux. [INRA-cemagref, 2005]

I.3.3. Type de formulation :

Les pesticides sont disponibles en différentes formulations. Ils peuvent se présenter sous forme solide, liquide ou gazeuse. (**Tableau 2**)

Tableau 2 : Les différentes formes des pesticides. [Fournier et Bonderf, 1983]

Exemples de formulations	Prêt à l'emploi ou non préparé
Forme solide	
Appât	Prêt à l'emploi
Poudre	Prêt à l'emploi
Poudre mouillable	Non préparé
Forme liquide	
Aérosol	Prêt à l'emploi
Concentré émulsifiable	Non préparé
Solution	Non préparé
Forme gazeuse	
Fumigant	Prêt à l'emploi

I.3.4. Mode d'action :

Les pesticides peuvent être regroupés selon la cible ou la mode d'action de l'organisme indésirable sur lequel ils agissent. Plusieurs cibles et modes d'action sont connus pour les herbicides, les fongicides ainsi que les insecticides. (**Tableau 3**)

Tableau 3 : Les différents modes d'action d'un pesticide [Bonnefoy, 2012]

Herbicide	
	Mode d'action
De contact	Agit sur les parties de la plante avec lesquelles il entre en contact.
Systémique	Absorbé par la plante, se déplace à l'intérieur de celle-ci.
Sélectif	Ne contrôle que certaines plantes traitées.
Non-sélectif	Contrôle toutes les plantes traitées.
Résiduaire	Se dégrade lentement et contrôle les plantes sur une longue période.
Non-résiduaire	Est rapidement inactif après son application et ne contrôle les plantes que sur une courte période.
Fongicide	
Préventif	Protège la plante en empêchant que la maladie ne se développe.
Curatif	Réprime une maladie qui est déjà développée.
Insecticide	
De contact	Agit lorsque l'insecte entre en contact avec le produit.
D'inhalation	Agit lorsque l'insecte respire le produit.
D'ingestion	Agit lorsque l'insecte se nourrit du produit.

I.4. Classification des pesticides

I.4.1. Classification selon le groupe chimique

Les pesticides sont parfois classés en fonction de leurs substances actives, autrement dit leurs groupes chimiques. On peut ainsi parler de pesticides organochlorés (DDT, chlordane, lindane,...etc), d'organophosphorés (malathion, parathion) ou encore de carbamates (aldicarbe, corpophame, carbamyl, etc).

I.4.1.1. Les organochlorés :

Est un produit chimique de synthèse, dérivé de molécules de chlore et utilisés comme : insecticide, fongicide ou réfrigérant ou molécules intermédiaires de synthèse en chimie et pharmacie. Les organochlorés perturbent le système nerveux, l'appareil hépatique, la régulation hormonale et la reproduction de nombreux animaux, y compris l'Homme. Ce sont d'importants contaminants des écosystèmes et le problème principal est qu'ils sont extrêmement stables. [Aligon et al, 2010]

I.4.1.2. Les organophosphorés :

Les organophosphorés sont des esters obtenus en faisant réagir divers alcools avec l'acide orthophosphorique ou l'acide thiophosphorique. Ils ont été développés à partir des années 1970, pour remplacer les organochlorés désormais interdits. Ces produits présentent une toxicité aiguë bien plus forte que les organochlorés. [Bonney, 2012]

I.4.1.3. Les carbamates :

Ce sont des dérivés de l'acide carbamique, dont la formule est NH_2COSH ou NH_2CSOH regroupent également des herbicides et un grand nombre de fongicides. Certains carbamates agissent comme inhibiteurs de cholinestérase (enzyme nécessaire au fonctionnement du système nerveux de l'homme et des insectes) ; il a été utilisé comme gaz de combat pendant la première guerre mondiale. Leur demi-vie s'étend de quelques jours à plusieurs mois, voire plusieurs années dans les eaux souterraines. Leur toxicité est variable d'une molécule à une autre. [Aligon, 2010]

I.4.2. Classification selon la dangerosité :

L'organisation mondiale de la santé (OMS) classe les pesticides par dangerosité en se basant sur leur dose létale médiane orale ou cutanée. Chaque pesticide est alors placé dans une des quatre classes : Extrêmement dangereux, Modérément dangereux, Très dangereux, Légèrement dangereux. **(Tableau 4)**

Tableau 4 : Classement des pesticides selon l'OMS. [PASP-MALI, 2000]

CLASSE		DL ₅₀ pour le rat (en mg/kg de poids vif)			
		Voie orale		Voie cutanée	
		<i>Solides</i>	<i>Liquides</i>	<i>Solides</i>	<i>Liquides</i>
I a	Extrêmement dangereux	5 ou en dessous	20 ou en dessous	10 ou en dessous	40 ou en dessous
Ib	Hautement dangereux	5 – 50	20 – 200	10 – 100	40 – 400
II	Modérément dangereux	50 – 500	200 – 2000	100 – 1000	400 – 4000
III	Peu dangereux	Plus de 500	Plus de 2000	Plus de 1000	Plus de 4000

I.5. Les voies de pénétration des pesticides

Les produits phytosanitaires, en général sont tous susceptibles de pénétrer dans l'organisme par différentes voies.

I.5.1. La voie 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 chimique. Toutefois, la majorité des pesticides peut être absorbé par toute la surface corporelle et ce, en quantité suffisante pour causer des effets systémiques tant aigus (à court terme) que chroniques (à long terme) en plus des effets dermatologiques et oculaires possibles. Les pesticides peuvent être absorbés plus facilement par certaines régions corporelles comme le cuir chevelu, le front, les yeux et les organes génitaux. [Onil et Saint-Laurent, 2001]

I.5.2. La voie 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 le fumigant 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. [Onil et Saint-Laurent, 2001]

I.5.3. La voie 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. [Onil et Saint-Laurent, 2001]

I.6. Les effets des pesticides sur l'environnement

Le risque phytosanitaire consiste à caractériser d'une part l'écotoxicité du produit, d'autre part les possibilités de contact des organismes avec ce produit en fonction de leur mode d'action, de leur persistance et de leur capacité de bioaccumulation. Ces produits peuvent être responsables de pollutions diffuses et chroniques et/ou aiguës et accidentelles, lors de leur fabrication, transport ou lors utilisation. On retrouve des résidus de pesticides partout : dans l'eau, l'air, le sol (**Figure 2**), et même dans les aliments.

I.6.1. Les pesticides dans le sol :

Il précise que le sol est une source potentielle de contamination par les pesticides. La plus part de ces produits vont également toucher d'autres organismes de manière directe (absorption, ingestion, respiration, etc.) ou indirecte (via un autre organisme contaminé, de l'eau pollué, etc.). Cela peut avoir un effet nocif sur la fertilité de sol. [Calvet, 2005]

I.6.2. Les pesticides dans l'air :

Bien que la plupart des pesticides soient peu volatils, disséminés dans l'atmosphère sur de grandes surfaces et pendant de longues périodes, peuvent être retrouvés à grande distance de leurs points d'application. [Cellier 2004]

La contamination de l'atmosphère par les pesticides s'effectue :

- Par fraction de la pulvérisation qui n'atteint pas le sol ou la culture et qui est mise en suspension par le vent et les courants d'air.
- Par volatilisation de post-application à partir des sols traités.
- Par érosion sous forme adsorbée sur les poussières des sols traités. [INRA-Cemagref, 2005]

I.6.3. Les pesticides dans l'eau :

Ils existent quatre grands axes à travers lesquels les pesticides atteignent l'eau : ils peuvent se balader à l'extérieur de la zone destinée quand il est pulvérisé, il peut s'infiltrer, ou de lixiviation, à travers le sol, peut être mise à l'eau par ruissellement, ou il peut être déversés par exemple, accidentellement ou par négligence. Les facteurs qui affectent la capacité des pesticides à contaminer l'eau comprennent : la solubilité, la distance à partir d'un site d'application à un organisme d'eau, la météo, le type de sol, la présence d'une culture en croissance, et la méthode utilisée pour appliquer le produit chimique. [IFEN, 2007]

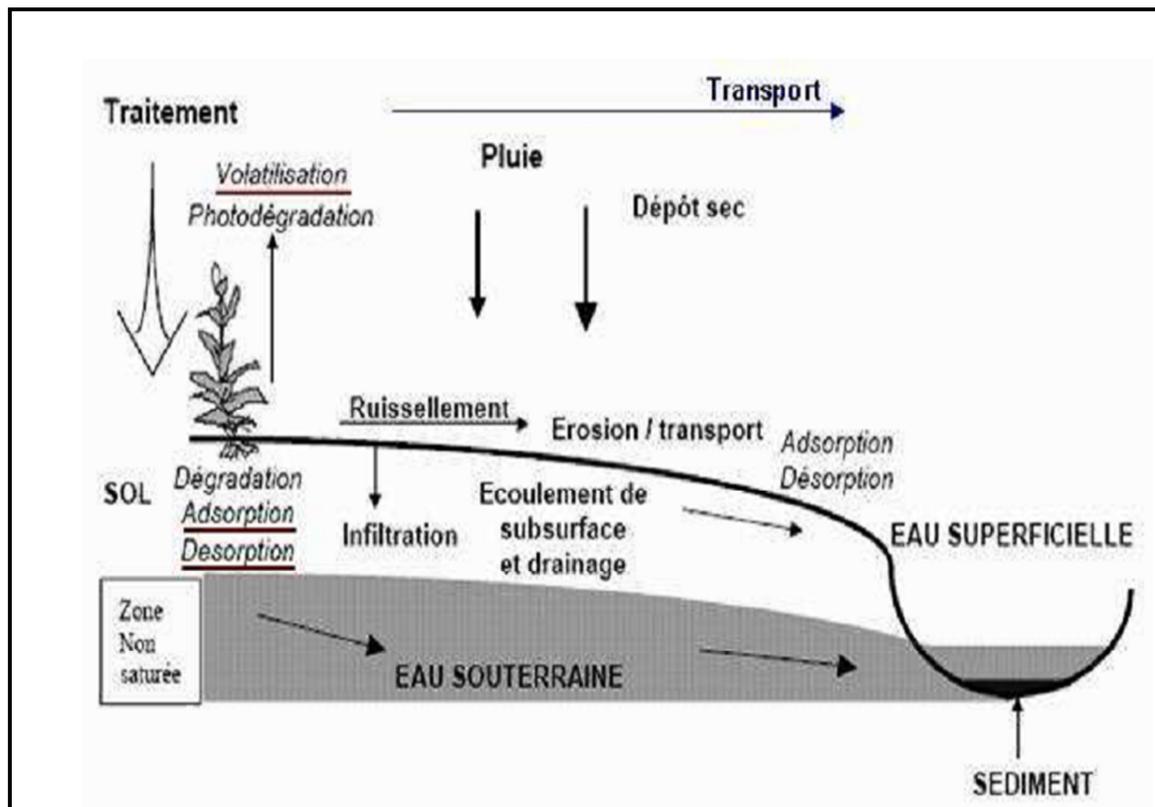


Figure 2 : Mécanismes de transferts des pesticides dans l'environnement. [INERIS, 2004]

I.6.4. Les pesticides dans la chaîne alimentaire :

La culture des produits alimentaires sur des sols contaminés ou à proximité, et l'utilisation d'eau contaminée pour arroser les champs constituent des risques d'exposition particulière pour la population générale. Les nourrissons et les jeunes enfants constituent un groupe particulièrement à risque. [OMS, 2004]

I.7. Les effets des pesticides sur la santé

On sait depuis plusieurs décennies que les pesticides peuvent occasionner des risques pour l'environnement, la santé des organismes vivants et la santé humaine. Depuis les années 1970, certains pesticides largement utilisés ont été interdits après la découverte de leurs propriétés particulièrement dangereuses (ex. : DDT, lindane). [Tellier, 2006]

Les risques pour la santé humaine en cas d'exposition aiguë à des doses élevées de pesticides, par exemple lors du mélange, sont connus de longue date et ont conduit à la publication de recommandations aux utilisateurs de manière à éviter ces risques. Les effets liés à une intoxication aiguë se produisent généralement tout de suite ou peu de temps après une exposition significative à des pesticides. Les malaises généraux peuvent être légers (maux de tête, nausées, étourdissements, fatigue, perte d'appétit, irritations de la peau et des yeux) ou graves (fatigue chronique, coma, mort). Les symptômes varient selon les types de pesticides en cause. [Tellier, 2006]

La toxicité chronique est, quant à elle, nettement moins bien connue et beaucoup plus difficile à mettre en évidence. Elle peut être associée à une absorption de faibles quantités de pesticides présents dans différents milieux sur une longue période de temps. Elle peut provoquer différents problèmes de santé : cancers, problèmes de reproduction et de développement, affaiblissement du système immunitaire, troubles hormonaux et neurologiques. [Tellier, 2006]

II. Généralité sur le système immunitaire

II.1. Le système immunitaire

Le système immunitaire (SI) est notre meilleur système de défense contre la maladie : il lutte contre les bactéries, attaque les champignons, tue les parasites et les virus ainsi que les cellules tumorales. Invisible à l'œil nu, il ne peut être identifié comme un organe unique, et doit assurer sa présence partout dans le corps, à toute heure du jour et de la nuit. [Rabhi, 2008]

Le fonctionnement du SI de l'homme et des vertébrés est basé sur trois principes fondamentaux ; la fonction de défense, la fonction de surveillance et la fonction de régulation, dictés par la nécessité de maintenir l'antigène et d'assurer la sauvegarde du milieu intérieur tout entier. [Parham, 2003]

II.2. Les composants du système immunitaire

Le système immunitaire comprend des cellules, des organes et des substances peptidiques libres en solution.

II.2.1. Les cellules immunitaires

Le système immunitaire est constitué des cellules différentes réparties dans tout le corps. Chaque catégorie de cellules a une fonction spécifique et se déplace dans l'organisme selon les besoins [Parham, 2003]. Toutes ces cellules dérivent originellement d'un même progéniteur, la cellule souche hématopoïétique de la moelle osseuse donnant naissance à des cellules progénitrices myéloïdes et lymphoïdes. **(Figure 3)**

II.2.1.1. La lignée myéloïde

Le progéniteur myéloïde est le précurseur des monocytes / macrophages et des granulocytes qui interviennent dans l'immunité naturelle.

Les monocytes : ne représentent qu'un faible pourcentage des cellules sanguines. Quand il pénètre dans un tissu, un monocyte subit des modifications morphologiques et fonctionnelles qui le transforment en une autre cellule, le macrophage. Les macrophages phagocytent les particules étrangères. Ils renferment de puissantes enzymes dans leur cytoplasme. Ils détruisent les particules étrangères, tout en conservant certains de leurs

composants chimiques antigéniques. Ils font alors parvenir ces antigènes à la surface de leur membrane afin que les lymphocytes puissent les détecter : les macrophages font partie des cellules présentatrices de l'antigène. [Rabhi, 2008]

Les granulocytes : ainsi appelés à cause de la présence dans leur cytoplasme des granules fortement marqués par certains colorants. Il y a trois types de granulocytes :

- **Granulocytes neutrophiles** : ils représentent environ 65% de l'ensemble des leucocytes du sang, et 99% des granulocytes. Les neutrophiles ne résident pas dans les tissus sains mais migrent rapidement vers les foyers de la lésion tissulaire, ils se trouvent ainsi sur la première ligne de la défense innée où ils exercent leur activité phagocytaire. [Parham, 2003]

- **Les granulocytes basophiles** : ils présentent un noyau volumineux, rond ou ovulaire avec quelques fissures (aspect en trèfle). Attirent les autres globules blancs en déversant l'histamine contenue dans leurs granules. Cette histamine active la réaction inflammatoire et intervient également dans les réactions allergiques. [Espinosa et Chillet, 2006]

- **Les granulocytes éosinophiles** : les éosinophiles représentent (2-5%) des leucocytes du sang ; leurs granules contiennent un « noyau cristalloïde » constitué d'une protéine basique qui peut être libérée par exocytose, causant ainsi des dommages aux agents pathogènes, en particulier les parasites. [Male, 2005]

Cellules dendritiques : les Cellules dendritiques initient la réponse immune en présentant les antigènes aux lymphocytes T. D'autres cellules telles que les lymphocytes B et les macrophages sont capables d'assurer cette tâche, moins efficacement. Elles représentent 0,5% des cellules mononuclées du sang et sont trouvées dans tous les organes. Ces cellules possèdent une motilité très élevée. [Bumester et Pezzutto, 2000]

Mastocyte : est un granulocyte présent dans les tissus, qui fabrique des granules comprenant des médiateurs chimiques comme la sérotonine, l'histamine ou l'héparine. [Rabhi, 2008]

II.2.1.2. La lignée lymphoïde

Ce sont les seules cellules de l'organisme capables de reconnaître spécifiquement un antigène. Ce sont des cellules à noyaux ronds et elles représentent environ 20 à 25 % des globules blancs. [Rabhi, 2008]

On distingue trois classes cellulaires : les lymphocytes T, les lymphocytes B et les cellules NK.

Les lymphocytes T : fonctionnent dans les organes et tissus lymphoïdes secondaires du corps pour contrôler les microbes intracellulaire et pour fournir une aide à la réponse des cellules B deux différents types de ces cellules participent à ces fonctions. [Male, 2005]

-les cellules T helper (Th) exprime le CD4 : sont des intermédiaires de la réponse immunitaire et prolifèrent pour activer d'autres types de cellules qui agiront de manière plus directe sur la réponse, et produisent également des cytokines (interleukine) induisant la prolifération des lymphocytes B et T. [Rabhi, 2008]

-les cellules T cytotoxiques (Tc) exprime le CD8 : reconnaissent les cellules infectées en utilisant des récepteurs pour tester la surface des autres cellules. Si elles reconnaissent une cellule infectée, elles peuvent la détruire ainsi que le virus qu'elle contient. [Rabhi, 2008]

Les lymphocytes B : les cellules B sont produites dans la moelle osseuse et tout comme les cellules T, elles migrent vers les tissus lymphoïdes secondaires où elles répondent aux antigènes étrangers. Les anticorps qui se trouvent sur leur surface sont les récepteurs d'antigènes. Lorsqu'elles sont activées par l'antigène la plupart du temps avec l'aide des cellules T, elles prolifèrent et se différencient formant des cellules à mémoire capables de répondre à l'antigène lors d'une réinfection et en plasmocytes qui secrètent de grande quantité d'anticorps. [Male, 2005]

Les cellules NK : N pour Natural, K pour Killer. Contiennent plus de cytoplasme, et possèdent des granules denses. Elles sont produites dans la moelle osseuse et sont retrouvées dans les tissus. Les cellules NK possèdent des récepteurs activateurs pour certaines molécules de surface appelés en anglais Killer activation receptor (KAR) et des récepteurs inhibiteurs (KIR : Killer inhibitory receptor). [Male 2005]

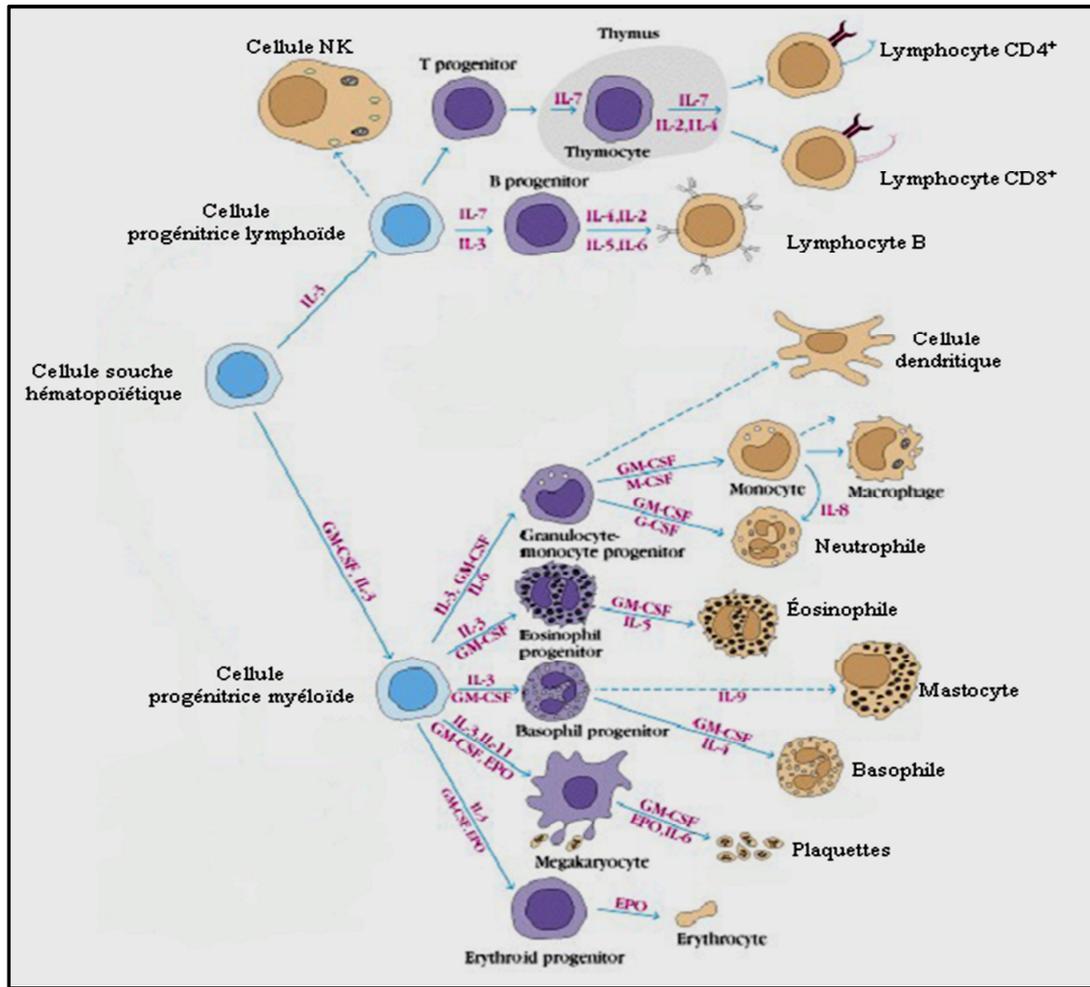


Figure 3 : Hématopoïèse du système immunitaire originaire d’une cellule souche de la moelle osseuse. [Goldsby et al, 2000]

II.2.2. Les organes du système immunitaire

Sont des tissus organisés où les lymphocytes interagissent avec les cellules non-lymphoïdes qui jouent un rôle important à la fois à leur maturation et leur activation. On les divise en organes lymphoïdes centraux (primaires) dans lesquels les lymphocytes sont formés (la moelle osseuse et le thymus) et les organes lymphoïdes périphériques (secondaires) où les réponses immunes sont engagées. [Lydyard et al, 2002] (**Figure 4**)

II.2.2.1. Les organes lymphoïdes primaires

Sont le lieu de maturation des lymphocytes où ils acquièrent un récepteur propre à chaque cellule (constitution du répertoire) on peut distinguer deux organes :

La moelle osseuse : correspond au tissu présent dans la partie centrale des os, possède une activité hématopoïétique, autrement dit la capacité de produire les différentes lignées de cellules sanguines. En effet seuls ces os possèdent encore de la moelle osseuse rouge constituée de cellules souches hématopoïétique multipotentes (CSH), en opposition à la moelle osseuse jaune constituée de cellules graisseuses (adipocytes). Ces cellules souches multipotentes ont la capacité de se multiplier à l'infini et de se différencier en un large éventail de cellules. [Kouassi, 2003]

Le thymus : un organe lymphoïde situé dans la partie supérieure de la poitrine, juste à côté du cœur. Ses principales fonctions sont la maturation et la destruction des lymphocytes T

Le thymus est divisé en une partie corticale et une partie médullaire et se compose principalement de cellules épithéliales et de lymphocytes (thymocytes). La médullaire contient des corpuscules thymiques. La corticale est constituée par une masse dense de thymocytes et des cellules épithéliales.

Le thymus produit probablement une substance humorale capable de stimuler la formation des lymphocytes dans les autres organes lymphoïdes. Il est de ce fait responsable de l'établissement et la régulation des réactions immunologiques. [Kouassi, 2003]

II.2.2.2. Les organes lymphoïdes secondaires

Les autres organes lymphoïdes sont dits périphériques. Une fois qu'un lymphocyte a terminé sa maturation dans la moelle ou le thymus, il se rend par voie sanguine dans l'un de ces organes.

Les ganglions lymphatiques : ce sont des structures finement organisées et sont le lieu de convergence de tout un réseau de vaisseaux afférents qui collectent le liquide extracellulaire des tissus appelé la lymphe et d'où sort un vaisseau efférent qui le renvoie vers le sang. Le lymphatique efférent draine la lymphe des tissus, charrie aussi des antigènes provenant des sites d'infections dans les diverses parties du corps et les amène aux ganglions lymphatiques où ils sont captés.

Un ganglion lymphatique comprend un cortex périphérique et une zone médullaire centrale. Le cortex se compose d'une zone externe contenant les lymphocytes B organisés en follicules et une zone plus profonde, dite paracorticale, garnie surtout de lymphocytes T.

Certains follicules de cellules B contiennent une zone centrale appelée centre germinatif, où la prolifération des cellules B est intense. [Petr et Delves, 2008]

La rate : est un organe abdominal intra-péritonéal, situé dans l'hypochondre gauche. Elle n'est pas branchée sur la circulation lymphatique, mais sur la circulation sanguine. On y distingue :

- **La pulpe rouge** est directement localisée sous la capsule et joue un rôle important dans la régulation de la formation et de la destruction des éléments figurés du sang, notamment des hématies. Elle correspond à la partie la plus vaste de la rate et est constituée de deux éléments principaux :

- Les cordons de Billroth composés de la trame réticulaire et des cellules associées. On observe des dépôts d'hémosidérine qui est une forme de stockage du fer.

- Les capillaires sinusoïdes caractérisées comme au niveau de la moelle osseuse rouge, d'une lame basale discontinue procurant une perméabilité plus importante.

- **La pulpe blanche** donne lieu à des rencontres antigènes-lymphocytes et est centrée par une artériole. Elle est construite en deux zones :

- La gaine lymphoïde péri-artérielle riche en lymphocyte T.

- Le corpuscule de Malpighi correspond à un amas de lymphocytes, essentiellement de LB. [Kouassi, 2003]

Les tissus lymphoïdes associés à l'intestin : comprennent, outre les amygdales, les tissus adénoïdes et l'appendice, des structures spécialisées appelées les plaques de Peyer situées dans l'intestin grêle. Les plaques de Peyer ont une grande importance, elles contiennent des cellules épithéliales spécialisées dans la capture des antigènes du système digestif. L'antigène pénètre à travers un épithélium spécialisé formé de cellule M. la masse du tissu lymphoïde est formée de cellule B organisées en follicules formant un dôme sous la couche des cellules M et entouré par une couronne de cellules T. la follicule de cellules B est très active et comporte un centre germinatif. D'autres épithéliums possèdent aussi des tissus lymphoïdes qui leur sont associés : ce sont le tissu lymphoïde associé aux muqueuses bronchiques et le tissu lymphoïde associé aux muqueuses. [Petr et Delves, 2008]

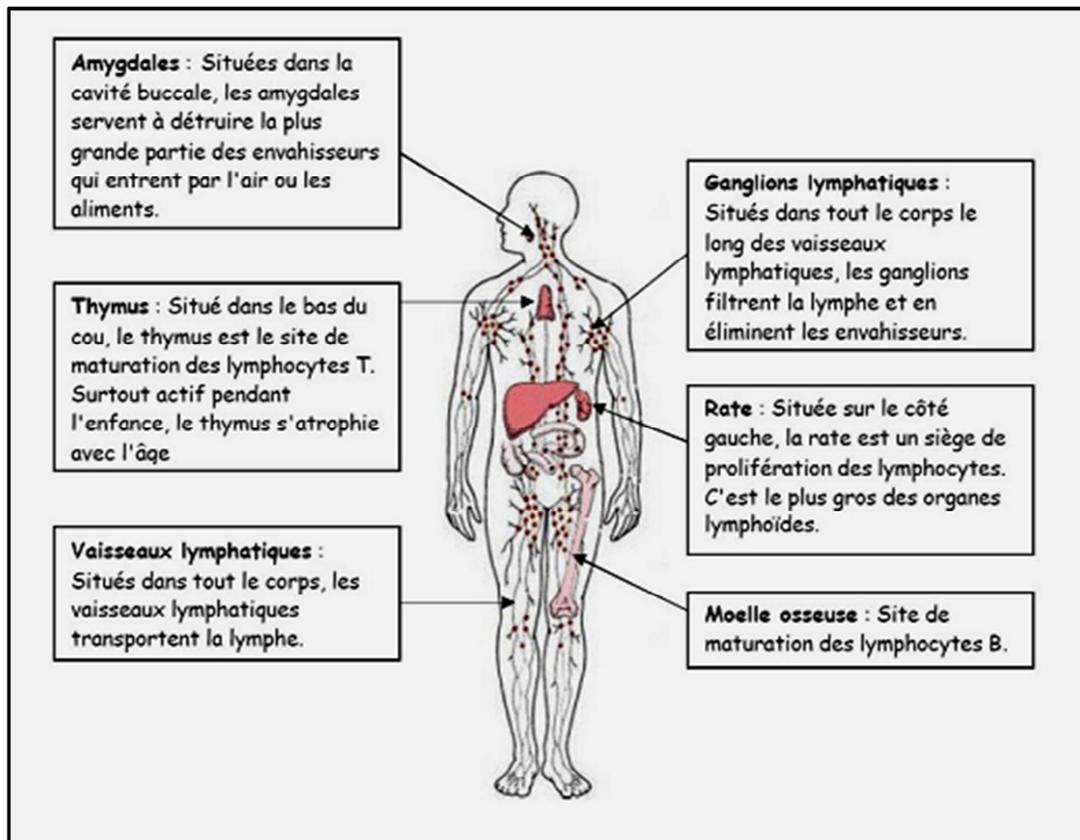


Figure 4 : Les organes et les tissus lymphoïdes [Petr et Delves, 2008]

II.2.3. Les substances solubles

Les trois sortes de substances chimiques libres faisant partie du système immunitaire sont de nature peptidique ou protéique, et sont en solution dans le sérum ou dans les liquides extracellulaires des tissus. Ce sont les immunoglobulines, les cytokines et les protéines du complément.

II.2.3.1. Les immunoglobulines (Ig) : sont des glycoprotéines douées d'une fonction anticorps (**Figure 5**), elles sont présentes :

- Sous forme soluble dans le sang, produites et sécrétées par les plasmocytes
- Sous forme membranaire comme élément du récepteur de l'Ag à la surface des cellules B matures (BCR). [Burmester et Pezzutto, 2000]

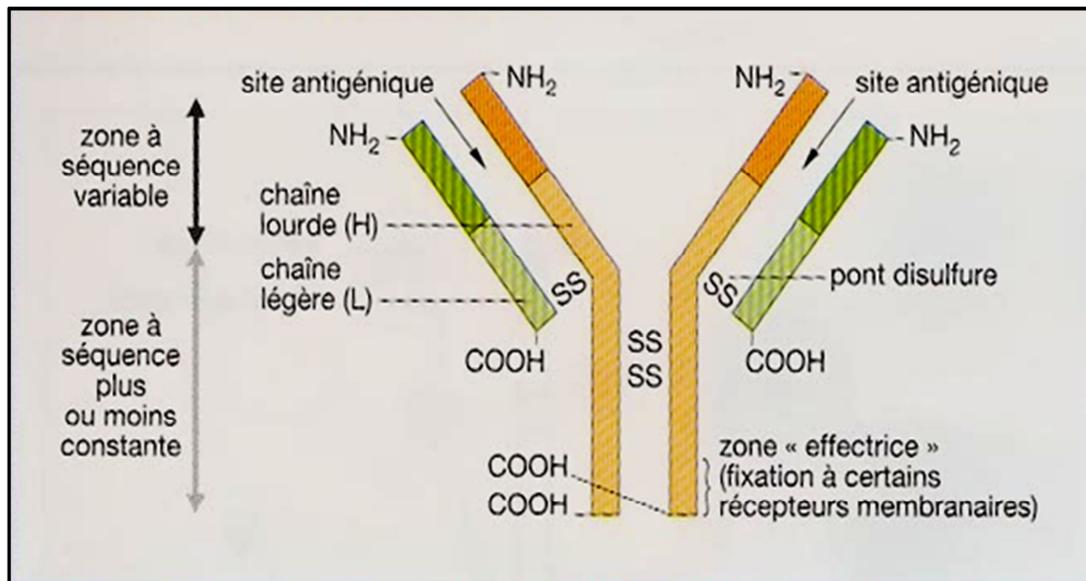


Figure 5 : Une immunoglobuline [Marie et Kolopp, 2009]

II.2.3.2. Les cytokines : sont des composantes solubles responsables de la régulation de la réponse immunitaire. Quand elles sont sécrétées par les lymphocytes, on les appelle lymphokines. Certaines cytokines amplifient ou accroissent une réponse immunitaire en cours, en général en provoquant la prolifération des cellules. D'autres suppriment une réponse en cours ; en effet, comme beaucoup d'autres systèmes de l'organisme, le système immunitaire est soumis à des mécanismes de régulation qui lui confèrent une activité d'intensité appropriée quand cela est nécessaire. [Rabhi, 2008]

II.2.3.3. Le complément : est un ensemble d'environ vingt protéines présentes dans le sang, d'où elles peuvent diffuser vers les tissus. Elles agissent d'une manière non spécifique, bien que souvent de concert avec les immunoglobulines afin de permettre le développement d'une réponse immunitaire adéquate. Lorsqu'un anticorps se lie à son antigène, les protéines du complément se lient au complexe ainsi formé, facilitant la phagocytose par les cellules immunitaires. Les protéines du complément peuvent également se lier seules à certaines bactéries ou cellules pour aboutir à leur destruction (cytolyse). [Rabhi, 2008]

II.3. La défense immunitaire

L'organisme résiste aux pathogène de deux manière : par une réponse immunitaire innée (ou naturel) et une réponse immunitaire adaptative (ou acquise).

Parmi les mécanismes de l'immunité innée qui entrent en jeu, la surface externe recouverte en continu par des cellules épithéliales formant une barrière protégeant les tissus et

les organes du corps du milieu extérieur. Ces épithéliums comprennent la peau et la cellule épithéliale des muqueuses des tractus respiratoire, gastro- intestinale et uro-génitale. Ainsi le système de complément d'où son activation présente un mécanisme de défense utilisable dès le début de l'infection [Parham, 2003].

En outre les cellules phagocytaires fournissent les principaux moyens par lesquels le système immunitaire détruit les pathogènes invasifs. Deux types cellulaires ,les macrophages et les neutrophiles, remplissent cette fonction dans l'immunité innée tel qu'amener les neutrophiles à quitter le sang pour gagner la zone infecter ,ou' ils prédominent rapidement parmi les cellules phagocytaires et dans la préparation terrain pour le développement de la réponse immunitaire adaptative [Parham, 2003] .

Alors on peut également dire que la réponse immunitaire innée contient l'infection, en attendant la mobilisation et la contribution plus puissante de la réponse immunitaire adaptative [Parham, 2003].

De son côté, la réponse immunitaire adaptative se distingue en deux types, l'une cellulaire et l'autre humorale. Elle commence par l'activation des cellules T naïves spécifiques pour l'antigène. Leur prolifération et différenciation aboutissent à de nombreux clones de cellules T effectrices spécifiques de l'antigène [Parham, 2003].

La réponse cellulaire est caractérisée par une réponse via les TCD8 et les TCD4.tandis que les cellules TCD8 sont prédestinées à l'exercice des fonctions cytotoxiques.

Les cellules TCD4 peuvent se différencier par voies alternatives pour produire des cellules effectrices, TH1, TH2, sécrétant différentes cytokines et pour orienter la réponse immunitaire dans différentes direction [Parham, 2003].

Ces trois types de cellules T effectrices permettent, au système immunitaire humain, de répondre aussi bien aux différentes catégories d'infection qu'aux différentes phases du processus infectieux [Parham, 2003].

Pour la réponse humorale c'est la réaction qui se produit lorsque des lymphocytes B, possédant les récepteurs spécifique, sont stimulés par un antigène et se différencient en clone de plasmocyte sécrétant les anticorps .ceux-ci sont efficaces contre l'agent pathogène circulant dans le sang et la lymphe. De plus, l'activation sélective des lymphocytes B dans

l'organisme de cellules mémoires à durée de vie prolongée et qui interviennent dans la réponse immunitaire secondaire. **(Figure 6)**

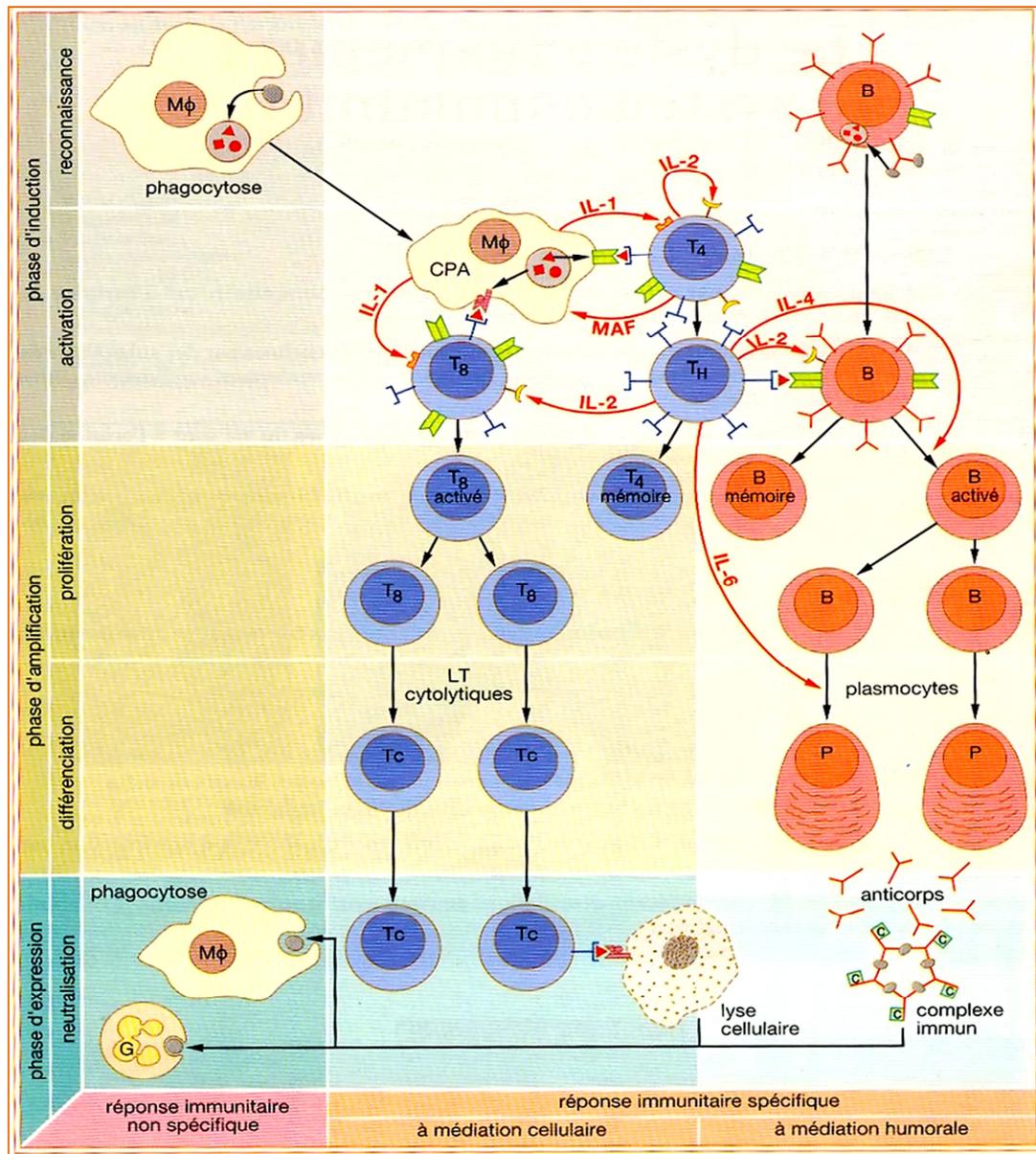


Figure 6 : Les étapes de la réponse immunitaire non spécifique et spécifique [Bencko et al, 1994]

III. Stress oxydant et immunotoxicité des pesticides

III.1. Les principaux mécanismes de toxicité des pesticides

Plusieurs études expérimentales *in vitro* ont permis de montrer que certains pesticides (Endosulfan, Roténone), peuvent induire un stress oxydant entraînant des perturbations des processus de régulation, de la survie et de la prolifération cellulaire comme par exemple certaines voies de signalisation cellulaire (MAPkinase, FAS /TNF). [Lee et al, 2008. In Maysaloun, 2008]

Il a été montré que des effets neurotoxiques [Drechsel & Patel, 2008. In Maysaloun 2008], immunotoxique [Li & Kawada, 2006. In Maysaloun 2008], ainsi que des effets cancérogènes [Antherieu et al, 2007. In Maysaloun 2008] et génotoxiques [Calviello et al, 2006. In Maysaloun 2008] étaient liés à une augmentation de la libération d'espèces d'oxygène en présence des pesticides. [Maysaloun, 2008]

III.1.1. Le stress oxydant

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre entre la production des radicaux libres et la destruction par des systèmes de défenses antioxydantes. Les radicaux libres peuvent engendrer des dommages importants sur la structure et le métabolisme cellulaire en dégradant de nombreuses cibles : protéines, lipides et acides nucléiques. Les radicaux libres sont une forme particulière d'espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un électron célibataire. [Angelos et al, 2005 ; Wassmann et al, 2004. In Hamadi, 2010]

Les antioxydants sont des molécules capables d'interagir sans danger avec les radicaux libres et de mettre fin à la réaction en chaîne avant que les molécules vitales ne soient endommagées. Chaque molécule anti- oxydante ne peut réagir qu'avec un seul radical libre, et par conséquent, il faut constamment refaire le plein de ressources antioxydantes.

Les mécanismes de défense anti-oxydante du corps humain peuvent être divisés en deux catégories différentes. Premièrement, un certain nombre d'enzymes sont synthétisées à partir des protéines et d'autres nutriments et constituants de l'organisme (Superoxyde dismutase (SOD), Catalase, Glutathion peroxydase). Le second groupe d'antioxydants doit être obtenu à partir de l'alimentation, puisque ces derniers ne peuvent être synthétisés par l'être humain

(Vitamines C et E), Oligo-éléments (Se, Cu, Zn), Acide urique (métabolisme des purines), Composés à groupement thiol (-SH). [Quillien, 2002]

III.1.2. Les effets immunotoxique des pesticides

L'immunotoxicité se définit par une atteinte du système immunitaire qui protège l'homme et l'animale contre l'invasion des substances étrangères. Le système immunitaire comprend des cellules, des organes et des substances peptidiques.

On distingue deux phénomènes : l'immunosuppression ou diminution des réponses immunitaires qui favorise la susceptibilité aux infections et ou le développement de certains cancers (lymphomes, myélome multiple, leucémies, etc), le second phénomène est l'immunopotentialisation qui provoque une augmentation excessive des réponses immunitaires responsables de crises d'allergie, d'asthme, de rhinites, d'anaphylaxie. [Sténuet et Van Hammée, 2005]

III.1.2.1. L'effet des pesticides sur les organes du système immunitaire

Des centaines d'études ont montré que les pesticides altèrent les organes du système immunitaire des animaux de laboratoire et les rendent plus sensibles aux maladies. Parmi les effets immunotoxique des pesticides, on notait une hypoplasie de la moelle osseuse et une diminution du poids absolu et relatif du thymus. Les études indiquant une suppression de la réponse immunitaire après une exposition au 2,4-D ont été réalisées chez les souris [Gandhi et al, 2000; Lee et al, 2001].

Une étude de [Beseler et al, 2006] montre que l'exposition au Dimethoate (un insecticide biologique) induit une diminution du poids de la rate chez des souris et des rats, associée à une réduction de nombre des lymphocytes.

Plusieurs d'autres études montrent que l'exposition aux pesticides entraîne une augmentation de poids des ganglions lymphatique. Comme indiqué par une étude de [Thomas et al, 1997] pour l'effet de deux pesticides isopropoxyphényle et méthylcarbamate chez des rats après 10 et 30 jours d'exposition, il observé une augmentation du nombre de lymphocytes B et la prolifération des cellules réticulaires dans les ganglions lymphatiques.

III.1.2.2. L'effet des pesticides sur les cellules immunitaires

▪ L'effet sur les lymphocytes B

Des études in vitro et in vivo ont effectivement montré que les pesticides ont la propriété de casser l'ADN et donc de favoriser les translocations. Les chromosomes 14 et 18 des lymphocytes B échangent par erreur de l'ADN. Le gène bcl-2 se retrouvant associé au

chromosome 14 (**Figure 7**), va alors être surexprimé, aboutissant à la synthèse massive d'une protéine impliquée dans l'inhibition de la mort cellulaire. Ainsi, les cellules B normalement destinées à la mort survivent de façon prolongée. Cette longue durée de vie augmente les risques de plusieurs autres altérations génétiques leur conférant la capacité de se multiplier, une des caractéristiques des cellules cancéreuses. [Npajon, 2011]

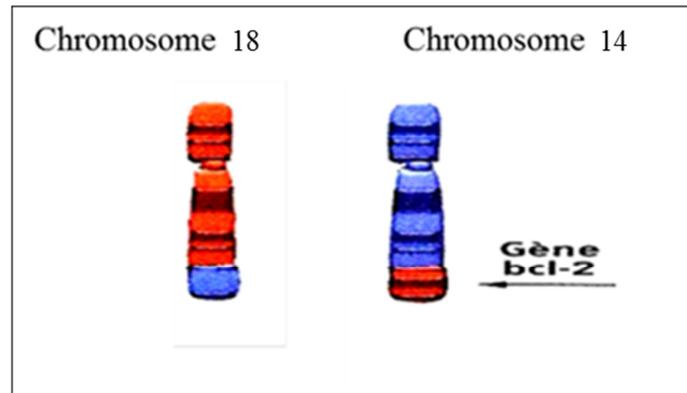


Figure 7 : La translocation génétique causée par les pesticides. [Npajon, 2011]

Dans une autre étude, il a été remarqué que l'exposition à certains pesticides diminue la quantité des lymphocytes B au niveau de la rate et du thymus fœtaux [Filipov et al, 2005] mais également sur des animaux adultes en entraînant une diminution de la production d'immunoglobulines et de la prolifération des lymphocytes B [Fournier et al, 1992. In Maysaloun, 2008]

▪ **L'effet sur les cellules lymphocytaires T**

La littérature indique une association entre les perturbations du système immunitaire et l'intoxication par les pesticides. In vitro, la présence des pesticides dérègle l'activité des lymphocytes T-cytotoxiques [Newcombe, 1992] et l'exposition aux pesticides aussi peut augmenter le risque de maladies infectieuses et de cancer. [Sténuet et Van Hammée, 2005]

Dans une étude in vitro de [Rowe et al, 2007] ont montré que l'exposition à l'Atrazine induit une inhibition de la capacité des cellules T cytotoxiques à sécréter des protéines lytiques sans affecter leur liaison avec les cellules cibles et un effet immunomodulateur sur les lymphocytes T humaines. [Maysaloun, 2008]

Des études similaires ont montré que l'exposition au carbaryl a inhibé la réponse des lymphocytes T cytotoxiques. [Rodgers et Ellefson, 1990. In Olgun, 2004]

D'autres études réalisées sur 10 fermiers ont révélé une évidence d'effet sur le système immunitaire après une exposition à un mélange de 2,4-D et de MCPA [De la Rosa et al, 2003, 2005]. Une réduction significative de certains types de cellules impliquées dans la réponse immunitaire tels que les lymphocytes T4 et T8 et les lymphocytes cytotoxiques, a été observée 1 à 12 jours après l'exposition. [Onil et Saint-Laurent, 2006]

▪ L'effet sur les cellules Naturel-killer (NK)

Les pesticides peuvent entraîner des effets immunotoxique en agissant par plusieurs mécanismes, certains pesticides, en particulier des organophosphorés, ont montré des effets inhibiteurs de l'activité des cellules NK (Natural killer), LAK (Lymphokine Activated Killer) et CTL (Cytotoxic T Lymphocytes). Ces cellules sont responsables de la mort des cellules tumorales ou des cellules infectées et peuvent être inhibées par les organophosphorés selon 3 mécanismes

- L'induction de l'apoptose cellulaire. **(Figure 8)**
 - L'inhibition de leur capacité de sécrétion de substances cytotoxiques.
 - l'inhibition directe de la voie Fas/FasL essentielle pour leur activité. **(Figure 9)**
- (Li and Kawada, 2006. In Maysaloun, 2008]

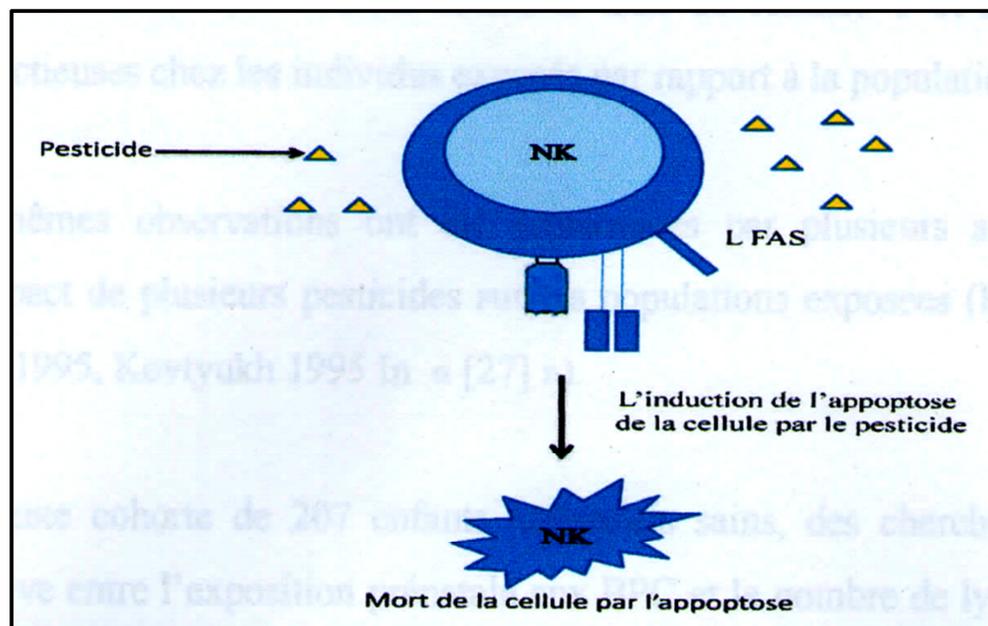


Figure 8 : L'induction de l'apoptose de cellule NK par le pesticide [Lounis, Mellouki et Rebiai, 2011]

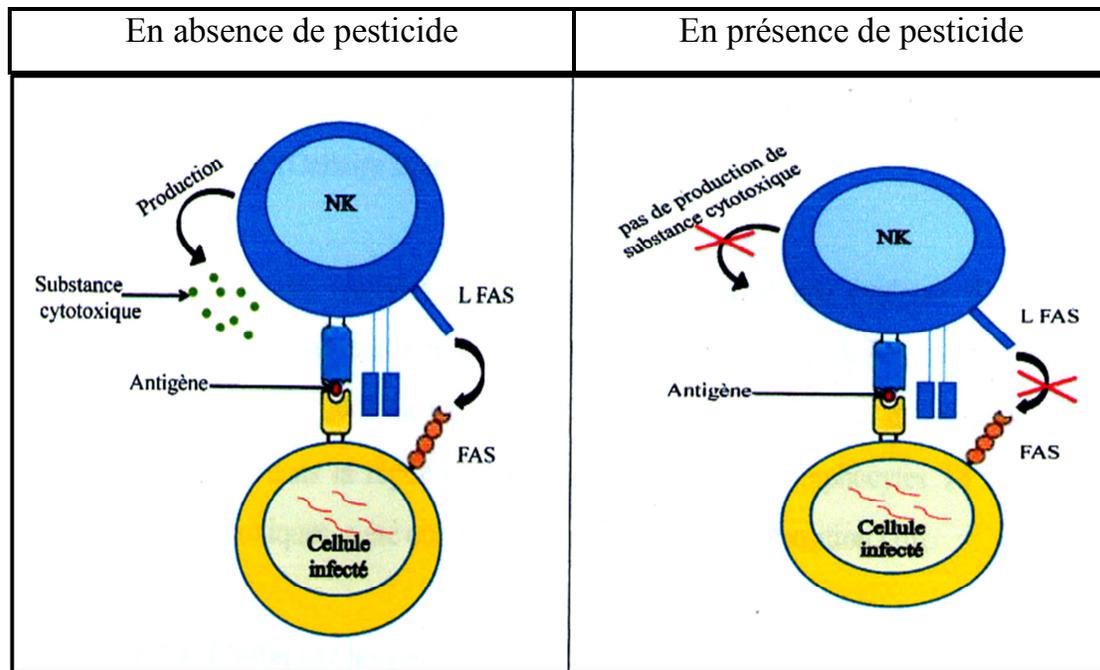


Figure 9 : Mécanisme d'action du pesticide sur les cellules NK [Lounis, Mellouki et Rebiai, 2011]

▪ L'effet sur d'autres types cellulaires

Des études publiées dans le Bulletin de la contamination de l'environnement et toxicologie ont révélé que le pesticide aldicarbe diminue la capacité des macrophages à tuer les cellules cancéreuses, cependant, il n'a pas affaibli celle des cellules tueuses naturelles.

Certaines études cliniques ont montré, chez des travailleurs industriels, que les pesticides organophosphorés se lient chimiquement aux estérases au niveau de cellules non spécifiques telles que les monocytes et les granulocytes, inactivant ainsi les estérases et du même coup les monocytes [Esa, 1999].

[Rodgers et Xiong, 1997] ont également rapporté que 14 ou 90 administration quotidienne du malathion a provoqué une activation des macrophages et la dégranulation des basophiles systémique. [Olgun, 2004]

III.1.2.3. L'effet des pesticides sur les substances solubles

▪ L'effet sur les Immunoglobulines

[André et al, 1983] ont montré que le carbaryl sélective augmente le taux sériques d'IgG1 et IgG2b chez la souris après exposition par voie orale pendant un mois. [Olgun, 2004]

Lindane, lorsqu'il est administré à 150 ppm par jour par voie orale pendant 1 mois n'a pas changé IgA, IgG 1, et les niveaux d'IgM dans le sérum chez la souris [André et al, 1993]. Le lindane administré à une concentration de 3 mg / kg / par jour pendant 5 semaines a réduit la réponse immunitaire humorale aux antigènes bactériens chez le lapin [Desi et al, 1978. In Olgun, 2004]

L'administration de fortes doses de malathion (jusqu'à 715 mg / kg) à des souris a augmenté la génération des IgM et une augmentation des réponses prolifératives aux mitogènes [Rodgers et Ellefson, 1990. In Olgun, 2004]

▪ L'effet sur Les cytokines

[Alluwaimi et Hussein, 2007] se sont intéressés aux effets immunotoxique d'un insecticide organophosphoré très répandu, le diazinon, chez la souris l'administration de 50 mg/kg/j dans l'eau de boisson pendant 30 jours a provoqué une diminution marquée et progressivement croissante de la libération des cytokines IL-2, IL-4, IL-12 et interféron (IFN) par les splénocytes. Bien que la dose testée soit relativement forte (1/5ème de la dose létale 50%), ces résultats suggèrent que le diazinon est immunotoxique. [Descotes, 2007]

[Corsini et al, 2007] Ont étudié les effets d'un herbicide, le propanil, chez 7 ouvriers agricoles exposés du nord de l'Italie, comparés à 7 sujets non exposés. Il observe que la production des cytokines IL-1 β et TNF- α n'était pas modifiée, celle de l'IL-6 était légèrement augmentée, et surtout celles de l'IL-10 et de l'IFN- γ fortement réduites. Enfin, ces auteurs ont mis en évidence un effet concentration-dépendant du propanil sur la réduction de la production d'IL-10 et de l'IFN- γ lors d'une étude in vitro sur lymphocytes humains. [Descotes, 2007]

III.1.3. Les effets neurologiques des pesticides

Certains pesticides présente une toxicité pour les neurones et plusieurs mécanismes sont proposés tels que le stress oxydatif et les perturbations enzymatiques. [Ferragu, 2010]

- **Chez l'enfant**, le développement neurologique particulièrement dans la phase fœtale est crucial. Des perturbations endocriniennes notamment pendant cette période peuvent causer des dommages irrémediables sur le développement du cerveau conduisant à des altérations intellectuelles et psychomotrices. [Blair et al, 2001]

- **Chez l'adulte**, d'autres pathologies ont été observées notamment une baisse des performances intellectuelles, l'anxiété, la dépression, etc. [Blair et al, 2001]

III.1.4. Les effets sur le système endocrinien et la reproduction

Plusieurs études se sont intéressées aux effets des pesticides sur la reproduction, en particulier sur la fertilité masculine. Les pesticides peuvent agir au niveau de la spermatogénèse via des altérations des hormones ou des effets génotoxiques [Toppari et al, 1996. In Maysaloun, 2008]. Par exemple une étude a montré une baisse significative du nombre et de la qualité des spermatozoïdes chez des ouvriers exposés au Chlordécone [Taylor et al. 1978. In Maysaloun, 2008]. [Clementi 2007-2008] précise que les pesticides pourraient être générateurs de stress oxydatif au niveau des spermatozoïdes induisant une perte de leur mobilité et de leur pouvoir fécondant. [Ferragu, 2010]

Les littératures disponible parle d'une puberté précoce associée à l'exposition aux organochlorés, d'une perturbation des hormones thyroïdiennes et sexuelles associée aux organophosphorés, pyréthrinoïdes ou éthylène-bis-dithiocarbamates (EBDCs) [Colborn et al, 1993; Anderson et al, 1999. In Maysaloun, 2008]

III.1.5. Les effets cancérigènes des pesticides

Dans une revue de la littérature portant sur l'association entre l'exposition chronique aux pesticides et le cancer, [Bassil et al, 2007] ont observés qu'il existe une association positive significative entre l'augmentation du risque des leucémies, des lymphomes hodgkiniens et de certaines tumeurs solides en particulier les cancers du cerveau et de la prostate et l'exposition chronique (professionnelle ou domestique) aux pesticides [Bassil et al, 2007. In Maysaloun, 2008]

MATERIEL ET METHODES

II. Matériel et Méthodes

II.1. Matériel chimique

Pour notre étude nous avons utilisé les pesticides suivants : Tilt, Zoom, Granstar. (Annexe 1)

II.2. Matériel biologique

Cette étude a été réalisée sur des souris blanches femelles âgées de quatre semaines et dont le poids varie de 23 à 39 g. Ces animaux sont élevés au sein de l'animalerie de l'institut de pharmacie à l'université Mentouri, Constantine. Les souris sont logés dans des cages avec accès libre de nourriture et d'eau et à température ambiante avec un cycle naturel de lumière et d'obscurité.

II.3. Méthodes

Les étapes de la partie expérimentale de notre travail sont résumées dans la figure 10 :

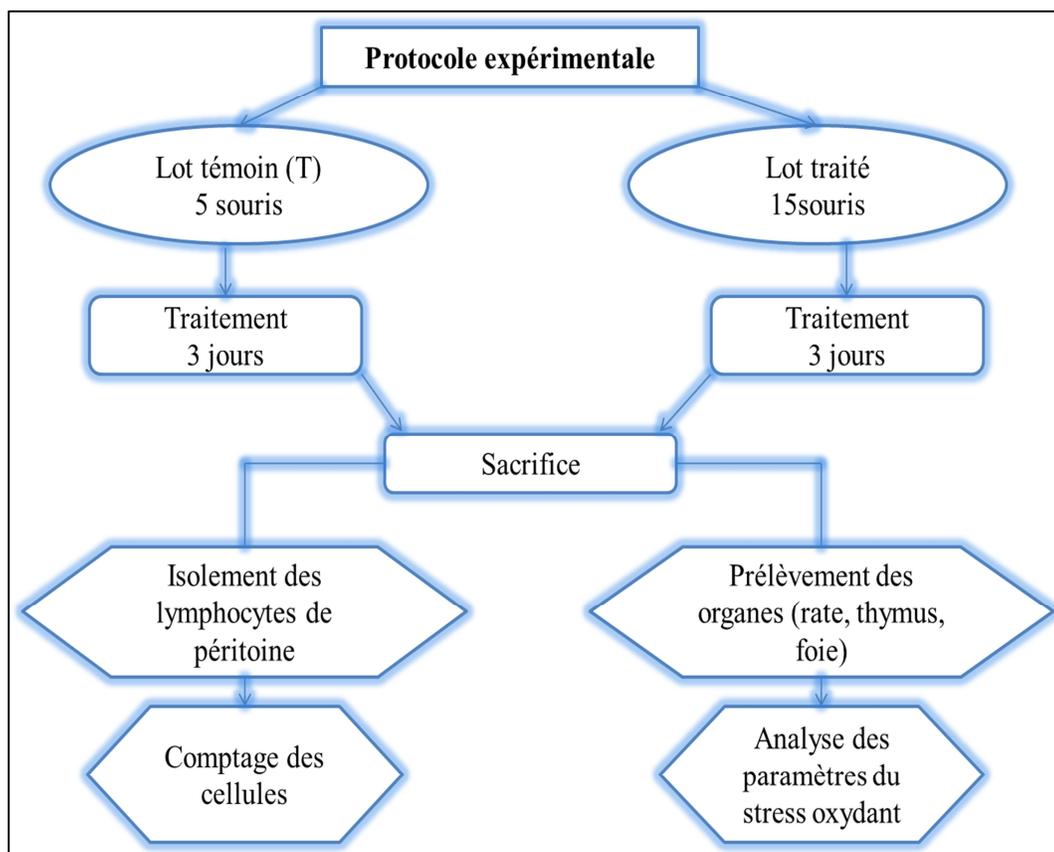


Figure 10 : Schéma récapitulatif des étapes expérimentales.

II.3.1. Traitement

Les souris sont réparties en quatre lots contenant chacun cinq souris. Ces souris sont traitées avec trois pesticides différents par voie intra-péritonéale. Les pesticides sont préparés dans une solution de NaCl à 0.9% puis injectés aux animaux une seule fois par jour pendant trois jours selon le protocole suivant :

Lot1 (TM): Représente le groupe témoin (TM) qui reçoit 10 ml/kg d'eau physiologique.

Lot2 (TL): Reçoit 250 mg/10 ml/kg de Tilt.

Lot3 (ZO): Reçoit 600 mg/10 ml/kg de Zoom.

Lot4 (GR) : Reçoit 600 mg/10 ml/kg de l'herbicide Granstar.

II-3-2- Sacrifice des animaux

A la fin de la période du traitement, les animaux sont mis à jeun pendant une nuit. Le poids des souris est notés chaque jour pendant le traitement et après le dernier jour du traitement avant le sacrifice. Les souris sont sacrifiées par le chloroforme. Après la récupération des lymphocytes péritonéaux, on passe rapidement à la dissection et au prélèvement des organes.

✓ Isolement des lymphocytes péritonéaux

Après avoir préparé et désinfecté les instruments ainsi que la planche à dissection avec l'alcool, la souris est placée sur la face dorsale et fixée à l'aide des aiguilles. Une boutonnière cutanée de 0.5 cm fut ouverte sur la ligne médio-ventrale du tronc en avant de l'orifice urinaire (attention de ne pas ouvrir le péritoine à cette étape). La peau est proprement écartée pour découvrir les muscles péritonéaux. A l'aide d'une seringue stérile, 5 ml de PBS sont introduits dans la cavité péritonéale. Après 5 minutes, le liquide de lavage est récupéré dans un tube stérile et centrifugé pendant 8 min à 1500 tpm. Le culot est remis en suspension dans 5 ml de PBS [Avijit et Bonnie]. Enfin, les lymphocytes péritonéaux sont comptés en utilisant la cellule de Malassez. Le nombre de lymphocytes péritonéaux par unité de volume est calculé selon l'équation suivante [Ferry, 2007] :

$$N = \frac{\text{nombre total des cellules comptées}}{\text{nombre des rectangles comptés} \times \text{volume d'un petit rectangle}}$$

N = nombre de cellules comptées par unité de volume

✓ Prélèvement des organes

Après la dissection, la rate, le thymus et le foie de chaque souris sont rapidement prélevés et lavés deux fois par une solution froide de NaCl à 0.9% puis séchés sur le papier filtre. Chaque organe est pesé puis homogénéisé dans une solution de KCl 1.15% à raison de 10% p/v pour le foie et 20% p/v pour le thymus et la rate. [Mahmet et al, 2000] L'homogénat obtenu est centrifugé à 4000 tpm pendant 10 minutes pour éliminer les débris cellulaires. Ensuite, le surnageant est récupéré dans des tubes secs est stocké à -20°C jusqu'à l'utilisation pour les dosages des paramètres tissulaires.

II-3.3. Analyse des paramètres tissulaires

✓ *Dosage des substances réactives de l'acide thiobarbiturique (TBARS)*

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 du thymus, de la rate et du foie selon la méthode de [Okhawa et al, 1979]. A 0.5 ml de l'homogénat, 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 tpm, 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-tetraétoxypropane » qui donne l' MDA après son hydrolyse.

✓ *Dosage de l'activité enzymatique du catalase*

L'activité enzymatique du catalase est déterminée dans les tissus du foie, de la rate et du thymus 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 (H_2O_2) par la catalase.

- **Réactifs et solvants :**

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

- b- Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) 19mmol/ml.

- **Procédure :** Dans une cuvette en quartz de 3 ml, 50 μ l de l'homogénat sont mélangés avec 2.95 ml d'une solution de H_2O_2 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 t_0 et après chaque minute. L'activité enzymatique du catalase est exprimée en unité internationale UI/ mg de protéines sachant que UI est la quantité d'enzyme nécessaire pour consommer 1 μ mol de l' H_2O_2 par minute.

✓ *Dosage du glutathion réduit*

Le dosage de glutathion réduit est effectué selon la méthode de [Ellman, 1959] au niveau de la rate, le thymus et le foie.

- **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 tissus s'effectue selon les étapes suivantes :

- a- 0.5 ml de TCA à 10% 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 5 minutes à 2000 tpm.

- c- D'autres tubes sont préparés pour le mélange réactionnel : 100 µl 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 5 minutes 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. (Annexe 2)

✓ *Dosage des protéines*

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de [Bradford, 1976] au niveau de la rate, le thymus et le foie.

- **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 G250 (BBC)

- b- Albumine Borne

- **Procédure** : 4 ml de BBC sont ajoutés à 100 µl de surnageant dans un tube propre, et ensuite agité au vortex. La lecture se fait dans intervalle de 2 min et 1 h 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. (Annexe 2)

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) suivie du test de Tukey. Les résultats sont exprimés en moyenne ± S.E.M et en comparant les groupes traités par les pesticides avec le groupe témoin où :

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 $p < 0.001$ (***)

RESULTATS ET DISCUSSION

III. Résultats et Discussion

III.1. Évolution du poids des souris

La variation du poids des souris constitue un paramètre très important. Le suivi régulier des animaux nous a amenés à obtenir les valeurs relatives à la figure 11. Distinctement, une différence entre la croissance des souris traitées par Tilt, Zoom et Granstar et celle des souris normales a été notée dont il y avait une diminution significative du poids corporel des souris traitées (-9.98%, -11.76% et -13.51%) respectivement.

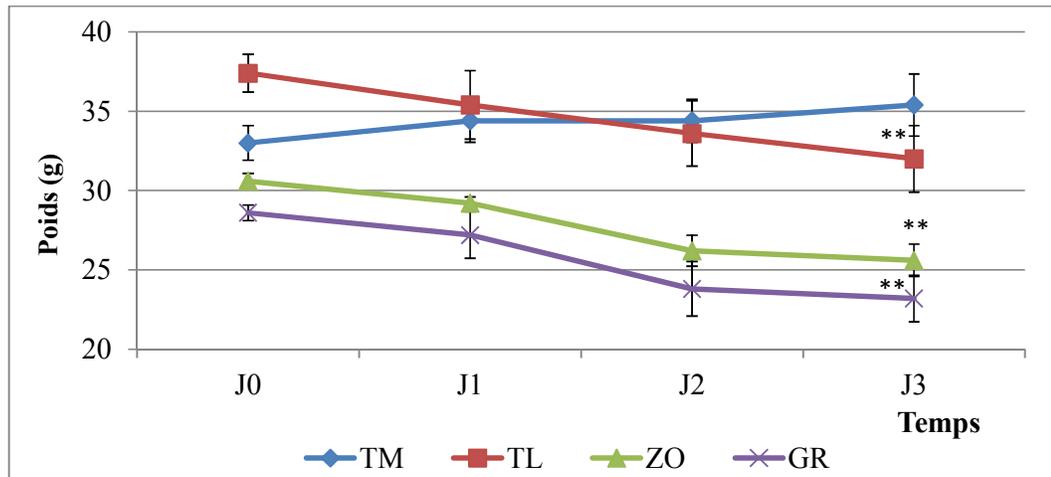


Figure 11 : Evolution du poids des souris témoins et traités durant les 3 jours de traitement. Chaque valeur représente la moyenne \pm S.E.M (n=5) * $0.05 > p > 0.01$, ** $0.01 > p > 0.001$, *** $p < 0.001$.

La perte du poids chez les souris traitées avec les trois pesticides peut être due à la diminution du poids des organes à cause de l'insuffisance des tissus au cours du stress oxydant ou à l'augmentation du métabolisme des lipides et des protéines [Anupama et al, 2011]

III.2. Evaluation du poids relatif du thymus et de la rate

D'après les résultats obtenus (Figure 12), nous avons noté une diminution significative du poids relatif du thymus chez les souris traitées par Zoom et Granstar alors qu'une augmentation significative de ce paramètre est notée dans la rate des souris traitées par Tilt. Cela peut être expliqué par une hypotrophie, nécrose des tissus, dissolution de la barrière tissulaire pour le thymus (Banerjee 1996, Handy et al 2002) ou une hypertrophie pour la rate (I'ster, 1993).

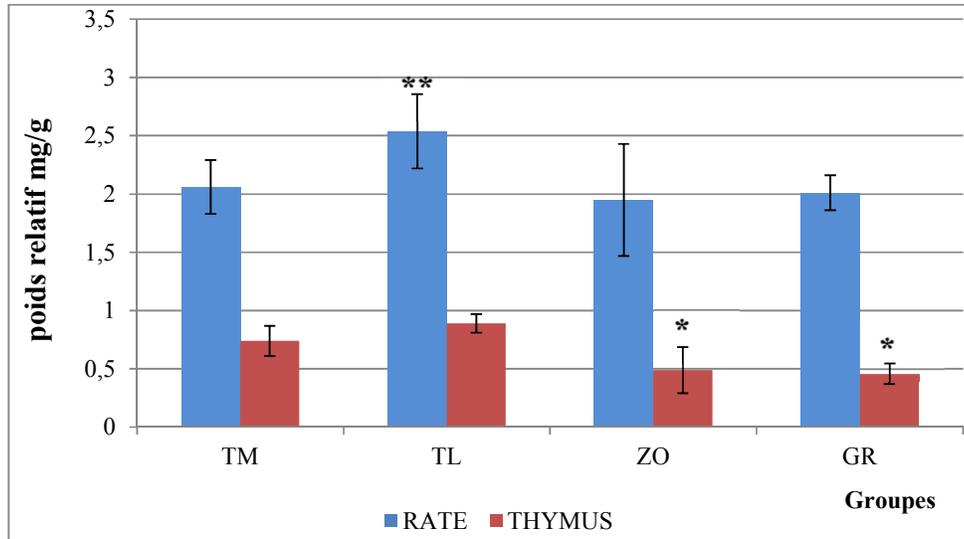


Figure 12 : Evaluation du poids relatif du thymus et de la rate. Chaque valeur représente la moyenne \pm S.E.M (n=5) * $0.05 > p > 0.01$, ** $0.01 > p > 0.001$, *** $p < 0.001$

III.3. Effet des pesticides sur les lymphocytes péritonéaux

Après 3 jours du traitement des souris par les trois pesticides (Tilt, Zoom et Granstar) et en comparant les résultats avec ceux du témoin (Figure 13), on a remarqué une diminution significative du taux des lymphocytes péritonéaux chez les souris traitées par Zoom et Granstar (-45.49%) et (-33.26%) respectivement, alors que la baisse des cellules enregistré chez les souris traitées par Tilt et très ombilic par rapport au témoin où elle atteint (-84.74%).

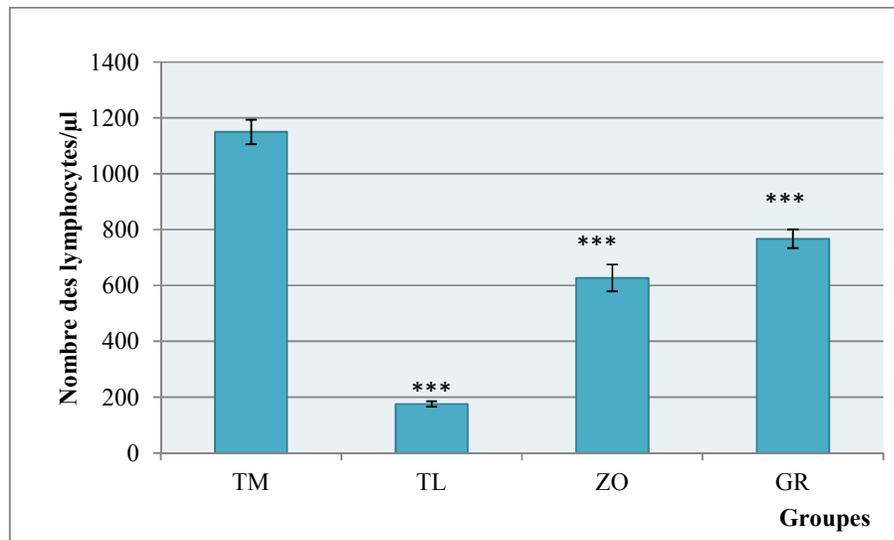


Figure 13 : La variation du taux des lymphocytes du péritoine sous l'effet des pesticides (Tilt, Zoom, Granstar). Chaque valeur représente la moyenne \pm S.E.M (n=5) * $0.05 > p > 0.01$, ** $0.01 > p > 0.001$, *** $p < 0.001$

La diminution des lymphocytes du péritoine peut être expliquée par la migration de ces cellules vers les organes périphériques d'une part, et l'inhibition de la production de la lignée lymphoïde d'autre part, sous l'effet du traitement par les pesticides. Nos résultats sont en accord avec l'étude réalisée par [Abbas et al. 2000] lorsqu'ils ont injectés des souris femelles par le méthyle de carbamate à une concentration de 400 mg / kg dans le péritoine, ils ont remarqué que le nombre de lymphocytes T et B et leur fonctions sont supprimés après l'exposition prolongée aux pesticides. La même observation a été remarquées par (Handy et al 2002) lors de l'exposition des rats au Diazinon à une concentration de 300 mg / kg pendant 45 jours. Thomas et al (1987), en étudiant l'impact de deux pesticides (isopropoxyphényle et méthylcarbamate) sur des rats après 10 et 30 jours d'exposition, ils ont observé une diminution du nombre de lymphocytes B.

La diminution des lymphocytes peut être aussi expliquée par des changements génétiques touchant l'ADN de ces lymphocytes sous l'effet des pesticides, ce qui peut déclencher une séquence suicidaire innée des activités dans les cellules (mort cellulaire programmée ou apoptose). Cette virtuelle et confirmée par la recherche de [Olgun S, 2004], qui a étudié l'immunotoxicité de l'exposition aux mélanges des pesticides (lindane, le malathion et la perméthrine) sur des souris C57BL / 6, et il a montré que ces expositions aux pesticides ont causé la mort cellulaire apoptotique et nécrotique à la fois des lymphocytes évaluée par cymomètre de flux. Par contre, (Madsen et al, 1996) lors du dosage des rats mâles par le pesticide Deltaméthrine pendant 28-jours à une concentration de 0, 1, 5, 10 mg / kg, il a observé une augmentation du taux des lymphocytes avec une augmentation du nombre de cellules productrices d'anticorps chez les animaux.

III.4. L'analyse des paramètres du stress oxydant

III.4.1. Dosage des substances réactives de l'acide thiobarbiturique

Le taux de l'MDA était augmenté significativement au niveau de la rate, le thymus et le foie (Figure 14), suite du traitement des souris par les trois pesticides (Tilt, Zoom et Granstar) par rapport aux souris du lot témoin. Cette augmentation remarquable de la peroxydation lipidique était évidente dans la rate (+46.79% sous l'effet de Tilt, +44.87% sous l'effet de Zoom et 32.69% sous l'effet de Granstar), dans le thymus (+72.01% sous l'effet de Tilt, +32.36% sous l'effet de Zoom et 34.98% sous l'effet de Granstar) et dans le foie (+34.35% sous l'effet de Tilt, 23.40% sous l'effet de Zoom et 21.24% sous l'effet de Granstar).

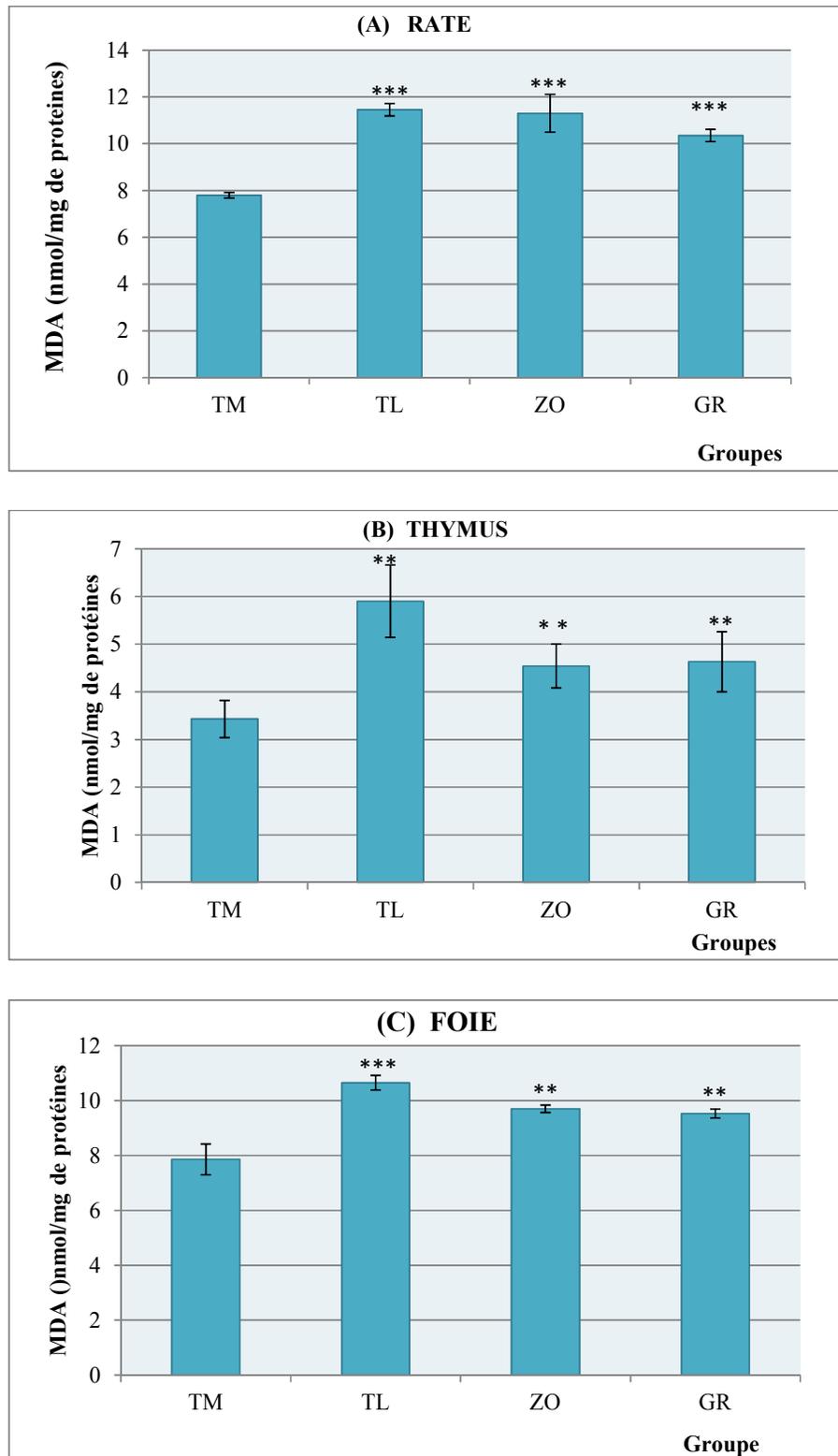


Figure 14 : Dosage de l'MDA au niveau de la rate (A), de thymus (B) et du foie (C). Chaque valeur représente la moyenne \pm S.E.M (n=5) * $0.05 > p > 0.01$, ** $0.01 > p > 0.001$, *** $p < 0.001$

III.4.2. Dosage de l'activité enzymatique du catalase

La figure 15 montre l'activité enzymatique du catalase, en temps qu'une enzyme antioxydant au niveau de la rate, de thymus et le foie des souris des différents lots. Au niveau de la rate, on note une diminution significative de l'activité enzymatique du catalase chez les souris traité avec Tilt (-68.01%), (-37.46%) chez les souris traité avec Zoom et (-27.37%) chez les souris traité avec Granstar par rapport aux souris de groupe témoin. Au niveau du thymus, une diminution significative de l'activité du catalase a été notée chez les souris traitées par Tilt (-45.83%), une baisse de (-45%) chez les souris traitée par Granstar et une réduction de (-19.24%) seulement enregistré chez les souris traitée avec Zoom en comparant avec le groupe témoin. L'activité du catalase hépatique a réduit significativement chez les souris traité par rapport aux souris témoin. Cette diminution au niveau du lot traité par Tilt a arrivé à (-67.88%), et (-55.05%), (-50.54%) au niveau des lots traités par Zoom et Granstar respectivement.

III.4.3. 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 la rate des souris après le traitement par Tilt, Zoom et Granstar, la réduction de GSH enregistrée est (-43.51%, -36.74 et -18.07%) respectivement. Au niveau de thymus la baisse de GSH enregistrée chez les souris traitée par Tilt est (-30.99%), alors que chez les souris traitée par Zoom et Granstar est (-13.13%, -10.50%) respectivement. Dans le cas du foie les valeurs enregistrées sont (-43.51%, -18.07% et -26.15%) chez les souris traitée par Tilt, Zoom et Granstar respectivement. (Figure 16)

Les présents résultats ont révélé une augmentation significative des TBARS au niveau de la rate, le thymus et le foie des souris traitées avec réduction importante de l'activité enzymatique du catalase et du taux de glutathion. Nos résultats sont en accord avec ceux présenté par [Olgun S, 2004]. L'augmentation du taux des TBARS indique l'augmentation de la peroxydation lipidique et le degré des dommages au niveau de ces organes [Hamden K., 2008]. La diminution de l'activité enzymatique du catalase peut être due à son inhibition par les réactions avec les métabolites des pesticides, alors que la déplétion en GSH réduit peut signifier son oxydation par les radicaux libres en GSSG oxydé. Ces données supportent l'idée que les trois pesticides (Tilt, Zoom et Granstar) induit le stress oxydant chez les modèles animaux. Mais particulièrement le pesticide Tilt dans notre étude montre une induction plus élevé du stress oxydant par rapport aux autres pesticides.

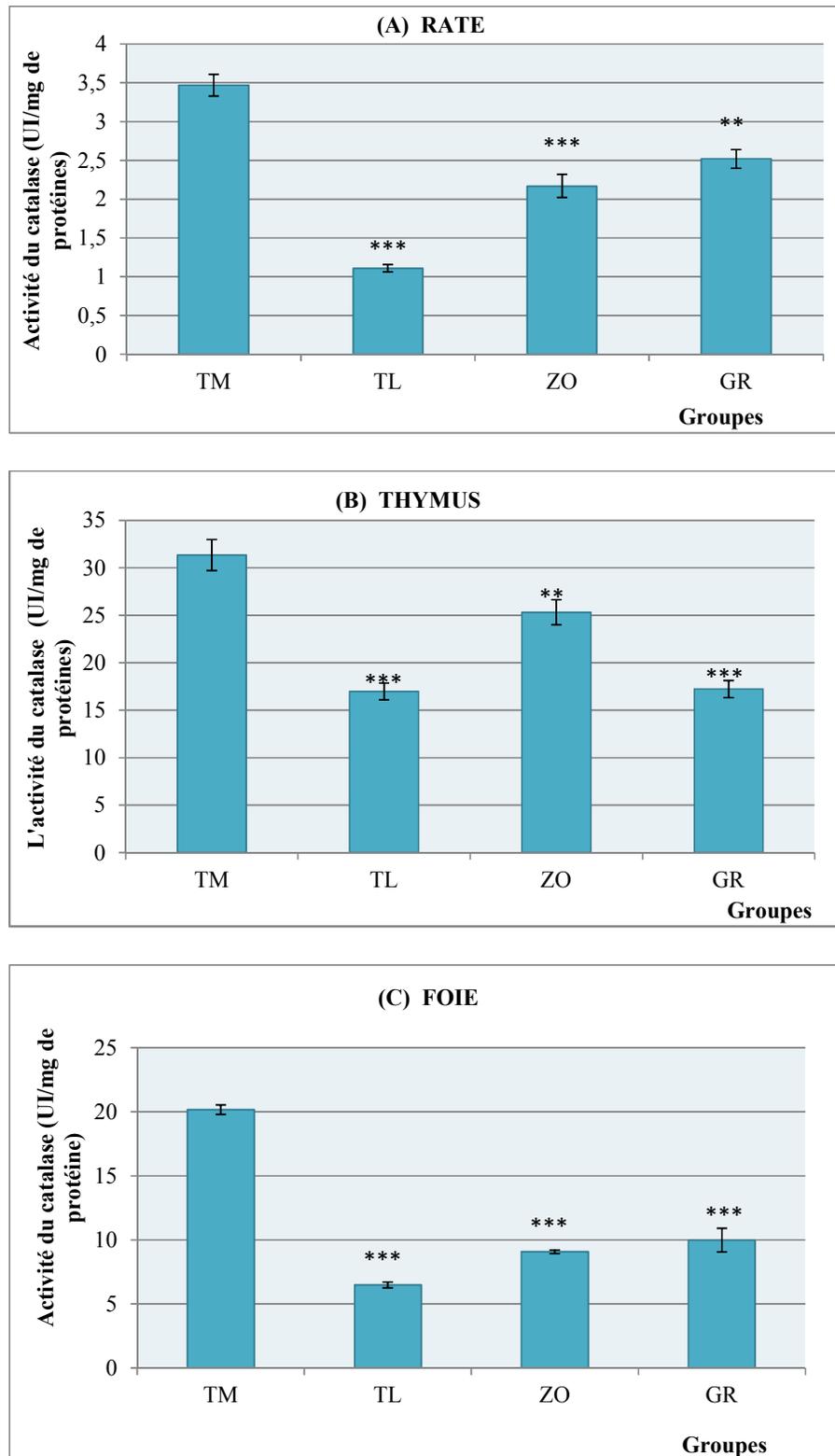


Figure 15 : Dosage de l'activité enzymatique du catalase tissulaire au niveau de la rate (A), le thymus (B) et le foie (C). Chaque valeur représente la moyenne \pm S.E.M (n=5) * $0.05 > p > 0.01$, ** $0.01 > p > 0.001$, *** $p < 0.001$

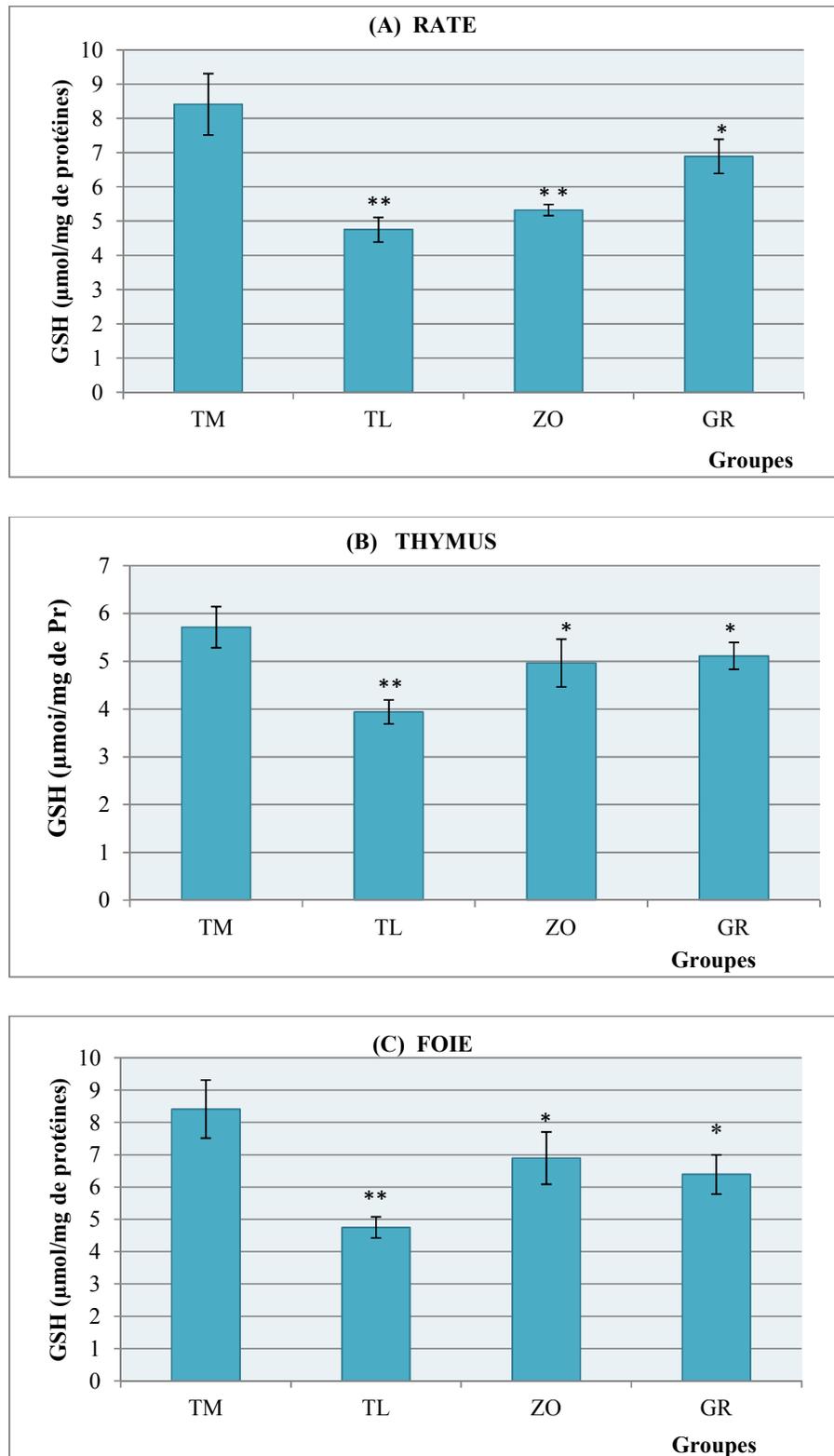


Figure 16 : Dosage du GSH tissulaire au niveau de la rate (A), de thymus (B) et du foie (C). Chaque valeur représente la moyenne \pm S.E.M (n=5)
 * $0.05 > p > 0.01$, ** $0.01 > p > 0.001$, *** $p < 0.001$

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Conclusions et perspectives

Notre présente étude sur l'effet immunotoxique du Tilt, Zoom et Granstar utilisés comme produits phytosanitaires en Algérie nous a permis de conclure que ces trois pesticides provoquent des perturbations dans le système immunitaire. Résultats révélés par les modifications pathologiques qu'on a constaté au niveau de la rate, du thymus et les lymphocytes péritonéaux sans oublier le foie, bien qu'il ne fait pas partie du système immunitaire mais c'est l'organe principale exprimant la toxicité d'un xénobiotique par excellence.

L'hypothèse de l'implication du stress oxydant dans la toxicité des pesticides étudiés est vérifiée dans notre étude dont on a pu conclure que le Tilt, Zoom et Granstar augmentent le stress oxydant ce qui peut être considéré probablement comme l'un des mécanismes de leur toxicité.

En perspective, cette étude préliminaire doit être approfondie en incluant d'autres paramètres immunologiques et histologiques et en utilisant d'autres modèles animaux ou des modèles cellulaires *in vitro* pour permettre de bien comprendre le mécanisme de toxicité de ces pesticides.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

(IFEN) Institut Français de l'Environnement (2004). Les pesticides dans les eaux. Sixième bilan annuel. Données 2002. Etudes et Travaux n°42. Institut Français de l'Environnement, Orléans. Ifremer. 54 p

(INERIS) Institut National de l'Environnement et des Risques Industriels (2004). Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, version n°4. 59 p

(OMS) Organisation Mondiale de la Santé (2004). Les enfants sont exposés à des risques élevés d'intoxication par les pesticides. Note commune à l'intention des médias OMS/FAO. n° 9. 2 p

(OMS/IPCS) (2005). The who recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification n°41. 19 p

(PASP-MALI) Programme Africain relatif aux Stocks de Pesticides : (2000). Les pesticides dans l'environnement. n°4. 25 p

Abbas AK, Al-Omar MA, Al-Obaidy SA (2000). Toxic effects of chemicals on the immune system. Department of Biology. College of Education for Women. University of Baghdad. Jadiriah, Iraq. Toxicol Lett. 10; 115(1):1-8.

Aligon D, Bonneau J, Garcia, Gomez, Le Goff D (2010). Estimation des expositions de la population générale aux insecticides : les Organochlorés, les Organophosphorés et les Pyrèthrinoides. Projet d'Estimation des Risques SA Nitaires. 78 p

Alluwaimi AM & Hussein Y (2007). Diazinon immunotoxicity in mice: modulation of cytokines level and their gene expression. Toxicology; 236(1-2):123-31.

Anderson AS., Maher L, Ha TK, Cooney J, Eley S, Martin M, Vespasiani G, Bruni M & Lean, ME (1999). Evaluation of a bar-code system for nutrient analysis in dietary surveys. Public Health Nutr. 2(4); 579-586.

André F, Gillon F, Andre C, Lafont S & Jourdan G (1993). Pesticide-containing diet augments anti-sheep red blood cell non reagenic antibody responses in mice but may prolong murine infection with *Giardia muris*. Environ Res, 32:145-150.

Angelos M G, Kutala V K, Stoner J D, Mohammed M & Oerannan K(2005). Hypoxic reperfusion of the ischemic heart and oxygen radiacal generation .Am J Physiol Heart Circ Physiol .Vol 290: 341-347.

Antherieu S, Ledirac N, Luzy A P, Lenormand P, Caron J C & Rahmani R (2007). Endosulfan decreases cell growth and apoptosis in human HaCaT keratinocytes: partial ROS-dependent ERK1/2 mechanism. Journal of Cellular Physiology . 213(1); 177-186.

Anupama O, Santosh KY & Nalini (2011). Effecto fcombined exposureofcomm only used organophosphate pesticides on lipid peroxidationandantioxidant enzymes inrattissues. *Pesticide Biochemistry and Physiology* (99)148–156.

Avijit Ray & Bonnie N. Dittel. Isolation of Mouse Peritoneal Cavity Cells. *Blood Research Institute BloodCenter of Wisconsin. Jove.*

Banerjee BD, Ray A & Pasha ST (1996). A comparative evaluation of immunotoxicity of DDT and its metabolites in rats. *Indian J Exp Biol*, 34(6):517-522.

Bassil KL, Vakil C, Sanborn M, Cole DC, Kaur JS & Kerr KJ (2007). Cancer health effects of pesticides: systematic review. *Can Fam Physician*. 53(10); 1704-1711.

Bencko V, Wagner V, Wagnerova M & Ondrejcek K (1994). Immunological profiles in workers occupationally exposed to inorganic mercury. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol*, 34: 9-14.

Beseler CB, Stallones L, Hoppin J, Alajanva M CR, Blair A, Keefe T & Kamel F (2006). Depression and pesticide exposures in female spouses of licenced pesticide applicators in the agricultural health study cohort *Journal of occupational and environmental medecine*, vol. 48, n° 10, p. 1005-1013.

Blair A, Zheng T, Linos A, Stewart PA, Zhang YW & Cantor KP (2001). Occupation and leukemia: a population-based case-control study in Iowa and Minnesota. *Am J Ind Med* . 40(1); 3-14.

Bonnefoy N (2012). Les pesticides et leur impact sur la santé et l'environnement. *Rapport d'information* . 348 p

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive methode for the quantitation of microgram quantittes of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72,248-254.

Burmester GR & Pezzutto A(2000). *Atlas De Poche d'immunologie*. Paris. 293 p

Calvet R, Barriuso E, Bedos C, Benoit p, Charnay MP, Coquet Y (2005). Les pesticides dans le sol: Conséquences agronomiques et environnementales. *Editions France Agricole*, Paris. 637 p

Calviello G, Piccioni E, Boninsegna A, Tedesco B, Maggiano N, Serini S, Wolf F I & Palozza P (2006). DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: involvement of the oxidative mechanism. *Toxicol Appl Pharmacol*. 211(2); 87-96.

Cellier P(2004). Les sources agricoles de polluants de l'air, in Charpin D. *L'air et la santé*. Flammarion Coll. Médecine-Sciences. 305 p

Clairborne A (1985). Catalase activity. In *handbook of method for oxygen radical Research*. Green world, R.A.ed: boca Raton. Fla CRC press, 283-284.

Clementi M, Causin R, Marzocchi C, Mantovani A & Tenconi R (2007). A study of the impact of agricultural pesticide use on the prevalence of birth defects in northeast Italy *Reproductive toxicology*, vol. 24, n° 1, p. 1-8.

Clementi M, Tibini GM, Causin R, LA Rocca C, Maranghi F, Raffagnato F & Tenconi R (2008). Pesticides and fertility: an epidemiological study in northeast Italy and review of the literature *Reproductive toxicology*, vol. 26, n° 1, p. 13-18.

Colborn T, vom Saal FS & Soto AM (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* . 101(5); 378-384.

Corsini E, Codeca I, Mangiaratti S et al. (2007). Immunomodulatory effects of the herbicide propanil on cytokine production in humans: In vivo and in vitro exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2007 ; 222(2):202-10.

De la Rosa P, Barnett J & Schafer R (2003). Loss of pre-B and IgM(+) B cells in the bone marrow after exposure to a mixture of herbicides. *J. Toxicol. Environ. Health A*, vol. 66 (24), p. 2299-313.

De la Rosa P, Barnett J & Schafer R (2005). Characterization of thymic atrophy and the mechanism of thymocyte depletion after in vivo exposure to a mixture of herbicides. *J. Toxicol Environ. Health A*, vol. 68 (2), p.81-98.

Descotes J (2007). Immunotoxicité des pesticides. Modifications de l'immunité en relation avec l'exposition de l'homme aux substances chimiques (données toxicologiques) *Hospices Civils de Lyon - Centre Antipoison – Lyon*. n° 5 : 16-17.

Desi I, Varga L & Karkas I (1978). Studies on the immunosuppressive effect of organochlorine and organophosphoric pesticides in subacute experiments. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol*, 22:115-122.

Drechsel DA & Patel M (2008). Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 44(11); 1873-1886.

Esa AH et al. (1999). "Immunotoxicity of Organophosphorus Compounds: Modulation of Cell-Mediated Immune Responses by Inhibition of Monocyte Accessory Functions ", *Clinical Immunology and Immunopathology*, 48: 41-52.

Espinosa E & Chillet P (2006). *Immunologie*. Ellipses Ed. Paris. 384 p

Ferragu C & Tron I (2010). Pesticides et santé : état des connaissances sur les effets chroniques en 2009. *ORS Bretagne*. 120 p

Ferry R (2007). Fichier [Malassez] version 1. 35 p

Filipov N, Pinchuk LM, Boyd BL & Crittenden PL (2005). Immunotoxic effects of short-term atrazine exposure in young male C57BL/6 mice. *Toxicol Sci* . 86(2); 324-332.

- Fournier E & Bonderf J (1983).** Les produits antiparasitaires à usage agricole; Conditions d'utilisation et toxicologie. Technique et Documentation (Lavoisier). Paris. 333p
- Fournier M, Friberg J, Girard D, Mansour S & Krzystyniak K (1992).** Limited immunotoxic potential of technical formulation of the herbicide atrazine (AAtrex) in mice. *Toxicol Lett* . 60(3); 263-274.
- Gandhi r, Wandji s A & Snedeker S (2000).** Critical Evaluation of Cancer Risk from 2, 4-D. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* vol. 167, p. 1–33.
- Gautier GL (2008).** Pesticides, danger ! Effets sur la santé et l'environnement. Publication sans but lucratif / Reproduction possible soumise à autorisation. p18-19.
- Goldsby et al (2000).** *Immunotoxicology and Immunopharmacology"*, Second Edition, Raven Press, Ltd, New York, pp 19-30.
- Hamadi N (2010).** Effet du resveratrol sur les défenses antioxydantes chez les rats rendus diabétiques par l'injection de la streptozotocine. Université Mentouri Constantine. 64 p
- Handy R & Galloway T (2003).** Immunotoxicity of organophosphorus pesticides. *Ecotoxicology*, 12(1-4):345-363.
- Inra-Cemagref (2005).** Expertise Scientifique collective, pesticides agriculture et environnement réduire l' utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux. 64 p
- Inra-Cemagref (2006).** Chapitre 2 Connaissances de l'utilisation des pesticides. In pesticides agriculture et environnement . Rapport d'expertise scientifique collective. 61 p
- Kouassi É, Revillard J-P, Fournier M, Ayotte P, Roy R, Brousseau P & Hadji L (2003).** Système immunitaire. In: Environnement et santé publique - Fondements et pratiques . Edisem / Tec & Doc, Acton Vale / Paris. PP 687-698.
- Lee K, Johnson V L & Blakley BR (2001).** The effect of exposure to a commercial 2,4-D formulation during gestation on the immune response in CD-1 mice. *Toxicology*, vol. 165 (1), p 39-49.
- Lee WJ, Son M, Chun BC, Park ES, Lee HK, Coble J & Dosemeci M (2008).** Cancer mortality and farming in South Korea: an ecologic study. *Cancer Causes Control*. 19(5); 505-513.
- Li Q & Kawada T (2006).** The mechanism of organophosphorus pesticide-induced inhibition of cytolytic activity of killer cells. *Cellular and Molecular Immunology*. 3(3); 171-178.
- L'ster MI (1993).** "Risk Assessment in Immunotoxicology: II. Relationships Between Immune and Host Résistance Tests", *Fundamental and Applied Toxicology*, 21: 71-82

Lounis S, Mellouki H & Rebiai R (2011). L'effet des pesticides sur le système immunitaire. Université de 08 Mai 1945-Guelma. 52 p

Lydyard P, Whelam A & Fanger MW (2002). L'essentiel en immunologie. Berti Ed. Paris. 384 p

Madsen C, Claesson MH & Ropke C (1996). Immunotoxicity of the pyrethroid insecticides deltamethrin and alpha-cypermethrin. *Toxicology*, 107(3):219-27.

Male D (2005). Introduction to the immune system. In: *Immunology* (6th ed.). Roitt I., Brostoff J., and Male D. (eds.), Harcourt Publishers, London, pp.1-12.

Marie N & Kolopp S (2009). Les immunoglobulines et leurs fonctions. Centre de Biologie Lyon Sud. 39 p

Maysaloun M (2008). Etude de l'impact de l'exposition à des mélanges de pesticides à faibles doses : caractérisation des effets sur des lignées cellulaires humaines et sur le système hématopoïétique de Toulouse, France. 140 p

Mehmet A, Otruan et Jean-Marie M (2007). Pesticide impacts environnementaux : gestion et traitement. Vol: 42 (2), 55p

Mehmet RS, Sahin H, Dulger H & Algum E (2000). The effects of dietary treatment on erythrocyte lipid peroxidation, SOD and serum lipid peroxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clinical biochemistry*.33(8):669-674.

Newcombe DS (1992). "Immune Surveillance, Organophosphorus Exposure, and Lymphomagenesis", *The Lancet*. February 29, 339: 539-541.

Npajon (2011). Pesticides et santé «Pesticides et cancers chez les agriculteurs». La Recherche n°436. 61 p

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

Olgun S (2004). Immunotoxicity of Pesticide Mixtures and the Role of Oxidative Stress. University in partial fulfillment of the requirements for the degree. Blacksburg, Virginia. 148 p

Onil S & Louis S-L (2001). Guide de prévention pour les utilisateurs de pesticides en agriculture maraîchère. 92 p

Onil & Louis S-L (2006). Profil toxicologique du 2,4-d et risques à la santé associés à l'utilisation de l'herbicide en milieu urbain. Institut national de santé publique du Québec. 54 p

Parham P (2003). Le système immunitaire. De Boeck Ed. Bruxelles. Paris 407 p

- Petr J, Seamus J, Bennis R & Ivan M (2008).** Fonction de l'immunologie. De Boeck Ed. Bruscelle, Paris. 452 p.
- Quillien J-F (2002).** Les antioxydants dans l'alimentation. Institut National de la Recherche Agronomique – France. 28 p
- Rabhi H (2008).** Manuel D'immunologie. Office des Publication Universitaires. Tom 3. Ben Aknoun. 181 p
- Ramade F (2002).** Dictionnaire encyclopédique de l'écologie et des sciences de l'environnement. Dunod. 1076 p.
- Rodgers K & Ellefson DD (1990).** Modulation of respiratory burst activity and mitogenic response of human peripheral blood mononuclear cells and murine splénocytes and peritoneal cells by malathion. *Fundam Appl Toxicol*, 14(2):309-317
- Rodgers K & Xiong S (1997).** Contribution of inflammatory mast cell mediators to alterations in macrophage function after Malathion administration. *Int J Immunopharmacol*, 19(3):149-156.
- Rowe AM, Brundage KM & Barnett JB (2007).** In vitro atrazine-exposure inhibits human natural killer cell lytic granule release. *Toxicol Appl Pharmacol*. 221(2); 179-188.
- Sténuit J & Van Hammée M-L (2005).** Aperçu sur l'épidémiologie des pesticides. 51 p
- Taylor JR, Selhorst JB, Houff SA & Martinez AJ (1978).** Chlordecone intoxication in man. I. Clinical observations. *Neurology*. 28(7); 626-630.
- Tellier S (2006).** Les pesticides en milieu agricole : état de la situation environnementale et initiatives prometteuses. 90 p
- Thomas PT, Ratajczak HV, Eisenberg WC, Furedi-Machacek M, Ketels K & Barbera PW (1997).** Evaluation of host resistance and immunity in mice exposed to the carbamate pesticide aldicarb. *Fundam Appl Toxicol*, Vol 9: 82-89.
- Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P, Guillette L J, Jegou B, Jensen TK, Jouannet P, Keiding N, Leffers H, McLachlan JA, Meyer O, Muller J, Rajpert-De Meyts E, Scheike T, Sharpe R, Sumpter J & Skakkebaek NE (1996).** Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect* . Vol 4; p741-803.
- Wassmann S, Wassmann K & Nickenig G (2004).** Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hyperten* .Vol 44: 381-386.

RESUMES

Résumé

Les pesticides sont des composés chimiques utilisés pour lutter contre des organismes nuisibles dans l'agriculture et également dans d'autres secteurs (usage domestique). Malgré cet usage bénéfique, il a été prouvé que l'exposition aux pesticides provoque des dommages au système immunitaire.

Dans ce contexte, nous avons essayé d'évaluer l'effet toxique de différents pesticides (Tilt, Zoom et Granstar) sur le système immunitaire par le biais du stress oxydant comme mécanisme de toxicité.

La toxicité a été étudiée expérimentalement chez des souris femelle blanches. Ces souris sont traitées par voie intra-péritonéale une seule fois par jour pendant trois jours à raison de $\frac{1}{4}$ DL₅₀/10 ml / kg pour chaque pesticide utilisé. Les paramètres suivants sont étudiés : Le nombre des lymphocytes péritonéaux, changement du poids corporel et relatif des organes (rate, thymus et foie), le Glutathion réduit (GSH), la catalase (CAT) et l'MDA. Les résultats obtenus ont mis en évidence des altérations immunologiques traduites par une diminution du nombre des lymphocytes péritonéaux avec perturbation du poids relatif des organes et diminution du poids corporel des souris traitées par les pesticides. En outre, l'MDA dans les tissus des différents organes étudiés a été significativement augmenté, tandis que le GSH et la CAT ont été significativement diminués par rapport aux souris témoins.

On peut conclure que ces pesticides (Tilt, Zoom et Granstar) sont des produits immunotoxique grâce à leur effets néfaste sur les lymphocytes et leurs pouvoir de générer le stress oxydant.

Mots clés : Immunotoxicité, pesticides, stress oxydant.

ANNEXES

Annexe (1)

Les pesticides utilisés

-**Tilt 250 EC (250 g /l)** : produits fongicide systémique est un liquide homogène concentré applicable sous forme d'émulsion après la dilution dans l'eau utilisé contre les maladies qui touche le Blé tell que Rouilles et Septoriose, Oïdium, et les maladies qui touches l'orge tell que Oïdium, helminthosporiose, rynchossoriose ,leur matière active est le bropiconazolel , leur dose =0,50l/ha pour les deux et la dose létale 50% est : 2.5g/kg , la firme est Novartis.

-**Zoom WG (4,1+65,9%)** : produits herbicides de post levée conter les adventices dicotylédones au niveau de blé et d'orge sous forme de granule applicable après le dilitageet la dispersion dans l'eau, leur matière active est Triasulfuron+Dicamba et la dose =120g/ha et la DL% est : 5g/kg, la firme est Syngenta Crop Protection .

-**Granstar 75 DF. WG (75 g/l)** : est un nouvel herbicide de post levée pour lutter contre les dicotylédones dans les céréales sous forme de granule applicable après le dilitage et la dispersion dans l'eau, leur matière active est le tribunaron méthyl et la dose =12g/ha et la DL% est 5g/kg, la firme est Dupont.

Préparation des pesticides utilisés

Tilt: 250mg/kg (1/4 DL50) dissoudre dans 6ml NaCl.

Zoom : 600mg/kg (1/4 DL50) dissoudre dans 6ml NaCl.

Granstar : 600mg/kg (1/4 DL50) dissoudre dans 6ml NaCl.

Traxos : 250mg/kg (1/4 DL50) dissoudre dans 6ml NaCl.

Topik : 250mg/kg (1/4 DL50) dissoudre dans 6ml NaCl.

Préparation de produits et des réactifs utilisés

Solution du PBS Ph=7.2

NaCl	8g
Na ₂ HPO ₄	1.15g
KH ₂ PO ₄	0.2g
KCl	0.2g
H ₂ O distillé	1000ml

Le bleu de Coomassie

Dissoudre 100 mg de BBC dans 50 ml d'éthanol.

Agiter 2h.

Ajouter 100 ml d'acide phosphorique, puis mélanger.

Ajouter de l'eau distillé jusqu'à un 1L, mélanger.

Le réactif doit être filtré sur papier filtre avant utilisation.

Le tampon phosphate Ph=7.4

KH ₂ PO ₄ (0.1M)	1ml
Na ₂ HPO ₄ de (0.1M)	4ml

Préparation de réactif d'Ellman

DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque acid)	40mg
Méthanol	10ml

Le TBA 0.67%

TBA	675g
NaOH	100ml

Le TCA 20%

TCA	20g
Eau distillé	100ml

Annexe (2)

• Préparation de la gamme étalon du glutathion réduit

Une série de 5 concentrations standards de glutathion est préparée à partir d'une solution mère à 10mM. Pour la préparation de cette solution, on pèse 3.15 mg de glutathion réduit pour 10ml d'eau distillée. Le système de dilution de ces standards est donné dans le tableau 10. (Tableau 1)

• **Méthode de calcul** : La quantité de glutathion est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Glutathion réduit } (\mu\text{mol/mg de protéines}) = \frac{\text{DO test} \times 2 \times F \times [\text{standard}] (\mu\text{mol})}{\text{DO standard} \times 0.2 \times n}$$

Dont :

2 : Volume total du milieu réactionnel

F : Facteur de dilution de l'échantillon testé.

0.2: Volume utilisé de l'échantillon testé.

n : La quantité estimée en mg de protéines dans le volume utilisé de l'échantillon testé

Tableau 1 : la gamme du glutathion réduit standard :

Numéro des standards	Concentration du glutathion réduit	Volume du glutathion standard	Volume de diluant (eau distillée)
4	10 mM	50 μ l	0 μ l
3	5 mM	50 μ l	25 μ l
2	2.5 mM	25 μ l	25 μ l
1	1.25 mM	12.5 μ l	100 μ l
0	0 mM	0 μ l	50 μ l

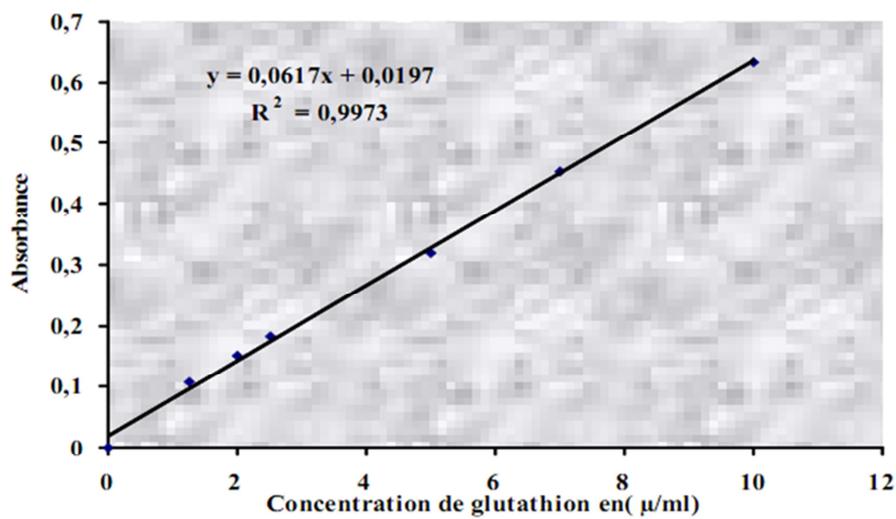


Figure 1 : Courbe d'étalonnage de Glutathion réduit GSH.

- **Préparation de la gamme étalon de l'ovalbumine:** Une série de 6 concentrations standards de l'albumine est préparée. (Tableau 2)

Tableau 2 : La gamme de standard.

	Blanc	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4	Tube 5	Tube 6
Solution standard (µl)	0	10	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	90	80	60	40	20	0
BBC (ml)	4	4	4	4	4	4	4
DO	0.011	0.156	0.234	0.356	0.506	0.752	0.817
La concentration mg/ml	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1

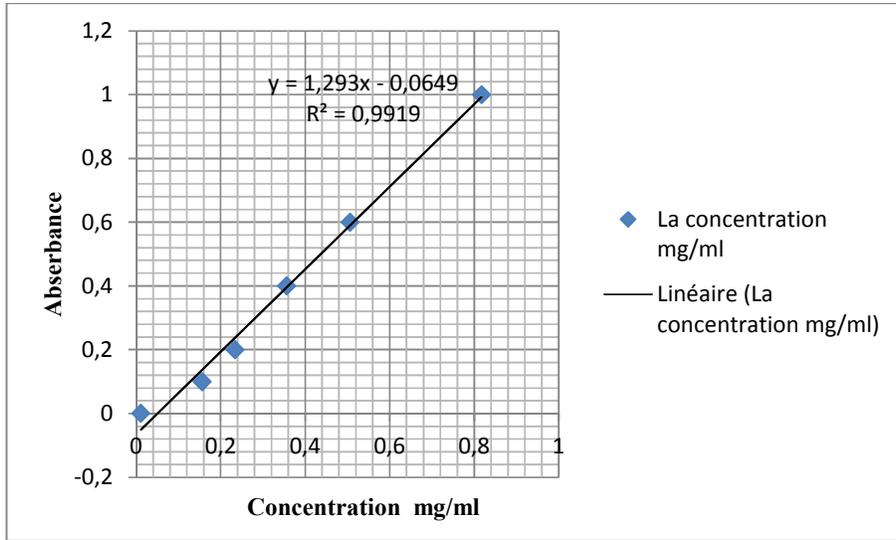


Figure 2 : Courbe d'étalonnage de standard (albumine).