

N° d'ordre :

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



UNIVERSITE DJILLALI LIABES
FACULTE DES SCIENCES
DE LA NATURE ET DE LA VIE
SIDI BEL ABBES

THESE
DE DOCTORAT EN SCIENCES

Présenté par:

Mme MEHDAOUI née SARSAR Fatima Zohra

Spécialité : Sciences biologiques

Option : Biochimie et santé

Intitulé

*Etude de l'effet immunomodulateur de la
Métribuzine et le Tribénuron-méthyle chez le
lapin ITELV/98 et effet antioxydant de Citrullus
colocynthis chez Saccharomyces cerevisiae*

Soutenu le : 09/10/2018

Devant le jury composé de :

<i>Président :</i>	<i>Pr ABBOUNI Bouziane</i>	<i>UDL-SBA</i>
<i>Examineurs :</i>	<i>Pr BELABID Lakhdar</i>	<i>Université de Mascara</i>
	<i>Pr MEDDAH Boumediène</i>	<i>Université de Mascara</i>
<i>Rapporteur:</i>	<i>Pr BENALI Mohammed</i>	<i>UDL-SBA</i>

Remerciements

Tout d'abord, je remercie DIEU le tout puissant de m'avoir donné le privilège et la chance d'étudier et de suivre le chemin de la Science comme je l'ai toujours souhaité.

Mes premiers remerciements iront à mon directeur de thèse Pr BENALI Mohamed (Professeur à l'université de Sidi Bel Abbes). Je vous remercie d'avoir cru en mes capacités, pour le temps et la patience que vous m'avez accordés tout au long de ces années en me fournissant d'excellentes conditions logistiques. Je garderai dans mon cœur votre générosité, votre compréhension et votre efficacité. Pour tout ce que vous m'avez donné, je vous remercie très sincèrement.

Mes sincères remerciements et ma gratitude vont aussi au Pr ABOUNI Bouziane (Professeur à l'université de Sidi Bel Abbes) pour avoir accepté de juger ce travail et de présider le jury de soutenance. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Je remercie le Pr BELABID Lakhdar (Professeur à l'université de Mascara) qui a accepté de juger ce travail en tant qu'examineur. Je lui adresse mes sentiments les plus respectueux. Qu'il trouve ici l'expression de ma respectueuse gratitude et mon profond respect.

Mes remerciements vont aussi au Pr MEDDAH Boumediène (Professeur à l'université de Mascara) pour avoir accepté d'examiner ce travail. Soyez assuré de mon entière reconnaissance avec l'expression de mes sincères remerciements.

Je remercie aussi tous les membres des Laboratoires de Biotoxicologie et de Microbiologie pour la sympathie et l'aide qu'ils m'ont témoignés durant ces années de dur labeur.

Je tiens à remercier M^r KACEM le gérant de l'animalerie (Sidi Lahcen) pour sa collaboration. Qu'il trouve ici ma profonde reconnaissance et mes profonds respects.

Enfin, je remercie sincèrement toutes les personnes qui m'ont aidé et encouragé pour faire aboutir ce travail, elles se reconnaîtront.

Dédicaces

Afin d'être reconnaissante envers ceux qui m'ont appuyé et encouragé à effectuer ce travail de recherche, je dédie cette thèse :

A MA CHERE MAMAN

qui est au ciel, je dédie ce travail. Sans ton courage je ne l'aurai jamais entrepris. Tu m'as toujours appris à aller de l'avant tout en gardant la tête haute. Toi qui était si fière de moi et qui ne le cachait pas sache qu'aujourd'hui je suis enfin arrivée à accomplir ton rêve et que tes sacrifices n'ont pas été vains. Ma reconnaissance et mon amour pour toi maman n'ont pas de limite. Repose en paix chère maman que dieu le tout puissant puise t'accorder sa sainte miséricorde.

Encore une fois MERCI maman.

A MON CHER PAPA

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je te porte, ni la profonde gratitude que je te témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que tu n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être. Que Dieu tout puissant te garde et te procure santé, bonheur et longue vie pour que vous demeuriez le flambeau illuminant le chemin de vos enfants.

Je t'aime papa.

A MON CHER MARI MOKHTAR

Merci d'avoir donné un sens à ma vie. Merci pour ton amour, ton soutien et tes encouragements qui ont toujours été pour moi d'un grand réconfort. Merci pour ta gentillesse et ton sens du sacrifice.

Je t'aime tout simplement.

A MA PETITE PRINCESSE SERINE

Avant même que mes yeux ne te voient ma chérie, mon amour et mon affection pour toi n'ont pas cessé de s'accroître de jour en jour. Ton sourire illumine ma vie et la rend plus joyeuse et pleine de sens. Tu as partagé avec moi cette aventure avant même ta naissance et tu continues à la vivre avec moi chaque instant. Que DIEU le tout puissant te garde pour tes parents qui t'adorent

Je t'aime ma puce.

A MA CHERE PETITE SŒUR SARAH

Votre aide, votre générosité, votre soutien ont été pour moi une source de courage et de confiance. Qu'il me soit permis aujourd'hui de vous assurer mon profond amour et ma grande reconnaissance.

J'implore Dieu qu'il vous apporte bonheur, et vous aide à réaliser tous vos vœux.

A MA BELLE FAMILLE

Vous êtes la seconde famille pour moi; vous m'avez accueilli dans votre maison pendant des années et vous m'avez traité comme votre fille.

Merci pour toute votre aide durant ce parcours.

A MES CHERS ANCLÉS, TANTES, COUSINS ET COUSINES

Veuillez accepter l'expression de ma profonde gratitude pour votre soutien, encouragements. Avec tout mon estime, affection et respect, je vous souhaite santé, bonheur et prospérité.

A MES CHERS AMIS

Qui font partie de ces personnes rares par leur gentillesse, leur tendresse et leurs grands cœurs. Qu'elles trouvent ici, le témoignage de tout mon amour et toute ma reconnaissance pour leur inlassable soutien. Je vous souhaite une vie pleine de réussite, de santé et de bonheur.

A tous ceux ou celles qui me sont chers et que j'ai omis involontairement de citer.

A Tous Mes enseignants tout au long de mes études.

A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Résumé

Des lapins males de souches ITELV 98 âgées de 2 à 3 mois sont alimentés Ad libitum en pesticides dans l'eau. La métribuzine utilisée à des concentrations de 1 µg/l et 2 µg/l n'entraîne aucune modification des poids ni de la prise alimentaire des animaux expérimentés. En effet, au cours du traitement des animaux par la Métribuzine le poids du groupe percevant 1 µg/l présente une évolution de poids (2133,33±47,17g à 5225±29,64g) comparable à celle du témoin (2094±14,97g à 5398g±58,62g). L'utilisation d'une dose plus élevée de 2 µg/l de Métribuzine ne modifie aucunement les poids de ce groupe. Le Tribénuron-méthyl utilisé aussi dans les mêmes concentrations ne modifie pas l'évolution pondérale ni la prise alimentaire des lapins expérimentés. Le groupe percevant 1 µg/l de cet herbicide présente une variation de poids de 2115,50±72,30g à 5166±108,14g qui reste comparable à celle du lot témoin. L'évaluation des IgG de lapin anti ovalbumine par la technique ELISA non compétitive montrent une diminution de leur taux chez tous les groupes expérimentaux et témoignent d'un effet immunomodulateur probable. L'utilisation de la Métribuzine chez *S. cerevisiae* a permis de montrer un effet oxydant qui à la concentration de 1.4 µg/ml (10 x LMR) entraîne une réduction du nombre cellulaire de 50% correspondant à l'IC50. Le pourcentage d'inhibition de 50% du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) est obtenu avec 1,5 mg/ml d'extrait éthanolique de pulpe de coloquinte (EEPco) et 0,76 mg/ml d'acide ascorbique utilisé comme antioxydant de référence. Aussi la concentration de 3,70 mg/ml d'extrait éthanolique de graine de coloquinte (EEGco) inhibe 50% du radical DPPH comparée à celle de l'acide ascorbique qui est seulement de 0,19 mg/ml. Les levures stressées par la métribuzine à la IC50 et en présence d'EEGco donnent un taux de survie de 63±2% ou un taux d'inhibition de 37±2%. Les levures stressées par la métribuzine à la IC50 en présence d'EEPco donnent un taux de survie de 56±1% correspondant à une inhibition de 44±1%. L'augmentation significative de la viabilité de *S. cerevisiae* témoigne du pouvoir protecteur de *C. colocynthis*.

Mots clés: lapins, Métribuzine, Tribénuron-méthyl, évolution pondérale, prise alimentaire, IgG anti-ovalbumine, ELISA, *S. cerevisiae*, *C. colocynthis*.

Summary

Male rabbits of ITELV 98 strains aged 2 to 3 months are fed Ad libitum pesticides in water. Metribuzin used at concentrations of $1\mu\text{g} / \text{l}$ and $2\mu\text{g} / \text{l}$ does not lead to any change in weight or feed intake of experimental animals. Indeed, during the treatment of animals with Metribuzin, the weight of the group receiving $1\mu\text{g} / \text{l}$ shows a change in weight ($2115,50\pm 72,30\text{g}$ at $5225\text{g} \pm 29.64$) comparable to that of the control ($2094 \pm 14.96\text{g}$ at $5398\text{g} \pm 58.62$). The use of a higher dose of $2\mu\text{g} / \text{l}$ of Metribuzin does not alter the weights of this group. Tribenuron-methyl also used in the same concentrations does not modify the weight change or food intake of experienced rabbits. The group perceiving $1\mu\text{g} / \text{l}$ of this herbicide has a weight variation of $2115,50\pm 72,30\text{g}$ to $5166\text{g} \pm 108.14$ which remains comparable to that of the control group. The evaluation of anti-ovalbumin rabbit IgG by the non-competitive ELISA technique showed a decrease in their level in all the experimental groups and showed an immunomodulatory effect. The use of metribuzin in *S. cerevisiae* has shown an oxidizing effect which at a concentration of $1.4\mu\text{g} / \text{ml}$ ($10 \times \text{MRL}$) results in a 50% reduction in the cellular number corresponding to the IC₅₀. The 50% inhibition percentage of the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical is obtained with $1.5\text{mg} / \text{ml}$ of ethanol extract of colocynth pulp (EEPco) and $0.76\text{mg} / \text{ml}$ of ascorbic acid used as reference antioxidant. Also the concentration of $3.70\text{mg} / \text{ml}$ ethanolic colocynth seed extract (EEGco) inhibits 50% of the DPPH radical compared to that of ascorbic acid which is only $0.19\text{mg} / \text{ml}$. Yeasts stressed by metribuzin at IC₅₀ and in the presence of EEGco give a survival rate of $63 \pm 2\%$ or an inhibition rate of $37 \pm 2\%$. The yeasts stressed by metribuzin at IC₅₀ in the presence of EEPco give a survival rate of $56\pm 1\%$ corresponding to a $44\pm 1\%$ inhibition. The significant increase in the viability of *S. cerevisiae* testifies to the protective power of *C. colocynthis*.

Key words: rabbits, metribuzin, tribenuron-methyl, weight change, food intake, anti-ovalbumin IgG, ELISA, *S. cerevisiae*, *C. colocynthis*.

ملخص :

تمت تغذية ذكور الأرانب من سلالة إيتالف 98، تتراوح أعمارهم من شهرين إلى ثلاثة أشهر بالمبيدات الحشرية في الماء. الميترابيوزين المستخدمة بتركيزات 01 ميكروغرام/لتر و 02 ميكروغرام/لتر لا يؤدي إلى أي تغير في الوزن أو تناول الأعلاف من طرف الحيوانات التجريبية. في الواقع أنه أثناء علاج الأرانب بالميتربيوزين فإن وزن المجموعة التي تناولت 01 مكغ/ل أظهرت زيادة في الوزن ($47,17 \pm 2133,33$ غ إلى 5225 ± 29.64 غ) بالمقارنة بالمجموعة الشاهد (2094 ± 14.67 غ إلى 5398 ± 58.62 غ). استعمال تركيز أعلى 02 مكغ/ل من الميترابيوزين لم يغير على الإطلاق في وزن هاته المجموعة. تريبينورون ميثيل المستعمل في نفس التركيزات لم يغير في زيادة الوزن ولا في تناول الأعلاف للأرانب التجريبية. المجموعة التي تناولت 01 مكغ/ل من هذا المبيد الحشري أظهرت تغير في الوزن من $2115,50 \pm 72,30$ غ إلى 5166 ± 108.14 غ الذي يبقى قابلاً للمقارنة مع المجموعة الشاهد. تقييم الأجسام المضادة IgG للأرانب ضد ألبومين البيض بتقنية إليزا ELISA الغير تنافسية أظهر انخفاض في جميع المجموعات التجريبية مما يدل على تأثير مناعي محتمل.

وقد أظهر استعمال الميترابيوزين في خميرة الخبز تأثير مؤكسد في تركيز 01.4 ملغ/مل (10 مرات الحدود القصوى للبقايا) بسبب انخفاض عدد الخلايا بنسبة 50% موافقة لتركيز التثبيط. تم الحصول على نسبة التثبيط لـ 50 % من DPPH الراديكالي (2.2 – ثنائي الفيلين – 1 - picrylhydrazyle) مع 1.5 ملغ/مل من المستخلص الكحولي للخبز الحنظل و 3.70 ملغ/مل من المستخلص الكحولي لخبز الحنظل يتبط 50 % من راديكال DPPH مقارنة بالحمض الأسكوربيك الذي لا يتعدى 0.19 ملغ/مل. الخمائر المتوترة بالميتربيوزين بتركيز التثبيط 50 % وبحضور المستخلص الكحولي للخبز الحنظل تعطي معدل بقاء بـ 63 ± 2 % أو معدل تثبيط بـ 37 ± 2 % . الخمائر المتوترة بالميتربيوزين بتركيز التثبيط 50 % وبحضور المستخلص الكحولي لخبز الحنظل تعطي معدل بقاء بـ 56 ± 1 % مقابل معدل تثبيط بـ 44 ± 1 % . الزيادة الكبيرة في استدامة خمائر الخبز تشهد على قوة حماية الحنظل.

الكلمات المفتاحية :

الأرانب ، ميترابيوزين، تريبينورون ميثيل، تغيرات الوزن، تناول الطعام، الأجسام المضادة IgG ضد ألبومين البيض، إليزا ELISA، خميرة الخبز، الحنظل .

SOMMAIRE

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

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : *Les pesticides*

I.1 Pesticides.....	4
I.1.1 Généralité.....	4
I.1.2 Classification des pesticides	5
I.2 Les herbicides	5
I.2.1 Métribuzine.....	6
I.2.1.1 Généralité	6
I.2.1.2 Propriété physico-chimiques	6
I.2.1.3 Utilisation	7
I.2.1.4 Mode d'action.....	8
I.2.2 Tribénuron-méthyl	8
I.2.2.1 Généralité	8
I.2.2.2 Propriété physico-chimiques	8
I.2.2.3 Utilisation	9
I.2.2.4. Mode d'action.....	10
I.3 Utilisation des pesticides.....	10
I.3.1 Dans le monde et dans les pays de l'Union Européenne	10
I.3.2 En Algérie	12
I.4 Contamination des milieux	13
I.4.1 Contamination des eaux.....	13
I.4.2 Contamination de l'air	14
I.4.2.1 Les pertes à l'épandage	14
I.4.2.2 La volatilisation.....	15
I.4.2.3 L'érosion éolienne	15
I.4.3 Contamination des sols	16
I.4.4 Contamination des aliments.....	16
I.4.5 Exposition de la population générale aux pesticides	16
I.5 Toxicité chronique des pesticides	18
I.5.1 Cancérogénicité	18
I.5.2 Reprotoxicité.....	20

I.5.2.1 Effet sur la fertilité	20
I.5.2.2 Effets sur le développement	21
I.5.3 Effets perturbateurs endocriniens	21
I.5.4 Neurotoxicité	22
I.5.5 Immunotoxicité.....	24
I.6 Réglementation	25
I.7 Indices toxicologiques	26
I.7.1 Résidus toxicologiques	26
I.7.2 Limite maximale de résidus (LMR).....	26
I.7.3 Dose journalière admise (DJA).....	27
CHAPITRE II : <i>Immunisation</i> , production d'anticorps et analyse immunochimique	
II.1 Les antigènes	28
II.1.1 Poids moléculaire	28
II.1.2 Utilisation des adjuvants.....	28
II.1.3 Utilisation des adjuvants de Freund	29
II.1.4 Voie d'injection de l'antigène	30
II.1.5 Dose d'antigène	30
II.2 Les Anticorps.....	31
II.2.1 Structure	31
II.2.2 Obtention d'anticorps polyclonaux	32
II.2.3 Choix de l'animal	32
II.2.4 Immunisation	33
II.3 Obtention du complexe Anticorps-Antigène.....	33
II.4 Affinité d'Anticorps	34
II.5 Méthodes immunochimiques.....	34
II.5.1 Méthodes sans marqueurs	34
II.5.1.1 Immunoprécipitation	34
II.5.1.2 mmunoagglutination	35
II.5.2 Méthodes utilisant un réactif marqué	35
II.5.2.1 Méthodes radio-immunologiques	35
II.5.2.2 Immunofluorescence	36
II.5.2.3 Méthodes immunoenzymatiques.....	36
II.5.2.3.1 Analyse en phase homogène.....	37
II.5.2.3.2 Analyse en phase hétérogène.....	38

II.5.2.3.2.1 Dosage immunochimique simple	39
II.5.2.3.2.2 Le dosage ELISA en « Sandwich ».....	40
II.5.2.3.2.3 le dosage ELISA par compétition	41
II.6 La technique ELISA	41
II.7 Modalités de dosage immunochimique	42
II.7.1 La phase solide	42
II.7.2 Les conjugués	42
II.7.2.1 Les enzymes	42
II.7.2.1.1 La peroxydase.....	42
II.7.2.1.2 La phosphatase alcaline	43
II.7.2.1.3 β –galactosidase.....	43
II.7.2.1.4 α -Amylase.....	44
II.7.2.2 Procédés de couplage d'anticorps avec des enzymes	44
II.7.2.2.1 procédé en un temps	44
II.7.2.2.2 Procédé en deux temps	44
II.7.2.3 Les agents de couplage	44
II.7.2.3.1 Couplage par le glutaraldéhyde	44
II.7.2.3.2 Couplage par le periodate de sodium	45
II.7.2.3.3 Couplage par le dimaléinide	45
II.7.2.3.4 Couplage par la <i>p</i> -benzoquinone	45
II.7.2.3.5 Système avidine-biotine	45
II.7.3 Les substrats	45
CHAPITRE III : <i>Plyphénols</i> : structure et propriétés antioxydantes	
III.1 Les composés polyphénoliques.....	47
III.1.1 Classification des polyphénols	47
III.1.1.1 Flavonoïdes	47
III.1.1.2 Les tanins	51
III.1.1.3 Les acides phénols	52
III.2 Activité antioxydante	52
CHAPITRE IV : <i>La coloquinte, citrillus colocynthis</i>	
IV.1 Classification botanique.....	55
IV.2 Noms vernaculaires.....	55
IV.3 Description morphologique.....	56
IV.4 Origine et distribution	56

IV.5 Composition chimique	57
IV.5.1 La pulpe	57
IV.5.2 Les graines	58
IV.5.3 Les tiges, les feuilles et les fleurs.....	59
IV.5.4 Les racines	60
IV.6 Effets thérapeutiques.....	61
IV.7 Toxicité de <i>Citrullus colocynthis</i>	62

CHAPITRE V : *Modèle biologique Sccharomyces cerevisiae*

V.1 Saccharomyces cerevisiae	63
V.1.1 Principales caractéristiques de la levure Saccharomyces cerevisiae.....	63
V.1.1.1 Morphologie et métabolisme de la levure.....	63
V.1.1.2 Reproduction de la levure	64
V.1.1.2.1 Phases de croissance cellulaire.....	64
V.1.1.2.2 Cycle de vie	64
V.1.2 Conditions de culture	66
V.2 Impact des différents stress des procédés industriels sur <i>S. cerevisiae</i>	67
V.3 Interaction <i>S. cerevisiae</i> - pesticides	67

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE VI : *Matériels et méthodes*

VI.1 Effet immunotoxique de deux pesticides chez le lapin.....	70
VI.1.1 Animaux et aliments	70
VI.1.2 Consommation de pesticides.....	70
VI.1.3 Immunogènes et immunisation des animaux.....	70
VI.1.4 Prélèvement sanguin	71
VI.1.5 Optimisation du test ELISA pour le dosage des IgG anti-ovalbumine.....	71
VI.1.5.1 Produits et réactifs chimiques.....	71
VI.1.5.2 Principe du test ELISA	71
VI.1.6 Différentes étapes de la technique ELISA	72
VI.1.6.1 Coating de la solution antigénique d'Ovalbumine	72
VI.1.6.2 Saturation des sites adsorbant (surcoating)	72
VI.1.6.3 Incubation avec l'antisérum (AS) de lapin anti ovalbumine	72
VI.1.6.4 Incubation avec la solution du conjugué	72
VI.1.6.5 Addition de tampon de révélation et lecture.....	72
VI.1.7 Détermination des dilutions optimales de titrage.....	73

VI.1.8 Analyse statistique	73
VI.2 Etude de l'effet oxydant de la métribuzine	73
VI.2.1 Préparation la gamme de la métribuzine 70%	73
VI.2.2 Etude chez <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	74
VI.2.2.1 Purification de la souche <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	74
VI.2.2.2 Traitement des levures par la métribuzine.....	75
VI.2.2.3 Détermination de la concentration inhibitrice de 50%	76
VI.3 Evaluation du pouvoir antioxydant de la Coloquinte (<i>Citrullus colocynthis</i>)	77
VI.3.1 Préparation des extraits éthanoliques de <i>C. colocynthis</i>	77
VI.3.1.1 Matériel végétal	77
VI.3.1.2 Mode opératoire.....	77
VI.3.2 Détermination de l'activité antioxydante des substrats	78
VI.3.2.1 Test de piégeage du radical libre DPPH.....	78
VI.3.2.2 Test de la réduction du fer FRAP (Ferric <i>reducing</i> antioxidant power)...	78
VI.3.3 Implication des extraits éthanoliques de <i>C. colocynthis</i> dans la résistance de <i>S. cerevisiae</i> face à un stress induit par la métribuzine à la IC50.....	79
CHAPITRE VII : Résultats et discussions	
VII.1 Evolution pondérale des animaux traités à la Métribuzine.....	80
VII.2 Evolution pondérale des animaux traités au Tribénuron-méthyl.....	81
VII.3 Evaluation du taux des immunoglobulines IgG par la technique ELISA indirecte non compétitive	82
VII.3.1 Détermination des conditions optimales de titrage par ELISA	82
VII.3.2 Détermination des IgG des différents groupes expérimentaux	83
VII.4 Extraits éthanoliques de <i>citrullus colocynthis</i>	87
VII.4.1 Détermination du rendement des extraits bruts éthanoliques.....	87
VII.4.2 Détermination de l'activité antioxydante de <i>C. colocynthis</i>	88
VII.5 Etude de la viabilité de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	90
VII.5.1 Comptage des colonies après traitement par la Métribuzine	90
VII.5.2 Adaptation de <i>S. cerevisiae</i> à la Métribuzine en présence d'extrait éthanolique de pulpe (EEPco) et de graine (EEGco) de coloquinte	92
Conclusion.....	94
Références bibliographiques	

Liste des figures

Figure 1: structure chimique de la Métribuzine	7
Figure 2: structure chimique du Tribunéron-méthyl	9
Figure 3: Répartition mondiale des produits phytosanitaires par catégories de produits utilisés en 2005	11
Figure 4: Consommation des trois grandes familles d'activités de pesticide en Europe	11
Figure 5: Pesticides les plus utilisés en Algérie	12
Figure 6: Devenir des pesticides dans l'environnement après application	13
Figure 7: Transfert des pesticides vers l'atmosphère	14
Figure 8: Voies de contamination des milieux et d'exposition de la population aux pesticides...	17
Figure 9: Structure d'une IgG	31
Figure 10: Méthodes Immunofluorescence directe et indirecte	36
Figure 11: principe d'un dosage par compétition en phase homogène	37
Figure 12: principe d'un dosage par compétition en phase hétérogène	38
Figure 13: Principe du test ELISA directe	39
Figure 14: Immunodétection indirecte simple d'antigène.....	40
Figure 15: principe d'un dosage par extration-saturation (technique sandwich).....	40
Figure 16: dosage ELISA par compétition.....	41
Figure 17: Structure de base des flavonoïdes.....	48
Figure 18: Structure des flavone (A) et flavonol (B)	48
Figure 19: Structure des Favan-3-ols (A) ; Flavan-3,4-diols (B) et Pelargonidol (C)	49
Figure20: Structure des Chalcones et Aurones	50
Figure 21: Biosynthèse des flavonoïdes.....	50
Figure 22: Structure chimique (a) d'un tanin condensé (proanthocyanidine) et (b) d'un gallotанин (1,2,3-tri-O-galloyl-β-D-glucose).....	51
Figure 23: Exemple de quelques acides phénols de la série benzoïque	52
Figure 24 : Exemple de quelques acides phénols de la série cinnamique.....	52
Figure 25 : Piégeage des espèces réactives oxygénées ROS (R•) par les flavonoïdes	53
Figure 26: Coloquinte <i>Citrillus Colocynthis</i>	56
Figure 27: Structure de la cucurbitacine E	57
Figure 28: Structure de l'acide linoléique	59
Figure 29: Structures de la quercétine et du kaempférol.....	60

Figure 30: Hiérarchie taxonomique de <i>S. cerevisiae</i>	63
Figure 31: Population de levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> observée au microscope optique et au microscope électronique à balayage	64
Figure 32: Cycle de vie de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	65
Figure 33: Préparation des différentes concentrations de Métribuzine.....	74
Figure 34: Utilisation des dilutions en cascade et d'ensemencement pour établir un nombre des cellules viables	76
Figure 35: Diagramme d'extraction éthanolique des graines et des pulpes de <i>C. colocynthis</i>	77
Figure 36: Influence des dilutions de l'As de lapin anti ovalbumine en fonction de la variation des concentrations d'antigène à la dilution 1/2000ème du conjugué.....	82
Figure 37: Influence des dilutions de l'As de lapin anti ovalbumine en fonction de la variation des concentrations d'antigène à la dilution 1/3000ème du conjugué.....	83
Figure 38: Taux d'IgG de lapin anti ovalbumine du groupe témoin et ceux consommant la Métribuzine à 0,1 ; 1 et 2µg/l	84
Figure 39: Taux d'IgG de lapin anti ovalbumine du groupe témoin et ceux consommant le Tribénuron-méthyle à 0,1 ; 1 et 2µg/l	85
Figure 40: Effet inhibiteur de l'extrait éthanolique de pulpe de <i>C. colocynthis</i> sur le radical DPPH.....	89
Figure 41: Effet inhibiteur de l'extrait éthanolique de graine de <i>C. colocynthis</i> sur le radical DPPH.....	90
Figure 42: Détermination de l'IC50 de la Métribuzine vis-à-vis de <i>S. cerevisiae</i>	92

Liste des tableaux

Tableau 1 : Différents types d'adjuvant utilisé	29
Tableau 2: Méthodes utilisant un marqueur	35
Tableau 3: Principales enzymes utilisées comme marqueurs en immunoanalyse	43
Tableau 4: Gamme de métribuzine à 70%	73
Tableau 5: les dilutions décimales pour l'obtention entre 30 et 300 cellules à partir de la DO_{600nm}	76
Tableau 6: Evolution des poids des animaux au cours de l'ingestion de Métribuzine (le test t de Student est utilisé pour comparer les différents groupes).....	80
Tableau 7: Evolution des poids des animaux au cours de l'ingestion de Tribénuron méthyl.....	81
Tableau 8: Rendement des extrait bruts éthanoliques de la pulpe et des graines de <i>Citrullus colocynthis</i>	87
Tableau 9: Comptage des colonies après traitement par la Métribuzine.....	91
Tableau 10: Taux de survie de la souche <i>S. cerevisiae</i> vis-a vis d'un stress oxydant induit par la métribuzine à la DL50 en présence et absence d'EEPco et EEGco	93

Liste des abréviations

Ac	Anticorps
Ac-Ag	réactivité antigène anticorps
ACF	Adjuvant Complet de Freund
Ag	Antigène
AIF	Adjuvant Incomplet de Freund
CAS	<u>Chemical Abstracts Service</u>
DBPC	1,2-dibromo-3-chloropropane
DDA	Acide 2,2 bis-parachlorophényl acétique
DDD	Dichloro Diphényl Dichloroéthane
DDE	Dichloro Diphényl Dichloro Ethylène
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthan
DJA	Dose Journalière Admissible
DSEO	Dose Sans Effet Observé
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EMIT	Enzyme Multiplied Immunoassay Technique
FAO	Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
FSH	Follicle-stimulating Hormone
Ig G	immunoglobulines Gammas
ITELV	Institut Technique d'Élevage
IUPAC	Union Internatinal de Chimie Pure et Appliquée
KDa	Kilo Dalton
LMR	Limite Maximale de Résidu
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OPD	Ortho-phényle-diamine
PBS	Phosphate buffered saline
PCP	Pentachlorophénol
PM	Poids Moléculaire
PNP	Paranitrophénol
PNPP	p-nitrophenyl phosphate
RIA	radioimmunoassay
°C	Degré Celsius
AS	Anti sérum
rpm	Tours par minute
UFC	Unité formant des colonies
DO_{600nm}	Densité optique à 600 nm
IC50	Concentration d'inhibition 50%
DPPH	(2,2 DiPhenyle-1-Picryl-Hydrazyle

INTRODUCTION

Introduction

Le régime alimentaire est une source importante d'exposition aux pesticides et à leurs traces très dangereuses présentes dans les denrées. Afin de minimiser l'exposition humaine aux résidus de pesticides, des contrôles réglementaires concernant leur utilisation et le niveau de leurs résidus doivent être établis. Mais malgré la conscience publique du risque provenant de cette exposition et les divers incidents alarmants, et quoi qu'il en soit, ces produits phytosanitaires resteront, dans le cadre d'une politique productiviste pour les pays en voie de développement et à des fins et des volontés exportatrices pour les pays développés, une des composantes essentielles de la production alimentaire. En effet, leur utilisation est toujours en croissance et de nouvelles matières actives sont continuellement et fréquemment introduites sur le marché ; les contrôles très récents indiquent une présence permanente et préoccupante de résidus et multirésidus contaminant les denrées diverses. Par conséquent l'examen de ces résidus et de leurs effets demeure une nécessité. Le souci majeur des pays en développement reste l'autosuffisance alimentaire pour rompre avec des dépendances de plus en plus pesantes. En conséquence, l'agriculture doit intensifier sa production et cela passe par l'utilisation accrue de fongicides et autres substances chimiques. L'usage des pesticides s'accompagne toutefois d'une contamination des écosystèmes terrestres et aquatiques (CGDD, 2015 ; Vernier, Rousset, 2014 ; Rappe, 1992).

D'après certaines études mondiales, 64 % des fruits et 35 % des légumes que nous consommons contiennent des résidus de pesticides, et 6% de ces produits ont une teneur en pesticides supérieure à la limite maximale de résidus (Aubertot, 2005).

Les pesticides sont plus au moins toxiques à l'égard de l'homme qui peut les absorber par contact (voie cutanée et voie oculaire), inhalation (voie respiratoire) ou ingestion (voie digestive). L'existence de cette toxicité impose de limiter voire d'éviter leur présence dans les aliments ainsi que le respect de règles strictes de manipulation (Béchaux et al, 2013 ; Calvet et al, 2005).

Les intoxications aiguës par les pesticides sont responsables d'une lourde mortalité mondiale et le pronostic varie selon le mode d'absorption, la nature des produits, les quantités absorbées et la dose du pesticide utilisé (Landier et al, 2013). Selon le rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé, le nombre annuel d'intoxications par pesticides est estimé entre 1 et 5 millions. Il est estimé que 99 % de ces intoxications mortelles sont enregistrées dans les pays en développement qui sont particulièrement touchés par ce fléau en raison d'un manque de réglementation et de systèmes de surveillance (Achour et al, 2014).

L'Algérie est classée parmi les pays qui utilisent de grandes quantités de pesticides avec 400 produits phytosanitaires homologués dont une quarantaine largement utilisées par les agriculteurs (**Bouziati, 2007**). L'état actuel des lieux révèle l'importation de produits avec des étiquetages sommaires qui n'évoquent rien lors d'un contrôle de visu et qui sont interdits dans les pays d'origine. La concentration de certaines molécules organochlorées dans l'eau de la région d'Alger (lindane, 2,4' et 4,4' DDT, 2,4' et 4,4' DDE) et des organophosphorés (diazinon, parathion), dépasse dans 30% des échantillons les valeurs guides préconisées par l'OMS (**Moussaoui et al, 2001**). Une enquête menée à l'échelle nationale sur la gestion des pesticides a montré que parmi les produits utilisés, les insecticides occupent une place prépondérante suivi des fongicides. Les herbicides et les nématicides sont faiblement représentés. Il ressort de l'étude que les agriculteurs utilisent une gamme assez large de pesticides regroupant 109 spécialités (**Kheddam-Benadjal, 2012**).

En Algérie, les pratiques phytosanitaires des serristes maraîchers et des agriculteurs en général, sont mauvaises et potentiellement nuisibles à la santé des applicateurs, des consommateurs et de l'environnement (**Belhadi, 2016 ; Madani et al, 2016**). De nombreux pesticides provoquent chez l'homme ou chez différentes espèces des réactions d'immunosuppression (**Anderson et al, 2010 ; Keil et al, 2009**) d'hypersensibilité (**Instanes, 2006 ; Fukuyama, 2011**) et d'autoimmunité (**Sobel, 2005 ; Gu, 2009**).

Des études récentes indiquent que l'exposition aux pesticides produit le stress oxydant par la génération des radicaux libres qui sont des dérivés instables et toxiques qui réagissent et dégradent l'ADN, les lipides et les protéines (**Mishra B, 2013**). Le stress oxydatif est le résultat de déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants (qui neutralisent les espèces réactives à l'oxygène (ROS) tels que la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase, le glutathion réduit, et la catalase (**Badraoui et al, 2007**).

Par conséquent, et face à cette dualité bénéfice-risque, la protection de la santé humaine contre l'exposition aux pesticides demeure une préoccupation majeure, et le problème de résidus toxiques reste d'actualité (**Jawich, 2006**).

Par ailleurs de nombreuses plantes de par leur composition en métabolites secondaires notamment peuvent être utilisées pour neutraliser les dégâts oxydants générés par les pesticides. Dans notre pays de nombreuses études ont concerné la coloquinte (*C. colocynthis*). Cette plante est utilisée en médecine traditionnelle et possède diverses propriétés thérapeutiques comme celles purgatives, anti-tumorale et immunostimulant (**Abdel-Hassan et al, 2000 ; Bendjeddou et al, 2003**), anti-inflammatoire et antioxydant (**Al-ghaithi et al,**

2004 ; Marzouk et al, 2010), Antirhumatismal (Boukef et al, 1982), laxative et contre les trouble urogénitaux, la leucémie, l'ictère, la fièvre, l'ascite, les désordres biliaires et les hémorroïdes (Ziyyat et al, 1997). Elle est utilisée contre les maladies hépatiques (Gebhardt, 2003) et l'extrait éthanolique du fruit exerce un effet anti-microbien et antifongique sur plusieurs genres de champignons (Gurudeeban et al, 2010) et les enquêtes ethnobotaniques ont montré qu'elle est utilisée dans le traitement du diabète (Roy et al, 2007 ; Bnouham et al, 2006 ; Benmehdi, 2000 ; Ziyyat et al, 1997). Pour toutes ces considérations nous avons utilisé cette plante pour corroborer ses nombreuses vertus thérapeutiques et confirmer le modèle levurien dans l'étude du stress oxydatif généré par la Métribuzine.

L'objectif de notre travail consiste donc à :

- évaluer le risque immunotoxique de deux pesticides, la Métribuzine et le Tribénuron-méthyl utilisant comme modèle expérimental le lapin ITELV/98.
- étudier l'effet oxydant de la métribuzine utilisée pour le traitement phytosanitaire de certaines cultures maraichères, à l'aide d'un modèle eucaryote expérimental levurien, *Saccharomyces cerevisiae*.
- évaluer le pouvoir antioxydant des extraits bruts de *citrullus colocynthis* sur l'adaptation de *Saccharomyces cerevisiae* au stress occasionné par la métribuzine à la DL50.

ETUDE

BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I
LES PESTICIDES

I.1 Pesticides

I.1.1 Généralités

Le mot pesticide est un terme générique utilisé pour désigner toute substance, naturelle ou de synthèse, capable de contrôler, de repousser ou de détruire des organismes vivants (microorganismes, animaux ou végétaux) ou de s'opposer à leur développement. Le vocal pesticide regroupe à la fois les produits phytopharmaceutiques destinés à un usage agricoles et les biocides anciennement dénommés pesticides à usage non agricole (**Vigouroux-Villard, 2006**).

Les pesticides représentent, de loin, les composés xénobiotiques les plus systématiquement introduits dans l'environnement et les plus largement utilisés sur les cultures les plus variées (**Amiard, 2011**). Les pesticides agricoles contribuent à augmenter la productivité agricole, mais posent dans le même temps des risques potentiels pour la santé humaine et l'environnement (**OECD, 2008**). L'Algérie est classée parmi les pays qui utilisent plus grandes quantités de pesticides, dont l'Association Algérienne pour la protection de l'environnement tire la sonnette d'alarme «L'Algérie est un grand consommateur de pesticides: 30000 tonnes sont épandues chaque année » (**Chiali, 2013**).

Chaque aliment est susceptible de contenir différents résidus de pesticides (**Amiard, 2011**). Le contrôle sanitaire des produits alimentaires occupent une place importante dans le programme des activités du Comité de santé publique de l'Accord partiel dans le domaine social et de la santé publique (**Council of Europe, 1992**). Les limites pour les résidus de pesticides présents dans les aliments devraient être subordonnées au contrôle et devraient tenir compte des limites internationales maximales recommandées pour les résidus de pesticides élaborées par la Commission du Codex Alimentarius (**FAO, 2001**).

Les pesticides peuvent être très nocifs, et ils sont soupçonnés de présenter un risque pour la santé de l'homme et pour son environnement en s'accumulant dans les écosystèmes. Ils sont en effet fréquemment mis en cause dans la dégradation de la qualité des eaux douces souterraines et des eaux côtières, de l'air et du sol, dans la réduction de la biodiversité terrestre constatée dans les zones agricoles et dans les milieux naturels contaminés ou bien encore dans des cas de surmortalité des abeilles et de baisse de production des ruches (**Aubertot, 2005**). L'accès des pesticides aux structures vivantes est soit volontaire (toxicologie expérimentale, suicide) soit involontaire (exposition accidentelle). On distingue généralement 3 modes principaux d'accès; inhalation (cas de vapeurs, aérosols), contact (application topique) (peau, muqueuses), ingestion (voie orale) (spontanée ou forcée, y

compris les actes criminels) (**Bounias, 1999**). Par ailleurs, de nombreuses études épidémiologiques suggèrent une corrélation entre l'utilisation professionnelle des pesticides et l'apparition de certaines pathologies dans les populations concernées. Des effets cancérigènes, neurotoxiques ou de type perturbation endocrinienne, des problèmes d'infertilité ou encore du système immunitaire affaibli sont plus fréquents chez eux (**Alavanja et al., 2004; Ascherio et al., 2006; Baldi et Lebailly, 2007**).

I.1.2 Classification des pesticides

Les pesticides peuvent être classés sur la base de leurs objectifs de ravageurs visés. Ces catégories sont décrites ci-dessous (**Freedman, 1995**):

- Les fongicides sont utilisés pour protéger les plantes et les animaux cultures de champignons.
- Les herbicides sont utilisés pour tuer les plantes adventices, de manière à libérer des plantes cultivées souhaitées de la concurrence.
- Les insecticides sont utilisés pour tuer les insectes nuisibles et les vecteurs de maladies humaines mortelles telles que le paludisme, la fièvre jaune, trypanosomais, la peste et le typhus.
- Les acaricides sont utilisés pour tuer les acariens, qui sont nuisibles en agriculture, et les tiques, qui peuvent transporter l'encéphalite de l'homme et des animaux domestiques.
- Les molluscicides sont utilisés contre les escargots et les limaces, qui peuvent être importants ravageurs des plantations d'agrumes et de jardins de légumes et de fleurs.
- Les nématicides sont utilisés pour tuer les nématodes, qui peuvent être importants parasites des racines des plantes cultivées.
- Les rodenticides sont utilisés pour lutter contre les rats, les souris, les gaufres et autres rongeurs nuisibles de l'agriculture de l'habitation humaine.
- Les avicides sont utilisés pour contrôler les oiseaux, qui sont parfois considérés comme des ravageurs dans l'agriculture.

Selon leur structure chimique, ils peuvent être organochlorés, organophosphorés, organostaniques, carbamates, benzimidazoles, triazoles, pyréthrinoïdes de synthèse, pyrimidines et autres.

I.2 Les Herbicides

Un produit herbicide est défini comme une préparation ayant la propriété de tuer les végétaux. Le terme « dés herbant » est un synonyme d'herbicide. En protection des cultures,

les herbicides sont employés pour lutter contre les adventices, ou mauvaises herbes, destinées à détruire ou à limiter la croissance des végétaux, qu'ils soient herbacés ou ligneux. Ils peuvent être utilisés, selon leur mode d'action, en pré ou post-levée. On distingue:

- Les désherbants sélectifs, les plus nombreux.
- Les débroussaillants et désherbants totaux.
- Les défanants qui détruisent la partie aérienne des végétaux. Ils sont par exemple utilisés pour la récolte mécanique de la pomme de terre ou de la betterave.
- Les anti-germes, qui empêchent le démarrage de la végétation de, par exemple, les oignons ou pommes de terre destinés à l'alimentation.

I.2.1 Métribuzine

I.2.1.1 Généralités

La métribuzine ($C_8H_{14}N_4OS$) est une substance phytosanitaire du groupe triazinone, à usage d'herbicide de certaines graminées et de nombreuses dicotylédones et sélectif des cultures de pomme de terre, de tomate, d'asperge, d'artichaut. Il est absorbé en premier lieu par les racines, mais également par les feuilles, avec translocation acropète dans le xylème, leur activité est due à une interférence avec le transport des électrons de photosystème II dans les chloroplastes des plantes (Inhibiteur de photosystème II dans les chloroplastes des plantes). Leur mode d'action est sélectif, systémique avec contact et activité résiduelle (Archibald et William, 1987).

La métribuzine expose à différents effets nocifs. Pour l'exposition à court terme la métribuzine peut affecter l'appareil respiratoire et la peau. L'intoxication aiguë peut donc affecter la respiration et provoquer de la somnolence. Les expositions élevées peuvent provoquer des maux d'estomac, la fatigue et la dépression du système nerveux central, provoquant une mauvaise coordination, des tremblements et une faiblesse. La concentration toxique pour l'homme est de 200 ppb (très faible).

Une forte exposition et à long terme ou répétée à la Métribuzine peut provoquer des modifications des enzymes hépatiques et peut affecter la fonction thyroïdienne en provoquant le goitre. Les différentes cibles sont le système nerveux central, la thyroïde et le foie (Pohanish, 2012).

I.2.1.2 Propriétés physico-chimiques

- Matière active : Métribuzine
- Fonction : herbicide
- Groupe chimique : triazinone

- Situation : ISO 1750 (publié)
- Nom chimique :
 - IUPAC : 4-amino-6-tert-butyl-4,5-dihydro-3-methylthio-1,2,4-triazin-5-one
 - CAS : 4-amino-6-(1,1-diméthyléthyl)-3-(méthylthio)-1,2,4-triazin-5(4H)-one
 - Numéro CAS : 21087-64-9
 - Formule moléculaire : $C_8H_{14}N_4OS$
 - Formulation : Granulés dispersibles
 - Masse moléculaire : 214,3
 - Point de fusion : 125°
 - Solubilité dans l'eau : 1,2 g/l à $20^\circ C$
 - Tension vapeur à $20^\circ C$: est inférieur a $1,3 \times 10^{-3}$ PA
 - Toxicité : DL 50chez les rats est de 2 200 mg/kg
 - DJA est de 0,025 mg/kg/jour
 - Formule développée : (Figure 01) (Acta, 2008)

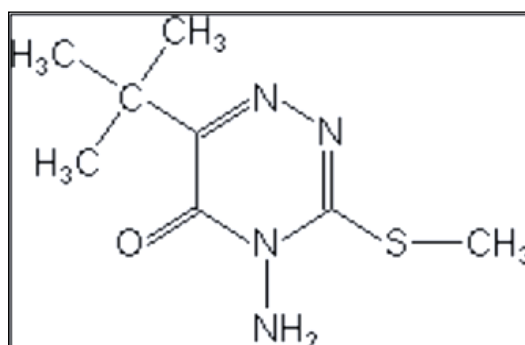


Figure 01: structure chimique de la Métribuzine (Acta, 2008)

I.2.1.3 Utilisation

La Métribuzine est employé en prélevée et en post-levée pour lutter contre les mauvaises herbes qui parasitent diverses cultures agricoles.

- Pomme de terre: 450 – 650 g/ha (en pré et post-levée et en sols légers) 650 – 900 g/ha (en pré levée et en sols moyens à lourds).
- Tomate: 450 g/ha (avant et 10 jours après repiquage et en sols légers) 700 g/ha (avant repiquage et en sols lourds).

- Ne pas appliquer la Métribuzine sur sols purement sableux contenant moins de 1% de matière organique.
- Si des pluies très abondantes surviennent peu de temps après l'application, la culture peut enregistrer une certaine phytotoxicité.
- Le niveau de tolérance à la Métribuzine des variétés de tomates, étant variable, il est nécessaire de le déterminer avant de passer à la pratique, afin d'éviter certains risques de phytotoxicité (MSNBS, 1986).

I.2.1.4 Mode d'action

La Métribuzine est adsorbé par les racines et le feuillage des mauvaises herbes. Elle agit en bloquant la photosynthèse. Son spectre d'activité est large, principalement en ce qui concerne les dicotylédones, mais aussi les graminées (MSNBS, 1986).

I.2.2 Tribénuron-méthyl

I.2.2.1 Généralités

Le Tribénuron-méthyle est un nouveau membre de la famille des herbicides de type sulfonilurée qui élimine une vaste gamme de mauvaises herbes latifoliées dans les cultures céréalières. Le Tribénuron-méthyle est moins persistant que le Chlorsulfuron et le Metsulfuron méthyle; la plupart des cultures en rotation peuvent être plantées dans les 60 jours qui suivent l'épandage en post-levée au taux recommandé sur l'étiquette.

La revue des données sur les teneurs résiduelles des récoltes montre que si le Tribénuron-méthyle est utilisé dans le blé de printemps, le blé dur et l'orge conformément aux instructions données sur l'étiquette et avec un délai avant moisson de 30 jours, la teneur résiduelle totale au moment de la moisson ne devrait pas dépasser 0,05 ppm, ce qui, considère-t-on, ne pose aucun risque pour la santé des consommateurs. Une limite maximale de résidus (LMR) de 0,01 ppm a été fixée pour le Tribénuron-méthyle dans le lait de façon à couvrir les résidus que peut entraîner la consommation par les vaches laitières d'une récolte verte traitée. Un délai de sept jours avant mise en pâturage a été fixé pour le bétail (Campagnie Dupont, 1995).

I.2.2.2 Propriétés physico-chimiques

- Matière active : Tribénuron-méthyl
- Fonction : herbicide
- Groupe chimique : sulfonilurées

- Situation : ISO 1750 (publiée)
- Nom chimique :
- IUPAC : méthyl-2-4-méthoxy-6-méthyl-1,3,5-triazine-2-yl-méthyl-carbamoylsulfamoyl-benzoate
- CAS : méthyl-2-4-méthoxy-6-méthyl-1,3,5-triazine-2-yl-méthylamino-carbonyl-amino-sulfonyl-benzoate
- N° CAS : 101200-48-0
- Formule moléculaire : $C_{15}H_{17}N_5O_6$
- présentation : solide blanc incolore
- formulation : granulés dispersibles
- Solubilité dans l'eau : 28 mg/l à pH 4 ; 280 mg/l à pH 6
- Toxicité : DL 50 chez les rats est de 5 000 mg/kg
- DJA est de 0,001 mg/kg/jour
 - Formule développée : (Figure 02) (Acta, 2008)

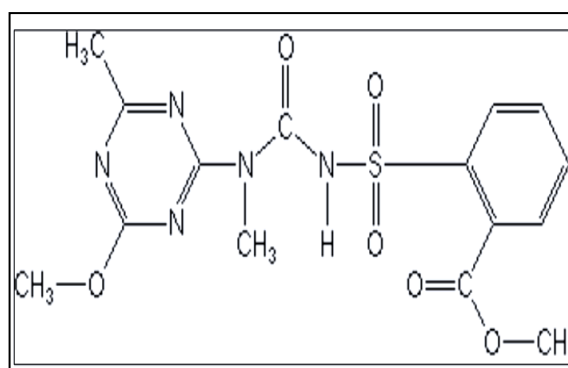


Figure 02: structure chimique du Tribunéron-méthyl (Acta, 2008)

I.2.2.3 Utilisation

Le Tribénuron-méthyl est utilisé pour le blé dur d'hiver, blé tendre, orge et orge de printemps (grandes cultures)

- Céréales (anti-dicotylédones) : 12,5 g/ha (du stade 3 feuilles au stade 2 nœuds de la céréale)
- Application terrestre : 200 à 400 L
- Application aérienne : 25 à 50 L

Le Tribunéron-méthyl peut être associé avec la plupart des anti -graminés couramment utilisés afin d'obtenir un désherbage complet.

Les meilleurs résultats sont obtenus lorsque le Tribunéron-méthyl est appliqué précocement sur des adventices jeunes (4 à 6 feuilles) en croissance active (**Campagnie Dupont, 1995**).

I.2.2.4 Mode d'action

Le Tribénuron-méthyl est absorbé par les feuilles et les racines. Sa systémie lui permet de migrer vers les zones de croissance. Il inhibe l'enzyme acétolactate synthétase (HLS) conduisant à la synthèse des acides aminés ramifiés, ceci provoque alors l'arrêt de croissance des adventices puis leur destruction complète.

Il est efficace sur de nombreuses dicotylédones annuelles ou vivaces (**Campagnie Dupont, 1995**).

III. Utilisation des pesticides

I.3.1 Dans le monde et dans les pays de l'Union Européenne

L'évolution des tonnages de pesticides utilisés pour l'agriculture est assimilée à l'évolution des ventes de matières actives. Une forte augmentation des quantités totales de substances actives vendues au début des années 80 traduit l'apparition des premiers fongicides de synthèse. Suivent ensuite des utilisations relativement stables jusqu'au début des années 1990 (**Merhi, 2008**).

Le changement majeur de la politique agricole commune en 1992 a entraîné une importante diminution des utilisations totales des pesticides (de l'ordre de 20%) surtout des herbicides et dans une moindre mesure des fongicides. De 2001 à 2003 certains produits ont vu leur utilisation interdite (certaines triazines comme l'Atrazine ou la Simazine) ou leur dose maximale limitée (urées substituées comme l'Isoproturon ou le Diuron dont la dose maximale est passée de 1800 g/ha à 1200 g/ha). Parallèlement, une forte augmentation de l'usage de nombreuses matières actives utilisées à de très faibles dosages à l'hectare (quelques grammes ou quelques dizaines de grammes) a été observée, notamment dans les familles des sulfonilurées pour les herbicides et les pyréthrinoïdes de synthèse pour les insecticides (**Aubertot, 2005**).

D'après les données de l'UIPP, les herbicides sont les pesticides les plus utilisés dans le monde toutes cultures confondues (47 % du tonnage mondial en 2005). Apparaissent ensuite, à utilisation égale, les insecticides (25%) et les fongicides (24%) Figure 03 (**Merhi, 2008**).

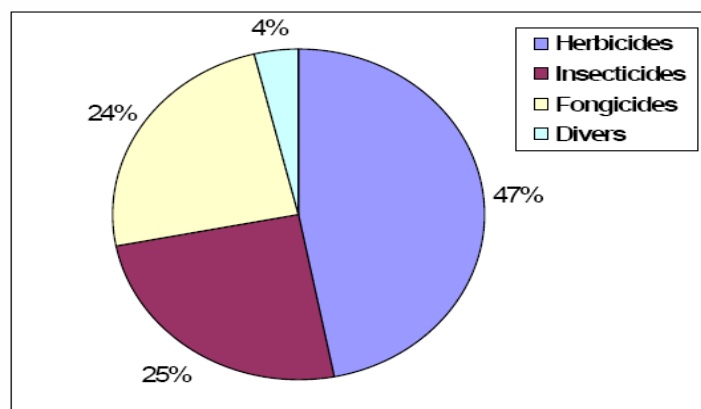


Figure 03: Répartition mondiale des produits phytosanitaires par catégories de produits utilisés en 2005 (Merhi, 2008)

La France est le quatrième producteur mondial de produits phytosanitaires (utilisés à plus de 90% pour l'agriculture) après les Etats-Unis, le Japon et le Brésil. En revanche, la France est de loin le premier utilisateur en Europe en volume total avec 71600 tonnes de substances actives en 2006 (Figure 4). La première place occupée par la France s'explique par son importante surface agricole, laquelle représente plus de la moitié du territoire national et les usages agricoles représentant plus de 90% de l'utilisation totale (Merhi, 2008).

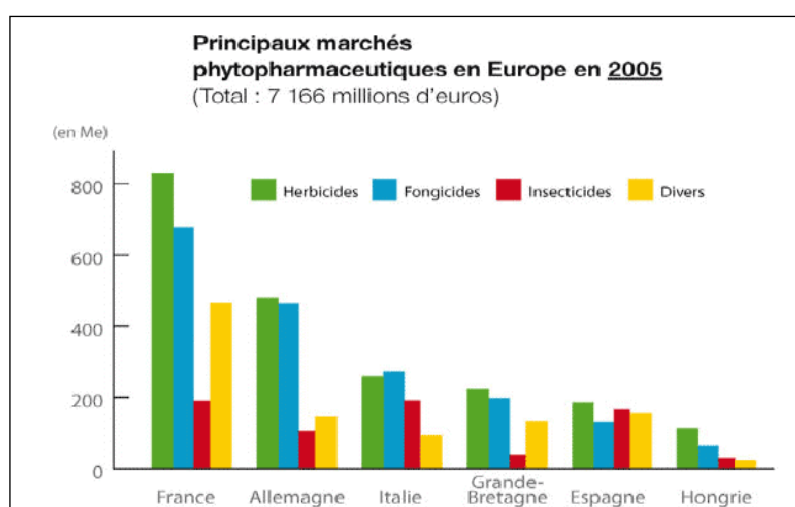


Figure 4: Consommation des trois grandes familles d'activités de pesticide en Europe (El Mrabet et al, 2008)

Les quantités totales utilisées ne sont pas proportionnelles à la Surface Agricole Utile du pays. Ainsi, par hectare de terre cultivée, la France est classée au quatrième rang européen après les Pays-Bas, la Belgique et l'Italie et devant le Royaume-Uni (Plan interministériel, 2006-2009). Les pays les plus "consommateurs" à l'hectare de surface cultivée sont ceux chez lesquels les systèmes de production sont fortement orientés vers l'horticulture et le maraîchage (Pays-Bas, Belgique).

Le profil de pesticides utilisés en Europe varie selon les pays : très peu de fongicides et d'insecticides dans les pays "froids" (Suède, Finlande, Danemark et Irlande). Au contraire la consommation de ces catégories est élevée dans les pays d'Europe du sud (Italie, Espagne, Portugal, Grèce et France), du fait notamment de l'importance des cultures légumineuse, de l'arboriculture et de la vigne (Merhi, 2008).

I.3.2 En Algérie

L'Algérie cherche à améliorer ses productions agricoles dans le but d'obtenir le plus de nourriture et à moindre cout. L'utilisation des pesticides à usage agricole, bien qu'encore relativement faible (6000 à 10000 t/an), ne représente que 14% des traitements nominatifs par rapport aux pays développés, elle est donc en augmentation croissance aussi bien en qualité qu'en variété (Moussaoui et al, 1999).

Les insecticides restent encore la catégorie de pesticides la plus utilisée en Algérie.

Les fongicides et les herbicides sont moins utilisés contrairement aux pays développés qui les utilisent fait qu'en éliminant les mauvaises herbes, on limite la population nuisible qui pourrait s'y développer (Figure 5).

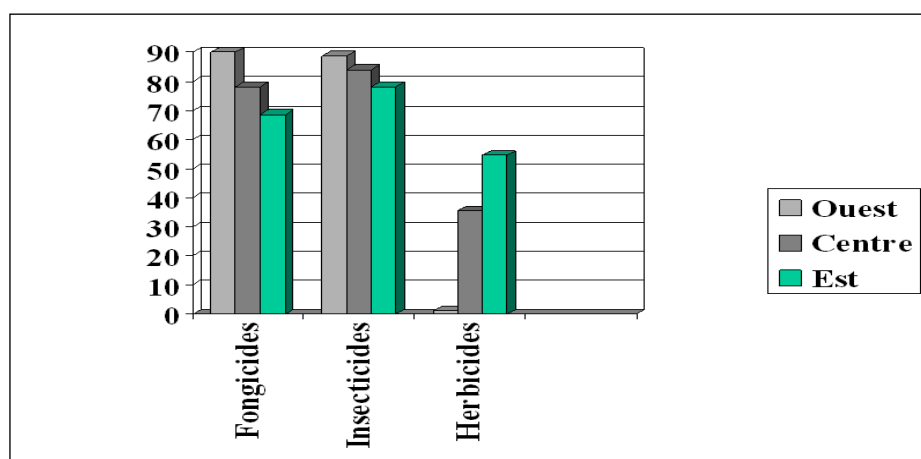


Figure 5: Pesticides les plus utilisés en Algérie (Moussaoui et al, 1999)

Le nombre et la nature des pesticides homologués sont révisés périodiquement. C'est ainsi qu'en 1997, 392 spécialités étaient homologuées alors qu'en 1998 ce chiffre est passé à 132. Par ailleurs, les pesticides organochlorés sont totalement interdits. En pratique la matière active est importée et c'est la formulation qui est faite localement pour 25 spécialités mais la plus grande partie est importée (Moussaoui et al, 1999).

I.4 Contamination des milieux

Une part importante des produits phytosanitaires utilisée au cours des traitements se disperse dans les trois compartiments environnementaux que sont l'eau, l'air, et le sol (**Colin, 2000**). Les mécanismes qui interviennent dans ces phénomènes de dispersion sont complexes et pour certains encore mal connus. Ils sont en effet gouvernés par de multiples facteurs tels que les propriétés physico-chimiques des pesticides et les conditions météorologiques (**Aubertot et al, 2005**).

Les principaux phénomènes qui contrôlent le devenir des pesticides dans l'environnement peuvent cependant être classés selon trois processus qui sont le transfert (vers l'atmosphère, vers les eaux de surface et dans les sols vers les eaux profondes), la rétention dans les sols et la dégradation physique ou biologique (Figure 6) (**Vigouroux-Villard, 2006**).

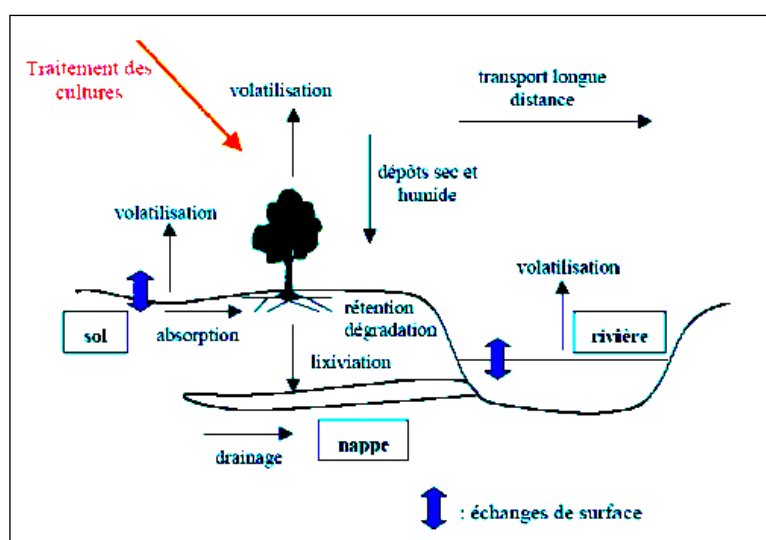


Figure 6: Devenir des pesticides dans l'environnement après application (Marlière, 2001)

I.4.1 Contamination des eaux

Les pesticides peuvent aussi être transportés par ruissellement et contaminer ainsi les eaux de surface et les nappes phréatiques. On observe actuellement une contamination préoccupante et généralisée des eaux par les pesticides. En effet, en Ile-de-France, plus de la moitié des prélèvements d'eau de surface et d'eau souterraine sont de qualité médiocre à mauvaise. Toutefois, du fait de traitements perfectionnés et coûteux, l'eau potable distribuée aux Franciliens est de bonne qualité. En effet, le contrôle sanitaire des eaux réalisé par les Directions départementales des affaires sanitaires et sociales montre que 95 % des Franciliens étaient alimentés par une eau toujours conforme aux normes de qualité en 2006 (**Grange et al, 2008**).

Les dispositions réglementaires en matière d'eau potable sont établies par le code de la santé publique en application des directives européennes 98/83/ CE et 75/440 CEE. Pour les pesticides, les limites de qualité sont ainsi fixées pour les eaux souterraines et les eaux brutes destinées à la consommation humaine (**Vigouroux-Villard, 2006**).

I.4.2 Contamination de l'air

On évoque très souvent la pollution des eaux par les pesticides mais très peu de l'air. En effet, la qualité des eaux est très surveillée pour son utilisation et des normes existent.

Par contre, aucune norme n'existe pour l'air. Aucun contrôle n'est réalisé avant son utilisation. Sa contamination est donc très peu connue et surtout très peu recherchée.

Des résidus de pesticides peuvent également être retrouvés dans l'air suite à des usages agricoles, collectifs ou domestiques. Le transfert peut se faire dès l'utilisation du pesticide ou après érosion des sols ou volatilisation. Les pesticides peuvent ensuite être transportés sur de longues distances (Figure 7). Ainsi, les zones rurales ne sont pas les seules concernées. On retrouve aussi des pesticides dans l'air des zones urbaines, principalement en lien avec des usages non agricoles (**Grange et al, 2008**).

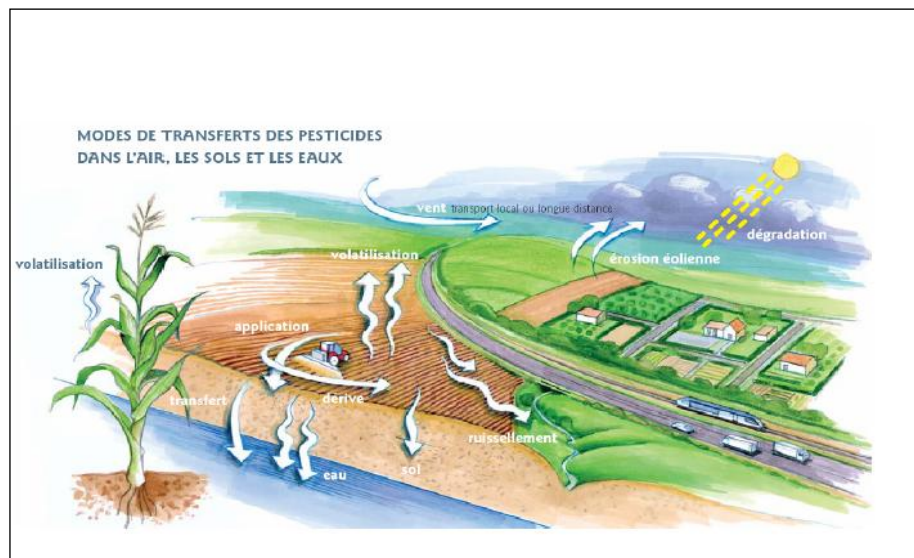


Figure 7: Transfert des pesticides vers l'atmosphère (Grange et al, 2008)

Les pesticides sont transférés dans l'air lors de l'épandage par volatilisation ou évaporation. Il est difficile de prévoir les points de chutes des pesticides utilisés (**Grange et al, 2008**).

Parmi ces trois voies de transfert vers l'atmosphère :

I.4.2.1 Les pertes à l'épandage : sont à l'heure actuelle mal documentée, mais on sait que le pourcentage de matière active n'arrivant pas sur la cible peut être très important en

fonction du type d'insecticide, de la technique d'application et du développement du couvert. Lors d'une fumigation du sol, les pertes vers l'atmosphère peuvent atteindre 20 à 30 % selon le respect ou non des bonnes pratiques d'application (**Aubertot, 2005**). En pulvérisation sur le feuillage, 30 à 50 % du produit passe vers l'air (c'est la dérive, ou « spray-drift ») (**Grange et al, 2008**). Bien que les facteurs impliqués dans les transferts atmosphériques sont identifiés (conditions météorologiques, modes d'application tels que la hauteur de la rampe, la taille de la buse...), certains demeurent mal renseignés, notamment par exemple l'évaporation des gouttelettes de spray. Les recherches s'appuient de plus en plus sur les modèles mathématiques pour comprendre ces phénomènes de dérive (**Vigouroux-Villard, 2006**).

I.4.2.2 La volatilisation: après l'application le transport des pesticides à longue distance a été mis en évidence depuis les années 1980 du fait de leur détection dans des zones éloignées de toute utilisation (montagnes, régions arctiques, lacs...) (**Grange et al, 2008**), la dispersion et le dépôt à courte distance de la phase gazeuse ne font l'objet de recherches que depuis assez récemment. L'ampleur de la volatilisation à partir de la plante serait plus importante, en termes de flux, que celle à partir du sol (**Lemière et al, 2001**).

I.4.2.3 L'érosion éolienne : à partir de la plante ou du sol et les facteurs qui la gouvernent sont eux aussi mal connus. Certains auteurs considèrent que le transfert par érosion est faible, d'autres estiment que cette voie peut être supérieure aux pertes par ruissellement (**Lemière et al, 2001**).

Ainsi, la fraction de pesticides passant dans l'atmosphère dépend de plusieurs facteurs liés aux caractéristiques intrinsèques du produit, au sol, à la méthode d'application, aux conditions météorologiques etc. Cette multiplicité des facteurs rend parfois difficile l'interprétation des résultats et explique que la connaissance sur l'origine et le comportement des pesticides dans l'atmosphère soit encore mal connue, comparativement à certains autres polluants atmosphériques (**Grange et al, 2008**).

Concernant la pollution de l'eau, nous savons que si le produit est utilisé sur une parcelle d'un bassin versant, avec le ruissellement, les molécules iront dans la rivière concernée. C'est différent pour l'air ; Le vent emporte des molécules dans des régions très éloignées de la terre d'épandage La pollution de l'air par les pesticides est très peu surveillée.

Comme il n'y a pas de normes sur l'air que nous respirons, rien n'oblige les services de l'état de contrôler cette pollution (**Merhi, 2008**).

I.4.3 Contamination des sols

Les pesticides dans les sols peuvent provenir des activités agricoles, mais également des activités de désherbage des réseaux routiers et ferrés et de l'entretien des espaces vert et des jardins. Les contaminations engendrées par ces activités constituent des pollutions diffuses. Les herbicides sont généralement plus persistants dans les sols que les insecticides ou les fongicides et leurs produits de dégradation sont stables (**Lemière et al, 2001**).

Les industries produisant des substances phytosanitaires et/ou procédant à leur stockage, peuvent également être à l'origine d'une contamination des sols. Il s'agit de source ponctuelle ou concentrées de contamination (**Vigouroux-Villard, 2006**).

I.4.4 Contamination des aliments

Les fruits sont ravagés par de nombreux insectes et champignons. Ces préjudices peuvent avoir lieu très tôt, d'autres ne surviennent que très tard, peu de temps avant la cueillette ou durant la conservation du fruit. Dans tous les cas l'effet négatif est considérable et la perte est importante.

Plusieurs solutions ont été proposées et pratiquées, mais le traitement par des pesticides organiques et systémiques s'est imposé comme la solution la plus efficace et commode. Ils sont appliqués en traitements pré et post récolte (trempage dans des bains fongicides) pour préserver les denrées dans le champ et lors de l'entreposage et le transport (**Jawich, 2006**).

La contamination des aliments est essentiellement liée à l'usage de pesticides dans le cadre agricole pour protéger les cultures. Les principaux aliments contaminés sont les fruits et légumes, mais aussi les céréales. Des résidus de pesticides peuvent également être retrouvés dans les produits animaux ou d'origine animale, après contamination de la chaîne alimentaire. Il est difficile d'établir une liste des aliments les plus contaminés car le devenir des pesticides dans les aliments est variable selon le pesticide et l'aliment considérés. Ainsi, le fait d'utiliser des pesticides sur une culture n'entraîne pas nécessairement la présence de résidus dans les aliments tels qu'ils sont consommés (les pesticides peuvent rester sur la peau ou être éliminés après lavage des aliments...) (**Grange et al, 2008**).

I.4.5 Exposition de la population générale aux pesticides

Du fait de la multiplicité des sources d'exposition (aliments, air, eau et sol) l'exposition aux pesticides peut se produire à la fois par ingestion, inhalation ou adsorption cutanéomuqueuse. Les voies prépondérantes varient selon qu'il s'agit d'exposition en milieu professionnel ou en population général. Le degré d'exposition aux pesticides varie selon la

durée, l'intensité et la fréquence de contact avec les portes d'entrées (bouche, narines, surface cutanée). De nombreux autres facteurs influent également sur l'exposition et notamment la concentration du produit dans les médias et ses propriétés physico-chimiques ainsi que les caractéristiques et les activités des individus exposés (**Vanderlinden et al, 2002**). L'exposition peut avoir lieu par contact direct avec la source (ex ; application de traitement) ou à distance de celle-ci (ex : chaîne alimentaire) (Figure 8).

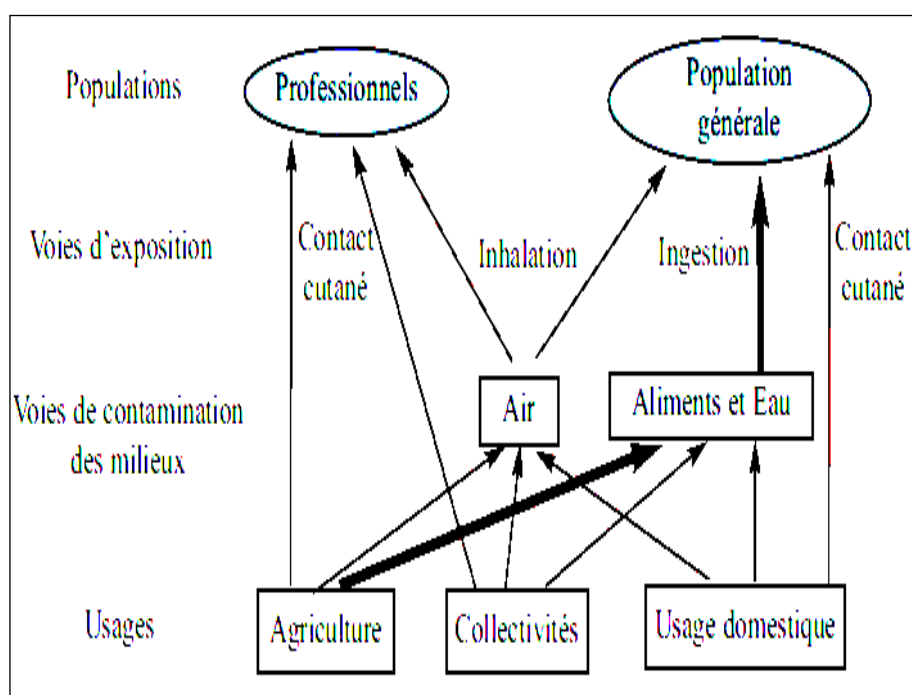


Figure 8: Voies de contamination des milieux et d'exposition de la population aux pesticides
(Grange, 2008)

La population générale est exposée aux pesticides de façon chronique et à des faibles doses par ingestion, inhalation et voie cutanée. Selon OMS, la principale source d'exposition pour les non professionnels est l'alimentation. D'après l'évaluation de risque, celle-ci contribue à 80% de l'exposition contre 10% pour l'eau. Cependant, l'utilisation de pesticides dans les habitations et les jardins doit également être considérée comme source d'exposition non négligeable en population générale (**Vigouroux-Villard, 2006**).

Il est important de noter que du fait de leurs caractéristiques physiologiques, métaboliques et comportementales, les enfants présentent des profils d'exposition différents de ceux des adultes. Par ailleurs, certaines voies et source d'expositions sont spécifiques à l'enfant (exposition transplacentaire, exposition via l'ingestion de lait maternel). Compte-tenu de ces particularités, les enfants peuvent être plus exposés que les adultes aux xénobiotiques en général et aux pesticides en particulier. L'enfant est donc plus exposé par voie respiratoire

et cutanée. De plus, jusqu'à l'âge d'1 an, la perméabilité cutanée de l'enfant est plus élevée que celle de l'adulte. Les enfants sont également plus exposés par voie alimentaire car ils consomment plus d'aliments et de boissons par kilo de poids corporel qu'un adulte avec les variations du régime alimentaire en fonction des différents stades du développement (WHO, 2006). D'autre part, la demi-vie d'élimination est plus longue chez les nouveau-né du fait de l'immaturation de son système rénal et la charge corporelle en pesticides est par conséquent plus importante (Schneider, 2001). Les comportements spécifiques de l'enfant (portage main-bouche, port d'objets contaminés à la bouche, contact avec les animaux domestiques traités, contacts fréquents avec le sol) contribuent également à l'augmentation des doses d'exposition (WHO, 2006).

I.5. Toxicité chronique des pesticides

Chez l'homme, l'exposition chronique aux pesticides a été associée à un grand nombre d'affection. Les effets chroniques les plus étudiés peuvent être classés en quatre grandes catégories :

- les cancers et notamment les leucémies et les lymphomes
- les effets sur la reproduction
- les effets perturbateurs endocriniens
- les effets neurotoxiques (Vigouroux-Villard, 2006).

I.5.1 Cancérogénicité

Les premières recherches sur le rôle des pesticides dans les cancers sont basées sur le constat de différences de mortalité entre les fermiers et les autres catégories socioprofessionnelles pour certaines pathologies cancéreuses. En effet, si globalement la mortalité par cancer chez les agriculteurs est moins élevée, notamment pour les cancers liés au tabac, certains cancers spécifiques s'avèrent plus fréquents dans cette population. Il s'agit des cancers des tissus hématopoïétiques (leucémies, myélomes, lymphomes) et conjonctifs, des lèvres, de l'estomac, de la prostate, de la peau et du cerveau (Baldi et al. 1998). Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer l'augmentation de ces pathologies dans les populations agricoles (Multiger, 2005).

Certaines pathologies comme les hémopathies malignes, et notamment les lymphomes malins, ont été particulièrement étudiées dans le cadre de l'exposition professionnelle aux pesticides. La majorité des travaux concernant les lymphomes non-hodgkiniens trouvent une association significative avec l'exposition des agriculteurs aux pesticides (Baldi et al, 1998 ; Kato et al, 2004).

Les résultats des différentes études épidémiologiques sont assez discordants en ce qui concerne les autres cancers hématopoïétiques (leucémies, myélomes). Certains travaux mettent en évidence des associations entre le risque de leucémie et la pratique de l'agriculture ou les traitements insecticides destinés aux animaux. Cependant, les virus animaux pourraient jouer un rôle dans la survenue de ce type de cancer (**Baldi et al, 1998**).

D'autres travaux ont évalué le lien entre l'exposition aux pesticides et les tumeurs solides (tumeurs du cerveau, du poumon de la prostate, des testicules, du sein, du foie, de l'estomac et du colon). Cependant, en raison de biais méthodologiques et de résultats discordants, les résultats obtenus dans ces études ne permettent pas de conclure formellement à une relation entre l'exposition aux pesticides et ces localisations cancéreuses (Baldi et al, 1998). Le cancer du sein par exemple, a fait de nombreuses études. Celles-ci ont notamment porté sur le DDT et son métabolite le DDE, la majorité des études réalisées depuis 1996 n'ont pas confirmé les résultats antérieurs associant le risque de cancer du sein et la présence de pesticide organochlorés dans le sérum, le tissu mammaire ou les tissus adipeux (**Lopez-cervantes et al, 2004 ; Raaschou-nielsen et al, 2005**).

Le rôle des pesticides dans la survenue des cancers de l'enfant a fait l'objet d'un nombre croissant d'études depuis la dernière décennie. L'exposition des enfants a le plus souvent été associée aux leucémies et aux cancers du cerveau. On peut citer par exemple, l'étude de **Menegaux et al, 2006** dans la quelle les auteurs trouvent une association significative entre le risque de leucémie aigue chez l'enfant et l'utilisation maternelle de pesticides durant la grossesse. Cette étude met par ailleurs en évidence une association entre le risque de leucémies aigues et l'utilisation dans le jardin d'insecticides et de fongicides, un lien significatif avec l'utilisation de shampoing anti poux a également été retrouvé.

Toutefois, aucune substance active spécifique ne peut être mise en cause. Les cancers du cerveau sont la seconde forme de cancer le plus fréquente chez l'enfant après certains types de leucémies. Plusieurs études ont mis en évidence un lien entre les tumeurs cérébrales de l'enfant et l'exposition aux pesticides durant la période prénatale. **Pogoda et Preston-Martin, 1997** trouvent une relation significative entre cancer du cerveau chez l'enfant et l'exposition au traitement anti-tiques et anti-puces notamment chez les enfants âgés de moins de 5 ans au moment du diagnostic. De plus, les auteurs mettent en évidence un risque prénatal plus élevé pour les mères préparant ou appliquant les produits elles mêmes. Dans cette étude, l'utilisation de sprays ou de brumisseurs a également été associée au risque accru

de tumeurs de Wilms, de sacrome d'Ewing et de tumeurs des cellules germinales chez l'enfant (**Daniels et al, 1997**).

Malgré un nombre d'études relativement important suggérant un lien entre pesticides et cancer, il est à ce jour impossible d'affirmer la causalité de cette relation. La cancérogénèse environnementale présente en effet certaines particularités. D'une part, les expositions environnementales se caractérisent par des expositions à des mélanges complexes dont la majorité reste souvent indéterminée. Il est donc difficile de déterminer si les effets observés sont en rapport avec l'exposition à une substance unique ou si ceux-ci résultent de la synergie de plusieurs composés. De plus, les susceptibilités individuelles aux différentes substances sont mal connues. Par ailleurs, le cancer est une affection de longue induction avec un temps de latence relativement important entre l'exposition et la survenue des effets. L'une des faiblesses majeures des études épidémiologiques réside dans la difficulté à reconstituer l'exposition notamment dans les études rétrospective. L'une des autres limites des études épidémiologiques est la difficulté à mettre en évidence les pathologies rares comme c'est le cas pour certains cancers (**Vigouroux-villard, 2006**).

I.5.2 Reprotoxicité

La reproduction comprend l'ensemble des étapes qui vont de la production des gamètes conditionnant la fertilité, jusqu'à la maturité sexuelle en passant par la fécondation suivie de la nidation de l'œuf et enfin le développement embryonnaire et fœtal. Ces différentes étapes comportent de nombreuses divisions cellulaires très sensibles aux agents environnementaux (**Multigner, 2005**). Les pesticides figurent parmi les xénobiotiques suspectés d'induire des effets sur l'appareil reproducteur (**Kaltenecker et Waissmann, 2006**).

I.5.2.1 Effet sur la fertilité

Malgré la diversité des habitudes, des comportements et des cultures, une augmentation de l'infertilité masculine a été observée à l'échelle mondiale. La reproduction masculine implique des phénomènes complexes et dépend du développement normal durant la période fœtale ainsi la croissance et la puberté. Les causes de l'augmentation de l'infertilité masculine demeurent à ce jour controversées, mais de nombreuses études suggèrent que les multiples substances auxquelles l'homme est exposé soient en relation avec ce phénomène. Environ 6% des hommes en âge de procréer présentent une infertilité. Les causes les plus fréquentes (environ 90%) sont associées à des troubles de la spermatogénèse (**Kaltenecker et Waissmann, 2006**). Un des exemples les plus classiques de la toxicité des pesticides sur la

reproduction est celui du 1,2-dibromo-3-chloropropane (DBPC) utilisé à partir des années 1950 jusqu'aux années 1980 dans les cultures bananière d'Amérique centrale, d'Asie du sud-est et des Caraïbes. Les effets spermatotoxiques de ce composé ont été mis en évidence sur le rat au début des années 1960 et ses effets délétères sur la spermatogénèse humaine ont été découverts en 1977. Il a tout d'abord été observé une baisse du taux des naissances chez les ouvriers californiens après leur embauche dans une usine produisant du DBPC (**Kumar, 2004**).

Il a plus tard été rapporté que l'exposition professionnelle au DBPC était responsable d'une baisse des concentrations de sperme dans les éjaculats. Ainsi, des concentrations médianes de 46 millions de cellules/ml ont été mesurées chez les sujets professionnellement exposés contre 79 millions de cellules/ml chez les non exposés. D'autres études ont également retrouvé des atrophies complètes de l'épithélium séminifère chez les sujets travaillant à la fabrication de cette substance (**Kumar, 2004**). En 1997, les effets du chlordécone sur la fertilité masculine ont également été observés chez une centaine d'ouvriers américains fabricants cette molécule. Des anomalies du sperme ont par ailleurs été rapportées chez les ouvriers agricoles utilisant certains pesticides comme le dibromure d'éthylène (**Multigner, 2005**).

L'impact des pesticides sur la fertilité féminine a été moins étudié. Aux Etats-Unis, l'usage d'herbicides ou de fongicides a été identifié comme facteur de risque chez les femmes consultant pour infertilité alors que le fait de résider dans une zone rurale ou dans des fermes a été retrouvé comme facteur protecteur (**Multigner, 2005**).

I.5.2.2 Effets sur le développement

Les études animales et humaines ont toutes deux démontré que les pesticides peuvent traverser la barrière placentaire et être ainsi transférés au fœtus durant la grossesse (**Arbuckle et Sever, 1998**). Ainsi les expositions maternelles pré ou post-conceptionnelles aux pesticides sont fortement suspectées d'être à l'origine d'effets délétères sur la grossesse (avortements spontanés prématurité mortinatalité ...) ou de certains troubles du développement fœtal tels que des malformations des fentes labiopalatines ou encore la non fermeture du tube neural (**Baldi et al, 1998**).

I.5.3 Effets perturbateurs endocriniens

Selon l'OMS, un perturbateur endocrinien est une substance exogène ou un mélange qui altère les fonctions du système endocrinien et qui, de ce fait, induit des effets nocifs sur la

santé d'un organisme intact, de ses descendants ou sous population (**Vigouroux-Villard, 2006**).

Les pesticides sont l'une des classes de composés chimiques faisant l'objet de nombreuses investigations quand à leurs effets sur le système endocrinien. Certains pesticides, notamment les substances obsolètes mais persistantes comme le DDT et ses métabolites sont fortement suspectés d'altérer le développement de la fonction reproductrice. De même, les organochlorés analogues du DDT peuvent être responsables d'effets sur la fertilité masculine en provoquant une oligospermie. En effet, une baisse de la fertilité et une augmentation du taux de FSH et du ratio testostérone/gonadotrophine avec une relation dose-réponse a été observée chez les ouvriers exposés à DBPC (**Kumar, 2004**). Une augmentation du nombre d'avortements spontanés et une modification du sexe ont également été mises en évidence dans cette population. Les expérimentations chez le rat exposé à la vinchlozoline ont montré une altération de la différenciation sexuelle chez le male. Chez les rats exposés pendant la période périnatale on a également pu noter des hypospadias, des testicules ectopiques, la formation de poches vaginales, agénésie prostatiques et un non développement des mamelons (**Lintelmann et al, 2003**).

Plusieurs études épidémiologiques ont par ailleurs recherché une association entre l'exposition à certains pesticides et l'apparition de certains cancers hormono-dépendants (cancer thyroïdiens, cancer de la prostate et des testicules, cancers du sein et de l'ovaire). Ces études montrent généralement une association non significative entre ces composés et les cancers étudiés (**Vigouroux-Villard, 2006**).

I.5.4 Neurotoxicité

Les effets aigus des produits phytosanitaires sont bien connus. En effets, la plupart des pesticides et notamment les organochlorés, les carbamates et les fatigants peuvent être toxiques pour le système nerveux dans le cadre d'expositions accidentelles ou volontaires à des fortes doses. Les effets neurotoxiques des pesticides dans le cadre d'expositions chroniques à faibles doses ou à des doses modérées sont plus contestés. Parmi les effets neurotoxiques retardés qui pourraient être liés à l'utilisation de pesticides figurent notamment les troubles neuropsychologiques et certaines pathologies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson (**Vigouroux-Villard, 2006**).

Un certain nombre d'études épidémiologiques ont évalué les effets des pesticides sur la fonction cognitive et neuro-comportementale. La majorité d'entre elles trouvent une association entre l'exposition aux pesticides et des déficits relatifs à ces deux fonctions

(**Kamel et Hoppin, 2004**). **Baldi et al, 2004** par exemple, mettent en évidence une baisse significative des performances neuropsychologiques chez des ouvriers viticoles exposés à long terme aux pesticides. La durée moyenne d'exposition des ouvriers (directement exposés) est de 22 ans et concerne essentiellement les fongicides. Cette étude indique que les fonctions les plus altérées sont celles impliquées dans la sélection de l'information (attention sélective), le traitement de l'information (la mémoire à court terme) ainsi que la mémoire associative, la fluidité verbale et l'abstraction.

L'analyse statistique donne des résultats significatifs pour la plupart des tests neuropsychologiques (**Kamel et Hoppin, 2004**).

Certaines études ont également recherché une relation entre des effets délétères sur les fonctions sensorielles et l'exposition aux pesticides. Des altérations de l'odorat, des troubles de la vision des couleurs, des dégénérescences rétiniennes ont parfois été observées. Cependant des données restent insuffisantes pour conclure à une relation entre exposition aux pesticides et effets sur les fonctions sensorielles. Les études épidémiologiques conduites pour évaluer les effets des produits phytosanitaires sur la conduction nerveuse périphérique ont, quand à elles, conduits en grande partie à des résultats négatifs (**Kamel et Hoppin, 2004**).

Les pesticides sont également suspectés de jouer un rôle dans la survenue de pathologies neuro-dégénératives et particulièrement dans la maladie de Parkinson. Cette dernière est un désordre neurologique caractérisé par une dégénérescence de la voie dopaminergique nigro-striée qui régule les mouvements du corps (**Liu et al, 2006**). Les premiers signes cliniques apparaissent après une perte d'environ 70 à 80% des neurones dopaminergiques (**Schapira, 1999**). Les études animales indiquent que plusieurs pesticides provoquent une neurotoxicité dopaminergique. Par ailleurs, lors de l'examen post-mortem de patients atteints de Parkinson, les concentrations de certains organochlorés, se sont révélées plus élevées que chez des sujets atteints d'autres pathologies neurologiques (**Liu et al, 2003**). Une méta-analyse rapportée par **Priyadarshi et al, 2000** révèle une association positive entre la maladie de Parkinson et l'exposition aux pesticides. Cette étude n'a cependant pas mis en évidence de relation dose-réponse et aucun lien, avec une ou plusieurs substances actives, n'a pu être établi. Une autre étude cohorte prospective réalisée à Hawaï par **Petrovitch et al, 2002** met en évidence, une augmentation significative de l'incidence de la maladie de Parkinson chez les hommes ayant travaillé dans des plantations pendant plus de 10 ans. Toutefois, il est important de noter que les travailleurs participant à cette étude n'étaient pas seulement exposés à de nombreux pesticides mais également à d'autres produits agrochimiques, à des

métaux et des micro-organismes pathogènes contenu dans le sol. L'étude de **Petrovitch et al, 2002** ne permet donc pas de discerner les xénobiotiques potentiellement impliqués dans le développement de la maladie de Parkinson. Une autre étude de cohorte prospective de **Baldi et al, 2004** réalisée auprès de 1507 personnes âgées de 65 ans et plus met en évidence une altération des performances cognitives chez les sujets exposés professionnellement aux pesticides. Elle trouve également un risque augmenté de développer la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer chez ces sujets. Cette relation n'était pas observée chez les femmes.

Le poids de l'évidence fournie par l'ensemble des données apparaît suffisant pour conclure à une association entre l'exposition aux pesticides et la maladie de Parkinson. Toutefois, dans l'état actuel des connaissances, ces données ne sont pas suffisantes pour affirmer l'existence d'une relation causale avec l'exposition à une substance active déterminée ou avec des expositions combinées à divers pesticides ou à d'autres xénobiotiques (**Brown et al, 2006**).

Les travaux étudiant l'implication éventuelle des produits phytosanitaires dans la survenue d'autres maladies neuro-dégénératives sont plus rares. Plusieurs études suggèrent cependant l'existence d'un lien entre les expositions professionnelles et la survenue de sclérose latérales amyotrophiques (**Kamel et Hoppin, 2004**).

I.5.5 Immunotoxicité

Il apparaît clairement dans les expérimentations animales que certains pesticides peuvent engendrer une altération structurelle ou fonctionnelle du système immunitaire. Cependant, les concentrations testées sur l'animal sont très supérieures à celles auxquelles l'homme est exposé ce qui pose le problème de l'extrapolation à l'homme (**Voccia et al, 1999**).

Les données sur les effets immunotoxiques des pesticides sur l'homme demeurent limitées. En effet, peu d'études ont spécifiquement examiné les modifications des paramètres immuns chez l'homme exposé à ces substances. D'autre part, le système immunitaire est extrêmement complexe et tous les mécanismes cellulaires et moléculaires intervenant dans l'immunotoxicité ne sont pas bien connus (**Banerjee, 1999**). La réponse immunitaire peut aussi être influencée par des facteurs individuels incluant l'âge, l'état de santé et le statut nutritionnel. Par exemple, les effets de la réponse au DDT chez le rat sont influencés par la teneur en protéines de l'alimentation. Ainsi, des rats nourris avec des aliments contenant 3% de protéines ont développé une immunosuppression, ce qui n'était pas le cas des rats alimentés avec des produits contenant 12 à 20% de protéines (**Banerjee, 1999**).

Les études épidémiologiques relatives à l'immunotoxicité des pesticides se sont principalement intéressées aux professionnels exposés lors de la formulation, ou l'application de ces composés. Chez des sujets exposés aux chlorpyrifos, **Trasher et al, 1993** trouvent une augmentation de certains types de lymphocytes par rapport à des sujets témoins ainsi que la présence d'auto-anticorps. **Voccia et al, 1999** rapportent également une augmentation de l'incidence des infections respiratoires chroniques et des inflammations cutanées. Ces dernières sont associées à une augmentation du niveau des immunoglobulines M (IgM) chez les sujets exposés professionnellement au pentachlorophénol (PCP) et à une augmentation significative de la prévalence d'infection récurrentes du tractus respiratoire supérieur chez les travailleurs exposés aux organophosphorés. **Salem et al, 2004** ont étudié l'influence des expositions environnementales au stade précoce de la vie dans la survenue de l'asthme et trouvent une relation significative entre cette pathologie et l'exposition aux herbicides durant la première année de vie.

Toutefois, la signification clinique des altérations du système immunitaire n'est pas claire. En effet, on ignore actuellement si les changements observés dans ces études constituent des réponses temporaires ou adaptatives ou des changements précoces pouvant conduire à une dérégulation immunitaire ultérieure et finalement aboutir à l'expression d'une pathologie (**Colosio et al, 1999**).

I.6 Réglementation

Les aliments sont des mélanges complexes de composés naturels tels que les lipides, les protéines ou encore les vitamines. Par ailleurs, d'autres substances provenant généralement de processus industriels, de traitements agrochimiques peuvent également être présentes. Bien que les composés toxiques tels que les pesticides, les toxines ou les hydrocarbures polyaromatiques soient présents en très faibles quantités, ils peuvent néanmoins être dangereux pour la santé humaine. Cette éventuelle toxicité a poussé les autorités législatives à établir des réglementations strictes (**Merhi, 2008**).

Ainsi, les teneurs en pesticides sont surveillées en permanence et font l'objet de réglementation. Il existe, en effet, des normes sur les taux de pesticides autorisés dans l'eau ou les aliments d'origine diverses. Ils relèvent en particulier de la directive du conseil de l'union européenne n° **91/414/CE**. Le principal objectif de la législation phytosanitaire de l'union européenne consiste à protéger la sécurité des denrées alimentaires produites à partir des végétaux, à garantir la santé et la qualité des cultures dans tous les états membres (**El Mrabet et al, 2008**).

Chaque produit phytosanitaire doit être homologué sur la base de l'analyse d'un dossier complet fourni par le demandeur et expertisé par les instances compétentes. Cette homologation nationale a été harmonisée à l'aide de la directive **91/414/CE**. Ce texte est complété par la directive européenne **199/45/CE** spécifiant les lois et la régulation de la classification, de la formulation et de la dénomination des préparations chimiques dangereuses. De ce fait, les procédures d'homologation des substances actives sont complexes (**Merhi, 2008**).

L'évaluation du risque d'un produit phytosanitaire pour l'homme est constituée d'une batterie de tests imposés par la directive **91/414/CE** ; des tests de toxicité (aiguë, à court et à moyen terme), de mutagénèse, de cancérogénèse, et de tests de toxicité pour la reproduction.

L'ensemble de ces tests va permettre de définir les seuils toxicologiques de référence dans le but d'assurer la sécurité de l'opérateur et du consommateur (**El Mrabet et al, 2008**).

I.7 Indices toxicologiques

I.7.1 Résidus toxicologiques

Selon le Codex Alimentarius (**FAO/OMS, 1994**), un résidu de pesticide est toute substance (dérivé, métabolite, impureté...) présente dans les aliments, les produits agricoles ou les aliments pour animaux par suite de l'utilisation d'un pesticide.

Les résidus de pesticides sont le souci permanent de la communauté scientifique et des organisations de santé publique à travers le monde. La surveillance des résidus de pesticide est un outil clé pour assurer la conformité avec la réglementation et contrôler le respect des Bonnes Pratiques Agricoles (**Picó et al, 2004**). Résidu toxique signifie évidemment tout résidu pouvant avoir une importance sur le plan toxicologique dans la marge des doses résiduelles ; il n'y a pas de composé toxique mais plutôt des doses toxiques (**Abhauer, 1990**). Pour cela, de nombreuses méthodes hautement sophistiquées ont été mises au point pour détecter, identifier et mesurer les multirésidus contaminant des matrices de différentes natures (**Juhasz et Naidu, 2001 ; Young et al, 2001 ; Fussel et al, 2002 ; Cliff et al, 2003 ; Baril et al, 2005**).

I.7.2 Limite maximale de résidus (LMR)

Elle représente selon le Codex les résidus acceptables sur le plan toxicologique, elle est fondée sur les données des Bonnes Pratiques Agricoles et est destinée à être appliquée dans le commerce international. Donc, c'est la concentration en résidus la plus élevée légalement acceptable pour que les denrées alimentaires restent commercialisables, elle

s'exprime en milligramme de résidus par kilogramme de produit alimentaire (**Cluzeau et al, 2000**).

I.7.3 Dose journalière admise (DJA)

C'est la quantité d'une substance pouvant être quotidiennement consommée au cours d'une vie entière sans présenter le moindre risque ou effet secondaire (**Cluzeau et al, 2000**). Elle est déterminée en divisant la dose sans effet (DSE) de l'animal le plus sensible par 100, la dose sans effet étant déduite d'après des études toxicologiques menées à long terme sur les animaux. Elle s'exprime en milligramme (ou microgramme) de résidus par kilogramme de poids corporel (**Derache, 1986**).

CHAPITRE II

Immunisation, production d'anticorps et analyse immunochimique

II.1 Les antigènes

On appelle un antigène Ag ou immunogène, toute entité moléculaire (peptides naturels ou artificiels, venins, hormones, polysides, etc) corpusculaire (virus) ou cellulaire (cellules anormales, infectées ou étrangères, bactéries, champignons, etc) reconnue comme non-soi ou soi modifiée par le système immunitaire de l'organisme (**Dainat et al, 2001**).

Selon Letonturier, 2001 le terme immunogène tend à désigner toute substance qui, injecté à un organisme, est capable d'induire une réaction immunitaire, que celle-ci soit de type humorale ou à médiation cellulaire. Le terme antigène s'applique à toute molécule capable d'être reconnue de façon spécifique par le système immunitaire, à savoir par les cellules T, les cellules B ou les deux. Selon ces conventions une même molécule peut ainsi être immunogène et antigénique, alors que d'autres (en particulier les haptènes) sont seulement antigéniques. Les immunogènes sont un sous-groupe inclus dans l'ensemble des antigènes (**Regnault, 2002**).

II.1.1 Poids moléculaire

Les grosses molécules en général stimulent une bonne réponse immunitaire que les petites molécules. En outre, le système immunitaire reconnaît certaines macromolécules mieux que d'autres. Les protéines et les polysaccharides sont les immunogènes les plus puissants, considérant que les lipides et les acides nucléiques sont généralement des immunogènes pauvres (**Lewis, 2000**).

II.1.2 Utilisation des adjuvants

Les adjuvants immunologiques améliorent la réponse immunitaire aux antigènes coadministrés. Ainsi, la production d'anticorps est plus faible si l'antigène est administré seul. Une variété de mécanismes contribue à cet adjuvant induisant l'amplification, y compris :

- La formation d'un dépôt d'immunogène aboutissant à la libération lente et à la présentation de l'antigène au système immunitaire dans une période prolongée de temps.
- L'optimisation de la stimulation immunitaire en se concentrant un immunostimulant et un antigène dans le microenvironnement même où ils peuvent interagir avec l'antigène présentant les cellules et les lymphocytes simultanément.
- L'activation non spécifique des cellules du système immunitaire facilitant ainsi les interactions qui favorisent la production d'anticorps (Tableau 1) (**Lewis, 2000**).

Tableau 1: Différents types d'adjuvant utilisé (Revillard, 2001)

Nom de l'adjuvant	Composition	Mécanisme d'action
Adjuvant incomplet de Freund	Emulsion l'huile dans l'eau	Libération retardée d'antigène : augmentation de la capture par les macrophages
Adjuvant complet de Freund	Emulsion l'huile dans l'eau avec des mycobactéries mortes	Libération retardée d'antigène : augmentation de la capture par les macrophages ; induction de costimulateurs dans les macrophages
Adjuvant de Freund	Emulsion l'huile dans l'eau avec muramyl dipeptides (MDP), un constituant de mycobactéries	Similaire de l'adjuvant complet de Freund
Allun (hydroxyde d'aluminium)	Gel hydroxyde d'aluminium	Libération retardée d'antigène : augmentation de la capture par les macrophages
Allun plus <i>Bordetella pertissus</i>	Gel hydroxyde d'aluminium avec <i>B.pertissus</i> tués	Libération retardée d'antigène : augmentation de la capture par les macrophages ; induction de costimulateurs dans les macrophages
Complexes immunostimulants (ISCOM)	Matrice de Quil A contenant des protéines virales	Délivre l'Ag dans le cytosol : permet l'induction des cellules T cytotoxiques

II.1.3 Utilisation des adjuvants de Freund

Les adjuvants les plus largement reconnus et utilisés sont l'eau et les émulsions d'huile initialement développées par Freund. Ces émulsions sont générées en mélangeant une solution aqueuse d'antigène soluble avec un volume égal d'huile à travers un processus d'émulsification. Au cours de cette procédure, les antigènes contenant des gouttelettes d'eau sont emprisonnés dans l'huile en formant des particules dans une émulsion très visqueuse, Pour assurer une activité adjuvante, il est essentiel que ces émulsions épaisses restent stables et que les composants ne sont pas séparés après les mélanger. Lors de l'administration dans les tissus de l'hôte, ce mélange visqueux agit comme dépôt d'antigène. La puissance d'émulsion eau-huile peut être augmentée par l'incorporation des immunostimulants. L'exemple classique est l'adjuvant complet de Freund (ACF), qui se compose de la solution aqueuse d'antigène, huile minérale, un agent émulsifiant, *Mycobacterium tuberculosis* tuées par la chaleur et un immuno-modificateur très puissant. L'adjuvant incomplet de Freund (AIF) est identique à l'ACF mais il ne contient pas de *M. tuberculosis* (Lewis, 2000).

Les adjuvants de Freund continuent d'être largement utilisés avec des antigènes pour stimuler la production de concentrations très élevée d'anticorps de bonne qualité. Il ya, cependant, des

facteurs compliqués qui doivent être pris en considération. Les émulsions sont fastidieuses de se produire et peuvent contribuer à la dégradation des antigènes protéiques.

Les adjuvants de Freund sont intrinsèquement toxiques entraînant fréquemment des granulomes, abcès stérile et des ulcérations après leur administration.

Pour réduire l'ampleur de ces complications, la plupart des recommandations conseillent d'utiliser des protocoles de ACF pour l'immunisation primaire seulement, puis AIF pour toutes les immunisations suivantes (**Lewis, 2000**).

II.1.4 Voie d'injection de l'antigène

La voie d'administration d'un antigène a une grande influence sur la nature de la réponse immunitaire. Différentes voies d'injection permettent d'inoculer un antigène à un animal ; la voie d'injection peut être sous-cutanée, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intraveineuse voir même intranasale.

L'administration par voie intraveineuse est recommandée pour les immunogènes en petites particules par conséquent, sont facilement capturés par les cellules lymphoïdes (**Coste et al, 2000**).

Le choix de la voie d'injection dépend de la forme et de la quantité d'antigène dans la plupart des circonstances. Toutefois, dans certains cas, une voie particulière est choisie pour faciliter le ciblage des cellules et de déclencher le système immunitaire à réagir de manière appropriée. Pour la plupart des antigènes solubles préparés avec l'adjuvant, la voie sous-cutanée est préférée chez les lapins et les chèvres, tandis que la voie intra-péritonéale est plus pratique pour les souris et autres rongeurs. L'antigène administré par voie intraveineuse est métabolisé très rapidement, tandis que l'immunisation intradermique et intramusculaire ralentit la présentation d'antigène au système immunitaire (**Bean, 2000**).

II.1.5 Dose d'antigène

La nature et la quantité des Ac produits au cours d'une immunisation dépendent de la quantité des Ag injectés. Une dose trop faible ou trop élevée n'induit pas de réaction immunitaire. Bien plus, l'injection de ces doses rends ensuite l'animal réfractaire lors d'une immunisation ultérieure faite avec des doses normalement immunogènes (**Bean, 2000**).

Afin d'obtenir des anticorps ayant une affinité accrue pour l'immunogène en question, l'antigène utilisé pour l'immunisation doit être purifié, exempt d'impuretés auquel cas il aura également production d'un plus grand nombre d'anticorps spécifiques aux contaminants présents dans la préparation immunogénétiques.

La dose d'antigène à injecter pour obtenir une quantité raisonnable d'anticorps varie beaucoup selon la nature de l'immunogène et l'espèce animale à immuniser (**Clemons et al, 1992**).

La dose d'antigène nécessaire pour déclencher une bonne réponse immunitaire dépend d'un certain nombre de facteurs, mais il est probable que la quantité d'antigène qui atteint les cellules du système immunitaire est un déterminant majeur. Ainsi, la voie d'administration et le choix de l'adjuvant affecteront grandement la présentation d'immunogène et la réponse immunitaire (**Bean, 2000**).

Pour les lapins et les chèvres, si l'antigène est abondant, 250 à 500µg par injection est conseillé. La valeur intrinsèque d'immunogénicité de l'antigène est le facteur le plus important. Pour les rongeurs, des doses de 10 à 100µg par injection sont recommandées. Il devrait être noté que beaucoup de protocoles d'immunisation efficaces utilisent des doses faibles de quelques microgrammes par injection, en particulier dans l'injection intra-splénique (**Bean, 2000**).

II.2 Les Anticorps

II.2.1 Structure

Les anticorps sont des complexes polypeptidiques de haut poids moléculaire (150 kDa). Chaque anticorps est composé de quatre chaînes polypeptidiques comprenant deux chaînes légères (L) identiques et deux chaînes lourdes (H) identiques. Les quatre chaînes sont associées par des liaisons covalentes et non covalentes (Figure 9). Chaque chaîne est divisée en régions variables (V) et constantes (C). La partie variée est située à la région NH₂-terminale des chaînes polypeptidiques H et L ; ces régions sont respectivement appelées VH ou VL. Les régions constantes correspondantes sont appelées CH ou CL (**Gorochov et Papo, 2000**).

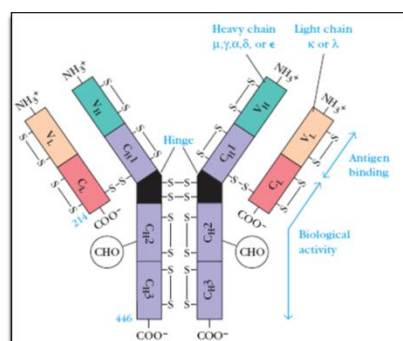


Figure 9: Structure d'une IgG (Kuby, 2003)

II.2.2 Obtention d'anticorps polyclonaux

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique.

Le système immunitaire agit par l'intermédiaire de deux principaux mécanismes qui sont la réponse de type humoral (production d'anticorps) et réponse à médiation cellulaire.

Les anticorps sont sécrétés par des plasmocytes qui sont des lymphocytes B différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope, qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure et elle peut se lier à cet épitope (**Hanl et al, 1995**).

La production d'anticorps polyclonaux dirigés contre un antigène d'intérêt est une technique importante applicable dans de nombreux domaines de la recherche biologique. Pour l'obtention d'anticorps polyclonaux de qualité, un protocole doit être suivi en se basant sur les points suivants :

II.2.3 Choix de l'animal

L'utilisation d'animaux dans la production d'antisérum polyclonal n'est pas difficile, mais les soins et la manipulation des animaux exigent l'expérience et la patience (**Bean, 2000**). Le choix de l'animal se porte habituellement sur le lapin, bon répondeur d'Ac, dont les IgG sont faciles à purifier. La souris ou rat sont utilisés si l'on souhaite préparer des Ac monoclonale. Le mouton, la chèvre ou le cheval sont choisis pour la production de grandes quantités d'Ac (**Revillard, 2001**).

Pour la production d'immunsérum, divers animaux peuvent être immunisés : lapin, chèvre, mouton, cheval, souris et rat.

Le choix de l'animal et le nombre d'animaux se fera en fonction de certains critères ; selon le volume de sérum requis, qui dépendra lui-même de la quantité d'anticorps à produire, le choix se portera sur des espèces animales de plus ou moins grande taille. Les rongeurs conviennent pour la production de faibles volumes d'anticorps.

Enfin, il faudra tenir compte de l'utilisation prévue des Ac: dans le cas d'un test ELISA, l'Ac qui se lie à l'Ag doit provenir d'une espèce différente de celle ayant produit l'Ac secondaire employé à l'état suivante du test (**Grossman, 1989**).

Le choix de l'espèce et de la souche animale doit être effectué avec soin. Le chercheur doit tenir compte des facteurs suivants :

- ▶ La qualité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (on doit envisager de choisir des animaux de plus grande taille lorsqu'on a besoin de grande quantité d'anticorps).
- ▶ La fonction effectrice des Ac provenant de l'espèce productrice d'anticorps (comme la capacité de fixer le complément).
- ▶ L'utilisation prévue des anticorps (dans un test ELISA, l'anticorps qui se lie à l'antigène doit souvent provenir d'une espèce différente de celle ayant produit l'anticorps secondaire employé à l'étape suivante du test) (**Coligan et al, 1997**).

II.2.4 Immunisation

L'immunisation est un phénomène de médiation par les cellules immunitaires (lymphocytes-B) et est normalement le résultat d'une diffusion hématogène de l'antigène. Le parcours d'introduction peut être très important pour déterminer dans quelle mesure l'individu répondra à un antigène. Une série de rappel d'immunisation peuvent être utilisées pour la production d'anticorps. Le choix de la méthode utilisée dépend de la nature de l'antigène et le type d'anticorps voulu (**Burns, 2005**).

D'une façon générale, le principe d'immunisation se base sur l'immunisation primaire, une période de latence permettant la réponse immunitaire primaire et la formation des cellules de mémoire, une ou plusieurs immunisations de rappel induit à une réponse secondaire. Ensuite la collecte du sérum 10 à 14 jours après le dernier rappel (**Bean, 2000**).

Le protocole d'immunisation soulève plusieurs questions importantes :

- Le mode de préparation de l'antigène
- L'emploi d'un adjuvant
- La voie d'administration et le nombre de sites d'injection

Le volume à injecter Le calendrier des injections (**Burns, 2005**).

II.3 Obtention du complexe Anticorps-Antigène

Les réactions antigène-anticorps sont des réactions très spécifiques, la spécificité d'un immunsérum résulte de l'addition de la réactivité de tous les anticorps présents, chacun d'eux réagissent avec un épitope différent de la molécule d'antigène et même avec différentes parties d'un même épitope. Cependant, lorsque certains épitopes d'un antigène A sont communs avec ceux d'un autre antigène B, une fraction des anticorps dirigés contre l'antigène A réagira également avec B. On parle alors de réaction croisée (**Turner, 2002**).

Les interactions noncovalentes qui forment la base de la liaison d'antigène-anticorps (Ag-Ac) incluent les liaisons d'hydrogène et ioniques, les interactions hydrophobes et de van der Waals (**Kuby, 2003**).

II.4 Affinité d'Anticorps

La force de l'interaction entre un antigène et un anticorps est appelée affinité. C'est la somme des forces attractives et répulsives résultant de la liaison d'un fragment Fab monovalent à son épitope. L'interaction d'un antigène avec son anticorps étant réversible, on peut lui appliquer la loi de l'équilibre des masses et une constante d'équilibre (**Male et al, 2007**).

II.5 Méthodes immunochimiques

La liaison de l'antigène à l'anticorps *in-vitro* produit une réaction soit directement visible à l'œil nu, soit détectable par une variété de moyen technique qu'elle est toutefois possible de simplifier :

Les premiers tests, qualifiés de réaction de 1^{ère} catégorie, caractérisent des réactions dont les immunocomplexes apparaissent sous une manifestation visible en cours de réaction. Les autres tests dénommés réaction de 2^{ème} catégorie, caractérisent des réactions qui utilisent un marqueur de l'antigène ou de l'anticorps, tels que le test ELISA, l'Immunofluorescence et la radio-immunologie (RIA, radioimmunoassay) (**Beraud, 2001**).

II.5.1 Méthodes sans marqueurs

II.5.1.1 Immunoprécipitation

Ces dosages ont été les premiers à être mis au point et leur élaboration était généralement très simple, ils ont l'avantage de pouvoir être réalisés avec un matériel et des réactifs peu onéreux, mais leur sensibilité est relativement faible. Etant basés sur la précipitation des complexes Ag-Ac, ils nécessitent, pour être performants, un rapport de concentrations Ag/Ac proche du point d'équivalence. Dans le cas contraire, c'est-à-dire en cas d'excès de l'un ou l'autre, les complexes sont solubles et donc peu détectables (**Paraf et Peltre, 1992**).

La réaction de précipitation se fait en milieu liquide soit en milieu gélifié. Le temps de réaction varie de moins d'une heure à plusieurs jours. La lecture peut se faire, soit à l'œil nu, soit avec des appareils tels que le néphélomètre ou le turbidimètre (**Audigié et al, 1983**).

II.5.1.2 Immunoagglutination

Les méthodes d'agglutination sont nées des l'observation de l'agglutination de bactéries par le sérum de malade et de l'agglutination des hématies par le sérum de sujets appartenant à des groupes sanguins différents dans le système A.B.O (**Masseyeff, 1997**).

La réaction d'agglutination met en présence des Ag de nature insoluble (cellule, érythrocytes, bactéries, macromolécules) et un immunsérum contenant des Ac spécifiques agglutinants. Cette réaction est spécifique et plus sensible que la réaction de précipitation (**Dainat et al, 2001**).

Ces méthodes sont très sensibles, à peu près au même niveau que l'ELISA ou le RIA. Elles sont d'exécutions simples, rapides, faciles à interpréter et ne demandent aucun matériel particulier. La réaction d'agglutination peut être passive ou active, soit directe ou indirecte (**Masseyeff, 1997**).

II.5.2 Méthodes utilisant un réactif marqué

Lorsqu'elle est opérée dans des zones de faibles concentrations des réactifs (Ag ou Ac), la réaction Ag –Ac ne donne lieu à aucun phénomène directement observable. Pour remédier à cela, il suffit de marquer l'un des partenaires de la réaction par une substance susceptible d'émettre un signal identifiable par l'œil nu ou par un appareil spécialisé. Ces marqueurs sont solidement fixés à l'Ag ou à l'Ac par une liaison covalente.

Un grand nombre de marqueurs (traceurs) différents ont été proposés mettant au point un grand choix de techniques de marquage (Tableau 2) (**Lafont, 2005**)

Tableau 2: Méthodes utilisant un marqueur (Lafont, 2005)

Traceur	Dosage avec compétition	Dosage sans compétition
Radiomarqué	Radioimmunoassay (RIA)	Immunoradiometric assay (IRMA)
Enzyme	Enzymoimmunoassay (EIA)	Enzyme-labeled immunosorbent assay (ELISA)
Fluorescent	Fluoroimmunoassay (FIA)	Immunofluorometric assay (IFMA)

II.5.2.1 Méthodes radio-immunologiques

Ces techniques reposent sur l'utilisation d'Ag ou d'Ac marqués avec un isotope radioactif (^3H , ^{14}C ou ^{125}I). Elles sont de moins en moins utilisées pour plusieurs raisons : nécessité que le laboratoire soit habilité à manipuler les radioéléments et présentent des

inconvénients liés à l'utilisation de traceurs radioactifs, coûts des systèmes de la radioactivité, durée de vie des réactifs qui est limitée par la demi-vie des isotopes (60 jours pour ^{125}I), contamination polluantes des déchets. Elles ne sont plus guère employées qu'en recherche ou pour étalonner les méthodes nouvelles (Adrian et al, 1998).

II.5.2.2 Immunofluorescence

Technique qui consiste à révéler des motifs antigéniques par la fixation d'un fluorochrome, les fluorochromes les plus utilisés sont l'isothiocyanate de fluorescéine et la rhodamine, la lecture se fait au microscope éclairé par la lumière ultra-violette. La réaction Ag-Ac fait apparaître des zones de fluorescence (Figure 10) (Genetet, 2002)

Les méthodes d'immunofluorescence permettent d'identifier des cellules caractérisées par l'expression de marqueurs de différenciation, de déterminer leur fréquence au sein de populations cellulaires hétérogènes, et de quantifier l'expression des marqueurs étudiés par appréciation de la densité des molécules. Les méthodes de marquage multiple, utilisant simultanément plusieurs anticorps de spécificités différentes couplés à des fluorochromes distincts se prêtent à une identification fine des constituants d'une suspension cellulaire (Genetet, 2002).

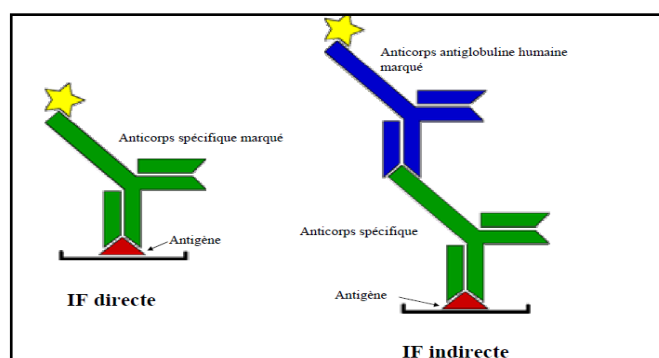


Figure 10: Méthodes Immunofluorescence directe et indirecte (Genetet, 2002)

II.5.2.3 Méthodes immunoenzymatiques

Immunoenzymologie fait appel à des techniques où les réactifs sont marqués par une enzyme dont l'activité est détectable par l'addition d'un substrat qui donne un produit coloré ; la lecture se fait à l'œil nu ou se mesure à l'aide d'un colorimètre.

On distingue deux grands types d'immunodosages utilisant un marqueur selon le réactif (Ac) est limitant ou en excès par rapport à l'Ag à doser.

La méthode ELISA est une technique immunochimique. Elle exploite la faculté de certaines protéines utilisées par le système immunitaire, les anticorps, à détecter certaines protéines, les antigènes, de manière spécifique. La technique utilise deux anticorps : l'un est

spécifique de l'antigène et va donc venir s'y fixer, tandis que l'autre réagit aux complexes antigène-anticorps formés et est couplé à une enzyme qui, en catalysant une réaction biochimique, va émettre un signal. L'intensité de ce signal révélera la quantité de complexes anticorps antigène et donc de l'antigène recherché (Liu *et al*, 2006).

Ces techniques sont basées sur deux types de procédés.

- Un procédé qui fait appel à un support solide pour immobiliser l'un des composés de réaction afin de faciliter la séparation des réactifs non liés : ce sont les dosages en phase hétérogène.
- Un procédé dans lequel aucune séparation n'est nécessaire car le dosage du complexe Ag-Ac-enzyme s'effectue directement dans le mélange réactionnel, en milieu liquide : ce sont les dosages en phase homogène (Liu *et al*, 2006).

II.5.2.3.1 Analyse en phase homogène

Ces techniques désignées sous le terme d'EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique) détectent, en une seule étape, un antigène en milieu liquide sans qu'il soit nécessaire de séparer l'antigène libre de la fraction ayant réagi avec l'anticorps. Ce type de dosage convient particulièrement bien pour les molécules de bas poids moléculaire comme les haptènes (Figure 11).

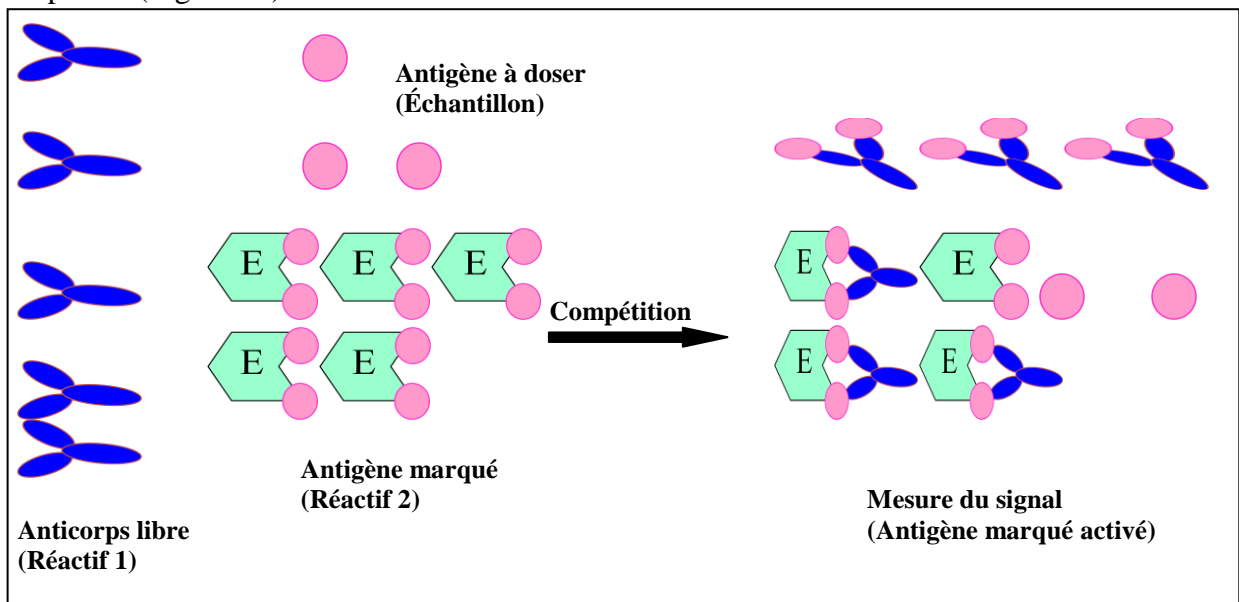


Figure 11: principe d'un dosage par compétition en phase homogène (Chomard, 2001)

Par exemple dans le cas où l'activité enzymatique est inhibée par la formation du complexe antigène-anticorps, si l'on met en contact l'anticorps avec un mélange d'haptène à doser et du même haptène couplé à une enzyme, l'activité de l'enzyme sera d'autant plus forte que la concentration d'haptène à doser est élevée.

Ces méthodes analytiques sont précises, rapides et facilement automatisables mais d'une sensibilité limitée; en outre, elles sont solidement protégées par des brevets nécessitent un important investissement scientifique pour être reproduites (**Adrian et al, 1998**).

Ces méthodes ont des caractéristiques communes :

- ▶ l'absence de réactions de séparation facilite l'automatisation et procure un gain de temps.
- ▶ cette rapidité compense leur sensibilité plus faible par rapport aux méthodes en phase hétérogène;
- ▶ elles utilisent toujours la compétition entre l'antigène à doser et l'haptène couplée à l'un des éléments de la réaction enzymatique;
- ▶ elles sont bien adaptées au dosage des haptènes. Un de leur domaine majeur d'application est celui du dosage des médicaments;
- ▶ trois enzymes sont principalement utilisées : le lysosyme, la malate déshydrogénase et le glucose -b- phosphate déshydrogénase (**Martin, 1995**).

II.5.2.3.2 Analyse en phase hétérogène

Les techniques désignées sous le terme d'ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) nécessitent la fixation de l'antigène ou de l'anticorps sur une surface solide (Figure 12).

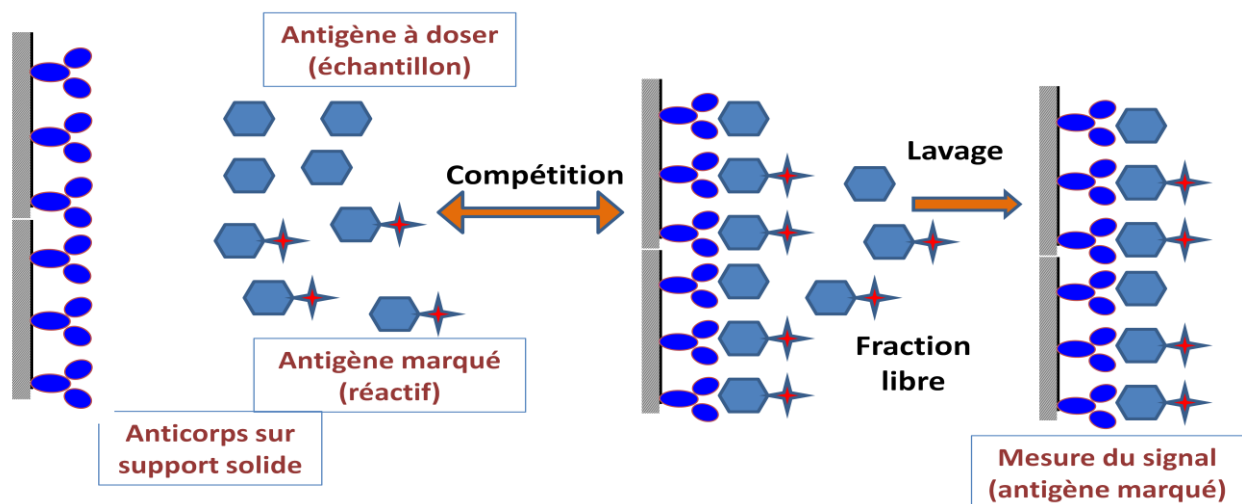


Figure 12: principe d'un dosage par compétition en phase hétérogène (Chomard, 2001).

Le support le plus utilisé est la plaque de microtitration de 96 puits en polystyrène ou en polyvinyle (PVC). Il autorise la manipulation d'un nombre important d'échantillons et la réalisation de toutes les étapes de dosage dans le même récipient : incubation des réactifs,

méthodologie, l'activité de l'enzyme et le substrat, mesures spectrométriques. Avec cette méthodologie, l'activité de l'enzyme n'est pas modifiée par la formation du complexe, aussi une ou plusieurs étapes de lavage sont nécessaires, avant la mesure de l'activité enzymatique, afin d'éliminer la fraction enzymatique non complexée (**Adrian et al, 1998**).

Selon **Paraf et Peltre, 1992**, on peut distinguer trois types majeurs d'ELISA en phase hétérogène :

- ELISA simple
- ELISA sandwich
- ELISA compétitif

II.5.2.3.2.1 Dosage immunochimique simple

Dans le dosage ELISA simple (ou ELISA à un site), l'antigène à doser est fixé directement sur le support solide qui peut être le plastique de plaques de micro-tirage à 96 puits à fond plat, des tubes ou des billes. L'antigène testé est détecté par un anticorps couplé à une enzyme et seul un site de liaison antigénique ou épitope est nécessaire à la reconnaissance antigène-anticorps. Il s'agit d'une fixation directe (Figure 13).

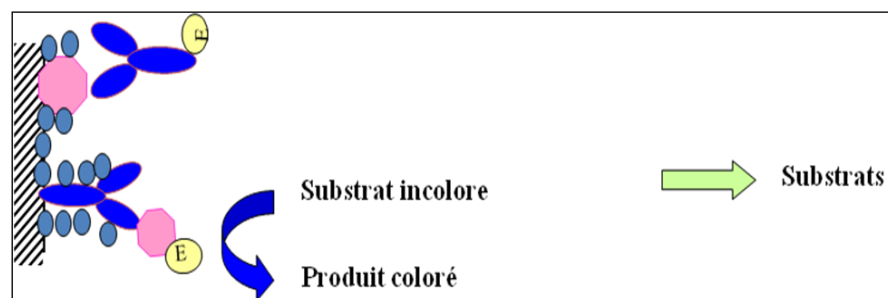


Figure 13: Principe du test ELISA directe (Genetet, 2002)

Un procédé plus couramment utilisé est la méthode de détection indirecte (Figure 14).

L'antigène à doser est tout d'abord détecté par des anticorps spécifiques non marqués appelés premiers anticorps, qui sont à leur tour détectés par des second anticorps qui sont marqués.

Cette méthode indirecte présente deux avantages par rapport à la précédente. D'une part un seul second anticorps couplé à une enzyme suffit à la détection de nombreux antigènes différents si les premiers anticorps dirigés contre ces antigènes ont été obtenus chez les mêmes espèces animales. Le second avantage de la détection indirecte est qu'un premier anticorps unique est généralement reconnu par plus d'un second anticorps marqué (jusqu'à huit second anticorps), ce qui augmente la qualité du marquage et la sensibilité du dosage (**Regnault, 2002**).

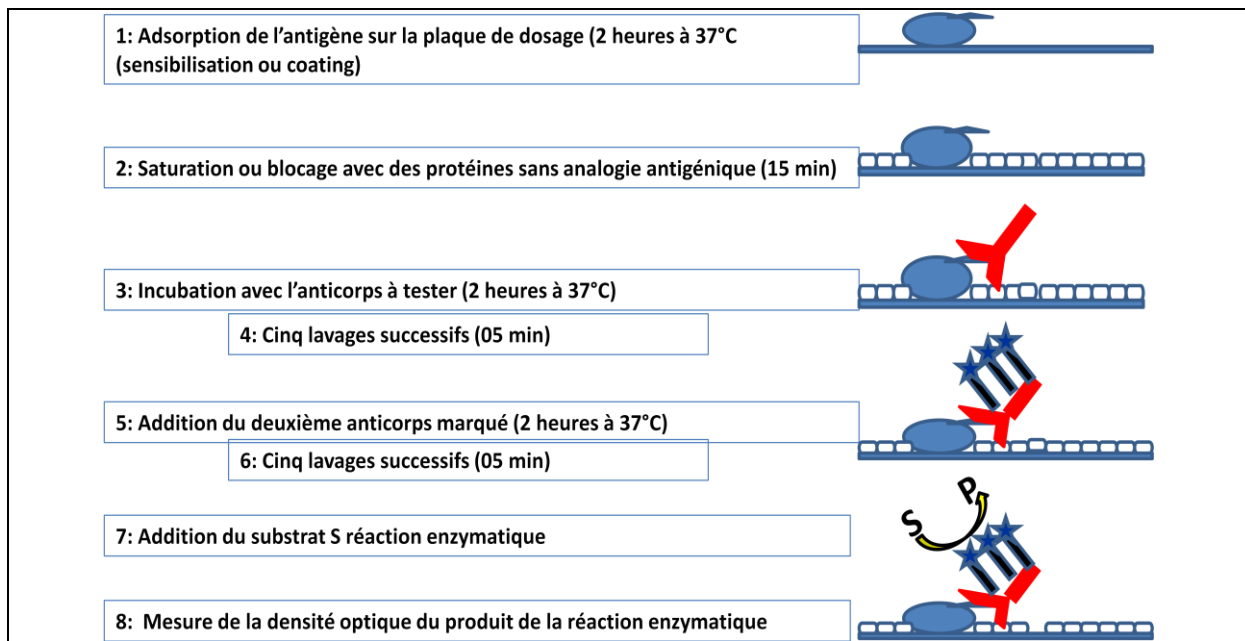


Figure 14: Immunodétection indirecte simple d'antigène (Regnault, 2002)

II.5.2.3.2.2 Le dosage ELISA en « Sandwich »

Le dosage ELISA en « Sandwich » ou immunocapture ou ELISA à deux sites ou encore immunométrique, diffère du dosage ELISA simple par le fait que l'antigène à doser n'est plus absorbé sur le plastique des plaques, mais immobilisé par un anticorps spécifique lui-même fixé au fond des puits.

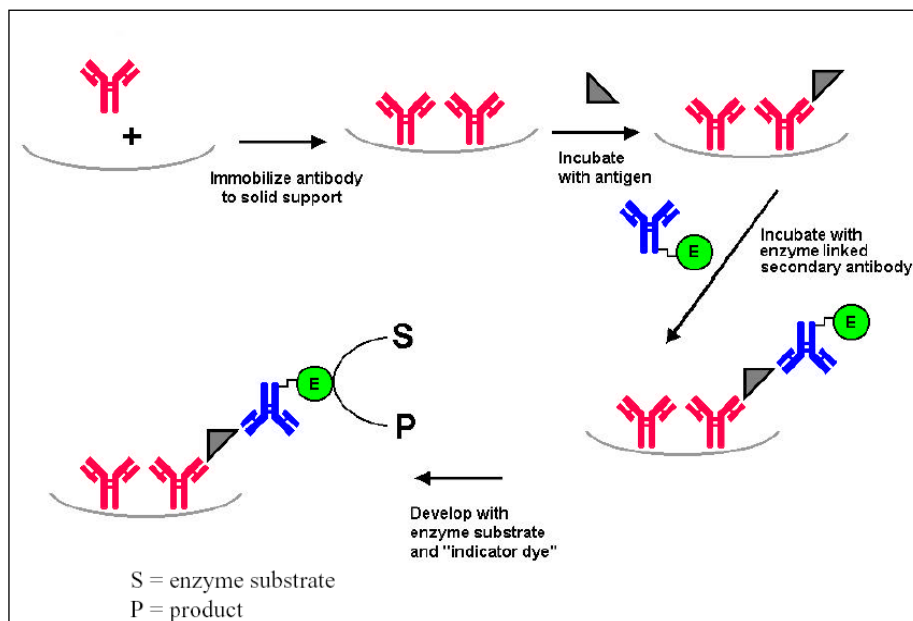


Figure 15: principe d'un dosage par extraction-saturation (technique sandwich) (Chomard, 2001)

L'antigène à doser est détecté ensuite comme le dosage simple, soit de façon directe, par un premier anticorps couplé à une enzyme, soit mieux, encore d'une façon indirecte, par un premier anticorps non marqué, détecté lui-même par un second anticorps couplé à une enzyme (Figure 15).

II.5.2.3.2.3 le dosage ELISA par compétition

Dans le dosage ELISA par compétition, des anticorps spécifiques sont fixés au support solide. L'antigène non marqué à doser est ajouté en quantité croissante en même temps qu'une quantité fixe et limitée d'antigène marqué. L'antigène « non marqué » et l'antigène « marqué » entrent en compétition pour la liaison à l'anticorps immobilisé, si bien que plus il y a d'antigène dans l'échantillon à tester, moins l'antigène marqué peut se lier à l'anticorps (Figure 16).

Les mesures quantitatives de l'antigène à doser s'effectuent grâce aux courbes de référence tracées à l'aide de quantités connues d'antigène non marqué (**Ricoux et al, 2000**).

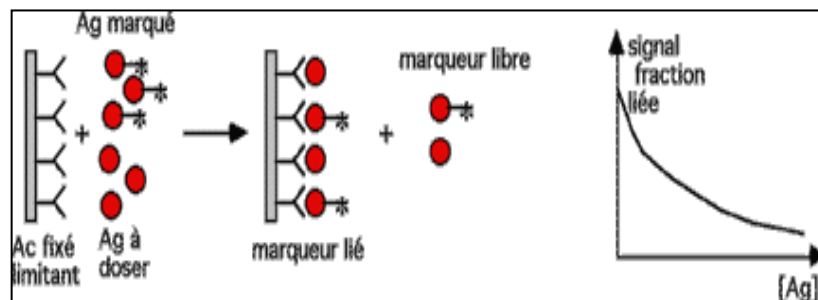


Figure 16: dosage ELISA par compétition (Lafont, 2005)

II.6 La technique ELISA

Présenté pour la première fois en 1971 par **Avrameas et Guilbert, Engvall et Perlmann**, Van Weemen et Schuurs, le dosage immunoenzymatique a été depuis largement appliqué, tant en recherche fondamentale que pour les diagnostics cliniques ou dans le domaine de la biotechnologie. Il a été conçu à partir des principes régissant les dosages radioimmunologiques, ainsi que ceux de la cyto ou de l'histoimmuno chimie. Son application pratique a pu être largement répandue dans la mesure ou il pouvait être adapté aux plaques en plastique utilisées depuis de nombreuses années pour les microtitrages par hémolyse ou hémagglutination.

La technique ELISA est en développement constant de manière à élargir son champ d'application. Elle permet de détecter et de quantifier les Ag ainsi que les Ac.

On a recours à deux types principaux de techniques : d'une part celles qui font appel à un support solide pour immobiliser un des composants de la réaction afin de faciliter la

séparation des réactifs non liés, et qui sont des dosages en phase hétérogènes, d'autre part celles qui sont réalisées en totalité dans un milieu liquide et qui sont dites en phases homogène (**Paraf et Peltre, 1992**).

II.7 Modalités de dosage immunochimique

II.7.1 La phase solide

Plusieurs phases solides ont été essayées pour immobiliser les Ac ou les Ag par liaisons covalentes sur des supports comme le verre, le nylon, la cellulose ou le polystyrène. Cependant, aucune méthode n'a été vraiment supérieure à la simple absorption physique sur les surfaces de plastique comme le polypropylène et surtout le polystyrène (tube en plastique de microtitration). Pour cela et aussi pour la facilité d'emploi, les dosages d'ELISA sont couramment pratiqués sur des plaques de microtitration de 96 trous en polystyrène pour lesquelles des lectures photométriques automatiques ainsi que des machines de lavage sont disponibles (**Avrameas et Ternynck, 1987**).

II.7.2 Les conjugués

Selon **Masseyeff, 1997** c'est **Avrameas et Uriel** qui ont montré en **1966** qu'il était possible de lier de façon covalente des enzymes à des Ag ou à des Ac sans faire perdre aux premiers leur activité catalytique et aux seconds leur pouvoir de liaison immunologique. Cette découverte a été appliquée à l'histologie mais n'a pas été immédiatement extrapolée à l'analyse quantitative.

II.7.2.1 Les enzymes

Les enzymes utilisés doivent posséder un ensemble de caractéristiques des rendant utilisables dans ces techniques : on doit pouvoir les obtenir à un degré de pureté élevé, à un prix raisonnable, ils doivent être stables, leur activité ne doit pas être altérée par le couplage covalent avec l'Ag ou l'Ac, cette activité doit être forte et donner lieu par l'intermédiaire d'un substrat à un signal identifiable (**Masseyeff, 1997**). Le Tableau 3 donne une liste des enzymes les plus utilisés et des substrats correspondants.

II.7.2.1.1 La peroxydase

Cette enzyme extraite du raifort, d'un PM 40 KD a une action oxydante. La peroxydase est une glycoprotéine, l'enzyme a comme substrat l'eau oxygénée (H₂O₂) dont elle déplace l'O natif et qui est alors révélé par un changement de coloration d'un réactif sensible. L'optimum d'activité enzymatique de la peroxydase est observé pour des pH voisins de 6 (**Tijssen et Kurstak, 1984**).

Le procédé de couplage en deux temps par le glutaraldéhyde est particulièrement applicable à cette enzyme contenant peu de groupements aminés ; lorsqu'elle est traitée par un excès de glutaraldéhyde, cette enzyme ne polymérise pas et peut alors se fixer dans un second temps à l'Ac (Nygren et Hansson, 1981).

Tableau 3: Principales enzymes utilisées comme marqueurs en immunoanalyse (Chomard, 2001)

Enzyme	Source	Substrats	Signal
Peroxydase (+H ₂ O ₂)	raifort	ABTS , OPD , TMB luminol, ABEI	Absorbance luminescence
Phosphatase alcaline (PAL)	<i>E.coli</i>	PNPP, PPP, FADP 4-MOP dioxetanes-phosphate	Absorbance fluorescence luminescence
β –galactosidase	<i>E.coli</i>	CPRG 4-MOG	Absorbance fluorescence
Malate déshydrogénase (MDH)	Cœur de porc	Malate/NAD	Absorbance
Glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PDH)	<i>Leuconostoc</i>	Glucose 6-P/NAD	Absorbance

II.7.2.1.2 La phosphatase alcaline

Métalloenzyme extraite d'*Escherichia coli* (PM=94 KD) ou d'intestin de veau (PM=125 KDA). C'est une phosphohydrolase avec un optimum d'activité à pH alcalin (9,5-10,5). Le résidu serine 102 est phosphorylé durant cette hydrolyse (Bradshaw *et al*, 1981).

L'activité enzymatique de la phosphatase alcaline est révélée à l'aide d'un substrat incolore (PNPP) qui donne un produit soluble coloré (PNP) mesurable au spectrophotomètre (Coleman, 1992).

Avec la peroxyde, cette enzyme est très utilisée pour l'obtention de conjugués destinés aux dosages immunoenzymatiques (Khatkhtay et Desai, 1999).

II.7.2.1.3 β –galactosidase

Enzyme isolée d'*Escherichia coli*, capable d'hydrolyser certains dérivés galactopyranosides avec un optimum d'activité pour des pH voisine de 7.

Avec cette enzyme, il est possible de construire des marques mixtes enzymatiques et fluorescentes. C'est le cas lorsque la β –galactosidase a pour substrat un composé fluorgène (la β-méthyle-ombelliférone) qui après action de l'enzyme donne un composé fluorescent (Bunea et Zarnescu, 2001).

II.7.2.1.4 α -Amylase

Enzyme thermostable isolée de *Bordetella licheniformis*. Les conjugués obtenus avec l' α -Amylase ont la particularité de maintenir leur activité biologique même s'ils sont conservés plusieurs semaines à 37°C (Nanda *et al*, 2002).

II.7.2.2 Procédés de couplage d'anticorps avec des enzymes

Selon Avrameas et Ternynck, 1987 lorsqu'on veut coupler deux constituants (A et B) entre eux, on peut procéder de deux manières :

II.7.2.2.1 procédé en un temps : les deux constituants A et B et l'agent couplant sont mélangés. Le couplage entre les différentes molécules se fait alors au hasard. La réaction est difficile à contrôler à cause de la réactivité différente des groupements fonctionnels de chaque constituant. Le produit de la réaction est en général hétérogène et de haut poids moléculaire mais peu de constituants ne sont pas couplés entre eux.

II.7.2.2.2 Procédé en deux temps : il consiste à traiter dans un premier temps un des constituant A avec un agent coupleur dans des conditions telles que les groupements introduits dans le constituant A restent actifs. Puis on élimine l'excès d'agent coupleur. Dans un deuxième temps, on fait réagir le premier constituant A dit « activé » avec l'autre constituant B à coupler. On obtient ainsi des composés plus homogènes (Avrameas et Turnynk, 1971).

II.7.2.3 Les agents de couplage

La plupart des agents coupleurs destinés à la préparation des conjugués Ac-enzyme sont des réactifs qui possèdent au moins deux groupements fonctionnels (Avrameas et Turnynk, 1971).

II.7.2.3.1 Couplage par le glutaraldéhyde

Ce réactif peut être utilisé pour coupler, par l'intermédiaire des groupements aminés, toutes les molécules possèdent des acides aminés primaires (Avrameas, 1969).

Le glutaraldéhyde est un aldéhyde dont les fonctions CHO se lient aux groupements aminés des lysines de l'enzyme ou de l'Ac (Avrameas et Ternynck, 1971).

Il a été utilisé pour coupler des anticorps aux enzymes (Parkinson *et al*, 1982) ou à la ferritine (Rauterberg et Schieck, 1981).

La technique de couplage au glutaraldéhyde est certainement la plus utilisée ; la simplicité des conditions permet de l'appliquer au couplage de toutes les protéines entre-elles (Ey et Ashman, 1986).

II.7.2.3.2 Couplage par le periodate de sodium

Ce réactif a été utilisé selon un procédé en deux temps et a été décrit pour coupler la peroxydase aux anticorps. Le couplage est basé sur le fait que la peroxydase possède peu de groupements aminés mais par contre est une glycoprotéine contenant 18% de sucre que le périodate peut oxyder en groupement aldéhydes actifs. Ces aldéhydes peuvent par la suite réagir avec les groupements aminés d'un anticorps ajouté secondairement. Ce procédé peut être appliqué à d'autres glycoprotéines comme la glucose oxydase (**Nakane et Kawaoi, 1974**).

II.7.2.3.3 Couplage par le dimaléinide

Le couplage est basé sur le fait que les groupements imides du dimaléinide réagissent avec les groupements thiols (-SH) de l'anticorps et avec ceux de l'enzyme.

Ce réactif est surtout utilisé pour coupler la glucose-oxydase aux anticorps. En cas d'absence de groupements thiols sur la molécule à marqueur, on utilise le monomaléimidobenzoyl N-hydroxy-succinimide-ester dans lequel une fonction maléimide est remplacée par la fonction N-hydroxy-succinimide-ester qui réagit avec les groupements -NH₂ (**Winston et al, 1989**).

II.7.2.3.4 Couplage par la p-benzoquinone

L'utilisation de cet agent a été décrite pour coupler des anticorps aux enzymes en activant soit l'anticorps, soit l'enzyme. Le couplage s'effectue par le procédé en deux temps. La réversibilité de ce réactif donne la possibilité de l'utiliser à différents pH ce qui permet un contrôle plus aisé de la réaction de couplage (**Winston et al, 1989**).

II.7.2.3.5 Système avidine-biotine

La forte interaction entre la biotine et l'avidine a été à la base du développement de nouveaux réactifs pouvant se substituer aux conjugués anticorps-enzyme préparés par couplage chimique. C'est ainsi que des anticorps « biotines » peuvent réagir avec l'antigène homologue et le complexe antigène-anticorps-biotine formé peut ensuite être révélé par deux procédés différents. Le premier consiste à utiliser l'avidine comme pont entre l'anticorps et l'enzyme, tous deux biotinisés, c'est le procédé BRAB (« Bridged-Avidin-Biotine ») Le second procédé consiste à utiliser de l'avidine couplée à une enzyme pour révéler l'anticorps biotiné; c'est le procédé LAB (« Labeled-Avidin-biotine ») (**Ternynck et Avrameas, 1987**).

II.7.3 Les substrats

Certains substrats spécifiques pour la mesure des activités enzymatiques ont la propriété de donner des produits de réaction solubles colorés qui permettent des dosages

précis de densité optique. Il existe aussi des substrats qui, après réaction avec l'enzyme libèrent des produits fluorescents. Ces substrats sont disponibles pour différentes enzymes, mais le plus efficace d'entre eux est le 4-méthyl-umbelliféryl- β -D-galactopyranoside, substrat qui hydrolysé par la β -galactosidase, donne le méthyl-umbelliférone, produit particulièrement fluorescent (**Ternynck et Avrameas, 1987**).

CHAPITRE III

polyphénols: structure et propriétés antioxydantes

III.1 Les composés polyphénoliques

Depuis une quinzaine d'années, chercheurs et industriels de l'agro-alimentaire s'intéressent de plus en plus à une catégorie d'antioxydants, les polyphénols. La reconnaissance des propriétés antioxydantes de ces composés, leur abondance dans l'alimentation et leur rôle probable dans la prévention des maladies associées à un stress oxydant sont les principales raisons de cet engouement.

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des métabolites secondaires largement répandues dans le règne végétal étant trouvé dans tous les fruits et les légumes. Ces composés sont présents dans toutes les parties des plantes mais avec une répartition quantitative qui varient entre les différents tissus. Plus de 8000 structures ont été identifiées (**Harborne, 2001**) allant de simples molécules comme les acides phénoliques à des substances hautement polymérisées comme les tanins (**Scalbert *et al.*, 2005**) qui présentent toutes un point commun: la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 atomes de carbone, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (**Hennebelle *et al.*, 2004**). Ils sont synthétisés par l'ensemble des végétaux et ils participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques (agents pathogènes, blessures, symbiose). Les polyphénols sont les antioxydants les plus abondants dans le régime alimentaire et contribuent à la qualité organoleptique des aliments issus des végétaux (couleur, astringence, arôme, amertume) (**Harborne, 2001**)

III.1.1 Classification des polyphénols

Les polyphénols sont répartis en plusieurs classes :

III.1.1.1 Flavonoïdes

Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux. Presque toujours hydrosolubles, ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquistes des plantes. Les flavonoïdes jouent un rôle important dans le système de défense. Les flavonoïdes peuvent fonctionner soit comme chélateurs de métaux (quercétine) ; soit capteurs de radicaux hydroxyles, superoxydes, alkoxydes et peroxydes (**Sofowora , 2010**).

Classification

Les principales classes des flavonoïdes sont : les flavonols, les flavones, les flavanones, les flavan-3-ols, les isoflavones et les anthocyanes, ils varient dans leurs caractéristiques structurales par la diversité fonctionnelle autour de l'oxygénation de l'hétérocycle (**Crosier, 2003 ; Sadasivam et Thayumanavan, 2003**) (figure 17).

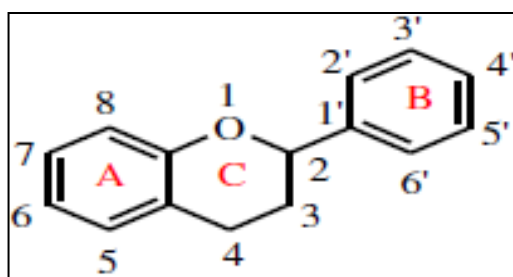


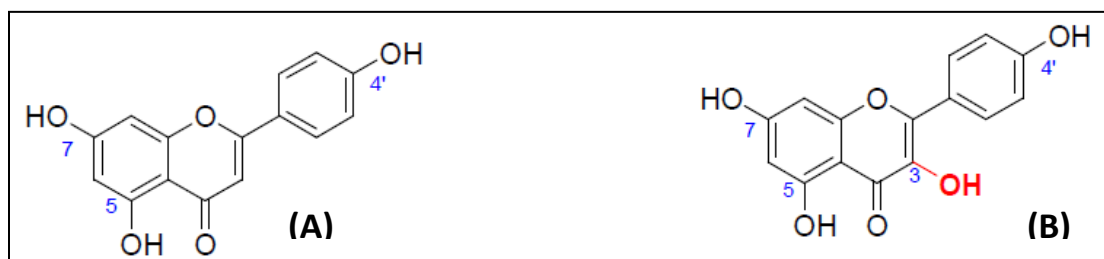
Figure 17 : Structure de base des flavonoïdes (Crosier, 2003)

Les principaux groupes de flavonoïdes peuvent être définis et différenciés comme suit :

➤ *Flavones et flavonols*

Le cycle A de ces deux types de molécules est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C5 et en C7. Ces hydroxyles peuvent être libres ou estérifiés. D'autre part, le cycle B est substitué en C4' ou di-substitué en C3' et C4' par des groupements OH ou méthoxyles (OCH₃).

Les flavonols se distinguent des flavones par un OH en C3 (Morreel *et al*, 2006) (figure 18).

Figure 18 : Structure des flavone (A) et flavonol (B). (Morreel *et al*, 2006)

➤ *Flavanones et hydroflavonols*

Ils se caractérisent par l'absence de la double liaison entre le C2 et le C3 et par la présence de centre d'asymétrie. Les variations structurales sont ici de même nature que celles décrites pour les flavones et les flavonols. Les dihydroflavonols se distinguent des flavanones par l'hydroxylation de la position C3 (Ono *et al*, 2006).

➤ Flavan-3-ols, flavan-3,4-diols et anthocyanidols (figure 19)

Ces molécules sont toujours hydroxylées en C3 et se caractérisent par l'absence du groupe carboxyle en C4. Cette position peut être libre (flavan-3-ols et anthocyanidols) ou hydroxylée (flavan-3,4-diols).

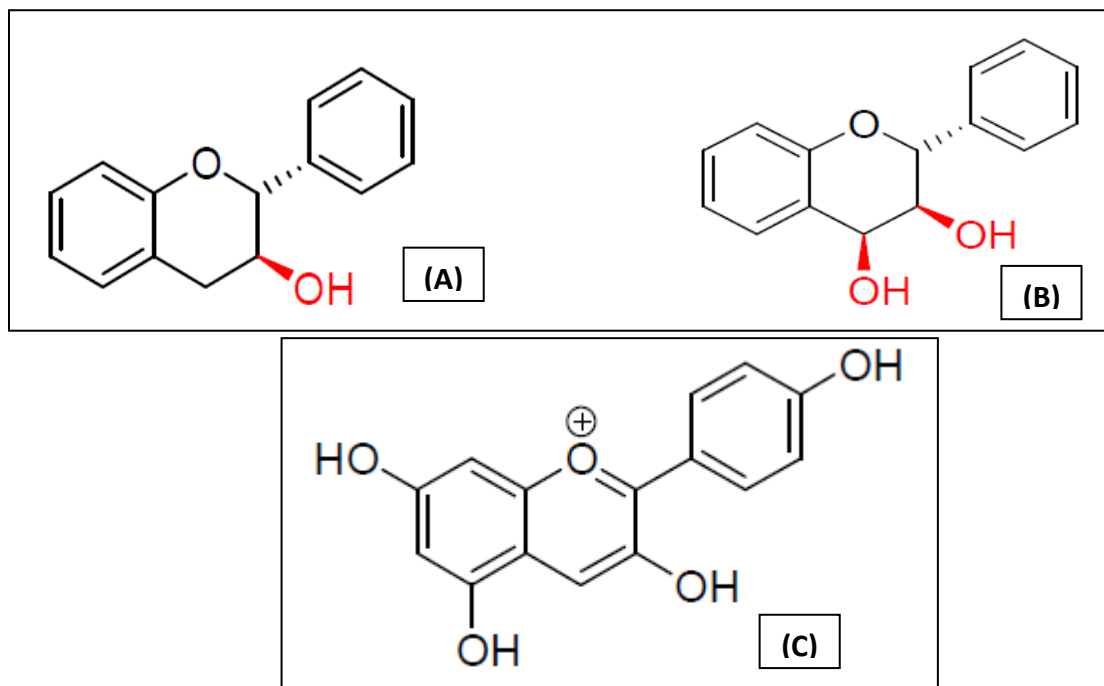


Figure 19 : Structure des Flavan-3-ols (A) ; Flavan-3,4-diols (B) et Pelargonidol (C) (Bruneton, 1999)

Les anthocyanosides sont caractérisées par l'engagement de l'OH en C3 dans une liaison hétérosidique. On trouve parmi ces composés, le pelargonidol-3,4-O-glucoside et le cyanidol-3-O-rutinoside ou keracyanine (Bruneton, 1999).

Les flavan-3-ols et les flavan-3,4-diols sont souvent à l'origine des polymères flavoniques appelés proanthocyanidols ou tannins condensés (Bruneton, 1999).

➤ Chalcones et aures

Les chalcones ont leur noyau pyranique central ouvert et sont constituées par deux unités aromatiques reliées par une chaîne tricarbonée, cétonique et insaturée (figure 20).

Le noyau B est assez fréquemment non substitué, alors que les substitutions sur le cycle A sont plus souvent identiques à celles des autres flavonoïdes. Les aures sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène coumarone (Bruneton 1999 ; Ono *et al*, 2006).

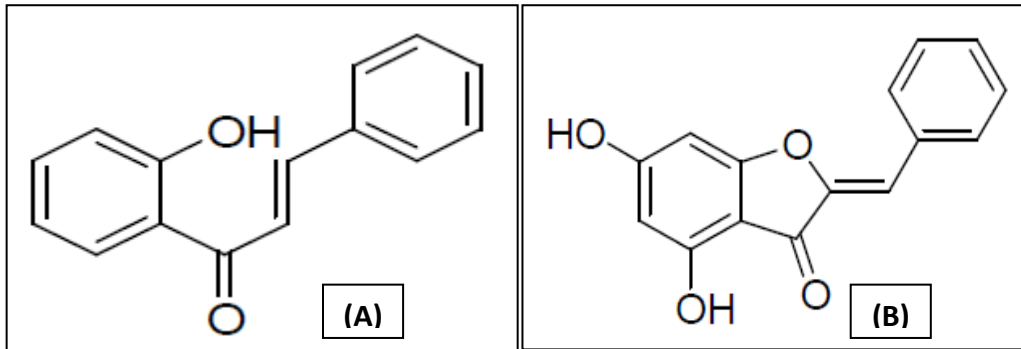


Figure 20 : Structure des Chalcones et Aurones (Jagtap and Khan, 2016)

Néanmoins, selon d'autres auteurs (Sarni et Cheynier, 2006), la classification des flavonoïdes inclue aussi le groupe des anthocyanes. Ceci en raison de la grande similitude structurale de ces derniers avec les flavonoïdes ; et plus précisément avec les anthocyanidols. La **figure 21** présente la biosynthèse des flavonoïdes.

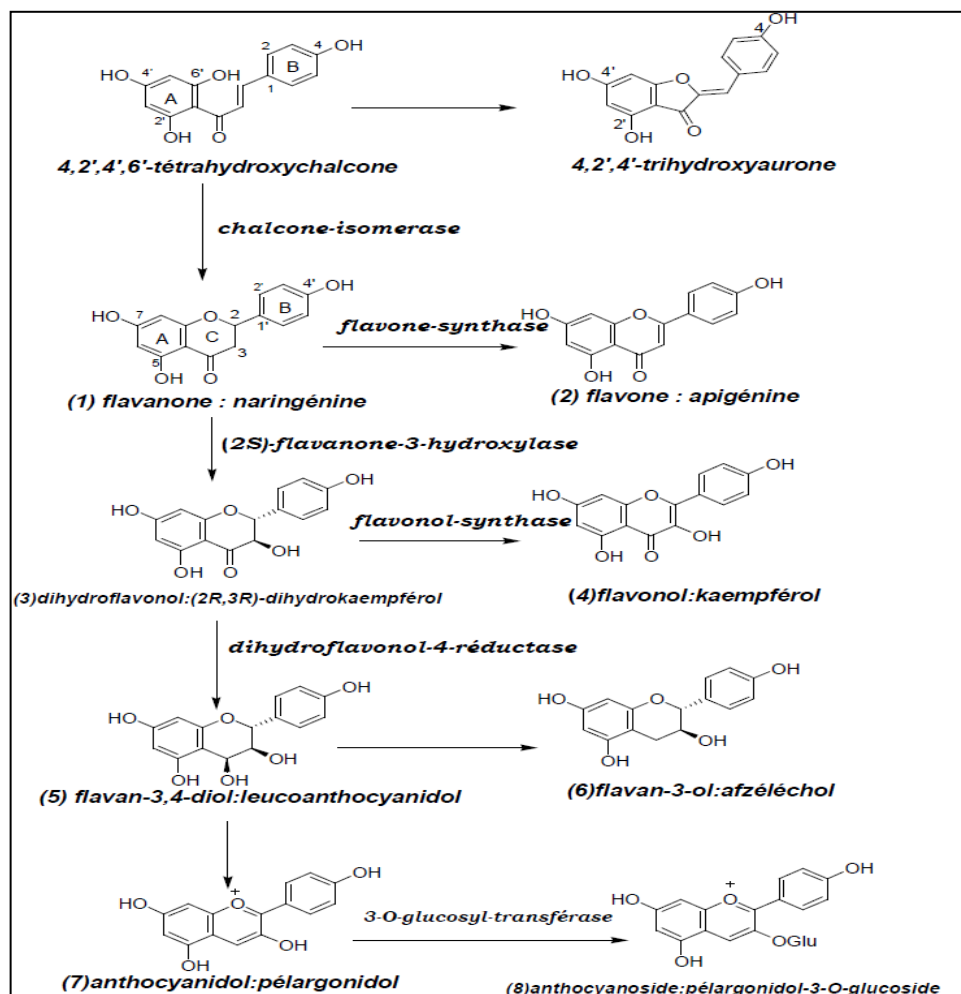


Figure 21 : Biosynthèse des flavonoïdes (Bruneton 1999)

III.1.1.2 Les tanins

Les tanins sont des polyphénols naturels d'origine, avec un poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Da (**Bouhadjera, 2005**). Ces métabolites secondaires, très répandus dans le règne végétal, sont présent dans le bois, l'écorce, les feuilles et les fruits des plantes supérieures (**Khenaka, 2011**) Les tanins ont la particularité de piéger les radicaux libres, ils limitent le stress oxydatif (**Bergoin, 2005**), leur capacité antioxydante due à leur noyau phénol. Ils sont caractérisés par l'inhibition de la peroxydation des LDL (**Bodas et al, 2008**), à ces propriétés s'ajoutent d'autre activités antitumorale, antimutagène, antivirale ou encore antiinflammatoire (**Buddle et al, 2010**).

Les tanins peuvent, selon leurs caractéristiques structurales, être divisés en deux catégories (figure 22) :

les tanins hydrolysables : constitués par une molécules de sucre, glucose le plus souvent, estérifiés par l'acide gallique ou un de ses dérivés (acide éllagique ou valonique), ils sont facilement hydrolysable par voie chimique ou enzymatique (**Garcia et al., 2008**).

Les tanins condensés : sont appelés aussi catéchiques, proanthocyanides, se sont des produits de la polymérisation de flavones et ne sont hydrolysables que dans les conditions fortement acides à cause de leur degré de polymérisation (**Garcia et al., 2008**).

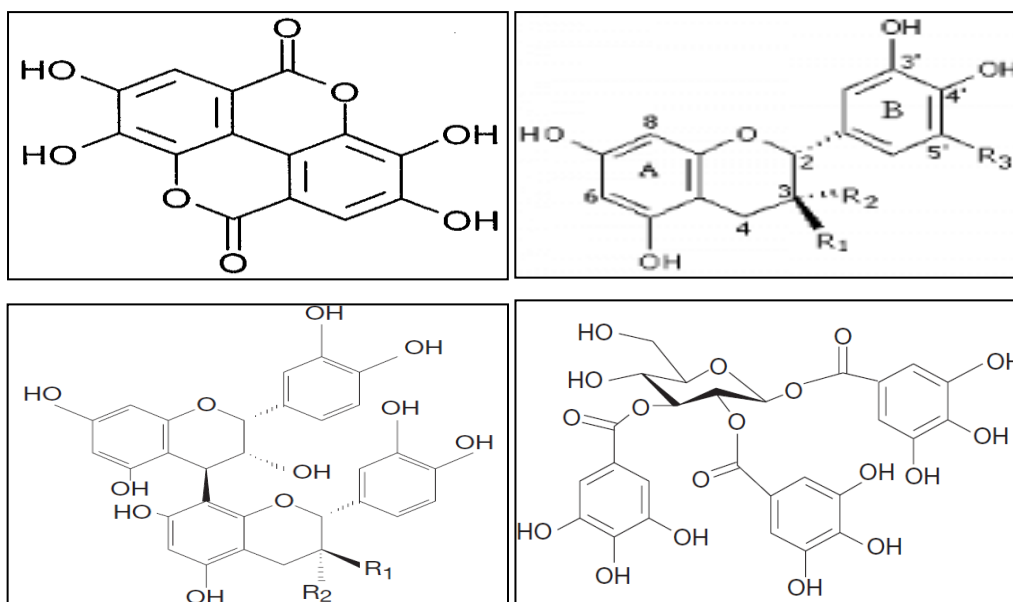


Figure 22: Structure chimique (a) d'un tanin condensé (proanthocyanidine) et (b) d'un gallotanin (1,2,3-tri-O-galloyl- β -D-glucose) (Bruneton, 1999 ; Garcia et al, 2008)

III.1.1.3 Les acides phénols

Les acides phénols, ou acides phénoliques, ont une fonction acide et plusieurs fonctions phénols. Ils sont incolores et plutôt rares dans la nature.

Classification

Ils se divisent en deux catégories :

Les acides phénols dérivés de l'acide benzoïque sont très communs, aussi bien sous forme libre que combinée à l'état d'esters ou d'hétérosides (**Haslam 1994**). Exemple : l'acide gallique qui est un élément principal de la structure des tannins hydrolysables (figure 23)

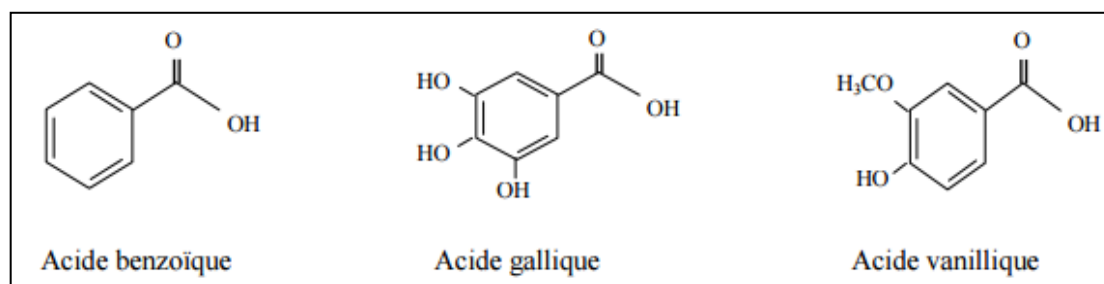


Figure 23: Exemple de quelques acides phénols de la série benzoïque (Bruneton 2009 ; Pawlowska *et al*, 2006)

Les acides phénols dérivés de l'acide cinnamique sont souvent estérifiés. Les plus courants sont l'acide cinnamique, l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide pacoumarique et l'acide sinaptique (**Haslam 1994 ; Bruneton 2009**) ; dont certains sont représentés dans la figure 24.

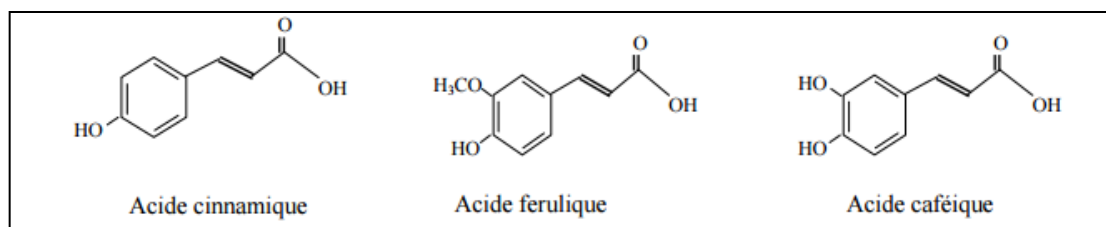


Figure 24: Exemple de quelques acides phénols de la série cinnamique (Bruneton 2009 ; Pawlowska *et al*, 2006)

III.2 Activité antioxydante

Un antioxydant est défini comme étant toute substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substances biologiques. Ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs (**Mohammedi, 2006**). Ces dernières années, les épidémiologistes ont attiré notre attention sur le rôle des antioxydants présents dans notre alimentation est leur implication dans la prévention de certaines maladies telles que les

maladies cardiovasculaires et neurodégénératives ou encore certains types de cancer (Soulet *et al*, 2001).

Des études récentes ont montré que les flavonoïdes possèdent de nombreuses activités biologiques, ces activités sont attribuées en partie aux propriétés antioxydantes de ces composés naturels. (Fuhrman *et al*, 1995). L'action antioxydant de ces composés ne s'exerce pas seulement par l'inhibition des radicaux libres, mais elle se manifeste aussi par la neutralisation d'enzymes oxydantes et par la chélation d'ions métalliques responsables de la production des espèces réactives de l'oxygène (Halliwell, 1994 ; Cotelle, 2001). À cause de leurs faibles potentiels redox, les flavonoïdes (Fl-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants (R^\bullet), comme le superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxy (HOO^\bullet), l'alcoxy (RO^\bullet) et l'hydroxy (OH^\bullet), par transfert d'hydrogène et le radical Flavonoxy (Fl-O) qui en résulte peut réagir avec un autre radical pour former une structure stable (Jovanovic *et al*, 1994).

Des chercheurs ont montré que les composés possédant un groupement carbonyle en C4 et une double liaison entre les carbones C2 et C3 sont les flavonoïdes dont les activités antioxydantes sont les plus marquées (Picman *et al*, 1995 ; Girotti-Chanu, 2006).

De nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur capacité à piéger les radicaux libres (Marfak, 2003) (figure 25). Leur intérêt comme antioxydants se manifeste également dans le domaine de la protection contre le stress photooxydant cutané induit par l'exposition aux rayons solaires (Mekkiou, 2005).

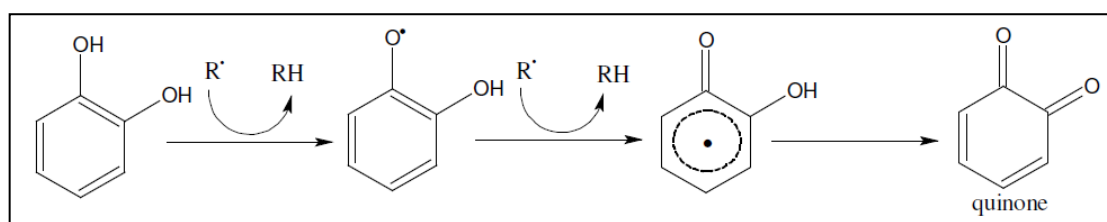
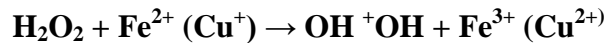


Figure 25: Piégeage des espèces réactives oxygénées ROS (R^\bullet) par les flavonoïdes (Marfak, 2003).
 R^\bullet représente l'anion superoxyde, le peroxy, l'alcoxy et l'hydroxy

Les flavonoïdes sont aussi considérés comme de bons chélateurs d'ions métalliques (Brown, 1998 ; Dacosta, 2003), comme les ions du fer (Fe^{2+}) et du cuivre (Cu^+) qui sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques, mais ils sont aussi responsables de la

production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :



Des essais *in vitro* sur différents tanins extraits de coloquinte montrent que les activités antioxydantes varient selon les composés, le plus efficace parmi les tanins extraits étant un tanin hydrolysable (**Hashimoto *et al*, 2003**).

Selon **Bruneton, 1999**, les tanins hydrolysables sont des piègeurs de radicaux libres et de l'ion superoxyde. Les tanins hydrolysables procyanidines présentent des propriétés antioxydants remarquables. Ils inhibent également l'autooxydation de l'acide ascorbique et de linoléate ; et la peroxydation lipidique des mitochondries du foie et des microsomes. Ces tanins sont de très bons capteurs des radicaux libres, ils sont donneurs des protons aux radicaux lipidiques produits lors de la peroxydation d'où la formation des radicaux tanniques plus stables (**Wen-Rebaba, 2002**).

CHAPITRE IV

La Coloquinte, Citrullus colocynthis

IV.1 Classification botanique

Citrullus colocynthis appartient à la famille des cucurbitacées qui comprend à peu près 100 genres et 750 espèces. Cette famille est connue pour sa grande diversité génétique et sa grande adaptation aux régions tropicales, subtropicales et les déserts arides (**Giwa et al, 2010**).

La famille des cucurbitaceae est répandue dans tous les continents du monde et particulièrement en Afrique et en Amérique latine. Elle a une grande importance économique car elle comprend des légumes comme les Courgettes et les concombres, des fruits comestibles comme le Melon (*Cucumis melo*) et la Pastèque (*Citrullus vulgaris*).

La coloquinte constitue la transition entre les espèces alimentaires et les espèces toxiques comme la byrone (*Byronia*) ou le concombre d'âne (*Ecballium*) puisqu'une consommation excessive de ces fruits peut entraîner la mort (**Armougom, 1998**).

La botanique à laquelle incombe la classification des espèces végétales, différencie la famille des cucurbitacées de la façon suivante:

Règne : Végétale

Sous règne : plantes vasculaires

Super division : spermaphytes

Division : angiospermes

Classe : dicotylédones

Sous classe : dialypétales

Ordre : dialypétales

Famille : cucurbitacées

Genre : *Citrullus*

Espèce : *colocynthis*

Nom binomial: *Citrullus colocynthis* (L.)

IV.2 Noms vernaculaires

Arabe: Handal, Hadag, Handhal, Hantal, Hadjja ;

Berber: Taberka, Tefersite, Tadjellet,

Français : coloquinte, chicotin

Anglais : Colocynth, bitter apple, bitter gourd

Allemande: Bitterzitrulle, Bitterapfel

Indie: Tumba ou Gartoomba

Italien: colointida, popone amaro coloquinte (Bedevian, 1936 ; Merad Chiali, 1973 ; Carter, 1997 ; John et Cincinnati, 1998 ; Batanouny, 1999 ; Sincich, 2002).

IV.3 Description morphologique

Citrullus colocynthis est une espèce rampante herbacée, annuelle ou vivace, munie de fleurs jaune verdâtre à sexes séparés, pédonculées, solitaires, apparaissent l'été : entre Mai et Aout à l'aisselle des feuilles, avec des tiges angulaires, rugueuses, rampantes ou migrantes et rudes.

Les feuilles sont larges de 5 à 10 cm de longueur, alternes, pétiolées, rugueuses et découpées en 5 à 7 lobes dentés obtus, sont vertes au-dessus, blanches et poilues en-dessous.

Chaque plante produite 15-30 fruits sphériques appelés gourdes, de 7 à 10 cm de diamètre ressemblent à une petite pastèque, de couleur verte panachée de jaune clair, devient complètement jaune à maturité, garnis de pulpe intérieure, spongieuse et très amère à cause de son contenu riche en colocynthine et colocynthéine dans laquelle se fixent les graines.

Les graines sont de petite taille (6mm de longueur) ovoïdes, aplaties et lisse, de couleur variant de l'orange au brun noirâtre et une saveur amère mucilagineuse (Merad Chiali, 1973 ; Feinbrun, 1978 ; Duke, 1983 ; Debuigne, 1984 ; John et Cincinnati, 1998).

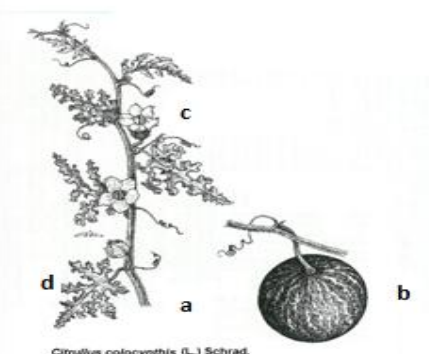


Figure 26: Coloquinte *Citrillus Colocynthis*. a= tameau ; b= fruit ; c= fleur ; femelle d= feuille (Zoro *et al*, 2003)

IV.4 Origine et distribution

La coloquinte était aussi bien connue chez les civilisations Grecques et Romaines que chez les Arabes (le *Handhal* est mentionné par Ibn El-Baytar dans ses prescriptions). Elle est aussi mentionnée dans un herbier Anglais du 11ème siècle (Trease, 1976 ; Memon *et al*, 2003).

La coloquinte est originaire des sols arides, est très fréquente dans les régions tropicales humides ou modérément sèches, elle est peu présentée dans les zones tempérées.

Elle occupe une région très vaste qui s'étend du nord Africain du Sahara, Arabie Saoudite, Egypte jusqu'au Inde, ainsi que les régions méditerranéenne (**Batonouny et al, 1999**).

IV.5 Composition chimique

Le screening phytochimique de différentes parties de la coloquinte (racines, tiges, graines et feuilles) a permis de caractériser les familles de composés chimiques existants dans la plante.

IV.5.1 La pulpe

Les cucurbitacées sont reconnues comme source de carbohydrates et de métabolites secondaires : les cucurbitacines.

Les cucurbitacines appartiennent aux groupes des triterpènes tétracycliques, ce sont des molécules en C₃₀ ou C₃₂ possédant 7 à 9 atomes d'oxygène et plusieurs groupes méthyle ou acétyle. Elles peuvent être libres ou associées à un sucre. Ce sucre peut être attaché directement au noyau stéroïdien ou/et à la chaîne aliphatique (**Harborne et al, 2001**).

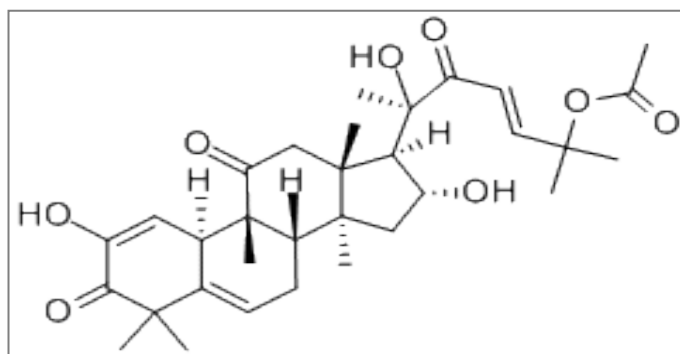


Figure 27: Structure de la cucurbitacine E (Harborne et al, 2001).

La présence des cucurbitacines responsables de l'amertume peut engendrer des propriétés purgatives de cucurbitacées (racine de bryone, fruit de coloquinte, suc d'élatrium) (**Takagi et al, 1981**).

La présence de cucurbitacines est liée à des facteurs génétiques, au stade de développement de la plante ainsi qu'à des facteurs environnementaux puisqu'ils représentent un moyen de défense de la plante. Ces composés apparaissent sous forme libre ou liés à un sucre. Ce sucre peut être attaché directement au noyau stéroïdien et/ou à la chaîne latérale aliphatique (**Blaise, 1997**). Ce sont des substances particulièrement toxiques (DL₅₀ voisine de 1mg/kg chez la souris en I.P.) amères, cytotoxiques, elles confèrent aux drogues qui en renferment des propriétés purgatives drastiques comme les graines de coloquinte (**Bruneton, 1993**).

De nombreux travaux sur l'extraction de ces principes actifs ont été menés avec succès. C'est ainsi qu'une quinzaine de cucurbitacines ont été isolées à partir des cucurbitacées et désignées par les lettres de l'alphabet : cucurbitacines A, B, C, D, E... (**Armougom, 1998**).

Parmi les cucurbitacines qui ont été identifiées à partir de l'extrait méthanolique de la plante de *Citrullus colocynthis* sont E, I, J, K et L (**Bauer et al, 1983 ; Seger et al, 2007 ; Sturm et al, 2009**).

Plusieurs de ces composés (cucurbitacines glucosides) ont diminué la croissance des cellules cancéreuses (cancer du sein) en provoquant des changements de la morphologie globale des cellules en diminuant l'organisation des filaments d'actine du cytosquelette (**Tannin-spitz et al, 2007**).

Par ailleurs, une revue de la littérature scientifique portant sur la grande famille des cucurbitacines souligne que ces molécules pourraient aussi protéger les cellules du foie contre certains composés toxiques, et aurait également des effets anti-inflammatoires. Puisque ces études sont essentiellement in vitro, ces résultats ne peuvent pas pour l'instant être appliqués à l'humain, et des chercheurs soulignent qu'il est impératif de mieux étudier ces composés afin de vérifier si certains d'entre eux ont des effets indésirables (**Jayaprakasam, 2003 ; Chen, 2005 ; Vanier, 2006**).

IV.5.2 Les graines

Les graines de *Citrullus colocynthis* représentent une bonne source de protéines et de lipides, elles font l'objet de nombreuses recherches.

- **Les protéines**

la fraction protéique représente 8,25% en poids des graines ; elle est riche en lysine, leucine et les acides aminés soufrés telle la méthionine (**Shaheen et al, 2003**).

Au cours de la germination des graines, les globulines sont utilisées avant les albumines; leur destruction permet l'élaboration des protéines à la jeune plante (**Jacks et al, 1972 ; Courtois et al, 1981**).

Notons qu'un acide aminé non protéique présentant une activité anti-helminthique a été identifié dans les graines de cucurbitacées ; il s'agit de la 3-amino-3-carboxypyrolidine ou cucurbitine (**Gurudeeban et al, 2010**).

Les protéines des cucurbitacées intéressent également l'industrie. Ainsi en Roumanie, elles sont utilisées pour la fabrication de colle à papier ou à bois.

- **Les glucides**

l'acide phytique ou ester hexaphosphorique de l'inositol identifié dans les graines représente une source importante de phosphate. En outre, les graines contiennent 70 à 80 % de phytine (sels métalliques d'acide phytique). Des triterpènes tétracycliques ou sous forme de glucosides appelés cucurbitacines sont présents. En revanche, l'amidon est apparemment absent (Courtois *et al*, 1981).

- **Les lipides**

Les graines de coloquinte sont riches en acides gras tels l'acide myristique, palmitique, stéarique, oléique, linoléique et linoléique (Khatri *et al*, 1993).

La composition qualitative et quantitative des acides gras des huiles comestibles sont similaires à celle des huiles commercialisées (huile de soja, tournesol...). Leur richesse en acides gras insaturés ainsi que leur forte teneur en acide linoléique confèrent à ces huiles de bonnes propriétés diététiques (Grompone, 1988 ; Karlesking, 1992).

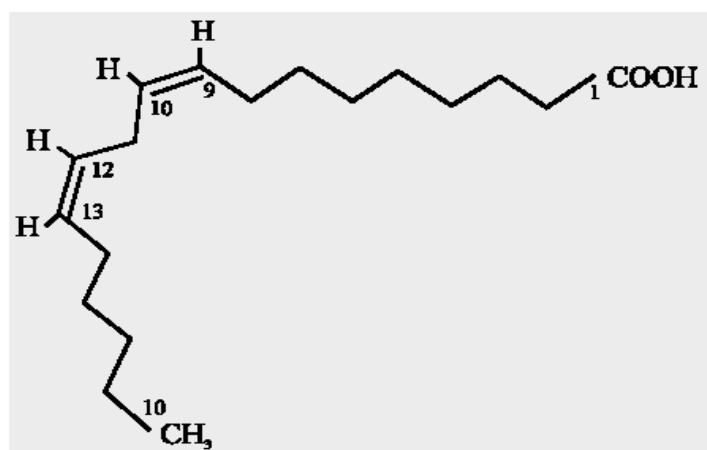


Figure 28 : Structure de l'acide linoléique (Khatri *et al*, 1993)

IV.5.3 Les tiges, les feuilles et les fleurs

Les feuilles et les fleurs de la coloquinte renferment de la quercétine et du kaempférol (Khare, 2007 ; Meena *et al*, 2008). Ce sont deux flavonols pourvus d'un excellent pouvoir antioxydant.

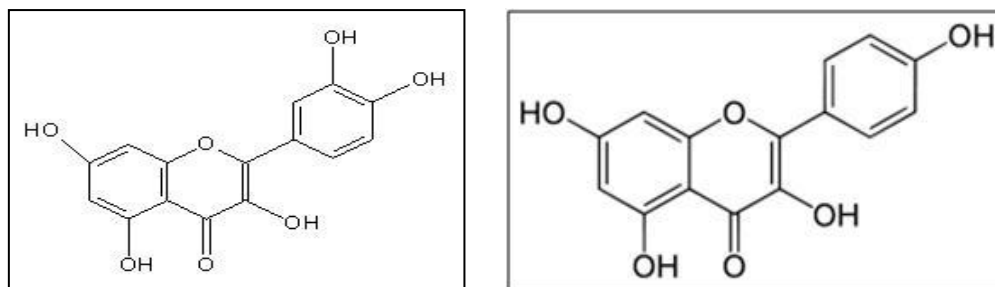


Figure 29: Structures de la quercétine et du kaempférol (Khare, 2007)

L'activité anti-oxydante au niveau des feuilles et des tiges de *Citrullus colocynthis* a révélé la présence des enzymes anti-oxydantes telles la catalase, la superoxyde dismutase (SOD), la glutathione reductase et la glutathione-S-transférase ; et d'autres molécules non-enzymatiques anti-oxydantes comme l'acide ascorbique, α -tocophérols, les caroténoïdes et les flavonoïdes comme cités ci-dessus. Ceci a permis de conclure que *Citrullus colocynthis* pourrait être une bonne source d'anti-oxydants. Par ailleurs, l'extrait (éther de pétrole) de feuilles a un effet anesthésiant local testé sur des grenouilles et un effet larvicide sur quelques espèces de moustiques (Abdul Rahman *et al*, 2008 ; Ramanathan *et al*, 2011).

IV.5.4 Les racines

C'est la partie de la plante où il y a eu le moins de recherches ; peu d'informations ont été élucidées sur les molécules présentes à ce niveau ; (Khare, 2007) a parlé de la présence de composés aliphatiques.

D'autres composés existent au niveau des racines comme l'hentriacontane (alcane longue chaîne hydrocarbonnée) et saponines (Memon *et al*, 2003).

Afifi *et al*, 1973 ont déterminé la présence de deux alcaloïdes : $C_{10}H_{15}NO_3$ et $C_{16}H_{24}NO_3$ dans tous les organes de la plante alors qu'un troisième alcaloïde ($C_{20}H_{36}NO_6$) est présent au niveau des graines, pulpes, feuilles et racines (Afifi *et al*, 1973).

Ainsi que, les fruits de la coloquinte contiennent trois flavonoïdes : 3'-méthoxy-isoorientine, iso-orientine et iso-vitexine. Les feuilles contiennent aussi trois flavonoïdes : 8-C-phydroxybenzoyl- iso-vitexine, 6-C-p-hydroxylvitexine et 8-C-p-hydroxybenzoyl- iso-vitexine 4' -o- glucoside (Maatooq *et al*, 1997).

Citrullus colocynthis renferme divers glycosides, Meissner et Vauquelin 1898, ont identifié pour la première fois un colocynthin ($C_{56}H_{34}O_{23}$), qui est responsable de l'amertume et des propriétés médicinales de la pulpe (John *et al*, 1998).

Ces glycosides se trouvent en grande quantité (0,22%) dans la pulpe. Les graines, les tiges et les feuilles renferment des taux respectifs de l'ordre de 0,18%, 0,17%, 0,15%

(**Darwish et al, 1974**). C'est β -cistosol-D Synthèse bibliographique glucoside qui est reconnu essentiellement par son effet antidiabétique, alors que les cucurbitacées A et B, sont responsables de l'activité anticancéreuse et insectifuge (**Duke, 2002**).

Cependant, les Graines de coloquinte contiennent 26,6% d'huiles, 13,5% des protéines, 2,1% des cendres, 52,9% des fibres brutes, 4,9% d'azote libre et contient 322 mg/100g de potassium, 119 mg/100g de phosphore et 3,3 mg/100 g de fer. (**Sawaya et al, 1986**). Contiennent aussi la phytosteroline (ipurand), 2 phytosterols, 2 hydrocarbures, saponines, alcaloïdes, polysaccharides, glycosides, et des tannins (**Duke, 1978**).

IV.6 Effets thérapeutiques

La pulpe mûre et séchée a un effet purgatif énergique, antinéoplasique, antihypertension, anti goutte, anti-arthrite et peut être un remède pour la congestion cérébrale, le rhumatisme et la sciatique (**Armougom, 1998**). Elle peut être aussi utilisée pour traiter les hémorroïdes et les varices (**Khare, 2007**).

A forte dose, elle est émétique et irrite les muqueuses gastro-intestinales et, à petites doses un bon expectorant.

En pharmacie moderne, l'extrait sec de la coloquinte entre dans la formulation des comprimés traitant les affections hépatiques, les fièvres, les parasites intestinaux, la constipation et la congestion cérébrale (**Anonymous, 1970 ; Memon et al, 2003**).

La pâte des racines s'applique aux différentes inflammations et tuméfactions. Dans le traitement de rhumatisme, 180g de mixture de racines et de poivre long à quantité égale sont pris tous les jours par le malade. Pour les inflammations intestinales et tumeurs, la poudre de racines mixée avec l'huile de ricin est administrée au malade, et la poudre seule peut être utilisée comme insecticide (**Dastur, 1962 ; Panda, 2000**).

Le cataplasme des feuilles est utilisé dans les migraines et les névralgies (**Kirtikar et al, 1957 ; Akhar, 1994 ; Khare, 2007**).

En Algérie, le traitement par le fruit du *Citrullus coloyntis* diffère d'une région à une autre sauf pour le traitement du diabète, où c'est toujours un traitement externe pour les trois régions :

- Dans la région d'El Goléa, en plus du traitement du diabète, il est utilisé pour les dermatoses, odontalgies, infections génitales et algies rhumatoïdes.
- Dans la région de Béni Abbès, on s'en sert surtout pour les infections génitales et les algies rhumatoïdes.

- Dans la région de Ouargla, on traite des plaies, des dermatoses et des piqûres de scorpions (**Maiza et al, 1993**).

IV.7 Toxicité de *Citrullus colocynthis*

Pendant des périodes bibliques, les fruits de la coloquinte ont été recueillis et considérés comme poison mortel (**Yanif et al, 1999**). Elle renferme 2 principes actifs: la colocynthe et la colocynthine. Cette dernière confère à la plante un effet purgatif extrêmement violent et dangereux, qui provoque généralement des hémorragies intestinales dont l'issue est souvent fatale (**Ben Salah et al, 1986**)

Sa consommation à des doses plus ou moins importantes peut provoquer divers accidents comme des diarrhées sanglantes et violentes, des douleurs abdominales, des douleurs épigastriques et rénales et une névralgie faciale (**Galvez et al, 1996**).

Les feuilles et les fruits sont particulièrement toxiques pour les moutons. La dose de 0,25 à 10 g/kg provoque la mort des animaux en 4 à 5 jours avec difficulté de respiration consécutive à une hémorragie pulmonaire, une entérite, une chute de poils et des diarrhées. Une quantité de 800 mg/kg de l'extrait éthanolique des feuilles de cette espèce est une dose toxique pour les rats et peut entraîner la mort de 60% de ces derniers après 24 heures (**Elawad et al, 1984; El Wasfi, 1994**).

Les études de la toxicité sur des petits ruminants suggèrent que la consommation du fruit endommage essentiellement le foie, les reins et l'appareil gastro-intestinal (**Yadav et al, 2013**). La poudre de pulpe est toxique à 0,6-1g/Kg ; les recherches ont montré que le fruit a une activité cancérogène (**Khare, 2007**).

CHAPITRE V

Modèle biologique Saccharomyces cerevisiae

V.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Depuis des années, *Saccharomyces cerevisiae* est utilisée comme un organisme clé pour l'identification et la compréhension des mécanismes moléculaires à la base des fonctions fondamentales de toutes les cellules eucaryotes (Knop et al, 2011).

A ce jour, cette levure est considérée comme cellule modèle en microbiologie et reconnue comme la « levure de boulanger » indispensable en panification. La classification de cette espèce est rapportée de levure est comme suit: (figure 30).

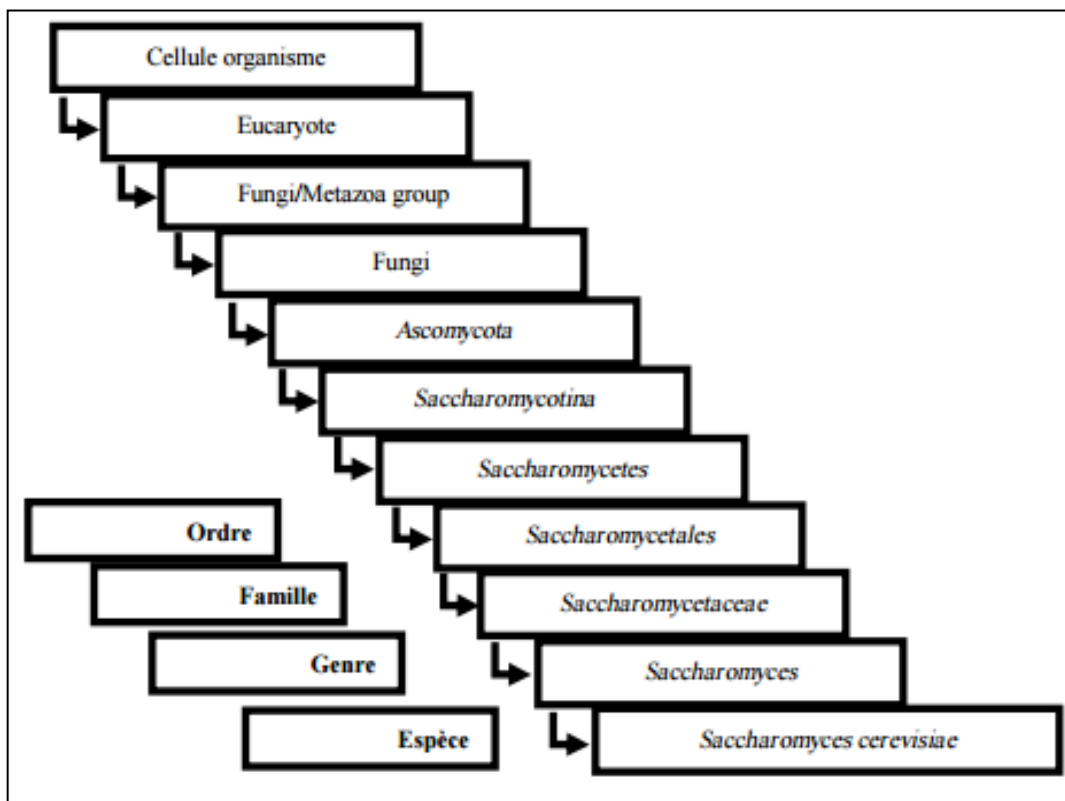


Figure 30 : Hiérarchie taxonomique de *S. cerevisiae* selon Nguyen, 2016

V.1.1 Principales caractéristiques de la levure *Saccharomyces cerevisiae*

V.1.1.1 Morphologie et métabolisme de la levure

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est reconnue par sa forme ovoïde à arrondie (phase stationnaire). La taille de la levure peut être variable de 1 à 10 μm en fonction de la composition nutritive de son milieu. La figure 31 représente la morphologie de *Saccharomyces cerevisiae* sous microscope. *Saccharomyces cerevisiae* est capable de suivre deux voies métaboliques : la voie aérobie et la voie anaérobie. Cela lui permet de vivre dans des environnements divers. Pour la voie aérobie, la levure se sert de la respiration aérobie pour métaboliser les glucides en dioxyde de carbone et en eau. Pour la voie anaérobie, elle fermente les glucides et produit de l'éthanol et du CO_2

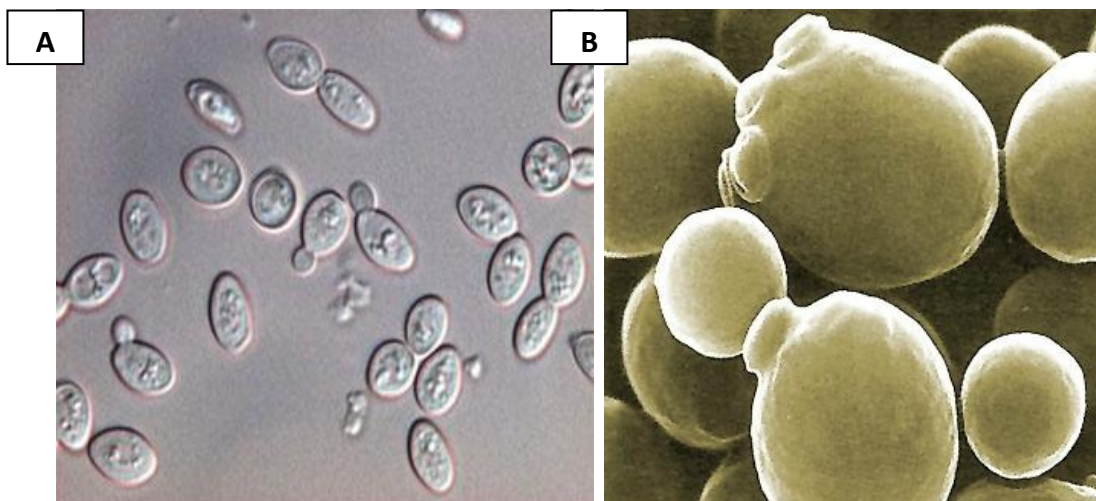


Figure 31 : Population de levure *Saccharomyces cerevisiae* (Nguyen, 2016)

V.1.1.2 Reproduction de la levure

V.1.1.2.1 Phases de croissance cellulaire

La croissance de la levure se présente principalement en quatre phases : phase latence, phase exponentielle, phase stationnaire et phase de déclin. Elle peut être encore distinguée plus précisément en rajoutant deux phases : phase d'accélération et phase de ralentissement. Cette terminologie est souvent utilisée pour décrire la courbe de croissance dans un milieu liquide, mais la croissance des cellules dans un milieu solide présente de phases similaires. Les deux phases les plus importantes de la courbe de croissance pour les études fondamentales ou les applications industrielles sont la phase exponentielle et la phase stationnaire. Dans la phase exponentielle, les cellules se divisent rapidement et la vitesse de division et le taux de croissance dépendent de la qualité nutritionnelle du milieu. Lorsque les éléments nutritifs essentiels deviennent limités, la croissance cellulaire ralentit ou même s'arrête. Lorsque les cellules atteignent la phase stationnaire, la levure contient une quantité plus élevée de tréhalose et de glycogène que dans les autres phases (Michael Breitenbach *et al*, 2004). Les cellules de la phase stationnaire sont capables de résister à un large nombre de stress (Werner *et al*, 1993).

V.1.1.2.2 Cycle de vie

La levure *Saccharomyces cerevisiae* existe sous deux formes diploïde ou haploïde qui peuvent suivre deux types de divisions cellulaires : la reproduction végétative et la reproduction sexuée. La ploïdie est la répétition de chromosome. Les cellules sont haploïdes lorsque les chromosomes qu'elles contiennent sont chacun en un seul exemplaire

(n chromosomes). Au contraire, les cellules avec des chromosomes en double exemplaire (2n chromosomes) sont diploïdes. La reproduction cellulaire est différente en fonction du génotype de la construction cellulaire

La figure 32 représente un cycle de vie de *Saccharomyces cerevisiae*. Les haploïdes (MAT a ou α) émettent des phéromones (facteur a ou α) qui sont détectées par les cellules de type sexuel opposé grâce à des récepteurs spécifiques. La fusion cellulaire et nucléaire des deux cellules haploïdes aboutit à la formation d'une cellule diploïde qui se multiplie ensuite par bourgeonnement (reproduction végétative) ou forme des spores.

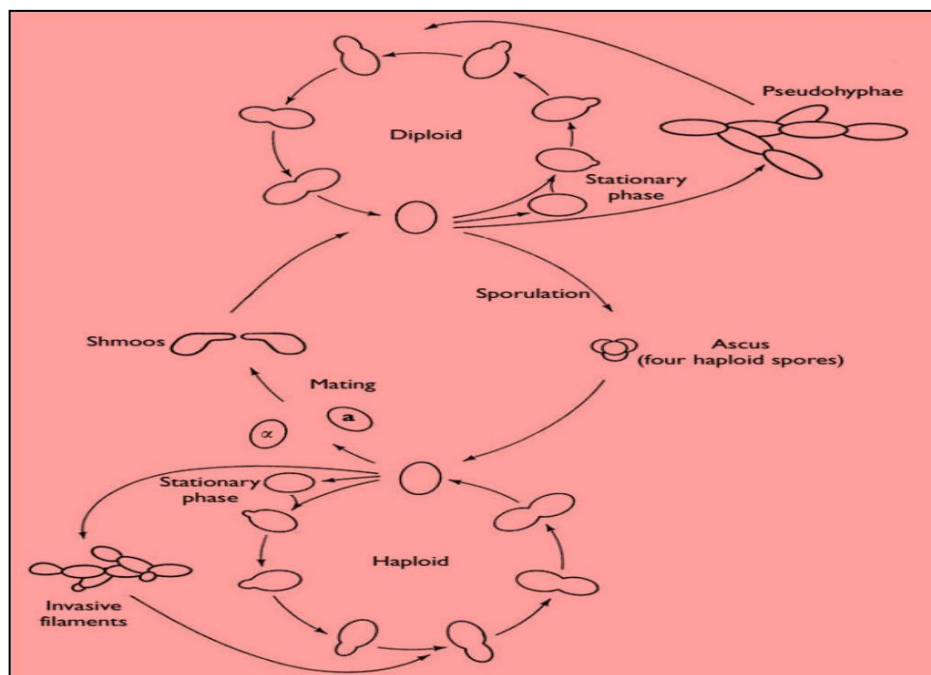


Figure 32: Cycle de vie de *Saccharomyces cerevisiae* (Michael Breitenbach et al, 2004)

Les cellules diploïdes (MAT a et α) se multiplient seulement en mode végétatif et produisent des nouveaux diploïdes. Une nouvelle cellule est formée par la division depuis sa cellule « mère ». Lors du bourgeonnement, la cellule «mère» forme un bourgeon à sa surface. Pendant que le bourgeon grossit, le noyau de la cellule mère se divise (mitose). Une paroi cellulaire commence à se former entre la cellule mère et le bourgeon. Lors que la taille de la nouvelle cellule acquiert 2/3 de cellule de sa mère, elles se séparent et deviennent deux cellules individuelles (Rupeš et al, 2002; Michael et al, 2004). La sporulation est observée chez les diploïdes (méiose) (Michael et al, 2004; Knop et al, 2011; Ibáñez et al, 2014). Quatre cellules haploïdes sont nées après cette étape. Lorsque les nutriments du milieu sont limités (condition de sporulation), les diploïdes forment les spores et produisent des haploïdes

qui possèdent des gènes différents par rapport à leurs cellules mères (Michael et al, 2004). Des auteurs ont reporté l'avantage de l'adaptation des cellules diploïdes comparées à celles haploïdes (Kondrashov et Crow, 1991; Thompson et al, 2006)

V.1.2 Conditions de culture

Saccharomyces cerevisiae peut être cultivée dans un milieu liquide ou solide. L'énergie et les éléments nutritifs nécessaires à la croissance et la prolifération de la levure doivent être assurés. La compréhension des conditions de culture permet de produire des levures qui présentent des caractéristiques intéressantes. Deux types de milieu peuvent être utilisés pour cultiver la levure : un milieu riche sélectif et un milieu synthétique.

Pour les milieux riches sélectifs, par exemple YPD, ceux-ci contiennent tous les nutriments essentiels pour le développement cellulaire. L'extrait de levure et peptone sont les sources d'azote principales. Ils contiennent également le phosphate, le sulfate, le sodium, le magnésium, le calcium, le cuivre, le fer, des acides aminées, des nucléotides, etc. De plus, ils contiennent des autres composés que toutes les souches de *Saccharomyces* sont incapables de synthétiser. Le sucre ou d'autres sources d'énergie doivent être ajoutés comme le glucose, le saccharose, l'acide lactique, etc., en fonction du génotype de la souche et la capacité de consommation des levures. Le glucose est la source de carbone la plus répandue. Dans ce type de milieu, les cellules se divisent rapidement avec un temps de division d'environ 90 minutes et les colonies sont facilement observées après environ deux jours d'incubation. Le milieu synthétique fournit les éléments nutritifs essentiels comme le milieu riche sélectif, mais il manque les acides aminés, les nucléotides et d'autres précurseurs. Ainsi, une souche doit être capable de synthétiser ces éléments afin de croître et se diviser dans le milieu synthétique. La croissance cellulaire est significativement plus lente avec un temps de division d'environ quatre heures. Les souches sauvages sont souvent capables de croître dans un milieu minimal synthétique qui contient une source de carbone et des sels minéraux. Par contre, les souches mutées sont incapables de synthétiser un élément essentiel. Si une souche est incapable de synthétiser un élément particulier alors les éléments nutritifs devront être ajoutés aux milieux pour sa croissance. Si une souche est incapable d'utiliser un élément nutritif particulier, le milieu doit contenir un autre élément de même source.

V.2 Impact des différents stress des procédés industriels sur *S. cerevisiae*

Depuis l'Antiquité, les Babyloniens, les Égyptiens et Celtes ont utilisé la levure pour la préparation de boissons alcoolisées. Vers 370 ans avant J.-C, Hippocrate, le célèbre médecin grec, a découvert l'action diurétique de la levure de bière et l'a conseillé comme remède. Au Moyen-Âge, les moines qui soignaient les lépreux absorbaient de la levure afin de ne pas être contaminés à leur tour. De nos jours, la levure *Saccharomyces cerevisiae* est largement utilisée dans l'industrie alimentaire pour la fabrication des boissons alcoolisées, du pain, des produits de santé et du bio-carburant. Les recherches actuelles portent sur l'amélioration des techniques de fermentation, la sélection de souches microbiennes à fort potentiel industriel et la découverte et l'exploitation de nouvelles voies biochimiques. Des groupes de scientifiques se sont attachés à mieux comprendre les phénomènes mis en œuvre lors des fermentations, des étapes de stabilisation et conservation, les aspects nutritifs de la levure, ou encore l'influence de certains paramètres physico-chimiques.

V.3 Interaction *S. cerevisiae* - pesticides

Saccharomyces cerevisiae présente un métabolisme respiratoire de capacité limitée (Vasserot, 1996), et est du type fermentaire (Botton, 1991 ; Belin, 1996). Largement utilisée en fermentation alcoolique industrielle où elle s'est imposée, elle possède une forte tolérance à l'éthanol, aux concentrations élevées de sucre et une stabilité en anaérobiose (Michel et al, 1990 ; Jackson, 1994 ; Panon, 1997). Elle a servi à des fins biologiques très variées. L'étude des gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques (médicaments, pesticides, toxines, métaux, etc.), la résistance, la toxicité et les cibles nucléaires et nonnucléaires des agents génotoxiques divers (Ohashi et al, 2003 ; Gomes et al, 2005), ont largement contribué à élucider ces différents mécanismes chez tous les eucaryotes, rendant ce modèle particulièrement robuste.

La membrane plasmique des levures est le site d'action de nombreux antifongiques qui vont soit se complexer aux stérols soit inhiber la synthèse de l'ergostérol et entraîner ainsi une désorganisation de la structure membranaire, et par la suite, un déséquilibre dans les échanges de la levure avec le milieu environnant ; suivi par différentes perturbations tel qu'une accumulation d'acides gras libres, une inhibition de la respiration et de la synthèse des acides nucléiques accompagnée par une augmentation du poids sec et des déformations morphologiques notables (Buchenauer, 1987 ; Bonaly, 1991 ; Hargreaves et al, 1996).

Plusieurs souches de *Saccharomyces cerevisiae* ont manifesté une sensibilité élevée envers le penconazole, le cymoxanil et le dichlofluanide, et ceci pour une gamme de

concentrations variant entre 5 et 100 mg/L pour les deux premiers, 0,2 et 6 mg/L pour le dernier (Ribeiro et al, 2000). Avec *S. cerevisiae*, la croissance est inhibée proportionnellement aux doses croissantes (0- 10 μM) de tributyltin ; cependant, après une heure d'exposition à 0,5 μM de ce biocide, la teneur cellulaire en tributyltin atteint 4,5 nmol/ 10^9 cell (Masia et al, 1998). Le DDT (0,5 ppm), le fénitrothion (1,5 et 10 ppm) et le chlorpyrifos (1,5 et 10 ppm) inhibent la croissance de *S. cerevisiae* jusqu'à 33%, 42% et 78% respectivement par rapport au témoin, mais cette inhibition est maximale au début du traitement, elle diminue progressivement à partir de 12 heures de contact pour disparaître complètement après 24 heures. Les cellules reprennent donc un fonctionnement normal malgré la présence des molécules toxiques dans le milieu et recommencent à se multiplier (Lal et Lal, 1987). D'après leur toxicité vis-à-vis de *S. cerevisiae*, 24 dérivés nitrobenzène souvent utilisés comme herbicides ou insecticides, peuvent être divisés en mononitrobenzènes et dinitrobenzènes ; l'action toxique des premiers dépend de leur processus de pénétration dans la cellule d'une part, donc de leur solubilité dans les membranes ou leur hydrophobicité, et de leur réactivité avec des sites cibles d'autre part ; alors que les deuxièmes présentent une toxicité supérieure et uniquement électrophile les impliquant dans des interactions avec les macromolécules structurales riches en électrons (Wang et al, 2002). Le traitement de *S. cerevisiae* par l'endosulfan engendre des dégâts oxydatifs, il en résulte une inhibition de la croissance et de la respiration cellulaires positivement corrélée à la dose appliquée, et qui peut être remédiée par l'apport d'antioxydants tel que l' α -tocophérol ou la β - carotène. La toxicité de l'endosulfan serait alors étroitement associée à l'induction de la génération d'espèces oxygénées réactives (ROS). En effet, lorsque les cellules sont exposées à 250 μM d'endosulfan pendant cinq heures, la génération de ROS augmente de 410 % par rapport aux cultures témoins démontrant un stress oxydatif sévère ; une dose supérieure d'endosulfan (500 μM) ne permet plus la mesure correcte des ROS générés à cause d'une grande perte de la viabilité. Quant à la croissance, elle se trouve réduite de 84 % par rapport au témoin après neuf heures de culture en présence de 100 μM d'endosulfan, cependant cette inhibition disparaît partiellement à partir de 22 heures de contact avec le pesticide suggérant une adaptation de *S. cerevisiae* à ce dernier ou sa détoxification (Sohn et al, 2004). Les levures peuvent se montrer résistantes à la présence de résidus de pesticides ; ainsi, l'application des six fongicides suivants : azoxystrobin, cyprodinil, fludioxonil, mepanipyrim, pyrimethanil et tétraconazole sur les moûts à des doses dépassant leurs LMRs (comprises entre 1,5 et 10 LMR) n'a pas affecté l'activité fermentaire de *Saccharomyces cerevisiae* et *Kloeckera*

apiculata, et ces levures n'ont présenté aucune adsorption ou dégradation des matières actives citées (Cabras *et al*, 1999). *Saccharomyces cerevisiae* cultivée dans des milieux additionnés de 0,01, 0,1 et 0,5 ppm de DDT et de 1,5 et 10 ppm de fénitrothion et chlorpyrifos est capable d'effectuer une bioaccumulation et une métabolisation de ces pesticides, mais seulement le DDD et le DDE ont été identifiés. En définitive, on peut noter qu'en matière d'interaction avec les pesticides, le modèle levurien se montre comme un système approprié pour répondre à nombreuses hypothèses de cytotoxicité et génotoxicité directe ou indirecte. Si les pesticides exercent une action toxique envers les levures, ces dernières peuvent à leur tour diminuer les résidus de pesticides par adsorption et/ou métabolisation des molécules toxiques. Cette vue d'ensemble ne peut que souligner l'efficacité du modèle levurien pour définir les bases cellulaires et moléculaires de la toxicité des pesticides.

PARTIE

EXPERIMENTALE

CHAPITRE VI
MATERIELS
ET
METHODES

VI.1 Effet immunotoxique de deux pesticides chez le lapin

VI.1.1 Animaux et aliments

L'élevage des lapins est pratiqué dans des conditions répondant au guide de bonnes pratiques en production cunicole (**Demers, 2013**). Des lapins mâles (n=35) de souche ITELV/98 âgés de 2 mois environ et pesant 2108,3±48,31g nous ont été fournis par l'institut technique des élevages de Sidi Bel-Abbes. Ils sont utilisés et élevés dans une batterie, avec des séparations, dotée de mangeoires avec une température de 20±2°C et un éclairage de 12 heures par jour (**Djago et al, 2007**). Les animaux, disposés en sept groupes de cinq lapins chacun, un groupe témoin et six groupes expérimentaux, perçoivent ad libitum de l'eau et un régime standard spécial lapin "EL ALF" sous forme de granulés (orge 20%, luzerne déshydratée 35%, tourteaux de soja 13%, son de blé 30%, sel 0,5%, complexe minéral et vitaminique 1%) durant toute la durée de l'expérimentation.

VI.1.2 Consommation de pesticides

La métribuzine commercialisée en Algérie sous le nom de Sencor[®] (70% de Métribuzine) est un herbicide de la famille des triazines inhibiteur de la photosynthèse par blocage de la protéine d1 du photosystème II et est utilisée pour le désherbage dans la culture de pomme de terre (**Hutchinson, 2012**). Le tribénuron-méthyle commercialisé sous le nom de GRANSTAR 75 DF (75% de Tribénuron méthyle pur) est aussi un herbicide de la famille des sulfonylurées, Inhibiteur de l'enzyme acétolactate synthase (ALS) conduisant à la synthèse des acides aminés ramifiés et utilisé comme herbicide sélectif des céréales (**FAO, 2011, Mukherjee et al, 2015**). Ces deux pesticides nous ont été fournis par la direction des services agricoles de la ville de Sidi Bel-Abbés. Les animaux sont abreuvés ad libitum avec l'eau supplémentée de ces deux pesticides aux concentrations calculées de 0,1 ; 1 et 2 µg/l qui sont respectivement 1 ; 10 et 20 fois supérieures à la norme relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine qui fixe à 0,1 µg/l la limite de qualité pour chaque type de pesticide et à 0,5 µg/l la limite de qualité pour la concentration totale en pesticides (**Directive n° 98/83/CE du 03/11/98**).

VI.1.3 Immunogènes et immunisation des animaux

L'ovalbumine, immunogène (SIGMA, A 5253, lot 60K0844), est dissoute à raison de 0,6mg/ml dans de l'eau physiologique. Pour effectuer la primo injection, un volume d'adjuvant complet de Freund (ACF) est mélangé à un volume égal de la solution antigénique d'ovalbumine. Pour les immunisations de rappel l'adjuvant incomplet de Freund (AIF) est utilisé dans les mêmes conditions. L'ACF (Sigma F 5881, lot 029K8708) et l'AIF (Sigma F

5506, lot 098K8724), nous ont été fournis sous forme huileuse dans des petits flacons de 10 ml par Sigma Aldrich, Germany. L'AIF utilisé contient 0,85 ml d'huile de paraffine et 0,15 ml de monooléate de mannide émulsionnés avec 0,85% de chlorure de sodium. L'ACF contient en plus des bacilles de Koch tués. L'immunisation des animaux est effectuée par voie sous cutanée, la plus commune qui permet d'éviter les abcès stériles qui suivent l'injection d'adjuvant complet de Freund (**Bean, 2000 ; Clark et al, 2002**). Les cuisses et les épaules des lapins sont rasées afin de cibler les différents sites d'injection et la seringue est inclinée lors de son introduction pour ne pas léser d'autres organes. L'adjuvant complet de Freund est chauffé à une température de 37°C pendant 1 à 2 minutes ensuite vortexé pour suspendre les mycobactéries (**Baldrige et Lacy, 2000**). La solution d'immunisation est préparée en mélangeant à l'aide d'un vortex 0,5 ml de l'ACF à 0,5 ml de la solution antigénique contenant approximativement 300 µg d'ovalbumine. Un volume de 1 ml est injecté profondément dans quatre sites au niveau des cuisses et des épaules de chaque lapin des lots expérimentaux. Les injections de rappel sont effectuées au 15^{ème}, 30^{ème} et 45^{ème} jour en utilisant dans les mêmes conditions l'antigène en présence d'adjuvant incomplet de Freund.

VI.1.4 Prélèvement sanguin

Dix jours après le troisième rappel d'immunisation (55^{ème} jour), une dernière immunisation type boost est effectuée suivie au 60^{ème} jour d'un prélèvement de 5 ml de sang. L'animal est chauffé à la lumière d'une lampe pour provoquer une vasodilatation périphérique. Le sang est prélevé par incision de la veine marginale de l'oreille de lapin. L'incision est effectuée de manière perpendiculaire au vaisseau et la veine est comprimée après le prélèvement afin d'obtenir une hémostase (**Perry-Clark et al, 1991 ; Smith et al, 1988**). Le sang collecté dans un tube sec est centrifugé à 1500g pendant 15 minutes. Le sérum est ensuite aliquoté et congelé à -20°C jusqu'à utilisation.

VI.1.5 Optimisation du test ELISA pour le dosage des IgG anti-ovalbumine

VI.1.5.1 Produits et réactifs chimiques

La gélatine, le Tween 80, l'ovalbumine, l'anticorps de chèvre anti IgG de lapin marqué à la peroxydase, l'o-Phénylènediamine nous ont été fournis par Sigma-Aldrich (Germany). Tous les autres produits chimiques et solvants sont de qualité analytique.

VI.1.5.2 Principe du test ELISA

Le protocole d'analyse retenu est celui de la technique ELISA conceptualisée et développée par **Engvall et Perlmann en 1971**. Il s'agit d'une technique ELISA indirecte non compétitive dont le principe repose sur la prise en sandwich de l'anticorps anti-ovalbumine

entre l'antigène (ovalbumine) et l'anticorps de chèvre anti-IgG de lapin marqué à la peroxydase. L'activité enzymatique est mesurée par addition de l'o-Phenylenediamine (OPD) un substrat incolore dont l'oxydation fournit un produit orangé apprécié par colorimétrie à 492 nm.

VI.1.6 Différentes étapes de la technique ELISA

VI.1.6.1 Coating de la solution antigénique d'Ovalbumine

Chaque puits de l'immunoplaque reçoit 100 µl d'une dilution de solution antigénique en tampon phosphate salin (PBS) 0,15 M pH 7.4. Après incubation pendant 2 h à 37°C on procède à trois lavages de la plaque avec du tampon PBS-Tween et un séchage par retournement sur du papier joseph afin d'éliminer toute trace de liquide résiduel.

VI.1.6.2 Saturation des sites adsorbant (surcoating)

Distribuer dans chaque puits de 100 µl d'une solution de blocage, PBS-Tween-Gélatine. La plaque est incubée 1 heure à 37°C en chambre humide ensuite lavée 3 fois avec du tampon PBS-Tween.

VI.1.6.3 Incubation avec l'antisérum (AS) de lapin anti ovalbumine

Distribuer 100 µl de chaque dilution de l'AS de lapin, effectuée dans le PBS-Tween-Gélatine. Après une incubation de 2 heures à 37°C en chambre humide, pendant laquelle les anticorps se fixent aux antigènes adsorbés sur la plaque, celle-ci est lavée 5 fois par le tampon PBS-Tween et séchée par retournement sur du papier joseph.

VI.1.6.4 Incubation avec la solution du conjugué

Distribuer 100 µl de solution du conjugué, anticorps de chèvre anti IgG de lapin marqué à la peroxydase, dans du PBS-Tween-Gélatine. Recouvrir la plaque et incuber 1 heure à 37°C en chambre humide. Laver 5 fois avec du tampon PBS-Tween pour éliminer tout conjugué non lié et sécher par retournement sur du papier joseph.

VI.1.6.5 Addition de tampon de révélation et lecture

Dissoudre extemporanément 6 mg d'OPD dans 12 ml de tampon citrate de sodium-acide citrique 0,1 M pH 5,5 et ajouter extemporanément 100 µl d'eau oxygéné H₂O₂ 3%.

Répartir rapidement 100 µl par puits et recouvrir la plaque avec du papier aluminium. Incuber 30 min à 37°C en chambre humide. Pendant l'incubation, le conjugué enzymatique lié convertit le chromogène incolore qui vire au jaune. L'addition de 50 µl de la solution d'arrêt H₂SO₄ 2N le fait virer du jaune à l'orange. La lecture des densités optiques du chromogène est faite à 492 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque ELISA (Tecan Sunrise, Austria GmbH).

VI.1.7 Détermination des dilutions optimales de titrage

Nous avons déterminé systématiquement les proportions optimales de chacun des réactifs entrant dans le dosage immunoenzymatique en l'occurrence l'Ac polyclonal de lapin anti-ovalbumine, l'antigène ovalbumine et l'Ac de chèvre anti IgG de lapin marqué à la peroxydase. La capacité d'adsorption de la microplaque conditionne la quantité fixée, qui commande à son tour la cascade des réactions ultérieures. L'expérience est menée sous forme d'une série de tableaux croisés.

Afin de déterminer les conditions optimales de titrage, des séries de puits d'une plaque de microtitration (de A à H) ont été sensibilisés par une série de concentration de l'ovalbumine de 10 ; 5 ; 2,5 ; 1,25 ; 0,625 ; 0,3 ; 0,1 et 0,07 μ g/ml. Chaque série de puits (de 1 à 11) correspondant à une dilution donnée de l'ovalbumine, a été mise à réagir avec une gamme de dilutions de l'immunosérum (Is) des lapins anti-ovalbumine (1/75, 1/150, 1/300, 1/450, 1/600, 1/750, 1/1200, 1/2400, 1/4800, 1/9600 et le blanc).

Les séries de puits précédemment sensibilisées sont croisées avec les dilutions de 1/2000 et 1/3000 du conjugué de chèvre anti IgG de lapin marqué à la peroxydase.

VI.1.8 Analyse statistique

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne suivie de l'écart-type. L'analyse statistique des données des différents groupes est réalisée par le test de Student "t", ce test statistique paramétrique est adapté à une analyse comparative entre les moyennes des groupes expérimentaux et celle du groupe témoin. La probabilité $P < 5\%$ est considérée comme significative.

VI.2 Etude de l'effet oxydant de la métribuzine

VI.2.1 Préparation la gamme de la métribuzine 70%

- 1- pour la Métribuzine à 100% de matière active la limite maximale de résidus (LMR) est de 0.1 μ g/L. Pour la Métribuzine à 70% la LMR est de 0.14 μ g/L.
- 2- Préparation de cinq (05) concentrations de Métribuzine à 70% (Tableau 4)

Tableau 4 : Gamme de métribuzine à 70%

Métribuzine (LMR)	1	5	10	15	20
Concentration (μ g/l)	0.14	0.7	1.4	2.1	2.6

Une solution mère est préparée avec 0,1mg de métribuzine dans 100 ml d'eau distillée stérile. A partir de cette solution, cinq (05) concentrations sont préparées selon la relation : $C_1.V_1=C_2.V_2$

La concentration $C_1=0,14\mu\text{g/l}$ représentant la LMR (limite maximale de résidus) est calculée à partir de la concentration de solution mère $C_0=0,1\text{mg}/100\text{ ml}$ avec $V_1=100\text{ml}$, et par conséquent V_0 pipeté =0,14ml. Le même procédé est adopté pour les autres concentrations :

Pour $C_2=0,7\mu\text{g/l}$, le $V_{0\text{ pipeté}}=0,7\text{ ml}$

pour $C_3=1,4\mu\text{g/l}$, le $V_{0\text{ pipeté}}=1,4\text{ ml}$

Pour $C_4=2,1\mu\text{g/l}$, $V_{0\text{ pipeté}}=2,1\text{ ml}$

pour $C_5=2,8\mu\text{g/l}$, le $V_{0\text{ pipeté}}=2,8\text{ ml}$

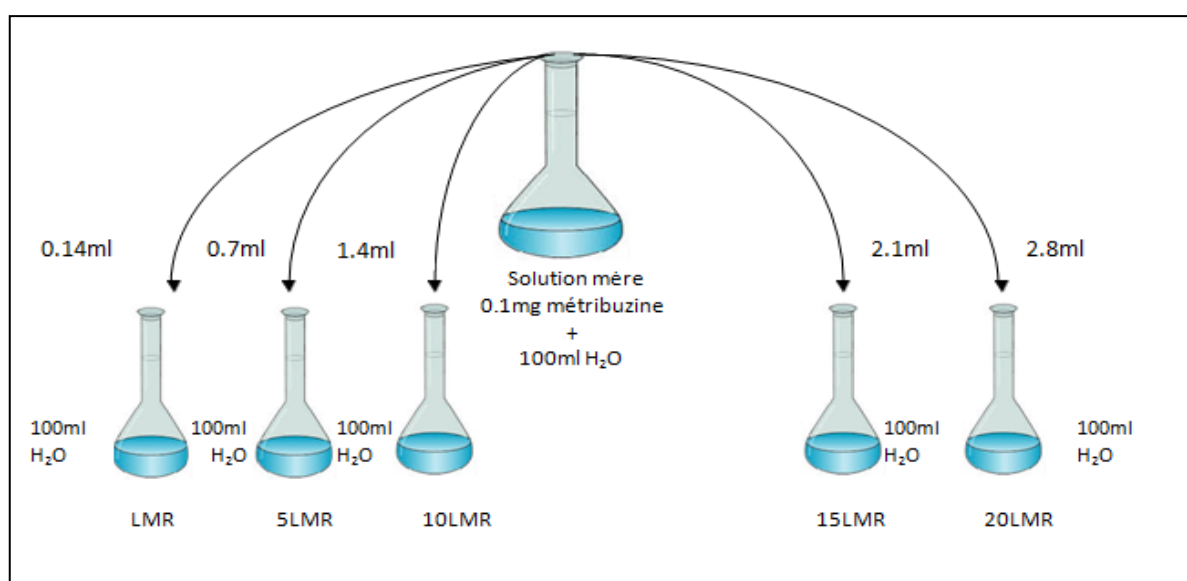


Figure 33: Préparation des différentes concentrations de Métribuzine

VI.2.2 Etude chez *Saccharomyces Cerevisiae*

VI.2.2.1 Purification de la souche *Saccharomyces cerevisiae*

Mode opératoire

Dans un verre de montre, on place quelques gouttes d'eau distillée et une miette de levure boulangère obtenue du commerce.

On mélange pour obtenir une solution légèrement laiteuse.

Pour la mise en culture des souches et leur isolement, la gélose de Sabouraud est utilisée. Cette dernière est mise dans des tubes à essai à raison de 15 ml par tube et le pH est ajusté à 6. Les tubes sont ensuite stérilisés à l'autoclave 20 min à 120°C.

Au moment de l'utilisation, les tubes du milieu Sabouraud sont mis à fondre dans un bain bouillant (100°C), puis maintenus en surfusion dans un bain thermostaté à 50°C. Le milieu est coulé stérilement à raison d'un tube par boîte de Pétri stérile. Ces boîtes sont

maintenues pour solidification et refroidissement dans un environnement stérile, entrouvertes, autour d'un bec bunsen. Elles sont ensuite stockées couvercle en bas avant d'être utilisées.

Après avoir stérilisé l'anse en la portant au rouge dans la flamme du bec bunsen et attendu qu'elle refroidisse dans la zone stérile, sans l'agiter ni la poser sur la paille, on prélève une anse d'échantillon (milieu contenant *la levure*) stérilement et on ensemence par stries sans entamer la gélose, une boîte de Pétri contenant le milieu de Sabouraud gélosé, par la technique suivante :

- * A l'aide d'un crayon feutre partager la boîte en deux moitiés, en faisant un trait sur le fond,

- * déposer le contenu de l'anse (l'inoculum) sur le milieu gélosé, puis l'étaler en faisant une strie en zig-zag, sans revenir en arrière jusqu'au trait de séparation, retirer l'anse mais la garder dans la zone stérile,

- *tourner la boîte d'un demi tour et recommencer à strier avec l'anse à partir de la deuxième moitié,

- * retirer l'anse, la flamber soigneusement, refermer la boîte, la retourner, la placer à l'étuve à 30°C pour une durée minimale de 48h.

Un repiquage est effectué une deuxième fois, ensuite les levures sont traitées au pesticide.

NB : On se limite à deux repiquages pour éviter les risques de mutation

VI.2.2.2 Traitement des levures par la métribuzine

Dans un milieu YPD (1% extrait de levure ,1% peptone, 2% glucose) les levures sont maintenues sous agitation 120 rpm à 30°C pendant 24h,

Le lendemain un prélèvement est effectué en vue d'obtenir une DO_{600nm} de 0.1 équivalente à $1.8 \cdot 10^6$ UFC/ml, ce qui représente 100% de viabilité (**Collinson et Dawes, 1992**).

Ensuite, on prélève 1.5 ml, et on le centrifuge à 4000g pendant 5min pour remplacer le milieu de culture par de l'eau distillée stérile. Deux lavages sont effectués pour éliminer le maximum de milieu de culture.

On ajoute 1.5 ml de Métribuzine à différentes concentrations aux levures à la concentration de $1.8 \cdot 10^6$ UFC/ml considérée comme 100% de viabilité et correspondant à la DO_{600nm} de 0,1.

Après 1 heure de stress on procède à un lavage des levures par l'eau distillée stérile en centrifugeant à 4000g pendant 5min.

Le milieu est remplacé à nouveau par 1.5 ml d'eau physiologique et la DO est toujours égale à 0,1

On procède par la suite à des dilutions décimales en cascade permettant d'obtenir entre 30 et 300 cellules comptées à partir de la DO_{600nm} de 0.1 ($1.8 \cdot 10^6$ UFC/ml) (Tableau 5).

Tableau 5: les dilutions décimales pour l'obtention entre 30 et 300 cellules à partir de la DO_{600nm}

Solution Mère	$D_1 10^{-1}$	$D_2 10^{-2}$	$D_3 10^{-3}$
$1.8 \cdot 10^6$ UFC/ml	$1.8 \cdot 10^5$ UFC/ml	$1.8 \cdot 10^4$ UFC/ml	$1.8 \cdot 10^3$ UFC/ml

Sur des boîtes de pétri contenant le milieu Sabouraud on étale 100 μ L de chaque tube à différentes concentrations (dilutions décimales) et on les incube dans une étuve à 30°C pendant 48h. On compte ensuite les colonies au bout de 48h.

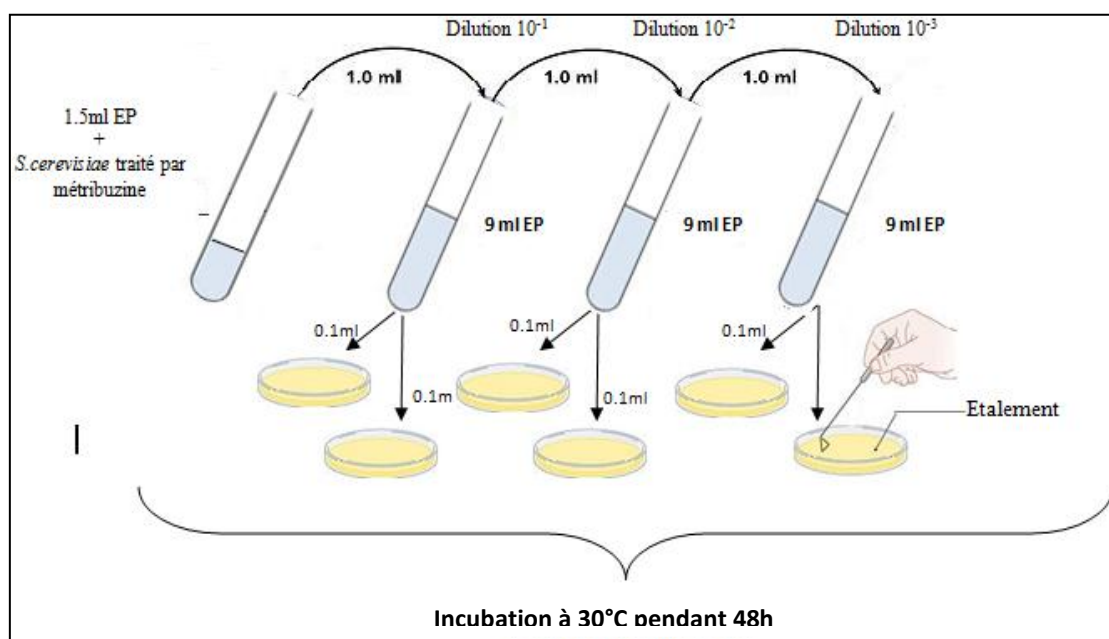


Figure 34: Utilisation des dilutions en cascade et d'ensemencement pour établir un nombre des cellules viables

VI.2.2.3 Détermination de la concentration inhibitrice de 50% (IC50)

Le pourcentage d'inhibition est déterminé par la relation :

$$100 * (N_t - N_{Met}) / N_t$$

Où N_t représente le nombre des colonies du témoin, N_{Met} celui de la boîte contaminée par le pesticide « Métribuzine » à la concentration « c ». Les concentrations inhibitrices de la

croissance de 50 % des colonies (IC50) sont estimées à l'aide du logiciel "Excel" en portant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration du pesticide.

VI.3 Evaluation du pouvoir antioxydant de la Coloquinte (*Citrullus colocynthis*)

VI.3.1 Préparation des extraits éthanoliques de *C. colocynthis*

VI.3.1.1 Matériel végétal

Les fruits de *C. colocynthis* sont récoltés à maturité durant le mois de mars 2017 dans la région Tamanrasset. Les graines et la pulpe sont récupérées à partir des fruits secs et broyées en poudre fine à l'aide d'un moulin à café.

VI.3.1.2 Mode opératoire

Une quantité de 7g poudre de pulpe ou de graines de *C. colocynthis* sont mises à macérer dans 50ml d'éthanol 80% sous agitation pendant 24h et à température ambiante et par la suite les' extrait sont filtré sur papier Whatman pour récupérer les premiers filtrats.

Les résidus sec on été macéré encore une foi à l'éthanol 50ml pendant 24h puis réalisé une deuxième filtration. Nous avons recueilli les deux filtrats et l'évaporées à sec dans un Rotavapor Buchi à 45°C jusqu'à séchage complet (figure 35). Les résidus secs ont été repris avec 1ml d'eau distillée stérile.

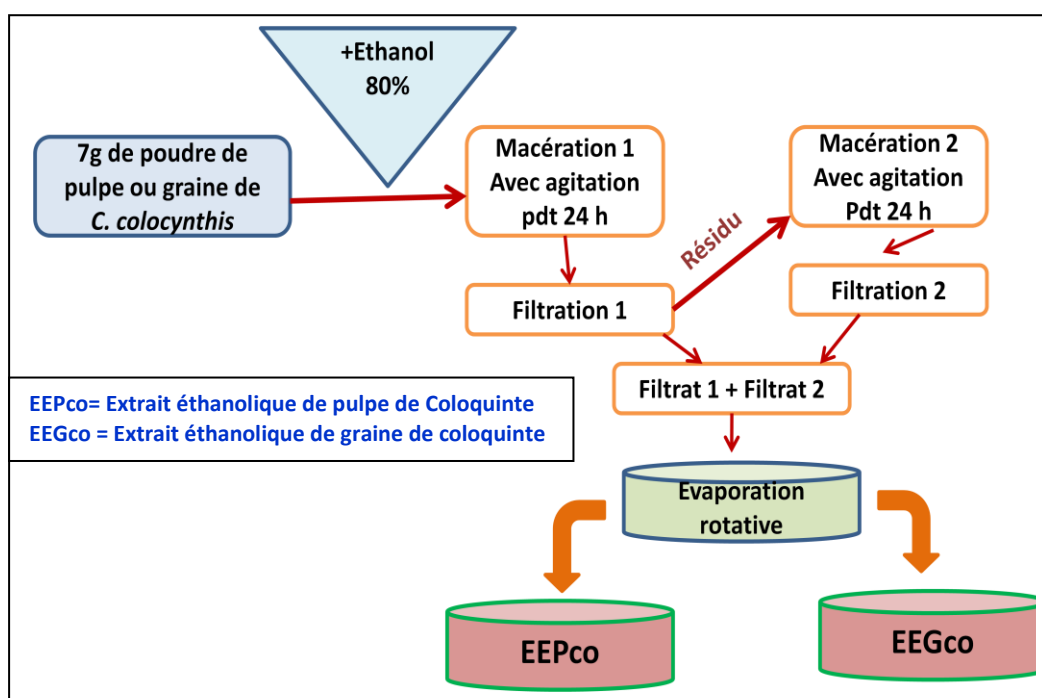


Figure 35: Diagramme d'extraction éthanolique des graines et des pulpes de *C. colocynthis* selon la méthode de Natiq *et al*, 1989

VI.3.2 Détermination de l'activité antioxydante des substrats

VI.3.2.1 Test de piégeage du radical libre DPPH

L'évaluation de l'activité antioxydante est effectuée par le test au diphényle-picrylhydrazyl, phosphomolybdate (DPPH) selon le protocole décrit par **Wang et al, 1998**. Pour cela, 0,5 mL de l'extrait (EEPco ou EEGco) à tester sont ajoutés à 1,25 ml de solution méthanolique de DPPH (4 %) et 0,5 mL de méthanol. Après agitation sur vortex, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la densité optique (DO) est mesurée à 517 nm. Le contrôle contient uniquement la solution de DPPH. L'activité antioxydante est évaluée à 517 nm en pourcentage d'inhibition ou pourcentage d'activité antioxydante, selon la formule suivante : % d'activité antioxydante = $(DO \text{ controle} - DO \text{ test}) / (DO \text{ controle} * 100)$. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration le test est répété 3 fois. On calcule graphiquement par la régression linéaire la concentration inhibitrice ou effective 50 (CI50) qui correspond à celle en antioxydants nécessaire pour réduire la moitié de la quantité en DPPH initialement présente dans le milieu (**Blois, 1958 ; Brand-Williams et al., 1995**).

VI.3.3 Implication des extraits éthanoliques de *C. colocynthis* dans la résistance de *S. cerevisiae* face à un stress induit par la métribuzine à la IC50

Pour tester l'effet de extraits éthanoliques de la pulpe et des graines de coloquinte sur la viabilité des *S. cerevisiae* on procède comme suit :

- Avec la IC50 déterminée précédemment sous l'effet de la Métribuzine, on stresse les levures dans les mêmes conditions décrites précédemment,
- A partir d'une suspension bactérienne dans un milieu YPD à une DO de 0,1 ($1,8 \cdot 10^6$ UFC/ml correspondant à une viabilité de 100%) on prépare les solutions de 1,5 ml suivantes:

1^{er} milieu = Levures ($1,8 \cdot 10^6$ UFC/ml) additionnées d'eau physiologique = Témoin

2^{ème} milieu = levures ($1,8 \cdot 10^6$ UFC/ml) additionné de 1,5ml de Métribuzine IC50 et considéré comme témoin de la IC50,

3^{ème} milieu = levures ($1,8 \cdot 10^6$ UFC/ml) additionné de 1ml d'extrait éthanolique de pulpe de *C. colocynthis* et de 0,5 ml de Métribuzine à la IC50,

4^{ème} milieu = levures ($1,8 \cdot 10^6$ UFC/ml) additionné de 1ml d'extrait éthanolique de graine de *C. colocynthis* et de 0.5 ml de métribuzine à la IC50.

Après une heure de stress, on remplace les milieux par de l'eau physiologique. On procède ensuite à des dilutions en cascade pour avoir entre 30 et 300 cellules et on étale 100µl de chaque milieu sur boîte pétri contenant le milieu de culture Sabouraud.

Le comptage des colonies est effectué après 48h d'incubation à 30°C dans un milieu Sabouraud et selon la relation qui suit :

$$[N] = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1 n_2) dV}$$

- Σc : la somme de toutes les colonies comptées sur toutes les boîtes retenues (au moins une des boîtes comptées contient au moins 15 colonies).
- $V = 100 \mu l$ le volume inoculum appliqué à chaque boîte.
- n_1 : le nombre de boîtes retenues à la première dilution (en général 2).
- n_2 : le nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution (en général 2).
- d : taux de dilution de la première dilution retenue pour les comptages sur boîte ($d=10^{-1}$).

- ▶ Le taux de dilution de la 1^{ère} dilution retenue pour les comptages sur boîte $d = 10^{-1}$
- ▶ $DO_{600} = 0.1$ signifie $1.8 \cdot 10^6$ UFC/ml représentant le 100% de survie.

CHAPITRE VII
RESULTATS
ET
DISCUSSIONS

VII.1 Evolution pondérale des animaux traités à la Métribuzine

Après huit (08) semaines de toxicité subaiguë par ingestion de pesticides, la pesée montre que l'évolution du poids des lapins du groupe témoin ($2094 \pm 14,97$ g à $5398 \pm 58,62$ g) est comparable à celle des animaux expérimentés du groupe recevant $0,1 \mu\text{g/l}$ de Métribuzine ($2140 \pm 108,66$ g à $5331,5 \pm 104,11$ g) et du groupe recevant $1 \mu\text{g/l}$ de Métribuzine ($2133,33 \pm 47,17$ g à $5225 \pm 29,64$ g) ($P < 0,05$). Pour le groupe expérimental recevant $2 \mu\text{g/l}$ de Métribuzine, l'évolution du poids des animaux reste aussi comparable à celle du témoin ($2109,17 \pm 53,52$ g à 5444 ± 54 g) ($P < 0,05$) (tableau 6).

Tableau 6 : Evolution des poids des animaux au cours de l'ingestion de Métribuzine (le test t de Student est utilisé pour comparer les différents groupes (n=5))

	Poids moyens des lapins à la réception	Ecart-types	Poids moyens des lapins après 8 semaines	Ecart-types
groupe témoin	2094	14,97	5398	58,62
Groupe recevant la Métribuzine à $1 \mu\text{g/l}$	2133,33	47,17	5225	29,64
Groupe recevant la Métribuzine à $2 \mu\text{g/l}$	2109,16	53,52	5444	54,00

Dans une étude sur la tératologie, où des lapines gravides ont reçu des doses importantes de Métribuzine une baisse de poids corporel a été observée pour la dose de 135mg/kg p.c. (Unger et Shellenberger, 1981). Les travaux de Chiali *et al*, 2013, ont montré que l'exposition à la Métribuzine induit une réduction significative du poids, de la consommation alimentaire et une perturbation des paramètres biochimiques chez le rat Wistar. Selon Merhi, 2008, le traitement des souris mâles et femelles avec le mélange de 11 pesticides ne semble affecter ni la consommation alimentaire ni l'évolution normale du poids de ces animaux comparativement aux témoins. Dans notre cas la dose de Métribuzine utilisée même 10 fois celle recommandée par la Directive n° 98/83/CE du 03/11/98, ne semble pas affecter le poids des animaux. Selon McKinley *et al*, 2008, la Métribuzine est un herbicide perturbateur hormonal thyroïdien dont l'utilisation est assujettie à une autorisation de mise sur le marché à usage agricole. Dans nos conditions expérimentales les probables perturbations des hormones thyroïdiennes, fortement impliquées dans la régulation du métabolisme, la

croissance et le développement, en particulier du système nerveux central des mammifères (Ait El Cadi et al, 2011) n'ont pas été mises en exergue par les simples mensurations pondérales. Cependant chez le groupe consommant 2µg/l de Métribuzine on relève des difficultés respiratoires, de la toux et des agressivités corroborées par les travaux de l'ORS, 2008. Selon Bleeke, 1985 les rats ayant reçu de la métribuzine marquée radioactivement, en ont éliminé environ 95% après la deuxième journée. On retrouve du mercapturate de désaminométribuzine dans les urines et des métabolites toxiques comme celui désaminé, dicéto et dicéto désaminé dans les tissus. Selon MSNBS, 1986 la consommation de Métribuzine par des chiens beagle à la dose de 1500ppm entraîne une diminution de la consommation alimentaire et du gain de poids. Dans notre cas la dose utilisée de 2µg/l (20 fois la norme) n'entraîne pas d'effet significatif sur le développement pondéral normal des animaux.

VII.2 Evolution pondérale des animaux traités au Tribénuron-méthyl

Ce composé est un biocide à usage domestique, un herbicide perturbateur des hormones œstrogéniques dont l'utilisation passe par une autorisation de mise sur le marché à usage agricole (Mc Kinley, 2008). Son administration à la dose de 0,1 et 1µg/l dans l'eau de boisson pendant 8 semaines n'entraîne aucune variation du poids des animaux recevant 0,1µg/l (2117±105,18g à 5325±78,79g) et 1µg/l (2115,5±72,30g à 5166±108,14g) de Tribénuron méthyl, comparativement au groupe témoin.

Tableau 7 : Evolution des poids des animaux au cours de l'ingestion de Tribénuron méthyl (le test t de Student est utilisé pour comparer les différents groupes, avec (n=5)

	Poids moyens des lapins à la réception	Ecart-types	Poids moyens des lapins après 8 semaines	Ecart-types
groupe témoin	2094	14,97	5398	58,62
Groupe recevant le Tribénuron méthyl à 1µg/l	2115,50	72,30	5166	108,14
Groupe recevant le Tribénuron méthyl à 2µg/l	2089,50	38,89	5427	49,86

L'administration de cet herbicide à des souris Crl: CD-1 (ICR) BR pendant 4 et 18 semaines a montré des doses sans effets observés (DSEO), différentes et respectivement de 500 et 20 ppm avec une diminution de poids dans les deux cas (PMRA, 1995). Une étude

conduite par la même agence chez le lapin blanc de Nouvelle-Zélande définit une DSEO de Tribénuron méthyle de 20 mg/kg p.c./jour chez la mère et le fœtus avec des effets tératologiques. A partir de 80 mg/kg p.c./jour on a signalé des pertes de poids et d'appétit ainsi que des décès chez les mères et les fœtus. Dans notre expérimentation chez le groupe recevant 2µg/l de Tribénuron-méthyle une perte d'un lapin est survenue au 58^{ème} jour. Cette perte semble être liée à la consommation de ce pesticide mais peut être due à une probable inadaptation physiologique de ce lapin qui a succombé à cette forte dose malgré une évolution pondérale normale qui passe de 2089,5±38,89 à 5427g±49,85 et qui reste comparable à celle du témoin.

VII.3 Evaluation du taux des immunoglobulines IgG par la technique ELISA indirecte non compétitive

VII.3.1 Détermination des conditions optimales de titrage par ELISA

Les résultats de la Figure 36 montrent l'influence de la dilution de l'antisérum de lapin sur les densités optiques en fonction des concentrations d'ovalbumine. La sensibilité du test augmente aux dilutions faibles de l'As de lapin anti ovalbumine et à la faible concentration d'ovalbumine. Les densités optiques varient de 1,58 à 0,045. Ainsi, à partir de ces résultats nous avons opté pour la dilution 1/750 d'As de lapin anti ovalbumine. A cette dilution l'absorbance présente une valeur maximale de 1,58 Unités à la concentration de 5 µg de solution antigénique (ovalbumine).

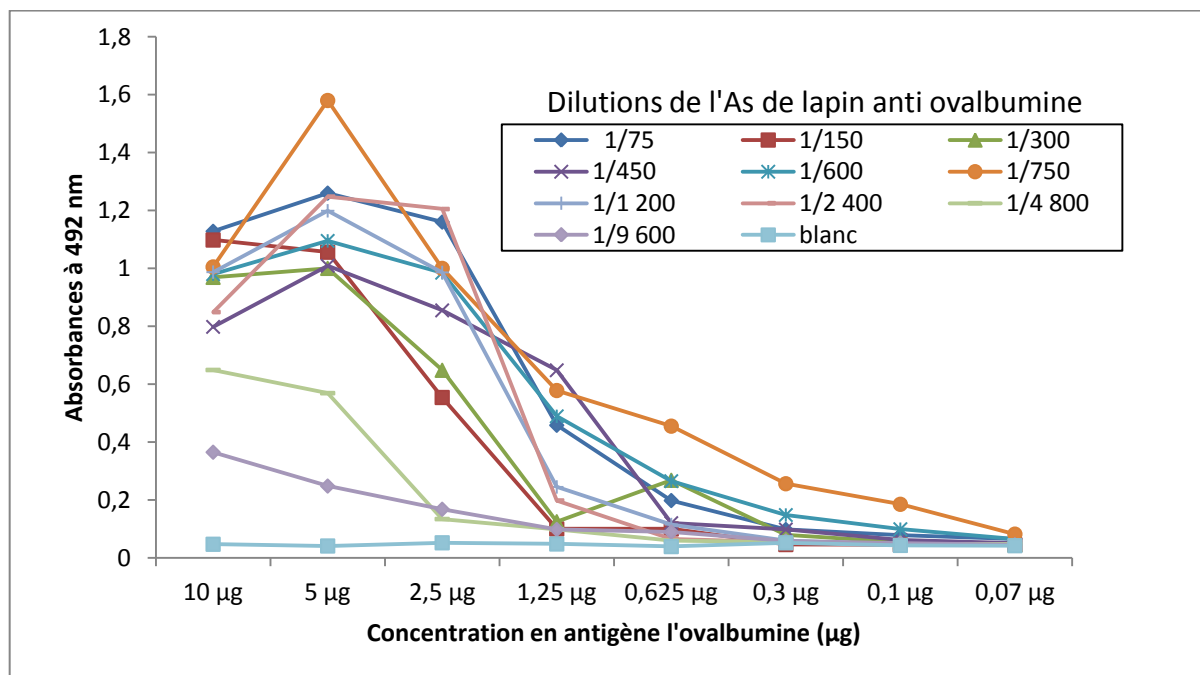


Figure 36: Influence des dilutions de l'As de lapin anti ovalbumine en fonction de la variation des concentrations d'antigène à la dilution 1/2000^{ème} du conjugué

En définitive la dilution 1/750 de l'As de lapin anti ovalbumine et la concentration de 5µg de cet antigène sont retenus pour la suite de nos travaux. Aussi la dilution au 1/2000^{ème} est retenue pour le dosage des immunosérums dans la gamme de dilutions adoptée comparativement à celle utilisant 1/3000^{ème} qui a donné de faibles densités optiques (figure 37).

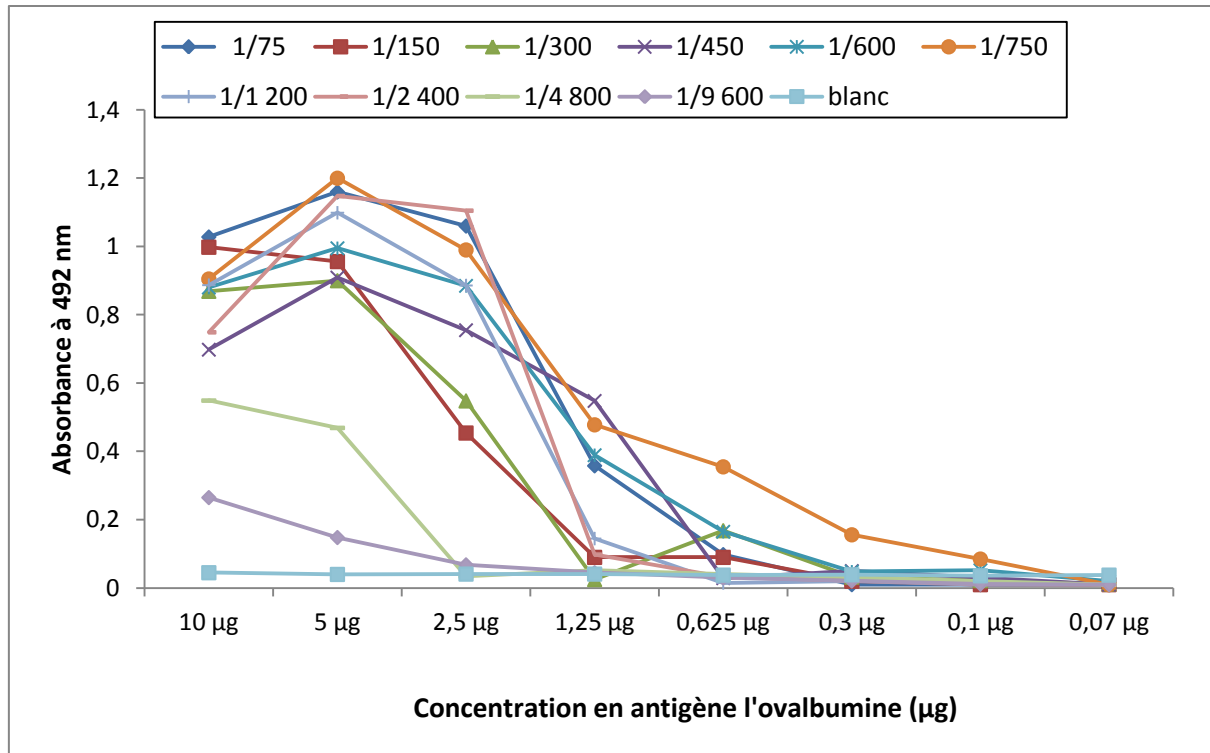


Figure 37: Influence des dilutions de l'As de lapin anti ovalbumine en fonction de la variation des concentrations d'antigène à la dilution 1/3000^{ème} du conjugué

VII.3.2 Détermination des IgG des différents groupes expérimentaux

Ces mêmes conditions expérimentales sont adoptées pour le test ELISA permettant le dosage immunoenzymatique des IgG de lapin anti ovalbumine. La Figure 38 montre que le taux d'immunoglobulines exprimées en unités de densité optique est diminué chez les animaux recevant de la Métribuzine comparés au témoin. Cette diminution est dose dépendante.

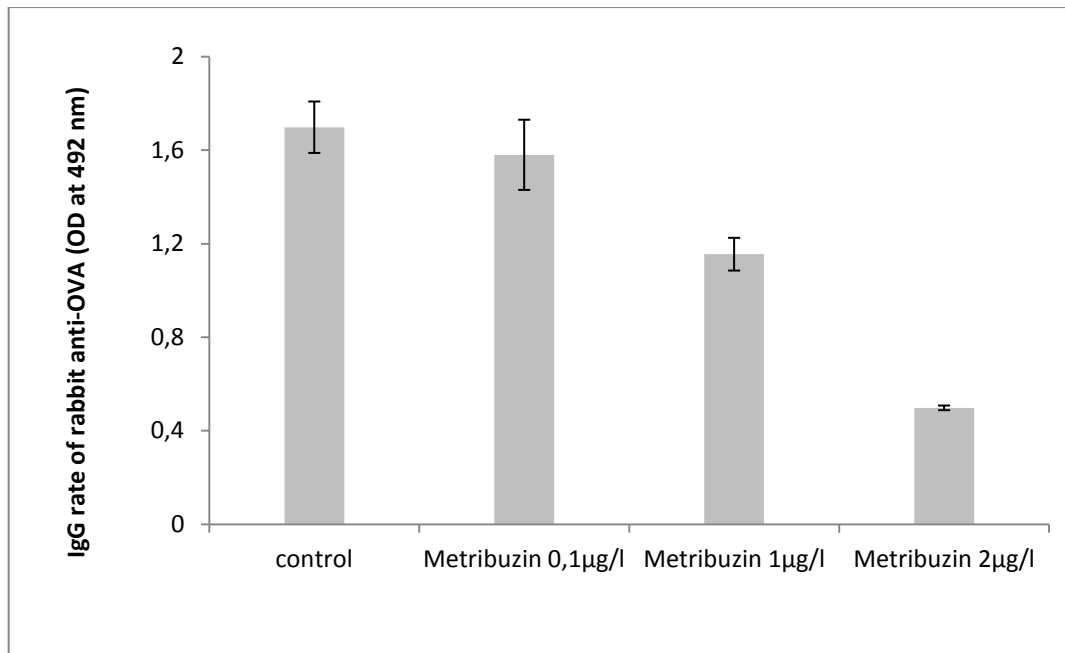


Figure 38 : Taux d'IgG de lapin anti ovalbumine du groupe témoin et ceux consommant la Métribuzine à 0,1 ; 1 et 2µg/l. (Les valeurs sont exprimées en moyennes ± écarts types)

Il en est de même pour les animaux recevant les mêmes doses de Tribénuron-méthyle (figure 39). Ainsi l'injection d'ovalbumine chez les lapins a suscité une réaction du système immunitaire par la mise en place d'une immunité innée ensuite spécifique entraînant la synthèse par les plasmocytes d'IgG dirigées contre l'ovalbumine. Cela est avancé par de nombreux chercheurs évoquant la réaction du système immunitaire vis à vis d'un composé étranger à l'organisme (Heyman, 2000 ; Li et al, 2004 ; Jackson and Elswa, 2015). L'immunosuppression peut se traduire par un blocage de la présentation de l'antigène ne permettant pas la maturation et/ou la migration des cellules dendritiques. Elle peut aussi inactiver la prolifération, la migration et l'infiltration tissulaire par les lymphocytes. Elle peut être obtenue aussi par une déplétion lymphocytaire (Lebranchu et al, 2012). On assiste dans notre cas à une diminution dose dépendante prononcée de la synthèse des immunoglobulines chez les animaux contaminés. Les études effectuées *in vivo*, ont montré que certains pesticides agissent essentiellement *in utero* en altérant l'activité des macrophages (Theus et al, 1992) et en diminuant la quantité des lymphocytes 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 T (Fournier et al, 1992).

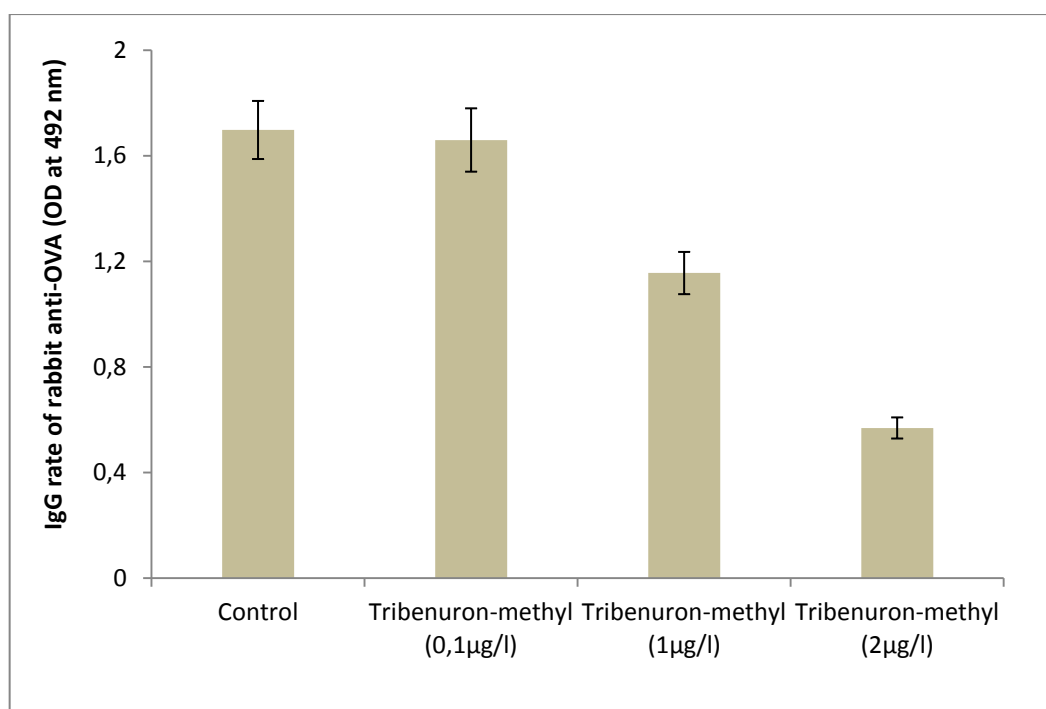


Figure 39 : Taux d'IgG de lapin anti ovalbumine du groupe témoin et ceux consommant le Tribénuron-méthyle à 0,1 ; 1 et 2µg/l. (Les valeurs sont exprimées en moyennes ± écarts types)

Selon **Bleeke et al, 1985** il n'y a aucun rapport sur les effets de l'exposition d'êtres humains à la métribuzine. On juge que ce composé n'exerce relativement pas d'effets toxiques aigus chez les mammifères. Les pesticides sont souvent considérés comme des produits potentiellement immunotoxiques, essentiellement sur la base de données animales, car très peu de données humaines sont actuellement disponibles.

Corsini et al, 2005 ont montré que des viticulteurs exposés à un fongicide, le Mancozeb présentait une diminution significative de leurs éosinophiles et des taux sériques d'immunoglobulines E (IgE) et une augmentation du nombre des lymphocytes T totaux (CD3+), des lymphocytes T CD4+ et T CD19+.

Seth et al, 2005 ont montré que les taux sériques d'IgG, IgM, IgA et IgE ne sont pas affectés chez les patients intoxiqués par un insecticide organochloré, le Lindane et qu'en revanche, les taux sériques de plusieurs cytokines mesurés par ELISA étaient fortement perturbés. Selon ces deux derniers travaux, qu'il s'agisse d'une exposition chronique ou aigue à un pesticide aucune conséquence clinique en rapport avec ces perturbations immunologiques n'a été relevée.

Des perturbations immunologiques n'ont de signification que dans la mesure où elles peuvent être corrélées à des événements pathologiques (**Descotes, 2007**). Selon ce même

auteur, d'autres études seront nécessaires pour prédire la signification réelle de ces perturbations en termes de conséquences pour la santé humaine.

Par ailleurs, et concernant les perturbations entraînées par les pesticides étudiés, l'importance du cytochrome P450 pour la détoxification de la métribuzine chez la souris a été démontrée par **Bleeke et al, 1985**.

Le poisson (*Cyprinus carpio*) exposé à la métribuzine n'a présenté aucun changement dans le cytochrome P450 et l'activité de l'éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD) par rapport au témoin (**Haluzová et al, 2011**).

Des études antérieures ont montré que différents herbicides de la famille des triazines causaient une perturbation des processus radicalaires dans les branchies de poissons comme le merisier (Elia et al., 2002) et les carpes communes (**Velisek et al, 2011; Stara et al, 2013**).

Husak et al, 2016 ont montré que l'exposition de poissons rouges à la Métribuzine entraînait un développement du stress oxydatif au niveau des branchies.

Le Tribénuron-méthyl utilisé à des doses de 1 et 2 µg/l soit respectivement 10 et 20 fois la dose normale réglementée entraîne une diminution du taux des IgG chez les lapins et de manière presque similaire à l'effet de la Métribuzine (Figure 39).

Les travaux de **Corsini et al, 2007** sur des patients exposés pendant un mois à un herbicide, le Propanil ont montré l'effet concentration-dépendant sur la réduction de la production d'IL-10 et de l'IFN-γ et ont souligné qu'il n'est pas possible à la lumière des données disponibles de préciser la réalité et l'ampleur du risque immunotoxique du propanil pour l'homme.

Selon **Lah, 2011** les herbicides sont beaucoup moins toxiques envers les mammifères car leurs mécanismes d'action sont conçus pour perturber le métabolisme des végétaux. Dans notre cas, les effets obtenus des deux herbicides testés sur les lapins sont révélateurs d'une perturbation du système immunitaire traduite par la diminution des taux d'IgG sériques. Les doses de pesticides utilisées sont supérieures à celles normalisées.

Les normes réglementaires devraient être fixées en fonction des données de toxicité ; c'est le cas pour les aliments végétaux et animaux, mais ce n'est pas le cas pour l'eau car les teneurs limites de 0,1 µg/l et 0,5 µg/l qui sont fixées au niveau européen en fonction d'autres considérations sont non spécifiques des pesticides étudiés. Ces teneurs limites sont maintenues alors que les données scientifiques acquises depuis lors les rendaient encore plus caduques. Il en résulte aujourd'hui une absence de lisibilité (**CPP, 2002**).

En Algérie, tous les efforts doivent être faits pour intensifier la coopération de tous les acteurs concernés par le problème des pesticides pour l'évaluation des risques auprès des différents utilisateurs et prendre les mesures qui s'imposent.

VII.4 Extraits éthanoliques de *Citrullus colocynthis*

Pour l'obtention de l'extrait de la poudre de la pulpe et des graines de *Citrullus colocynthis* on réalise des macérations éthanoliques puis une évaporation rotative du solvant.

Cette extraction a permis d'obtenir des extraits bruts de la pulpe et des graines de Coloquinte.

VII.4.1 Détermination du rendement des extraits bruts éthanoliques

Le rendement est déterminé par le rapport du poids de l'extrait sec après évaporation sur le poids de la matière végétale sèche utilisée pour l'extraction.

$$RD\% = (m \times 100) / m_1$$

m : la masse de l'extrait sec après évaporation

m_1 : la masse de la matière végétale sèche

Sachant que :

La masse de l'extrait brut m est déterminé par la différence entre le poids du ballon plein P_1 (après élimination du solvant par évaporation rotatif) et le poids du ballon vide P_0 ;

$$m = P_1 - P_0$$

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Rendement des extraits bruts éthanoliques de la pulpe et des graines de *Citrullus colocynthis*

	Pulpe	Graine
P_0 (g)	165.88±0,01	165.88±0,01
P_1 (g)	167.42±0,86	166.35±0,67
m (g)	1.68±0,04	0.24±0,01
m_1 (g)	7±0,01	7±0,01
Rendement (%)	24±0,5%	3.43±0,1%

Les résultats obtenus montrent que le calcul des rendements d'extrait brut de pulpe est amplement supérieur à celui de la graine ($P < 0,05$).

Il est difficile de comparer les résultats avec ceux de la bibliographie, le rendement n'est que relatif et dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée. La méthode d'extraction affecte également le contenu total en phénols et flavonoïdes et par conséquent l'activité antioxydante (Lee et al, 2008).

VII.4.2 Détermination de l'activité antioxydante de *C. colocynthis*

Les antioxydants sont des molécules qui, lorsqu'elles sont présentes à faibles concentrations par rapport aux substrats oxydables, retardent ou stoppent le processus d'oxydation. L'activité antioxydante des molécules peut être évaluée in vivo comme in vitro. Pour évaluer l'activité antioxydante, in vitro, des extraits de plantes, différentes méthodes ont été développées. Ces méthodes impliquent le mélange d'espèces oxydantes, tels que des radicaux libres ou des complexes métalliques oxydés, avec un échantillon qui contient des antioxydants capables de piéger les radicaux libres et réduire les complexes métalliques. Ces antioxydants peuvent agir selon deux mécanismes majeurs, par transfert d'atome d'hydrogène ou par transfert d'électron. Ainsi, compte tenu des différents facteurs impliqués, tels que les propriétés physico-chimiques des molécules, il est recommandé d'utiliser plusieurs tests pour confirmer l'activité antioxydante d'un échantillon testé (**Prior et al, 2005**). Pour cela, deux tests différents ont été utilisés, in vitro, afin d'évaluer l'activité antioxydante des extraits éthanoliques de pulpe et graine de *C. colocynthis* à savoir le test de piégeage du radical libre DPPH ainsi que le test de pouvoir réducteur du fer.

Les profils d'activité anti radicalaire obtenus révèlent que les extraits éthanoliques de graine et pulpe de la coloquinte possèdent une activité anti radicalaire dose dépendante.

Piégeage du radical libre DPPH' (diphényl-picrylhydrazyle)

De nombreux travaux ont montré suite à un screening phytochimique et une quantification des métabolites secondaires de *C. colocynthis* que cette plante présente une bonne activité antioxydante évaluée par différentes techniques in vitro. Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α,α -diphényl- β -picryl hydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques (**Blois, 1958 ; Brand-Williams, 1995**).

Dans notre cas le pourcentage d'inhibition de 50% du radical DPPH est obtenu avec 1,5 mg/ml d'EEPco et 0,76 mg/ml d'acide ascorbique utilisé comme antioxydant de référence (figure 40). Aussi la concentration de 3,70 mg/ml d'EEGco inhibe 50% du radical DPPH comparée à celle de l'acide ascorbique qui est seulement de 0,19 mg/ml (figure 41). Ces résultats sont importants et témoignent d'une grande capacité de la pulpe et la graine de Coloquinte, renfermant des antioxydants naturels (polyphénols), à atténuer les dommages oxydatifs induits par les radicaux libres (DPPH).

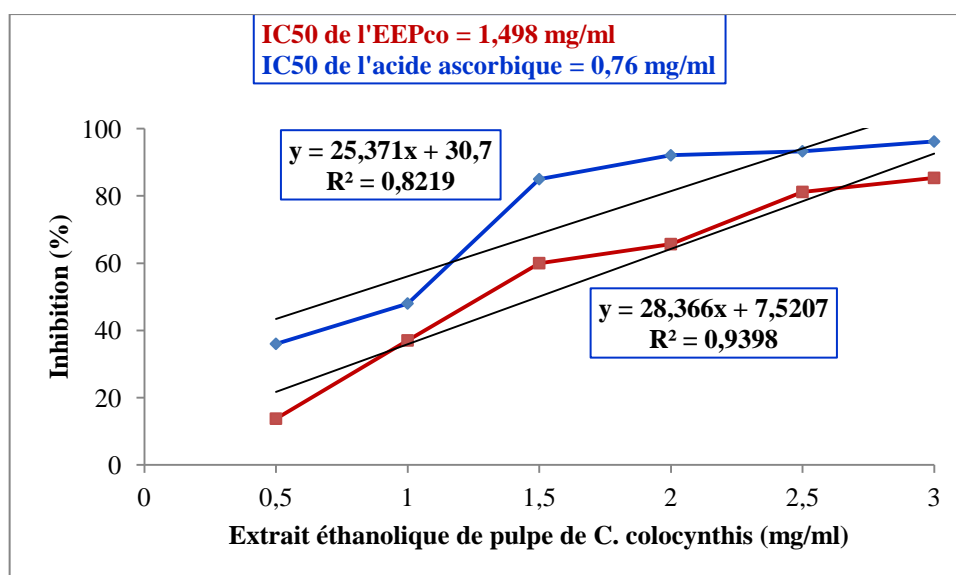


Figure 40 : Effet inhibiteur de l'extrait éthanolique de pulpe de *C. colocynthis* sur le radical DPPH

Selon **Koko et al, 2009** un extrait éthanolique à 80% de fruit de coloquinte est dépourvu d'alcaloïdes, d'antraquinones, de coumarines et de tannins mais renferme des flavonoïdes et des terpénoïdes.

Les travaux de **Benariba et al, 2013** rapportent la présence appréciable de polyphénols et flavonoïdes dans cinq extraits de graines de *C. colocynthis* avec des valeurs qui varient de 150 à 1002 mg et 94 à 620 g respectivement. L'activité antioxydante des flavonoïdes dépend de leur structure chimique, en particulier du groupe 3', 4'-orthodihydroxy sur le cycle B et du groupe 4-carbonyle sur le cycle C. Les groupes 3-OH et 5-OH sur le cycle C sont également impliqués dans l'effet antioxydant (**Sokol-Letowska, 2007 ; Marfak, 2003**).

Selon **Aldamegh et al, 2013**, les fruits de *C. colocynthis* révèlent la présence de saponine, de flavonoïdes, de terpénoïdes et d'alcaloïdes. Ceci est en accord partiel avec les résultats de **Rodge et Biradar, 2012** qui ont trouvé que *C. colocynthis* poussant en Inde se compose de tanins, de saponines, de flavanoïdes, de terpénoïdes, d'alcaloïdes, de stéroïdes et de glycosides cardiaques. Leur étude ne détecte pas de tanins. La variation de la saison de récolte ou de différentes localités géographiques peut avoir un effet sur la production de certains composés phytochimiques.

L'activité de piégeage des radicaux (DPPH) par l'extrait éthanolique de graines de *C. colocynthis* étudiées par **Aldamegh et al, 2013** montre un effet dose dépendant en inhibant à plus de 80% le DPPH à la concentration de 50µg/ml. Le même constat est rapporté par **Mahsa et al, 2014** avec une augmentation de l'inhibition du radical DPPH avec l'augmentation de la concentration de l'extrait hydroalcoolique de graines de *C. colocynthis* de 25 à 50

ensuite 75 µg/ml.

Selon les résultats des travaux de **Sithisarn et al, 2005**, l'extrait méthanolique de pulpe de *C. colocynthis* contient quelques flavonoïdes et présente une activité de piégeage des radicaux libres modérée à élevée lorsqu'elle est testée par la méthode de piégeage du DPPH.

Dans le test de piégeage des radicaux DPPH utilisé par **Mohadjerani et Shokohsaljoghi en 2014**, les extraits méthanoliques de la pulpe et de la racine de *C. colocynthis* ont montré une activité modérée dépendant de la concentration avec des activités de piégeage maximales respectivement de 46,64% et 28,57% pour les racines et les pulpes à la concentration de 100 µg/ml. La capacité des extraits à piéger le radical DPPH (IC50) a été déterminée pour l'acide ascorbique (AA), l'hydroxytoluène butylé (BHT), les racines et les pulpes de *C. colocynthis* avec des valeurs de 1,72±0,001 µg/ml ; 8,84±0,001 µg/ml ; 110,80±0,002 µg/ml et 159,07±0,002 µg/ml respectivement.

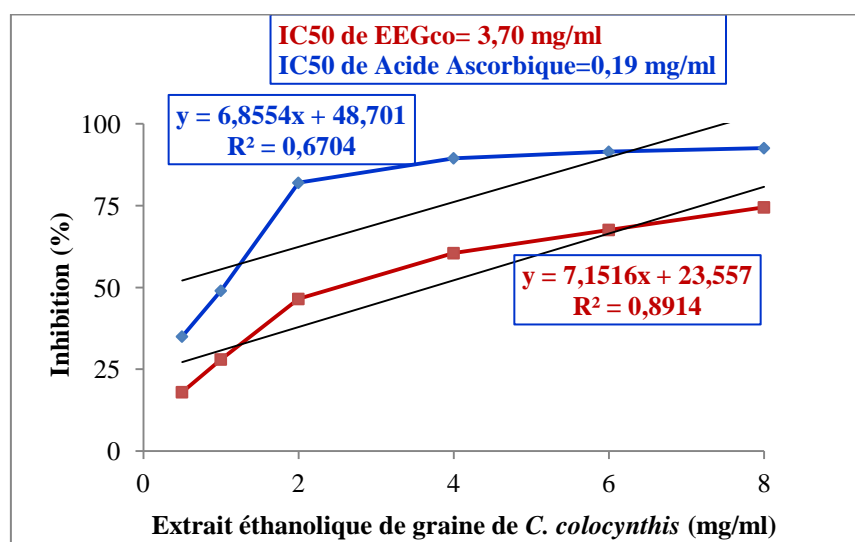


Figure 41 : Effet inhibiteur de l'extrait éthanolique de graine de *C. colocynthis* sur le radical DPPH

VII.5 Etude de la viabilité de *Saccharomyces cerevisiae*

VII.5.1 Comptage des colonies après traitement par la Métribuzine

Le comptage des colonies est rapporté dans le tableau 9. La méthode utilisée est celle du comptage direct sur gélose. Cette levure est souvent utilisée comme organisme modèle par exemple dans les études biochimiques et génétiques accompagnant la détermination du mode d'action des fongicides inhibiteurs de la biosynthèse de l'ergostérol dans les mycètes (**Hargreaves et al, 1996**)

Tableau 9: Comptage des colonies après traitement par la Métribuzine

Métribuzine	Témoin	*LMR	5 LMR	10 LMR	15 LMR	20 LMR
**Σc	396±28	392±27	294±16	198±13	96±8	28±4
UFC/ml (x10 ⁴)	180±13	178±12	133±6,56	90±6	44±3	13±2
Survie (%)	100±1	99±7	74±4	50±3	24±2	7±1
Inhibition (%)	0	3±2	26±4	50±3	76±2	93±1

*Limite maximale des résidus (0,14µg/l)

** Un triplicat est réalisé pour chaque concentration testée et pour le témoin. La moyenne et l'écart type sont déterminés par StatView 5.0 ; n=3 et P<0,05 considéré comme significative.

Les résultats montrent la sensibilité de *S. cerevisiae* aux différentes concentrations de Métribuzine en utilisant comme référence, la DO_{600nm} de 0.1 équivalente à $1.8 \cdot 10^6$ UFC/ml et représentant 100% de viabilité cellulaire (taux de survie).

A des concentrations $\leq 0,14\mu\text{g/l}$ (LMR) le taux de survie de notre souche est de 98%. Ce taux important montre que la concentration LMR de métribuzine n'a qu'une faible voire inexistante influence sur *S. cerevisiae* comparée au témoin (P<0,05). Selon les travaux de **Jawich D et al, 2005**, parmi six pesticides actifs testés, le bénomyl, le cyhéxatin et le penconazole présentent un effet toxique qu'ils exercent sur la croissance de *S. cerevisiae* qui se traduit par une diminution du nombre des colonies (inhibition) et un retard de leur apparition. Le retard et le pourcentage d'inhibition augmentent avec la concentration du pesticide.

A des doses dépassant la LMR, un intervalle de 0.14µg/l à 1.4µg/l entraîne une diminution remarquable du taux de survie. A la concentration de 1.4µg/ml la réduction du nombre cellulaire est de 50% correspondant à l'IC50 (figure 42). Ceci montre l'effet oxydant des pesticides sur *S. cerevisiae*. Les travaux de **Fujita et al, 2003** montrent que le stress oxydatif provoque une activation significative de Plusieurs paramètres qui participent aux défenses naturelles de la levure contre le stress (catalase, superoxyde dismutase, glutathion réductase).

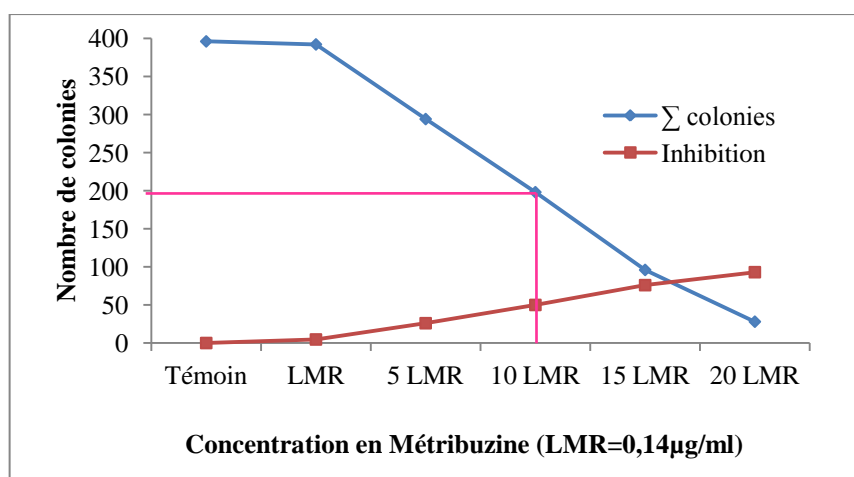


Figure 42 : Détermination de l'IC50 de la Métribuzine vis-à-vis de *S. cerevisiae*

A des concentrations supérieures à 1.4µg/l le taux de survie de *S. cerevisiae* diminue considérablement. Le traitement de *S. cerevisiae* par la métribuzine à forte dose engendre des dégâts oxydatifs. Il en résulte une inhibition de la croissance, de la respiration cellulaire et une inhibition des sites actifs des enzymes antioxydantes. Selon Cuinier, 1996 Le penconazole (pesticide) agit en inhibant la synthèse des stérols, avec pour conséquence en œnologie un arrêt précoce de la fermentation, mais peu ou pas d'effet sur la phase de latence. Le mécanisme d'inhibition s'exercerait au niveau de la membrane dont les propriétés de transfert seraient amoindries suite au manque de stérols (**Buchenauer, 1987 ; Bonaly, 1991**). En outre, des dommages importants causés à l'ADN, aux lipides et aux protéines par la Métribuzine entraînent l'initiation du processus d'apoptose, un processus de mort cellulaire programmée, enclenché par la cellule lorsqu'elle a perdu son intégrité structurale et fonctionnelle (**Fujita et al, 2003**).

VII.5.2 Adaptation de *S. cerevisiae* à la Métribuzine en présence d'extrait éthanolique de pulpe (EEPco) et de graine (EEGco) de coloquinte

Pour cette partie de notre travail on se limite à tester la viabilité de *S. cerevisiae* à la IC50 obtenue dans la 1^{ère} partie avec l'utilisation de la Métribuzine à 1,4 µg/l.

Les extraits éthanoliques sont préparés à partir du résidu sec obtenu par macération, filtration et évaporation. Le tableau 10 rapporte l'évolution de la croissance des levures en présence de Métribuzine utilisée à l'IC50 et en présence d'extraits éthanoliques de pulpe et graine de *C. colocynthis*.

Tableau 10: Taux de survie de la souche *S. cerevisiae* vis-à-vis d'un stress oxydant induit par la métribuzine à la DL50 en présence et absence d'EEPco et EEGco

	Témoin	IC50	IC50+EEGco	IC50+EEPco
Σc	396±28	198±13	248±8	220±5
UFC/mL (x10⁴)	180±13	90±6	113±7	100±3
Survie (%)	100±1	50±3	63±2	56±1
Inhibition (%)	0	50±3	37±2	44±1

Les résultats obtenus montrent que les levures stressées par la métribuzine à la IC50 et en présence d'EEGco donnent un taux de survie de 63±2% ou un taux d'inhibition de 37±2%. Les levures stressées par la métribuzine à la IC50 en présence d'EEPco donnent un taux de survie de 56±1% correspondant à une inhibition de 44±1%.

Ces résultats expriment l'effet antioxydant des extraits éthanoliques de pulpe et graine de coloquinte contre l'effet oxydant de la métribuzine à la IC50 indiquant une augmentation significative de la viabilité de *S. cerevisiae* témoignant ainsi du pouvoir protecteur de *C. colocynthis*. Ce résultat est en accord avec les études de **Klervi, 2005 ; Panovska, 2005 et Sokol, 2007** qui ont rapporté que l'activité antiradicalaire des extraits éthanolique et aqueux des plantes est liée à leur contenu en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins. Les composés phénoliques semblent être de bons candidats pour une activité antioxydante du fait de la présence de nombreux hydroxyles, pouvant neutraliser les radicaux libres.

Selon ces résultats, nous pouvons prédire que l'EEGco est plus riche en antioxydants que l'EEPco. Les travaux de **Sabo et al, 2014** sur la Coloquinte confirment la grande richesse des graines en substances polyphénoliques.

Notre choix s'est porté sur cette plante médicinale *C. colocynthis* qui fait l'objet d'étude dans notre laboratoire mais il est important de signaler la présence des polyphénols dans pratiquement toutes les plantes alimentaires, médicinales, condimentaires ou aromatiques et que de nombreuses études sont réalisées en vue de valoriser chaque plante dans son contexte pour répondre à des besoins déterminés.

CONCLUSION

Conclusion

Le côté positif des pesticides ne doit pas occulter le fait qu'il s'agit aussi de produits, pouvant présenter des risques toxicologiques pour l'homme. Il n'est pas rare en effet, qu'ils provoquent des accidents graves voire mortels qui se manifestent soit immédiatement après une absorption unique dans le cas d'intoxication aiguë, soit après un délai plus ou moins long, à la suite de pénétration répétée et prolongée dans les cas d'intoxication chronique.

Notre travail nous a permis d'évaluer le risque immunotoxique de la consommation subaiguë de deux pesticides, la Métribuzine, herbicide ou substance active de la famille des triazones qui se caractérise par son large spectre d'efficacité sur graminées et dicotylédones utilisée pour la culture de pomme de terre et le Tribénuron-méthyl, herbicide sélectif des céréales utilisé pour la culture céréalière en Algérie.

Nos résultats montrent que l'ensemble des animaux présente une évolution pondérale normale donc une croissance homogène des lapins des cinq groupes, durant toute la phase d'expérimentation. En effet au cours du traitement des animaux par la Métribuzine le poids du groupe mâle percevant $1\mu\text{g/l}$ présente une évolution de poids (2200g à 5225g) comparable à celle du groupe femelle (2150g à 5105g) percevant la même quantité de ce pesticide et à celle du témoin mâle (2094g à 5398g) et femelle (2180g à 5480g). Ces résultats révèlent un développement normal des animaux. L'utilisation d'une dose plus élevée de $2\mu\text{g/l}$ de Métribuzine ne modifie aucunement les poids des différents groupes expérimentés. Cependant le groupe femelle montre une toux avec une difficulté respiratoire.

Pour le Tribénuron-méthyl l'utilisation d'une dose d' $1\mu\text{g/l}$ donnée Ad libitum aux animaux n'entraîne aucune modification du poids ni de la prise alimentaire. En effet le groupe lapin mâle et femelle percevant $1\mu\text{g/l}$ de cet herbicide présente respectivement une variation de poids de 2206g à 5166g et de 2310g à 5460g qui reste comparable à celle des témoins respectivement du même sexe. Le Tribénuron-méthyl utilisé à $2\mu\text{g/l}$ dans l'eau entraîne une perte du lapin mâle avec une insuffisance respiratoire et de la toux chez le lapin femelle. Ces résultats concordent avec quelques travaux scientifiques qui ont concerné ces herbicides et montré l'absence de modification du poids et la consommation alimentaire.

L'évaluation des IgG de lapin anti ovalbumine par la technique ELISA non compétitive montrent une diminution de leur taux chez tous les groupes expérimentaux. En effet chez le groupe consommant de la Métribuzine à $1\mu\text{g/l}$ on constate une diminution du taux d'IgG exprimé en densité optique de 3,155 contre 3,698 pour le témoin. A $2\mu\text{g/l}$ de ce même pesticide la diminution est plus prononcée et atteint 2,498 unités de densité optique.

Le Tribénuron-méthyl utilisé aux mêmes concentrations donne des résultats comparables à savoir une diminution des IgG anti ovalbumine en fonction de la dose utilisée.

À ce jour, l'utilisation de pesticides augmente considérablement et de façon irrationnelle entraînant donc un risque pour la santé de l'homme par leurs effets oxydants. Comme alternative pour la neutralisation de ces composés dangereux l'utilisation des antioxydants naturels d'origine végétale s'avèrent une source appréciable pour la lutte contre les maladies de civilisation.

Notre étude nous a permis de montrer que les extraits bruts de graine et de pulpe du *Citrullus colocynthis* ont un effet antioxydant en augmentant la viabilité des levures *S. cerevisiae* soumises à un stress par un pesticide utilisé comme herbicide dans les cultures maraichères, la métribuzine.

En effets des extraits bruts éthanoliques des graines et de pulpe de *Citrullus colocynthis*, obtenus à des rendements de 3.43% et de 24% ont prouvé un effet antioxydant sur les levures qui ont été auparavant soumises à un stress oxydant par la métribuzine. Cet effet antioxydant est à l'image du pourcentage d'inhibition de 50% du radical DPPH obtenu avec 1,5 mg/ml d'EEPco et 0,76 mg/ml d'acide ascorbique utilisé comme antioxydant de référence. Aussi la concentration de 3,70 mg/ml d'EEGco inhibe 50% du radical DPPH comparée à celle de l'acide ascorbique qui est seulement de 0,19 mg/ml.

Pour cela nous avons réalisé une gamme de concentration de la métribuzine permettant d'étudier la viabilité de nos levures et de déterminer la IC50.

Notre matériel biologique *S. cerevisie* a été exposé à cette concentration (IC50 de l'ordre de 10 LMR de métribuzine + extrait de graines ou de pulpe de *C. colocynthis*).

Globalement, les résultats obtenus dans ce travail témoignent d'une possible perturbation du système immunitaire et donc un effet immunomodulateur des deux herbicides étudiés. Les effets constatés sont fonction des doses utilisées en référence à des normes qui de nos jours et au niveau européen sont contestées. A cet effet il est important de reconsidérer la validité de ces normes pour les fixer en fonction des données de toxicité. Aussi par rapport à la Coloquinte les résultats montrent un effet incontestable de notre molécule bioactive décrivant un puissant pouvoir antioxydant de nos extraits éthanoliques bruts. Notre plante *Citrullus colocynthis*, a eu un effet protecteur vis-à-vis de la levure *S. cerevisiae* qui a mobilisé tout son arsenal métabolique et physiologique pour lutter contre le stress oxydatif induit par le pesticide, la métribuzine.

Les plantes ont la particularité de synthétiser un grand nombre de substances chimiques très intéressantes pour la recherche. Il est très important d'étudier les composants contenus dans les extraits bruts de la coloquinte afin d'évaluer leur activité antioxydante et intégrer ces antioxydants dans divers aliments pour en faire des produits fonctionnels permettant de lutter contre les maladies de civilisation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- ▶ *Abdel Hassen IA, Abdel Barry DA et Tariq Mohammeda S (2000) The hypoglycemic and antihyperglycemic effect of citrillus colocynthis fruit aqueous extract in normal and alloxan diabetic rabbits, J Ethnopharmacol, 71(1-2): 325-330*
- ▶ *Abdul Rahuman A et Venkatesan P (2008) Larvicidal efficacy of five cucurbitaceous plant leaf extracts against mosquito species, Parasitology Research, 130(1) : 133-139*
- ▶ *Abhauer J (1990) Pesticide residues-Determination and evaluation in food and environment, Pesticide chemistry, VCH, New York, 361-372*
- ▶ *Achour S, Khattabi A, Rhalem N, Ouammi L, Mokhtari A, Soulaymani A, Soulaymani Bencheikh R (2014) L'intoxication par les pesticides chez l'enfant au Maroc : profil épidémiologique et aspects pronostiques (1990-2008), Santé Publique, 23 (1) : 195-205*
- ▶ *ACTA (2008) Index phytosanitaire, 41^{ème} édition, p 430-450*
- ▶ *Adrian J, Potus J, Pojfait A et Dauvillier P (1998) Introduction à l'analyse nutritionnelle des denrées alimentaires, Ed : Lavoisier Tec et Doc, Paris-France, p 195*
- ▶ *Afifi M, Darwish S, Balba S (1973) Nitrogenous bases of different organ of Citrullus colocynthis, Planta media, 24 (3) : 260-265*
- ▶ *Ait El Cadi M, El Jaoudi R, Bouslimane Y, Bouklouze A et Cherrah Y (2011) Les perturbateurs endocriniens : quel risque pour la santé, mt Médecine de la Reproduction, Gynécologie Endocrinologie, 13 (2) : 13-102*
- ▶ *Akhar J (1994) Studies on composition and metabolism of lipids in seeds of Citrullus species, thèse de Doctorat, Pakistan; p 7*
- ▶ *Alavanja M C R, Hoppin JA, Kamel F (2004) Health effects of chronic pesticide and childhood cancer and Neurotoxicity, Annu Rev Public Health, 25: 155-197*
- ▶ *Aldamegh MA, Abdallah EM, Hsouna AB (2013) Evaluation of antimicrobial and antioxidant properties of leaves of Emex spinosa and fruits of Citrillus colocynthis from Saudi Arabia, African Journal of Biotechnology, 12(34): 5308-5313*
- ▶ *Al-Ghaithi F, El-Ridi MR, Adeghate E, Amiri MH (2004) Biochemical effects of Citrullus colocynthis in normal and diabetic rats, Mol Cell Biochem, 261: 143-149*
- ▶ *Amiard JC (2011) Les risques chimiques environnementaux. Méthodes d'évaluation et impacts sur les organismes, Ed Lavoisier, Paris. 782p.*
- ▶ *Anderson SE (2010) Irritancy and allergic responses induced by topical application of ortho-phthalaldehyd, Toxicological sciences, 115(2): 435-443*
- ▶ *Anonymous (1970) Hamdard Pharmacopoeia of Eastern Medicine, Handard National Foundation, Pakistan 2nd Impression p 373*
- ▶ *Arbuckle TE, Sever LE (1998) Pesticide exposures and fetal death: a review of the epidemiologic literature, Crit revs toxicol, 28: 229-70*

- ▶ Archibald B, William R (1987) *Weeds: An Illustrated Botanical Guide to the Weeds of Australia*, Ed Elsevier, Hungary. 255p
- ▶ Armougom P (1998) *Etude de la fraction lipidique des graines de cucurbitacées tropicales des genres Lagenaria, Luffa, Momordica*, Thèse de doctorat, la Réunion, France, p74-78
- ▶ Ascherio A, Chen H, Weisskopf MG, O'reilly E, Mcculloughm L, Calle E E, Schwarzschild MA, Thun MJ (2006) *Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease*, *Ann Neurol*, 60: 197-203
- ▶ Aubertot J N, Barbier JM, Carpentier A, Gril J J, Guichard L, Lucas P, Savary S, Savini I et Voltz M (2005) *Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux*, rapport Inra et Cemagref, p 64
- ▶ Aubertot J N, Barbier J M, Carpentier A, Gril (2007) *Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux*, Expertise scientifique collective Inra-Cemagref 2005, 120 p
- ▶ Audigié Cl, Dupont G et Zonszain F (1983) *Principes des méthodes d'analyses biochimiques*, tome 2, Ed : Doin, Paris, pp 117-118
- ▶ Avrameas S (1969) *Coupling of enzymes to protein with glutaraldehyde. Use of conjugates for the detection of antigen and antibodies*, Ed: *Immunochemistry* 8: 231-235
- ▶ Avrameas S, Ternynck T (1971) *Peroxidase labeled antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration*, Ed: *Immunochemistry*, 6: 1123-1134
- ▶ Avrameas S, Ternynck T (1987) *Techniques immunoenzymatiques*, Ed: INSERM, p 34
- ▶ Badraoui R, Sahnoun Z, Bouayed A, Hakim A, Fki M, Rebaï (2007) *Peut état des antioxydants épuisement par Tetradifon induire génotoxicité secondaire chez les rats Wistar femelles par le stress oxydatif*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88 : 149–155
- ▶ Baldi I, lebailly P (2007) *Cancers and pesticides*, *Rev Prat*, 57: 40-44
- ▶ Baldi I, Lebailly P, Mohamed Brahim B, Letenneur L, Dartigues J F et Brochard P (2004) *Neurodegenerative diseases and exposure to pesticides in the elderly*, *Am J Epidemiol*, 157: 409-14
- ▶ Baldi I, Mohamed Brahim B, Brochard P, Dartigues J F et Salamon R (1998) *Effets retardés des pesticides sur la santé, état des connaissances épidémiologiques*, *Rev Epidemiol Sante publique*, 46 : 134-42
- ▶ Baldridge JR, Lacy MJ (2000) *Adjuvants*. In: G.C. Howard and D.R. Bethell : *Basic methods in antibody production and characterization*, Ed: CRC Press, Boca Raton-USA, p 19
- ▶ Banerjee B D (1999) *The influence of various factors on immune toxicity assessment of pesticide chemicals*, *Toxicol Left*, 107: 21-31
- ▶ Baril A, Whiteside M, Boutin C (2005) *Analysis of a database of pesticide residues on plants for wildlife risk assessment*, *Environmental toxicology and chemistry*, 24(2): 360-371

- ▶ *Batanouny K H, Abou Tabl S, Shabana M et Soliman F (1999) Wild medicinal plants in Egypt: An Inventory to Support Conservation and Sustainable Use. Academy of Scientific Research and Technology, Egypt International Union for Conservation (IUCN).*
- ▶ *Bauer R, Wagner H (1983) Curcubitacin-containing drugs, Analysis and Standardization of medicinal drugs and plant preparations by high-performance liquid chromatography (HPLC) and other chromatographic methods, Dtsch Apoth Ztg, 123: 1313-1321*
- ▶ *Bean E S (2000) Polyclonal Antibodies, In: Howard G.C. and Bethell D. R.: Basic methods in antibody production and characterization, Ed: CRC Press, Boca Raton-USA, pp 31-49*
- ▶ *Béchaux C, Zetlaoui M, Tressou J (2013) Identification of pesticide mixtures and connections between combined exposure and diet, Food Chem Toxicol, 59: 191-198*
- ▶ *Bedevian AK (1936) Illustrated Polyglottic Dictionary of Plant names. Cairo, Argus D Papazian Presses*
- ▶ *Belhadi A, Mehenni M, Reguieg L (2016) Pratiques phytosanitaires des serristes maraîchers de trois localités de l'est des Ziban et leur impact potentiel sur la santé humaine et l'environnement, Revue Agriculture, 1: 9–16*
- ▶ *Belin J M (1996) Les levures, in Microbiologie alimentaire tome 2, Aliments fermentés et fermentations alimentaires, Lavoisier, Tec & Doc, Paris, 35-52*
- ▶ *Ben Salah N, Amamou M, Jerbi Z, Ben Salah F, et Yacoub M (1986) Un cas de surdosage en Peganum harmala L, Journal de toxicologie clinique et expérimentale, 6(5):319–322*
- ▶ *Bendjeddou D, Lalaoui K and Satta D (2003) Immunostimulating activity of the hot water-soluble polysaccharide extracts of Anacyclus pyrethrum, Alpinia galangal and Citrullus colocynthis, J Ethnopharmacol, 88: 155-160*
- ▶ *Benmehdi H (2000) Valorisation de certaines plantes médicinales à activité hypoglycémiantes comme la coloquinte, Thèse de magistère. Chimie organique appliquée. Université de Tlemcen, 15-20*
- ▶ *Beraud J (2001) Le Technicien d'analyses biologiques, Ed : tec & Doc, p 790*
- ▶ *Bergoin-Lefort M (2005) Application du concept de raffinage végétal au safran du Quercy (crocus sativus) pour la valorisation intégrée des potentiels aromatiques et colorants. Thèse présentée pour obtenir le titre de Docteur de L'Institut National Polytechnique de Toulouse, 1-329*
- ▶ *Blaise P (1997) Etude de lipides par spectroscopie de RMN, thèse de Doctorat I.N.P. de Toulouse France.*
- ▶ *Bleeke MS, Smith MT, Casida JE (1985) Metabolism and toxicity of metribuzin in mouse liver, Pestic. Biochem. Physiol, 23:123-130*
- ▶ *Blois MS (1958) Antioxidant determinations by the use of stable free radical, Nature, 181: 1199-1200*

- ▶ Bnouham M, Ziyyat A, Mekhfi H, Tahri A, Legssyer A (2006) Medicinal plants with potential antidiabetic activity – a review of ten years of herbal medicine research (1990–2000), *Int. J. Diabetes Metabol.* 14: 1–25
- ▶ Bodas R, Lopez S, Fernandez M, Garcia-Gonzalez R, Rodriguez AB, Wallace RJ (2008) In vitro screening of the potential of numerous plant species as antimethanogenic feed additives for ruminants, *Animal Feed Science and Technology*, 145 : 248-249
- ▶ Bonaly R (1991) Ultrastructure des levures, in *Biotechnologie des levures*, ed Masson, Paris, 97-170
- ▶ Botton B (1991) La physiologie des levures, in *Biotechnologie des levures*, ed Masson, Paris, 97-170
- ▶ Bouhadjera K (2005) Contribution à l'étude chimique et biologique de deux plantes médicinales sahariennes *Oudneya africana* R.Br. et *Aristida pungens* L, Thèse de doctorat en Chimie Organique Appliquée. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen
- ▶ Boukef K, Souissi HR, Balansard G (1982) Contribution to the study of plants used in traditional medicine in Tunisia, *Plant Med. Phytother*, 16: 260-279
- ▶ Bounias M (1999) *Traité de toxicologie générale: du niveau Moléculaire à l'échelle Planétaire*. Ed. Springer Science & Business Media, France, 804p
- ▶ Bouziani M (2007) L'usage immodéré des pesticides- de graves conséquences sanitaire – guide de la médecine et de la santé, *Santé Maghreb*, p 45-52
- ▶ Bradshaw R A, Cancedda F, Ericsson L H, Neuman P A, Picoli S P, Shelesinger M J, Shriefer Walsh K A (1981) Amino acid sequence of *Escherichia coli* alkaline phosphatase, *Proc Natl Sci*, 78: 3473-3477
- ▶ Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel–Wissenschaft und Technologie*, 28: 25-30
- ▶ Brown JE, Khodr H, Hider RC, and Rice-Evans C (1998) Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties, *Biochem. J*, 330: 1173-1178
- ▶ Brown T P, Rumsby P C, Capleton A C, Rushton L et Levy L S (2006) Pesticides and parkinson's disease-is there a link?, *Environ health perspect*, 114: 156-164
- ▶ Bruneton J (1993) *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 2^{ème} Ed. tec & doc, Paris ,210-338p
- ▶ Bruneton J (1999) *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*, 3^{ème} Ed. tec & doc, Paris , 575p
- ▶ Bruneton J (2009) *Pharmacognosie ; Phytochimie, plantes médicinales*. 4^{ème} Ed. Tec & Doc, Paris , 1288p
- ▶ Buchenauer H (1987) Mechanism of action of triazolyl fungicides and related compounds, in *Modern selective fungicides*, Longman scientific & technical, New York, 205-232

- ▶ *Buddle BM, Denis M, Attwood GT, Alterman E, Janssen PH, Rominus RS (2010) Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture, The Veterinary Journal, 188(1): 11-17*
- ▶ *Bunea M, Zarnescu O (2001) New current aspects on the immunohistochemical techniques, Roum Biotechnol Lett , 6: 177-206*
- ▶ *Burns R (2005) Immunization Strategies for Antibody Production. In: Burns Immunochemical protocols, Ed: Humana Press Inc., 3rd edition, Totowa-USA, Coll: Methods in molecular biology, Vol 295, 01-11*
- ▶ *Cabras P, Angioni A, Garau VL, Pirisi FM, Farris GA, Madau G, Emonti G (1999) Pesticides in fermentative processes of wine, Journal of agriculture and food chemistry, 47: 3854-3857*
- ▶ *Calvet R, Barriuso E, Bedos C, Benoit P, Charnay M P, Coquet Y (2005) Les pesticides dans le sol, conséquences et environnementales, Ed : France agricole, P 21*
- ▶ *Campagne Dupont (1995) Document des décisions : Tribénuron-méthyl, http://www2.Dupont.com/Crop_Protection/fr_CA/assets/downloads/20080118-Sparrran-F-MSDS.pdf, consulté le 24/03/2009*
- ▶ *Carter I (1997) Plantes protectrices pastèque sauvage, Revue Pas à Pas Tear Fund, 32 : 9-19*
- ▶ *Chen JC, Chiu MH, Nie RL, Cordell GA, Qiu SX (2005) Cucurbitacines and cucurbitane glycosides : structures and biological activities, Natural Product Report, 22(3) :386-99*
- ▶ *Chiali F Z. (2013) Effets métaboliques d'un régime à base de purée de pomme de terre contaminée par les pesticides chez le rat wistar, Thèse doctorat Physiologie et Biochimie de la Nutrition. Tlemcen. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen. 205p*
- ▶ *Chomard P (2001) Immunoanalyse, In : Céline L. et Chomard P., instrumentation, In : Béraud J, le technicien d'analyses biologiques : guide théorique et pratique, Ed : Lavoisier, technique et documentation, Paris, pp 1885-1906*
- ▶ *Clark A, Befus D, O'Hashi P (2002) Lignes directrices: production d'anticorps, 44*
- ▶ *Clemons D J, Besch Williford C, Steffen E K (1992) Evaluation of a subcutaneously implanted chamber for antibody production in rabbits, Laboratory Animal Science, p 42*
- ▶ *Cliff B, Weibel D E, Lockyer N P, Jungnickel H, Stephens G, Vickerman J C (2003) Detection of chlorinated pesticides on the surface of fungus using ToF-SIMS, Applied surface science, 203: 710-713*
- ▶ *Cluzeau S, Patunelle M C, Lhoutellier C (2000) Index phytosanitaire, Association de coordination technique agricole, ACTA, Paris, p 644*
- ▶ *Coleman J E (1992) Structure and mechanism of alkaline phosphatase Annu, Rev Biophys Biomol Stuct, 21: 441-483*
- ▶ *Coligan J E, Kruisbeek A M, Margulies D H (1997) Current Protocols in Immunology, Baltimore MD :John Wiley & Sons Inc, 64-80*

- ▶ Colin F (2000) *Approche spatiale de la pollution chronique des eaux de surface par les produits phytosanitaires. Cas de l'atrazine dans le bassin versant du sousson (gers, France), Thèse de doctorat université de Montpellier, p 233*
- ▶ Collinson LP, Dawes IW (1992) *Inducibility of the response of yeast cells to peroxide stress, Journal of General Microbiology, 138: 329-335*
- ▶ Colosio C, Corsini E, Barcellini W et Maroni M (1999) *Immune parameters in biological monitoring of pesticide exposure : current knowledge and perspectives, Toxicol left, 108: 285-95*
- ▶ CGDD (Commissariat général au développement durable) (2015) *Évaluation des risques liés aux pesticides pour les écosystèmes aquatiques. Recommandations issues du programme de recherche «Pesticides», 218: 1-6*
- ▶ Corsini E, Codeca I, Mangiaratti S (2007) *Immunomodulatory effects of the herbicide propanil on cytokine production in humans: In vivo and in vitro exposure, Toxicology and Applied Pharmacology, 222(2): 202-210*
- ▶ Corsini E, Birindelli S, Fustinoni S (2005) *Immunomodulatory effects of the fungicide Mancozeb in agricultural workers, Toxicology and Applied Pharmacology, 208(2): 178-185*
- ▶ Coste A, Sirard J C, Johansen K, Cohen J et Kraehenbuhl J P (2000) *Nasal immunization of mice with virus-like particles protects offspring against rotavirus diarrhea, J Virol, 74: 8966-8971*
- ▶ Cotellet N (2001) *Role of flavonoids in oxidative stress. Curr. Top. Med. Chem. 1:569-590. (cited in Yakhlaif G, 2009)*
- ▶ COUNCIL OF EUROPE., 1992. *Documents. Ed. Council of Europe, Germany. 208p.*
- ▶ Courtois JE, et Perles R (1981) *Precis de chimie biologique 2. Ed. Masson, p 135*
- ▶ CPP (Comité de la Prévention et de la Précaution) (2002) *Risques sanitaires liées à l'utilisation des produits phytosanitaires. Edition : Ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement, France, 47*
- ▶ Crozier A (2003) *Classification and biosynthesis of secondary plant products: an overview. In Plants" Diet and Health", Ed Goldberg, pp: 27- 48*
- ▶ Dacosta Y (2003) *Les phytonutriments bioactifs, Ed Yves Dacosta, Paris. 317*
- ▶ Dainet J, Herbuté S et Romestand B (2001) *Immunologie, In: Béraud J., le technicien d'analyses biologiques: guide théorique et pratique, Ed: Lavoisier, technique et documentation, Paris, p 718-796*
- ▶ Daniels J L, Olshan A F et Savitz D A (1997) *Pesticides and childhood cancers, Environ health perspect, 105: 1068-1077*
- ▶ Darwish-Sayed M, Balbaa SI et Afifi MSA (1974) *The glycosidal content of the different organs of Citrullus colocynthis, Planta Medica, 26: 293-298*
- ▶ Dastur JF (1962) *Medicinal plants of India and Pakistan. D.B. Taraporevala Sons and Co. Pvt. Ltd. Bombay, India, p.56*
- ▶ Debuigne G (1974) *Larousse des plantes qui guérissent. Ed Larousse, paris, 254p*

- ▶ Demers S (2013) *Guide de bonnes pratiques en production cunicole*. Edition le lapin du Quebec, 27
- ▶ Derache R (1986) *Toxicologie et sécurité des aliments, Technique et documentation*, Ed : Lavoisier, Paris, 594p
- ▶ Descotes J (2007) *Modification de l'immunité en relation avec l'exposition de l'homme aux substances*, in : Afsset, *Bulletin de veille scientifique*, 16-17
- ▶ Directive n° 98/83/CE du 03/11/98, modifiée par Directive (UE) n° 2015/1787 du 6 octobre 2015, relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine.
- ▶ Djago YA, Kpodekom M, Lebas F (2007) *Méthodes et techniques d'élevage du lapin*
- ▶ Duke JA. (1978) *The quest for tolerant germ plasm*, In: *ASA Special Symposium 32, Crop tolerance to suboptimal land conditions*. Am. Soc. Agron. Madison, WI: 1-61
- ▶ Duke JA (1983) *Citrullus colocynthis (L.) Schrad. Handbook of Energy Crops*, http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/dukeindex.html, consulté le 10/01/2014.
- ▶ Duke S (2002) *Phytochemical and ethnobotanical databases*. USDA-ARS-NGRL. Beltsville Agricultural Research Center. EDT
- ▶ El Mrabet K, Charlet P, et Lalère B (2008) *Les pesticides*, Ed: L N E, p 109-145
- ▶ El Wasfi A (1994) *pharmacological Studies on Citrullus colocynthis*, *Journal of Herbs Specie and Medicinal Plants*, 2:65-79
- ▶ Elawad A, Abdel Bari E M, Mahmoud O M , Adam S E (1984) *The Effect of Citrullus colocynthis on Sheep*, *Veterinary and Human Toxicology*, 26: 481-485
- ▶ Engvall E, Perlmann P (1971) *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G*, *Immunochemistry*, 8(9): 871-874
- ▶ Ey P L, Ashman L K (1986) *The use of alkaline phosphatase conjugated anti immunoglobulin with immunoblots for determining the specificity of monoclonal antibodies to protein mixtures*, *Method in Enzymology*, 121: 497-509
- ▶ FAO (2001) *Codex alimentarius: Dispositions générales. Volume 1A*. Ed. Food & Agriculture Org, Rome. 397
- ▶ FAO (2011) *FAO specifications and evaluations for plant protection products. Tribenuron-methyl*
- ▶ FAO/OMS Commission du Codex Alimentarius (1994) *Résidus de pesticides dans les denrées alimentaires, 2*, FAO/OMS, Rome, 477p
- ▶ Feinbrun-Dothan N (1978) *Flora Palaestina. Part III. The Israeli Academy of Sciences and Humanities, Jerusalem. organes cibles, évaluation du risque*. Paris pp 73- 202
- ▶ Filipov NM, Pinchuk LM, Boyd BL (2005) *Immunotoxic effects of short-term atrazine exposure in young male C57BL/6 mice*, *Toxicological Science*, 86(2): 324-332
- ▶ Fournier M, Friberg J, Girard D (1992) *Limited immunotoxic potential of technical formulation of the herbicide atrazine (AAtrex) in mice*, *Toxicology Letters*, 60(3): 263-374

- ▶ *Freedman B (1995) Environmental Ecology: The Ecological Effects of Pollution, Disturbance, and Other Stresses, Ed. Academic Press, America, 606p*
- ▶ *Fuhrman B, Lavy A et Aviram M (1995) Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation, Am J. Clin. Nutr, 61:549-554*
- ▶ *Fujita D, Yoshimura A, and Yasui H (2003) Detection of QTLs associated with antibiosis to green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* Uhler, in four *Indica* rice varieties. Rice Genet, Newslett, 19: 90–91*
- ▶ *Fukuyama T, Tajima Y, Hayashi K, Ueda H, Kosaka T (2011) Prior or coinstantaneous oral exposure to environmental immunosuppressive agents aggravates mite allergen-induced atopic dermatitis-like immunoreaction in NC/Nga mice, Toxicology, 289: 132-140*
- ▶ *Fussell R J, Jackson A K, Reynolds S L, Wilson M F (2002) Assessment of the stability of pesticides during cryogenic sample processing 1. Apples, Journal of agricultural and food chemistry, 50: 441-448*
- ▶ *Galvez J, Duarte J, Sanchez de Medina F, Jimenez J, Zarzuelo A (1996) Inhibitory effects of quercetin on guinea-pig ileum contractions, Phytotherapy Research, 10(1): 66-69*
- ▶ *Garcia-Gonzalez R, Lopez S, Fernandez M, Bodas R, Gonzalez JS (2008) Screening the activity of plants and spices for decreasing ruminant methane production in vitro, Animal Feed Science and Technology, 147 : 38-39*
- ▶ *Gebhardt R (2003) Antioxidative, antiproliferative and biochemical effects in HepG2 cells of a homeopathic remedy and its constituent plant tinctures tested separately or in combination, Arznei-Forschung, 53: 823-830*
- ▶ *Genetet N (2002) Immunologie, Ed: éditions médicales internationales, 4^{ème} édition, Paris-France, p 761-786*
- ▶ *Girotti-channu C (2006) Etude de la lipolyse et de synthèse des composés du Derme sous l'effet de la Cirsimarine, Flavone extraite de *Microtea Debilis*, Thèse de Doctorat. Institut national des sciences appliquées de Lyon, p127*
- ▶ *Giwa S, Abdullah LC, Adam N M (2010) Investigating « Egusi » (*Citrullus colocynthis* L.) Seed Oil as Potential Biodiesel Feedstock, Energies, 3 : 607-618*
- ▶ *Gomes D S, Riger C J, Pinto M L C, Panek A D, Eleutherio E C A (2005) Evaluation of the role of Ace1 and Yap1 in cadmium absorption using the eukaryotic cell model *Saccharomyces cerevisiae*, Environmental Toxicology and Pharmacology, 20(3): 383-389*
- ▶ *Gorochov G et Papo Th (2000) Immunologie, Ed: doin, Coll : InterMed, Paris-France, p 15-16*
- ▶ *Grange D, Camard J P, Host S et Grémy I (2008) Les pesticides : considérations sanitaires, Ed : O R S, ile de France, p 6-19*
- ▶ *Grompone MA (1988) Chemical Evaluation of Uruguayan Cucurbitaceae Seeds as Potential Sources of Vegetable Oils, lipid Science and Technology, 90(12): 487-490*

- ▶ Grossman C J (1989) Possible underlying mechanism of sexual dimorphism in the immune response, fact and hypothesis, *J Biochem*, 34: 241-251
- ▶ Gu JY, Qian CH, Tang W, Scherbaum WA, Schott M Liu C (2009) Polychlorinated biphenyls affect thyroid function and induce autoimmunity in Sprague-Dawley rats, *Horm Metab Res*, 41(6): 471-474
- ▶ Gurudeeban S, Satyavani K et Ramanathan T (2010) Bitter apple (*Citrullus colocynthis*) : An Overview of Chemical Composition and Biomedical Potentials. *Asian, Journal of Plant Sciences*, 9(7): 394-401
- ▶ Halliwell B (1994) Free radicals and antioxidants, *Nutr.Rev*, 52:253-265
- ▶ Haluzová I, Modrá H, Blahová J (2011) Biochemical markers of contamination in fish toxicity tests, *Interdisciplinary Toxicology*, 4(2): 85-89
- ▶ Hanl Y, Ratwohl J E, Bennet B T (1995) Review of polyclonal antibody procedures in mammals and poultry, *Research Journal*, 118: 76-89
- ▶ Harborne JB (2001) Twenty-five years of chemical ecology, *Nat Prod Rep*, 18: 361–379
- ▶ Hargreaves J A, Keon J P R, Croxson R (1996) Molecular genetics of ergosterol biosynthesis in *Ustilago maydis*, in *Modern fungicides and antifungal compounds*, Intercept, U.K., 117-125
- ▶ Hashimoto F, One M, Masuoka C, Ito Y, Sakata Y, Chimizu K, Nonaka G, Haslam E (2003) Natural polyphenols (vegetable tannins): Gallic Acid metabolism, *Nat. Prod*, 59(2): 205-215
- ▶ Haslam E (1994) Natural polyphenols (vegetable tannins): Gallic Acid metabolism, *Nat. Prod*, 11: 41-66
- ▶ Hennebelle T, Sahpaz S, Bailleul F (2004) Polyphénols végétaux, source, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif, *Phytothérapie*, 1 : 3-6
- ▶ Heyman B (2000). Regulation of antibody responses via antibodies complement and Fc receptors, *Annual Review of Immunology*, 18: 709-737
<http://www.cuniculture.info/docs/elevage/tropic-01.htm> consulté le 10/09/2010
- ▶ Husak VV, Mosiichuk NM, Maksymiv IV, Lushchak VI (2016) Oxidative stress responses in gills of goldfish, *Carassius auratus*, exposed to the metribuzin-containing herbicide Sencor, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 45: 163-169
- ▶ Hutchinson PJS (2012) Weed Control and Potato Crop Safety with Metribuzin, University of Idaho College of Agricultural and Life Sciences. CIS 1185
- ▶ Ibáñez C, Pérez-Torrado R, Chiva R, , Manuel Guillamón J, Barrio E, Querol A (2014) Comparative genomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from fermentations of traditional beverages unveils different adaptive strategies, *International Journal of Food Microbiology*, 171: 129-135
- ▶ Instanes CE (2006) *Toxicology letters*, 161: 219-225
- ▶ Jacks TJ, Hensarling TP, Yatsu LY(1972) Cucurbit seeds: characterizations and uses of oils and proteins, *Economic botany*, 26: 135-141

- ▶ Jackson R S (1994) *Wine science, principles and applications*, Academic press, San Diego, California, 235-276
- ▶ Jackson DA, Elswa SF (2015) *Factors regulating immunoglobulin production by normal and disease-associated plasma cells*, *Biomolecules*, 5(1): 20-40
- ▶ Jagtap SV and Khan AA (2016) *Synthesis and biological activities of auronones: A Review*, *Int J Pure App Biosci*, 4(2): 137-155
- ▶ Jawich D (2006) *Etude de la toxicité de pesticides vis-à-vis de deux souches de levure : approche cinétique et moléculaire*, thèse de doctorat, Toulouse, pp 33-43
- ▶ Jawich D, Hilan C, Saliba R, Lteif R (2005) *Strehaiano P. Effects of some pesticides on two yeast strains : Saccharomyces cerevisiae and Metschnikowia pulcherrima*, *Journal International de la Vigne et du Vin*, 39(2): 67-74
- ▶ Jayarprakasam B, Seeram NP, Nair MG (2003) *Anticancer and anti-inflammatory activities from Curcubita andreana*, *Cancer letters*, 189(1):11-6
- ▶ John U, Cincinnati O (1898) *Citrullus colocynthis*. Reprinted from the *Western druggist*. Chicago, 11p
- ▶ Jovanovic SV, Steenken S, Tosic M, Marjanovic B et Simic MG (1994) *Flavonoids as antioxidants*, *J. Am. Chem. Soc*, 116: 4846-4851
- ▶ Juhasz A L, et Naidu R (2001) *Extraction and recovery of organochlorine pesticides from fungal mycelia*, *Journal of microbiology methods*, 39: 149-158
- ▶ Kaltenecker Retto de Queiroz E, Waissmann W (2006) *Occupational exposure and effects on the male reproductive system*, *Cad, Saude publica*, Rio de Janeiro, 22: 485-493
- ▶ Kamel F, Hoppin J A (2004) *Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease*, *Environ health perspect*, 112: 950-958
- ▶ Karlesking A (1992) *Manuel des corps gras 1, Techniques & documentation*, Lavoisier, 12-16
- ▶ Kato I, Watanabe-Meserve H, Koenig K L, Batiste M S, Lillquist P P, Frizzera G, Burke J S, Moseson M et Shore R E (2004) *Pesticide product use and risk of non-hodgkin lymphoma in women*, *Environ health perspect*, 112: 1275-1281
- ▶ Keil DE (2009) *N,N,-Diethyl-m-Toluaamide (DEET) suppresses humoral immunological function in B6C3F1 mice*, *Toxicology Science*, 108(1) : 110-123
- ▶ Khare C P (2007) *Indian medicinal plants*, Springer, 5: 152
- ▶ Khatkhatay M I, Desai M A (1999) *Comparison of performances of four enzymes used in ELISA with special reference to beta lactomase*, *J Immunoassay*, 113: 75-80
- ▶ Khatri L M, Nasir MK, Saleem R et Valhari (1993) *Characteristics and chemical composition of Citrullus colocynthis*, *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, 36 : 383-384
- ▶ Kheddam-Benadjal N (2012) *Enquête sur la gestion des pesticides en Algérie et recherche d'une méthode de lutte alternative contre Meloidogyne*

incognita (Nematoda: meloidogynidae), thèse de doctorat, Université de Constantine, 87p

- ▶ Khenaka k (2011) *Effet de diverses plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogénèse ruminale chez l'ovine*, Mémoire de magister en Biotechnologie Microbiennes. Université Mentouri Constantine Algérie
- ▶ Kirtikar K R, Basu B D (1988) *Indian Medicinal Plants*, 2nd ed., ed. by Basu L. M., The Indian Press, Allahabad, 1158-1159
- ▶ Klervi LL (2005) *Connaissance chimiotaxonomique du genre Turbinaria et étude des composés de défense de différents espèces de Sargassacées des Iles Salmon (Pacifique sud)*. 210p
- ▶ Knop M (2011) *Yeast cell morphology and sexual reproduction – A short overview and some considerations*, *Comptes Rendus Biologies*, 334: 599-606
- ▶ Koko WS, Osman EE, Galal M (2009) *Antioxydant and antiglycation potential of some Sudanese medicinal plants and their isolated compounds*, *Buletin latinoamericano del Caribe de Plantas Med Aromáticas*, 8: 402-411
- ▶ Kondrashov A S and Crow J F (1991) *Haploidy or diploidy: which is better?*, *Nature land*, 351: 314-315
- ▶ Kuby J (2003) *Immunology*, 5th ed, Ed: Freeman New York, USA, pp 57-104.
- ▶ Kumar S (2004) *Occupatiional exposure associated with reproductive dysfunction*, *J occup hearth*, 46: 1-19
- ▶ Lafont R (2005) *Méthodes physiques de séparation et d'analyse et méthodes de dosage des biomolécules*. <http://www.SNV.jussieu.fr/bmedia/lafont/index.html>, consulté le 15/10/2010
- ▶ Lah K (2011) *Effects of pesticides on human health*, *Toxipedia*, <http://www.toxipedia.org/display/toxipedia/Effects+of+Pesticides+on+Human+Health>, Consulté le 24/03/2015
- ▶ Lal S, and Lal R (1987) *Bioaccumulation, metabolism and effects of DDT, fenitrothion and chlorpyrifos on Saccharomyces cerevisiae*, *Archives of environmental contamination and toxicology*, 16 : 753-757
- ▶ Landier C, Ernouf P, O'Byrne P, Furet Y, Codjia M (2013) *Intoxication aiguë sévère par les organophosphorés*, *Étude toxicocinétique*, 14 : 213-215
- ▶ Lebranchu Y, Blancho G, Dantal J (2012) *Cibles et mécanismes d'action des immunosuppresseurs*, 80.
- ▶ Lee WJ, Huang MS, Yang IC, Lai TC, Wang JL, Pang VF, Hsiao M, Kuo MY (2008) *Essential roles of caspases and their upstream regulators in rotenone induced apoptosis*, *Biochem Biophys Res Commun*, 371(1): 33-38
- ▶ Lemiére J, Seguin J J, Leguern C, Guyonnet D et Baranger P (2001) *Guide du comportement des polluants dans les sols et les nappes*, In *Eau-aménagement-environnement*, p 122

- ▶ Lewis DH (2000) Antigenes. In: Howard G. C. and Bethell D. R.: *Basic methods in antibody production and characterization*, Ed: CRS press, USA, pp 11-18
- ▶ Li Z, Woo CJ (2004) The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination, *Genes et Development*, 18(1): 1-11p.
- ▶ Lintelmann J, Katayama A, Kurihara N, Shore L et Wenzel A (2003) Endocrine disruptors in the environment, *Pure and applied chemistry*, 75: 631-681
- ▶ Liu LH, Chen FC, Dorsey JL, Hsieh YHP (2006) Sensitive monoclonal antibody-based sandwich ELISA for the detection of porcine skeletal muscle in meat and feed products, *Journal of Food Science*, 71: 1267-1288.
- ▶ Lopez-Cervantes M, Torres-Sanchez L, Tobias A et Lopez-Carrillo L (2004) Dichlorophenyldichloroethane burden and breast cancer risk : a meta-analysis of the epidemiologic evidence, *Environ health perspect*, 112: 207-14
- ▶ Maatooq GT, El-Sharkawy SH, Afifi MS et Rosazza PN (1997) C-p Hydroxybenzoylglyco-flavones from *Citrullus colocynthis*, *Phytochemistry*, 44 (1): 187-190
- ▶ Madani FZ, Hafida M, Merzouk, SA (2016) Hemostatic, inflammatory, and oxidative markers in pesticide user farmers, *Biomarkers*, 21(2): 138-145
- ▶ Mahsa P, Bokaeian M, Gholamreza K, Malihe R (2014) Evaluation of antioxidant and antibacterial activity on *Citrullus colocynthis* seed extract; *Bull Env Pharmacol Life Sci*, 3: 59-62
- ▶ Maiza K, Brac de la Perrière RA, Hammiche V (1993) *Pharmacopée traditionnelle saharienne : Sahara septentrional, Médicaments et aliments : l'approche ethnopharmacologique*, Paris –France, 169-171
- ▶ Male D, Brostoff J, Roth DB et Roitt Y (2007) *Immunologie*, Ed: Elsevier, 7ème édition, Paris-France, p 78
- ▶ Marfak A (2003) *Radiolyse Gamma des flavonoïdes ; Etude de leur réactivité avec des radicaux issus des alcools*, Thèse de doctorat en pharmacie, Université de Limoges, France, 187
- ▶ Marlière F (2001) *Pesticides dans l'air ambiant*, Ed : INERIS, 23
- ▶ Martin A (1995) *Introduction au laboratoire de biochimie médicale*, Ed Ellipses, p 58
- ▶ Marzouk B, Marzouk Z, Haloui E, Fenina N, Bouraoui A, Aouni M (2010) Screening of analgesic and anti-inflammatory activities of *Citrullus colocynthis* from southern Tunisia, *J Ethnopharmacol*, 128:15-9
- ▶ Masia A, Avery SV, Zoroddu MA, Gadd GM (1998) Enrichment with a polyunsaturated fatty acid enhances the survival of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of tributyltin, *FEMS Microbiology Letters*, 167: 321-326
- ▶ Masseyff R (1997) *Méthodes immunochimiques*, in : Kamoun P. *Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire*, Ed: Flammarion, Médecine-sciences, Paris, p 231

-
- ▶ McKinlay R, Plant JA, Bell JN (2008) Endocrine disrupting pesticides: Implications for risk assessment, *Environment International*, 34(2): 168-183p.
 - ▶ Meena MC et Patni V (2008) Isolation and identification of flavonoid quercetin from *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad, *Asian Journal of Experimental Science*, 22 : 137-142.
 - ▶ Mekkiou R (2005) Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires d'espèces du Genre *Genista* (Fabaceae): *G. saharae*, *G. ferox*, Thèse de doctorat, 199 p
 - ▶ Memon U, Brohi AH, Waseemuddin SA, Azhar I, Bano H (2003) Antibacterial screening of *Citrullus colocynthis*, *Pakistan Journal of the Pharmaceutical sciences*, 16(1) : 1-6
 - ▶ Menegaux F, Baruchel A, Bertrand Y, Lescoeur B, Leverger G, Nelken B, Sommelet D, Hemon D et Clavel J (2006) Household exposure to pesticides and risk of childhood acute leukaemia, *Occup environ med*, 63: 131-134
 - ▶ Merad Chiali R (1973) Plantes thérapeutiques : traditions, pratiques officinales, science et thérapeutique, *Tec & Doc*, 24(1) : 120-135
 - ▶ Merhi 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 murin, thèse de doctorat, Toulouse, 5-14
 - ▶ Michael B, Stanley B, Ian WD, Richard Dickinson j, Groot P, Heeren G, Klaas H (2004) "The Metabolism and Molecular Physiology of *Saccharomyces cerevisiae*." CRC Press Second edition (Edited J. Richard Dickinson and Michael Schweizer), Ed Taylor & Francis Ltd, 459
 - ▶ Michel A, Bizeau C, Drilleau JF (1990) Relations métaboliques entre levures impliquées dans la fermentation du cidre, *Belgian j food chem biotec*, 45 : 98-104
 - ▶ Mishra A et Devi Y (2013) Histopathologica alterations in the brain (optic tectum) of the fresh water teleost *Channa punctatus* in response to acute and subchronic exposure to the pesticide Chlorpyrifos, *Acta Histochem*, 116: 178-181
 - ▶ Mohadjerani M, Shokohsaljoghi E (2014) Evaluation of antioxidant activity of *Citrullus colocynthis* (L.)Schrad. Extracts and their effect on urease activity, *Ethno-Pharmaceutical products*, 1: 53- 58.
 - ▶ Mohammedi Z (2006) Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des Huiles essentielle et Flavonoïdes de quelques Plants de la région de Tlemcen, Thèse de Magister, Université de Tlemcen.140p
 - ▶ Morreel K, Goeminne G, Storme V, Sterck L, Ralph J, Coppieters W, Breyne P, Steenackers M, Georges M, Messens E, Boerjan W (2006) Genetical metabolomics of flavonoid biosynthesis in *Populus*: a case study, *Plant J*, 47: 224-37.
 - ▶ Moussaoui KM, Boussahel R et Dermi D (1999) Pesticides et environnement n°3, *Bulletin international de l'eau et l'environnement*, p 5-12
 - ▶ Moussaoui KM, Boussahel R, Tchoulak Y (2001) Utilisation, évaluation et impacts des pesticides en Algérie, Ecole Nationale Polytechnique, Alger, Algérie, 31.

- ▶ MSNBS (ministère de la Santé Nationale et du Bien-être social), 1986. La Métribuzine, <http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/metribuzin-metribuzine/index-fra.php>, consulté le 16/05/2010
- ▶ Mukherjee I, Das TK, Kumar A (2015) Behavior and bioefficacy of tribenuron-methyl in wheat (*Triticum aestivum* L.) under irrigated agro-ecosystem in India, *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(10): 610
- ▶ Multiger L (2005) Effets retardés des pesticides sur la santé humaine, *Environnement, risques et sante* 4 : 187-194
- ▶ Nakane PK, Kawoi A (1974) Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation, *J Histochem Cytochem*, 33: 1084-1091
- ▶ Nanda S, Muralidhar K, Kar SK (2002) Thermostable alpha-amylase conjugated antibodies as probes for immunodetection in ELISA, *J Immunoassay immunochem*, 23: 327-345
- ▶ Natiq H, Donald AW, et Nahia JY (1989) Cucurbitacin glycosides from *Citrullus colocynthis*, *Phytochemistry*; 28 (4): 1268-1271
- ▶ Nguyen TD (2016) Protection de la levure *Saccharomyces cerevisiae* par un système biopolymérique multicouche : effet sur son activité métabolique en réponse aux conditions de l'environnement, Thèse de Doctorat, Microbiologie et Parasitologie, Université de Bourgogne- France, 4-7
- ▶ Nygren H, Hansson HA (1981) Conjugation of horseradish peroxydase with benzoquinone, glutaraldehyde, or peroxydase as cross-linking reagents, *J Histochem Cytochem*, 29: 266-270
- ▶ OECD (2008) La performance environnementale de l'agriculture dans les pays de l'OCDE depuis 1990, Ed OECD Publishing, England, 657p
- ▶ Ohashi K, Kajiya K, Inaba S, Hasegawa T, Seko Y, Furuchi T, Naganuma A (2003) Copper (II) protects yeast against the toxicity of cisplatin independently of the induction of metallothionein and the inhibition of platinum uptake, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 310: 148-152
- ▶ Ono E, Hatayama M, Isono Y, Sato T, Watanabe R, Yonekura-Sakakibara K, FukuchiMizutani M, Tanaka Y, Kusumi T, Nishino T, Nakayama T (2006) Localization of a flavonoid biosynthetic polyphenol oxidase in vacuoles, *Plant J*, 45: 133-43
- ▶ ORS (Observatoire Régional de Santé d'île de France), 2005. Les pesticides, <http://www.ors-idf.org/dmdocuments/Pesticides.pdf> consulté le 10/09/2010
- ▶ Oyaizu M (1986) Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine, *Jpn J Nutr*, 07: 307-15
- ▶ Panda H (2000) Herb Cultivation and Medicinal Uses. National Institute of Industrial Re, p 240-243.
- ▶ Panon G (1997) Cultures mixtes et séquentielles de levures cidricoles : *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum*, *Hanseniaspora valbyensis* et *Metschnikowia pulcherrima*. Rôle de l'oxygène et suivi des paramètres de fermentation en milieu modèle, *Sciences des aliments*, 17 : 193-217

-
- ▶ Panovska TK (2005) *In vitro* antioxydant activity of some *Tencrium* species (*Lamiaceae*), *Acta Pharm*, 55: 207-214
 - ▶ Paraf A, Peltre G (1992) *Immunoanalyses pour l'agriculture et l'alimentation*, Ed: INRA, Paris, p 12
 - ▶ Pawlowska AM, De Leo M, Braca A (2006) Phenolics of *Arbutus unedo* L (*Ericaceae*) fruits: Identification of anthocyanins and gallic acid derivatives, *J Agric Food Chem*, 54 (26): 10234-10238
 - ▶ Perry-Clark LM, Meunier LD (1991) Vascular access ports for chronic serial infusion and blood sampling in New Zealand white rabbits, *Laboratory Animals Science*, 41(1): 495-497
 - ▶ Pest Management Regulatory Agency (PMRA) (1995) Tribénuron-méthyle, Document des décisions - E95-04. 1.
 - ▶ Petrovitch H, Ross GW, Abbot RD, Sanderson WT, Sharp DS, Tanner CM, Masaki KH, Blanchette PL, Popper JS, Foley D, Launer L et White LR (2002) Plantation work and risk of parkinson disease in a population-based longitudinal study, *Arch Neurol*, 59: 1787-1792
 - ▶ Picman AK, Schneinder EF, Picman J (1995) Effect of flavonoids on mycelial growth of *verticillium albo-atrum*, *Biochemical Systematics and ecology*, 23:683-693.
 - ▶ Picó Y, Font G, Mañes J (2004) In *Handbook of food analysis*, 2nd Ed, Ed: L. M. L. Nollet Marcel Dekker, New York, NY, 1072 p
 - ▶ Pogoda JM et Preston-Martin S (1997) Household pesticides and risk of pediatric brain tumors, *Environ hearth perspect*, 105: 1214-1220
 - ▶ Pohanish RP (2012) *Sittig's Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens*, Volume 1. Ed: 6. Elsevier, USA. 3040p.
 - ▶ Prior RL, Wu X, Schaich K (2005) Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, *J Agric Food Chem* 2005, 53: 4290–4302
 - ▶ Priyadarshi A, Khuder SA, Schaud EA et Shrivastava S (2000) A meta-analysis for parkinson's disease and exposure to pesticides, *Neurotoxicology*, 21: 435-440
 - ▶ Raaschou-Nielsen O, Pavuk M, Leblanca, Dumas P, Phillipe Weber J, Olsen A, Tjonneland A, Overvad K et Olsen JH (2005) Adipose organochlorine concentrations and risk of breast cancer among postmenopausal danish women, *Cancer epidemiol biomarkers prev*, 14: 67-74
 - ▶ Ramanathan T, Gurudeeban S, et Satyavani K (2011) Local anesthetic effect of *Citrullus colocynthis* on *Rana exadactyla*, *Research Journal of Medicinal Plants*, 5 (3):338-342
 - ▶ Rappe A (1992) *Pesticides et santé*, Ed : Association Pharmaceutique Belge, Bruxelles, 484p
 - ▶ Rauterberg EW, Schieck C (1981) Ferritin-labeling of antibodies by glutaraldehyde, comparison of conjugates prepared at different antibody : ferritin : glutaraldehyde ratios, *Immunobiology*, 159: 307-320

- ▶ *Regnault JP (2002) Elément de microbiologie et d'immunologie, Edition Décarie, INC, Canada, p 156-500*
- ▶ *Revillard JP (2001) Immunologie ,4^{ème} Edition De Boeck Université, Bruxelles, p 29*
- ▶ *Ribeiro IC, Verissimo I, Moniz L, Cardoso H, Sousa MJ, Soares AMVM, Leão C (2000) Yeasts as a model for assessing the toxicity of the fungicides penconazole, cymoxanil and dichlofluanid, Chemosphere, 41(10): 1637-1642*
- ▶ *Ricoux R, Chazaud B, Tresca JP, Pontet M (2000) Quality control of coated antibodies: new, rapid determination of binding affinity, Clin Chem Lab Med, 38: 239-243*
- ▶ *Rodge SV, Biradar SD (2012) Preliminary Phytochemical screening and antimicrobial activity of Citrullus colocynthis (Linn.) Shared, Indian J Plant Sci, 2(1):19-23*
- ▶ *Roy RK, Thakur M, Dixit VK (2007) Development and evaluation of polyherbal formulation for hair growth-promoting activity, J Cosmet Dermatol, 6: 108-112*
- ▶ *Rupeš I (2002) Checking cell size in yeast, Trends in Genetics, 18(9): 479-485*
- ▶ *Sabo H, Sadou H, Alma MM, Sidikou RS, Saadou M, Amoukou IA (2014) Antioxidant Activity and Phenolics Content of the Seeds of Eighteen Varieties of Edible Cucurbitaceae of Niger, Journal of Food Resource Science, 3: 1-11*
- ▶ *Sadasivam S, Thayumanavan B (2003) Molecular host plant resistance to pests. Volume 96 de Books in soils, plants and the environment. CRC Press, p221*
- ▶ *Salem MT, Li YF, Langholz B et Gililand FD (2004) Early-life environmental risk factors for asthma : findings from the children's health study, Environ health perspect, 112: 760-765*
- ▶ *Sarni-Manchado P et Cheynier V(2006) Les polyphénols en agroalimentaire, Lavoisier Tec & Doc, p 398*
- ▶ *Sawaya WN, Dagher NJ, Khalil JK (1986) Citrullus colocynthis seeds as a potential source of protein for food and feed, Journal-of Agricultural and Food Chemistry, 34(2) : 285-88*
- ▶ *Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M (2005) Polyphenols: antioxidants and beyond, The American Journal of Clinical Nutrition, 81: 215-217*
- ▶ *Schapira AH (1999) Science, medicine, and the future : parkinson's disease, clinical research edition, 318(7179): 311-314*
- ▶ *Schneider K (2001) Empirical evaluation in regard to differences in toxicokinetics between children and adults, In workshop on exposure of children to substances used as ingredients in pesticides, pp 78-79*
- ▶ *Seger C, Sturm S (2007) HPLC-SPE-NMR-a novel hyphenation technique, LC-GC Europe, 20:587-597*
- ▶ *Seth V, Ahmad RS, Suke SG (2005) Lindane-induced immunological alterations in human poisoning cases, Clinical Biochemistry, 38(7): 678-680*
- ▶ *Shaheen AM et Hamed AI (2003) Comparative studies and nutritional values of some weedy species collected from newly reclaimed areas (Western shore of Lake Nasser, Aswan, Egypt). Egypt, J Biotechnol, 13: 176-186*

- ▶ *Sincich F (2002) Bedouin Traditional Medicine in the Syrian Steppe, Rome, FAO: 114-115.*
- ▶ *Singleton VL, Rossi Joseph AJr (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents, A. j enol vatic, 16:144-158*
- ▶ *Sithisarn P, Supabphol R, Gritsanapan W (2005) Antioxidant activity of Siamese neem tree (VP1209), J Ethnopharmacol, 99: 109- 112*
- ▶ *Smith PA, Prieskorn DM, Knutsen CA (1988) A method for frequent blood sampling in rabbits, Laboratory Animal Science, 38(5): 623-625.*
- ▶ *Sobel ES, Gianini J, Butfiloski EJ (2005) Roberts, Environ Health Perspect, 113: 323.*
- ▶ *Sofowora A (2010) Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique, Ed Karthala, 43*
- ▶ *Sohn HY, Kwon CS, Kwon GS, Lee JB, Kim E (2004) Induction of oxidative stress by endosulfan and protective effect of lipid-soluble antioxidants against endosulfan-induced oxidative damage, Toxicology Letters, 151: 357-365*
- ▶ *Sokol-Letowska A, Oszmiansk J, wojdylo A (2007) Antioxydant activity of the phenolic compounds of Hawthorn, pine and skullcap, Food chemistry, 103:853-859*
- ▶ *Soulet S, lecoupeau J-P, Vercauteren J (2001) Implication chimique et biologique de la présence de polyphenols dans le cacao. Deuxième journée scientifique de l' UFR de sciences pharmaceutiques. Pharm, Bordeaux, 140:1*
- ▶ *Stara A, Kristan J, Zuskova E (2013) Effect of chronic exposure to prometryne on oxidative stress and antioxidant response in common carp (Cyprinus carpio L.), Pest Biochem Physiol, 105: 18–23*
- ▶ *Sturm S, Schneider P, Serger C, Stuppner H (2009) Analysis of Citrullus colocynthis Cucurbitacine Derivatives with HPLC-SPE-NMR, Scientia pharmaceutica , 77 : 254-259*
- ▶ *Takagi T, Itabashi Y (1981) Occurrence of mixtures of geometrical isomers of conjugated octadecatrienoic acids in some seed oils: Analysis by open-tubular gas liquid chromatography and high performance liquid chromatography, Lipids, 16 : 546-551*
- ▶ *Tannin-Spitz T, Grossman S, Dovrat S, Gottlieb HE et Bergman M (2007) Growth inhibitory activity of cucurbitacin glucosides isolated from Citrullus colocynthis on human breast cancer cells, Biochemichal pharmacology, 73 :56-67*
- ▶ *Theus SA, Lau KA, Tabor DR (1992) In vivo prenatal chlordane exposure induces development of endogenous inflammatory macrophages, Journal of Leukocyte Biology, 51(4): 366-372*
- ▶ *Thompson DA, Desai MA, Murray AW (2006) Ploidy Controls the Success of Mutators and Nature of Mutations during Budding Yeast Evolution, Current Biology, 16(16): 1581-1590.*
- ▶ *Thrasher JD, Madison R et Broughton A (1993) Immunologic abnormalities in humans exposed to chlorpyrifos : preliminary observations, Arch environ hearth, 48: 89-93*

- ▶ Tijssen P et Kurstak E (1984) *Highly efficient and simple methods for the preparation of peroxidase and active peroxidase –antibody conjugates for enzyme Immunoassay*, *Anal Biochem*, 34: 232-256
- ▶ Trease GE (1976) *A text-book on Pharmagnosy*, Bailliere Tindall and Cox.London, England, P 646
- ▶ Turner M (2002) *Les anticorps*. In : Roitt I. M., Brostoff J., Male D., Masson P. L., *Immunologie*, Ed: de Boeck, 3ème édition, Paris-France, p 78
- ▶ Unger TM, Shellenberger TE (1981) *A teratological evaluation of Sencor (R) in mated female rabbits: 80051, Rapport final. MRID 00087796 citée au renvoi 11.*
- ▶ Vanderlinden L, Clark K, Ursitti F et Gingrich D (2002) *Lawn and garden pesticides, a review of human exposure & hearth effects research*, 84 p
- ▶ Vanier P (2006) *Courge. Passeport santé.*
<http://passeportsante.net/fr/Nutrition/EncyclopedieAliment/Fiche.aspx?doc=courgeu>
 (consulté le 06-02-2017).
- ▶ VASSEROT Y (1996) *La fermentation alcoolique chez Saccharomyces cerevisiae : aspects biochimiques et physiologiques*, *Rev fr oenol*, 159 : 13-16
- ▶ Velisek J, Stara A, Kolarova J (2011) *Biochemical, physiological and morfological responses in common carp (Cyprinus carpio L.) after long-term exposure to terbutryn in real environmental concentration*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100(3) : 305-3113
- ▶ Vernier F, Rousset S (2014) *Les mesures agroenvironnementales à enjeu «eau/pesticides»: évaluation environnementale et économique de l'impact de modifications des pratiques agricoles par modélisation intégrée à partir de scénarios d'évolution (ECCOTER), rapport final, programme Pesticides*, 49p
- ▶ Vigouroux-villard A (2006) *Niveaux d'imprégnation de la population générale aux pesticides : sélection des substances a mesuré en priorité, thèse de doctorat, Paris*, 69-120
- ▶ Voccia I, Blakley B, Brousseau P et Fournier M (1999) *Immunotoxicity of pesticides, a review Toxicol Ind Hearth*, 15: 119-132
- ▶ Wang M, Li J, Rangarajan M, Shao Y, LaVoie Edmond J, Huang Tzou-Chi, Ho Chi-Tang (1998) *Antioxidative Phenolic Compounds from Sage (Salvia officinalis)*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4869-4873
- ▶ Wang X, Yin C, Wang L (2002) *Structure–activity relationships and response–surface analysis of nitroaromatics toxicity to the yeast (Saccharomyces cerevisiae)*, *Chemosphere*, 46: 1045-1051
- ▶ Wen-Rehaba A-I (2002) *étude des activités biologiques et la toxicité aigue de l'extrait aqueux des feuilles de Mangifera Indica L.(Anacardiaceae)*, Thèse de doctorat, Université de Bamako, 128p
- ▶ Werner-Washburne M, Braun E (1993) *Stationary phase in the yeast Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiological Reviews*, 57(2): 383-401

- ▶ *Who (2006) Principales for evaluating hearth risks in children associates with exposure to chemicals in environmental hearth criteria, Ed IPCS, pp 302*
- ▶ *Winston E, Fuller SA, Hurell JGR (1989) Conjugation of enzymes to antibodies, chapter 11. In: Ausubel F.M, Brent R , Current protocols in molecular biology, John Wiley and Sons, 122p*
- ▶ *Yadav D, Singh SC, Verma RK, Saxena K, Verma R, Murthy PK, Gupta MM (2013) Antifilarial diaryl heptanoids from *Alnus Nepalensis* leaves growing in high altitude areas of Uttarakhand, India *Phytomedicine*, 20(2) : 124-132*
- ▶ *Yaniv Z, Ellashabelsky et Schafferman D (1999) Colocynth: Potential arid land oil seed from an ancient cucurbit. Dans: J. Janick (Ed). Perspectives on new corps and new use. ASHS press; Alescendria V A, 257-261p.*
- ▶ *Young MS, Early M F, Mallet CR, Krol J (2001) Application of a mixed-mode solid-phase extraction and cleanup procedure for LC/MS determination of thiabendazole and carbendazime in apple juice, *Journal of AOAC international*, 84(5): 1608-1613*
- ▶ *Ziyyat A, Legssyer A, Mekhfi H, Dassouli A, Serhrouchni M, Benjelloun W (1997) Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco, *J Ethnopharmacol*, 58:45–54*
- ▶ *Zoro ABI, Koffi kK, Djè Y (2003) Caractérisation botanique et agronomique de trois espèces de cucurbites consommées en sauce en Afrique de l'Ouest: *Citrillus sp.*, *Cucumeropsis mannii* Naudin et *Lagenaria siceraria* (Molina) Standal, *Biotechnol Agron Soc Environ*, 7 : 189-199*



Scholars Research Library

Der Pharmacia Lettre, 2017, 9 [6]:182-193
[<http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html>]



Immunomodulatory effect of metribuzin and Tribenuron-methyl in male rabbit ITELV/98

Fatima Zohra SARSAR¹, Amira Ghislaine DRA¹, Karima OULD YERROU², Imène YAHLA^{1,3}, Soraya DJEBARA^{1,4}, Fatima Zohra ELKADI¹, Mokhtar BENABDERRAHMANE¹, Mohammed BENALI¹

¹*Biotoxicology Laboratory, University of Djilali Liabes, Sidi Bel Abbes, Algeria*

²*Bioconversion Laboratory, Microbiology Engineering and Health Safety, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Mascara*

³*Laboratory of beneficial microorganisms, functional foods and health. University of Mostaganem,, Algeria*

⁴*Department of Biology, University of Relizane, Algeria*

***Corresponding Author:** Mohammed B, Biotoxicology Laboratory, University of Djilali Liabes, Sidi Bel Abbes 22000, Algeria. E-mail: benalimo@yahoo.fr

ABSTRACT

Male rabbits of ITELV/98 strains, about 3 months old and weighing an average of 2200 ± 14.96 g, were used in this exposure to pesticides, and experiments reveal symptoms related to the intake of pesticides into the water. Thus, a difficulty breathing and coughing were observed in the groups that consumed Metribuzin and Tribenuron-methyl at the same concentration of $2 \mu\text{g/l}$. Metribuzin used at concentrations of 0.1 ; 1 and $2 \mu\text{g/l}$ had no effect on the weight of the animals tested. Indeed, during the treatment of animals by Metribuzin, the groups receiving 0.1 and $1 \mu\text{g/l}$ showed a change in weight (2200 ± 14.96 g at 5225 ± 29.64 g and 2140 ± 108.66 g at 5331.5 ± 104.11 g) comparable to that of the control (2200 ± 14.96 g at 5398 ± 58.62 g) ($P < 0.05$). The use of a higher dose of $2 \mu\text{g/l}$ of Metribuzin did not modify the weights of this group compared with the control group and the group receiving $1 \mu\text{g/l}$ of Metribuzin ($P < 0.05$). The use of Tribenuron-methyl at the same concentrations did not alter the weight evolution of the experimental rabbits. Indeed, the groups of rabbits receiving 0.1 and $1 \mu\text{g/l}$ of this herbicide show a variation in weight (2200 ± 14.96 g at 5166 ± 108.14 g and 2117 ± 105.18 g at 5325 ± 78.79 g) respectively Remains comparable to that of the control ($P < 0.05$). The evaluation of anti-ovalbumin rabbit IgG by previously optimized non-competitive ELISA showed a decrease in their rate in all experimental groups. In groups consuming metribuzin or tribenuron-methyl at $1 \mu\text{g/l}$, a decrease in the level of IgG is observed, which becomes more pronounced at the concentration of $2 \mu\text{g/L}$ ($P < 0.05$) and shows the effect Immunorepressor of these two pesticides.

Key Words: Rabbits, Metribuzin, Tribenuron-methyl, weight, ELISA, anti-ovalbumin IgG, immunosuppression

INTRODUCTION

The major concern of the developing countries remains the food self-sufficiency to break with increasingly heavy dependencies. As a result, agriculture needs to intensify production, and this requires the increased use of pesticides and other chemicals. The use of pesticides, however, is accompanied by contamination of terrestrial and aquatic ecosystems [1,2,3]. The toxicity of pesticides requires that they be limited or even avoided in food and water, as well as strict handling rules [4,5]. The health risk associated with occupational exposure to pesticides is best known and most certainly proven [6,7]. Several studies on occupational exposures indicate that some pesticides (dibromochloropropane, chlordecone, carbaryl, dibromoethylene and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid) have deleterious effects on male fertility [8,9,10]. The genotoxic potential of pesticide mixtures has also been reported [11]. Carbamate pesticides are generally neurotoxic and inhibit acetylcholinesterase. Some have been associated with negative effects on human development, especially in babies and children [12]. Complex mixtures of organochlorine pesticides are a determining factor in the risk of breast and prostate cancer [13,14]. The neurobehavioral effects of long-term exposure to pesticides also demonstrate their involvement in neurovegetative diseases or cognitive decline [15,16,17]. Algeria is classified as a country that uses large quantities of pesticides with 400 approved crop protection products, of which 40 are widely used by farmers [18]. The current state of affairs reveals the importation of products with summary labeling which does not mention anything during a visual inspection and which are prohibited in the countries of origin. The concentration of certain organochlorine molecules in water in the Algiers region (lindane, 2,4 'and 4,4' DDT, 2,4 'and 4,4' DDE) and organophosphates (diazinon, parathion) Exceeds the guideline values recommended by the WHO in 30% of samples [19]. In Algeria, the phytosanitary practices of greenhouse growers and farmers in general are bad and potentially harmful to the health of applicators, consumers and the environment [20,21]. Many pesticides cause, in humans or in different species, immunosuppression reactions [22,23] hypersensitivity [24,25] autoimmunity [26,27] Biochemical and Hematological Toxicity [28].

The objective of this work was to evaluate the immunotoxic risk of two pesticides, Metribuzin and Tribenuron-methyl used respectively for the cultivation of potatoes and cereals in Algeria. Both pesticides were used in ITELV/98 rabbits, causing acute toxicity. The evolution of the weight of the animals was measured and the immunological state was evaluated by indirectly optimized non-competitive enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

MATERIALS AND METHODS

Animals and Food

M Rabbit farming is carried out under conditions that meet the guide to good practice in rabbit production [29]. Male rabbits (n = 30) strain ITELV/98 about 2 months old and weighing 2108.3 ± 48.31 g were provided to us by the national institute of breeding of Sidi Bel-Abbes. They are used and reared in a battery, with separators, equipped with feeders with a temperature of $20 \pm 2^\circ\text{C}$ and a lighting of 12 hours per day [30]. The animals, arranged in seven groups of five rabbits each, a control group and six experimental groups, perceived ad libitum of water and a standard rabbit diet "El alf" in the form of granules (20% barley, dehydrated alfalfa 35%, Soybean meal 13%, wheat bran 30%, salt 0.5%, mineral complex and vitamin 1%) throughout the experiment.

Consumption of pesticides

Metribuzin marketed in Algeria as Sencor® (70% Metribuzin) is a herbicide of the triazine family, which inhibits photosynthesis by blocking the d1 protein of photosystem II and is used for weed control in cultivation of potatoes [31]. Tribenuron methyl, sold under the name Granstar 75 DF (75% pure Tribenuron methyl), is also an herbicide of the sulfonylurea family, inhibitor of the enzyme acetolactate synthase (ALS), leading to the synthesis of branched amino acids and used as a selective cereal herbicide

[32,33]. These two pesticides were provided to us by the agricultural services department of the town of Sidi Bel-Abbés (Algeria). Animals were watered ad libitum with water supplemented with both pesticides at the calculated concentrations of 0.1; 1 and 2 µg/l which were respectively 1; 10 and 20 times higher than the quality standard for water intended for human consumption. This standard sets the quality limit for each type of pesticide at 0.1 µg/l and the quality limit for the total pesticide concentration at 0.5 µg/l [34].

Immunogens and immunization of animals

The ovalbumin, immunogen (SIGMA, A 5253, lot 60K0844), was dissolved in the amount of 0.6 mg/ml in physiological water. To perform the first injection, a volume of Freund's complete adjuvant (ACF) was mixed with an equal volume of the antigenic ovalbumin solution. For recall immunizations Freund's incomplete adjuvant (AIF) was used under the same conditions. ACF (Sigma F 5881, lot 029K8708) and AIF (Sigma F 5506, lot 098K8724) were supplied to us in oily form in small 10 ml vials by Sigma Aldrich, Germany. The AIF used contains 0.85 ml of paraffin oil and 0.15 ml of mannide monooleate emulsified with 0.85% of sodium chloride. The ACF also contains koch bacilli killed. Immunization of the animals was performed subcutaneously, the most common way of avoiding sterile abscesses following Freund's complete adjuvant injection [35,36]. The thighs and shoulders of the rabbits were shaved in order to target the different injection sites and the syringe was inclined at the time of its introduction so as not to damage other organs. Freund's complete adjuvant was heated to 37 °C for 1 to 2 minutes and then vortexed to suspend mycobacteria [37]. The immunization solution was prepared by mixing 0.5 ml of the ACF with 0.5 ml of the antigenic solution containing approximately 300 µg of ovalbumin with a vortex. A volume of 1 ml was injected deeply into four sites at the thighs and shoulders of each rabbit of the experimental batches. Booster injections were performed at the 15th, 30th and 45th day using the antigen in the presence of Freund's incomplete adjuvant under the same conditions.

Blood sample

Ten days after the third immunization call (55th day), a last boost type immunization was followed on the 60th day by prelevment of a 5 ml blood sample. The animal was heated in the light of a lamp to cause peripheral vasodilatation. The blood was taken by incision from the marginal vein of the rabbit ear. The incision was made perpendicular to the vessel and the vein was compressed after sampling to obtain hemostasis [38,39]. The blood collected in a dry tube was centrifuged at 1500 g for 15 minutes. The serum was then aliquoted and frozen at -20°C until use.

Optimization of ELISA test for the determination of anti-ovalbumin IgG

Chemical products and reagents

Gelatin, Tween 80, ovalbumin, goat anti-rabbit IgG antibody labeled with peroxidase, o-Phenylenediamine were supplied to us by Sigma-Aldrich (Germany). All other chemicals and solvents were of analytical grade.

Principle of the ELISA test

The analysis protocol chosen was that of the ELISA conceptualized and developed by [Engvall and Perlmann in 1971 \[40\]](#). This was an indirect, non-competitive ELISA technique based on the sandwiching of the anti-ovalbumin antibody between the antigen (ovalbumin) and the goat anti-rabbit IgG antibody labeled with peroxidase. The enzymatic activity was measured by adding o-Phenylenediamine (OPD), a colorless substrate whose oxidation provides an orange product appreciated by colorimetry at 492 nm.

Different steps of the ELISA technique

Coating of the Ovalbumin antigenic solution

Each well of the immunoplate receives 100 µl of an antigenic dilution in 0.15 M phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4. After incubation for 2 h at 37 °C, the plate was washed three times with PBS-Tween buffer and reversed drying on Joseph paper in order to remove any traces of residual liquid.

Saturation of adsorbent sites (surcoating)

Distribute in each well 100 µl of a blocking solution, PBS-Tween-Gelatin. The plate was incubated for 1 hour at 37 °C in a humid chamber then washed 3 times with PBS-Tween buffer.

Incubation with rabbit antiserum (AS) anti-ovalbumin

Distribute 100 µl of each rabbit AS dilution in PBS-Tween-Gelatin. After incubation for 2 hours at 37 °C in a humid chamber, during which the antibodies bind to the antigens adsorbed on the plate, this was washed 5 times with PBS-Tween buffer and dried by turning over on Joseph paper.

Incubation with Conjugate Solution

Distribute 100 µl of the conjugate, goat antibody, anti-rabbit IgG, labeled with peroxidase in PBS-Tween-Gelatin. Cover the plate and incubate for 1 hour at 37 °C in a damp chamber. Wash 5 times with PBS-Tween buffer to remove any unbound conjugate and reverse-dry on Joseph paper.

Addition of revelation buffer and reading

Dissolve extemporaneously 6 mg of orthophenyldiamine (OPD) in 12 ml of sodium citrate / citric acid 0.1 M pH 5.5 and add 100 µl of oxygenated water H₂O₂ 3% extemporaneously.

Dispatch quickly 100 µl per well and cover the plate with aluminum foil. Incubate for 30 min at 37 °C in a humid chamber. During incubation, the bound enzymatic conjugate converts the colorless chromogen to yellow. The addition of 50 µl of the stop solution (H₂SO₄ 2N) causes the chromogen to turn from yellow to orange. The optical densities of the chromogen were read at 492 nm using an ELISA microplate reader (Tecan Sunrise, Austria GmbH).

Determination of the optimal dilutions for titration of the various reagents by ELISA

The optimal proportions of each of the reagents included in the enzyme immunoassay were determined systematically, namely, Rabbit Anti-Ovalbumin Polyclonal Antibody, ovalbumin antigen, and peroxidase-conjugated goat anti rabbit IgG. The adsorption

capacity of the microplate conditions the fixed quantity, which in turn controls the cascade of subsequent reactions. The experiment was carried out in the form of a series of cross-tabulations.

In order to determine the optimum titration conditions, well series of a microtiter plate (from A to H) were sensitized by a series of ovalbumin concentration of 10; 5; 2.5; 1.25; 0.625; 0.3; 0.1 and 0.07 μ g/ml. Each series of wells (1 to 11) corresponding to a given dilution of ovalbumin was reacted with a range of dilutions of the immunoserum (Is) of the anti-ovalbumin rabbits (1/75, 1/150, 1/300, 1/450, 1/600, 1/750, 1/1200, 1/2400, 1/4800, 1/9600 and blank).

The previously sensitized well series were crossed with dilutions of 1/2000 and 1/3000 of the peroxidase-conjugated goat anti rabbit IgG.

Statistical analysis

The results were expressed as a mean followed by the standard deviation. The statistical analysis of the data of the different groups was carried out by the Student "t" test, this parametric statistical test was adapted to a comparative analysis between the means of the experimental groups and that of the control group. The probability $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Weight evolution of animals treated with Metribuzin

After eight (08) weeks of subacute toxicity, by ingestion of pesticides, weighing showed that the weight change of the rabbits in the control group (2094 \pm 14.96g to 5398g \pm 58.62) was comparable to that of experimental animals group receiving 0.1 μ g/l of Metribuzin (2140 \pm 108.66 g to 5331.5 \pm 104.11 g) and of the group receiving 1 μ g/l of Metribuzin (2133.33 \pm 47.17 to 5225 g \pm 29.64) ($P < 0.05$). For the experimental group receiving 2 μ g/l of Metribuzin, the evolution of the weight of the animals was also comparable to that of the control (2109.17 \pm 53.52 to 5444 g \pm 54 g) ($P < 0.05$). In a teratology study where pregnant rabbits received large doses of metribuzin, a decrease in body weight was observed for the 135 mg/kg bw dose [41]. The work of Chiali et al., 2013 [42], showed that exposure to Metribuzin induced a significant reduction in weight, food consumption and a disruption of biochemical parameters in the Wistar rat. According to Merhi, 2008 [43], the treatment of male and female mice with the mixture of 11 pesticides does not appear to affect food consumption or the normal evolution of the weight of these animals compared to the controls. In our case the dose of Metribuzin used even 10 times that recommended by Directive 98/83 / EC of 03/11/98 [34] does not seem to affect the weight of the animals. According to McKinley et al, 2008 [44], Metribuzin is a thyroid hormone disrupting herbicide that is subject to a marketing authorization for agricultural use. In our experimental conditions, the probable disturbances of thyroid hormones, strongly implicated in the regulation of metabolism, growth and development, in particular of the central nervous system of mammals [45] have not been demonstrated by simple weight measurements. However, in the group consuming 2 μ g/l of Metribuzin, respiratory difficulties, cough and aggressiveness were noted. These symptoms were reported in the document by Praznoczy and Pepin, 2008 [46] which reported the acute effects of pesticides on human health. According to Bleeke, 1985 [47] rats given radioactively labeled metribuzin removed about 95% after

the second day. Deaminotribuzin mercapturate was found in urine and toxic metabolites such as deaminated, diketo and diketo deaminated in tissues. According to MSNBS, 1989 [48] consumption of Metribuzin by beagle dogs at a dose of 1500 ppm results in reduced food consumption and weight gain. In our case the dose used of 2 µg/l (20 times the norm) does not have a significant effect on the normal weight development of the animals.

Weight evolution of animals treated with Tribenuron-methyl

This compound is a biocide for domestic use, an estrogen hormone-disrupting herbicide that requires marketing authorization for agricultural purposes [44]. When administered at a dose of 0.1 and 1 µg/l in drinking water for 8 weeks, there was no change in the weight of animals receiving 0.1 µg/l (2117±105.18 g to 5325±78.79 g) and 1 µg/l (2115.5±72.30 to 5166g±108.14) of Tribenuron methyl, compared to the control group (P<0,05). Administration of this herbicide to CrI: CD-1 (ICR) BR mice for 4 and 18 weeks showed no observed effect level (NOEL) of 500 and 20 ppm, respectively, with decreased weight in both [49]. A study conducted by the same agency in the New Zealand white rabbit defines a no-observed-effect level (NOEL) of 20 mg/kg bw/day of tribenuron methyl in the mother and fetus with teratological effects. From 80 mg/kg bw/day, weight and appetite losses as well as deaths in mothers and fetuses were reported. In our experiment in the group receiving 2µg/l of Tribenuron-methyl a loss of a rabbit occurred on the 58th day. This loss seems to be related to the consumption of this pesticide but may be due to a probable physiological maladjustment of this rabbit who succumbed to this high dose despite a normal weight change that goes from 2089.5±38.89 to 5427g±49, 85 and which remains comparable to that of the control.

Evaluation of the IgG immunoglobulin level by indirect non-competitive ELISA

Determination of optimum titration conditions by ELISA

The results of figure 1 show the influence of the rabbit antiserum dilution on the curve of the optical densities as a function of the ovalbumin concentrations.

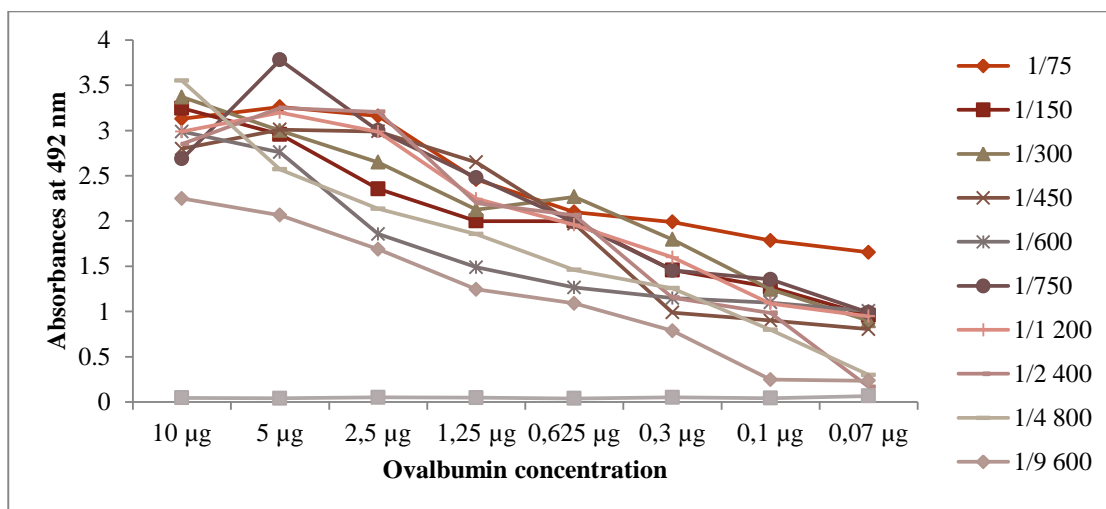


Figure 01: Influence of rabbit antiserum anti ovalbumin dilutions as a function of the variation of antigen concentrations at 1/2000th dilution of the conjugate.

The sensitivity of the test increases at low dilutions of rabbit anti-ovalbumin antiserum and low concentration of ovalbumin. The optical densities range from 1.58 to 0.045. Thus, from these results we opted for dilution 1/750 of antiserum rabbit anti ovalbumin. At this dilution, the absorbance has a maximum value of 1.58 units at the concentration of 5 μg of antigenic solution (ovalbumin). Finally, the 1/750 dilution of rabbit anti-ovalbumin antiserum and the concentration of 5 μg of this antigen were retained for the rest of our work. Therefore, dilution to 1/2000th was used for the determination of immunosera in the range of dilutions adopted compared to that using 1/3000th which gave low optical densities.

IgG determination of the different experimental groups

These same experimental conditions were adopted for the ELISA test allowing the enzyme immunoassay of rabbit anti-ovalbumin IgG. Figure 2 shows that the level of immunoglobulins expressed in units of optical density was decreased in the animals receiving Metribuzin compared to the control. This decrease was dose-dependent.

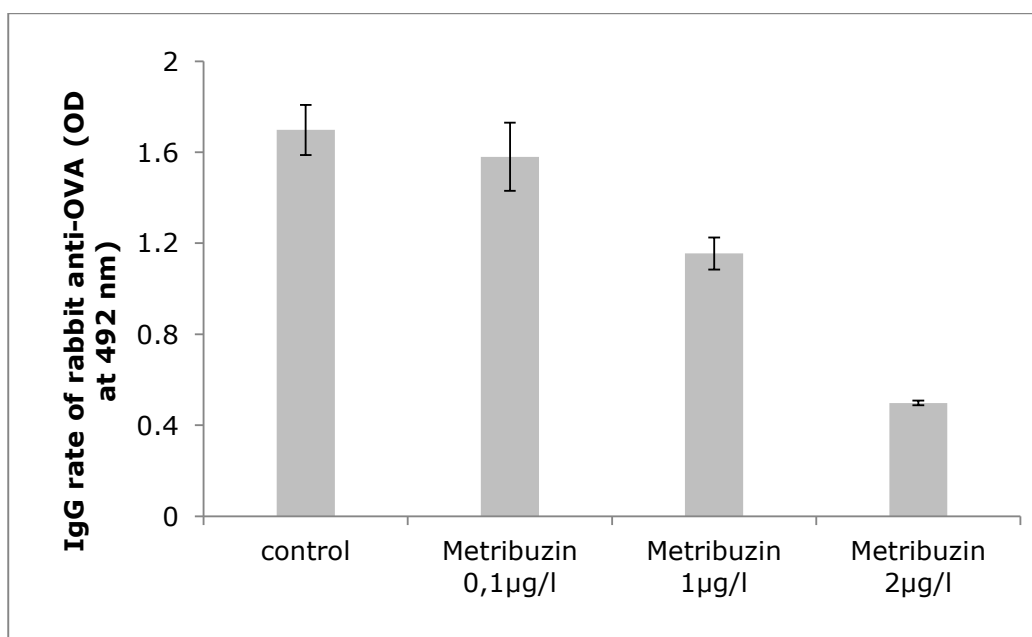


Figure 2: IgG level of rabbit anti-ovalbumin in the control group and those consuming metribuzin at 0.1; 1 and 2 $\mu\text{g}/\text{l}$. (Values are expressed as mean \pm standard deviations).

The same applies to animals receiving the same doses of Tribenuron-methyl (Figure 3). Thus the injection of ovalbumin in rabbits caused a reaction of the immune system by the implementation of an innate immunity then specific resulting in the synthesis by the plasmocytes of IgG directed against the ovalbumin. This is argued by many researchers who are discussing the response of the immune system to a compound foreign to the organism [50,51,52]. Immunosuppression may result in blocking the presentation of the antigen which does not allow maturation and/or migration of the dendritic cells. It can also inactivate proliferation, migration and tissue infiltration by lymphocytes. It can also be obtained by lymphocyte depletion [53]. In our case,

there is a pronounced dose-dependent decrease in the synthesis of immunoglobulins in contaminated animals. In vivo studies have shown that some pesticides act essentially in utero by altering macrophage activity [54] and by decreasing the amount of lymphocytes in the spleen and thymus fetuses [55], but also in adult animals, resulting in decreased immunoglobulin production and proliferation of T lymphocytes [56].

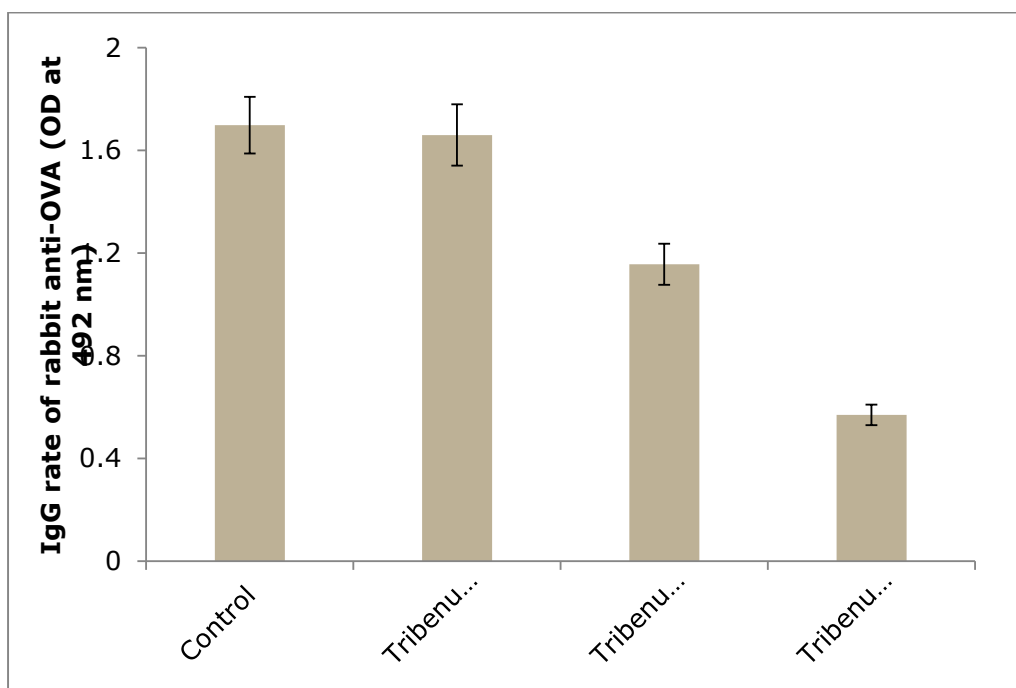


Figure 3: IgG level of rabbit anti-ovalbumin of the control group and those consuming Tribenuron-methyl at 0.1; 1 and 2 µg/l. (Values are expressed as mean ± standard deviations)

According to Bleeke et al., 1985 [47] there is no report on the effects of exposure of human beings to metribuzin. It is believed that this compound has relatively no acute toxic effects in mammals. Pesticides are often considered potentially immunotoxic products, mainly on the basis of animal data, as very little human data is currently available. Corsini et al., 2005 [57] showed that mancozeb-exposed viticulturists exhibited a significant decrease in their eosinophils and IgE serum levels, and an increase in the number of total T lymphocytes (CD3+), lymphocytes T CD4+ and T CD19+. Seth et al, 2005 [58] showed that serum levels of IgG, IgM, IgA and IgE were not affected in patients with poisoning by an organochlorine insecticide, Lindane, and that serum levels of several cytokines measured by ELISA were severely disrupted. According to these last two studies, no chronic or acute exposure to a pesticide had any clinical consequences in relation to these immunological disturbances. Immunological disturbances are meaningful only to the extent that they can be correlated with pathological events [59]. According to the same author, further studies will be needed to predict the real significance of these disturbances in terms of human health consequences. In addition, the importance of cytochrome P450 for the detoxification of metribuzin in mice has been demonstrated by Bleeke et al., 1985 [47], concerning the disturbances caused by the pesticides studied. *Cyprinus carpio* exposed

to metribuzin showed no change in cytochrome P450 and ethoxyresorufin-O-deethylase activity (EROD) compared to control [56]. Previous studies have shown that different herbicides in the triazine family cause disturbance of free radical processes in gills of bluegill sunfish [61] and common carp [62,63]. Husak et al., 2016 [64] showed that exposure of goldfish to metribuzin led to oxidative stress development in the gills.

Tribenuron-methyl used at doses of 1 and 2 µg/l, respectively 10 and 20 times the normal regulated dose, results in a decrease in the level of IgG in rabbits and almost similar to the effect of Metribuzin (Figure 03) . The work of Corsini et al., 2007 [65] on patients exposed for one month to an herbicide, Propanil showed the concentration-dependent effect on reduction of IL-10 and IFN-γ production and clarified that it is not possible in the light of available data to clarify the reality and magnitude of the immunotoxic risk of propanil to humans. According to Lah, 2014 [66] herbicides are much less toxic to mammals because their mechanisms of action are designed to disrupt plant metabolism. In our case, the effects of the two herbicides tested on the rabbits reveal a disturbance of the immune system, which was reflected in the decrease in serum IgG levels. The doses of pesticides used were higher than those standardized. Regulatory standards should be set based on toxicity data; This is the case for plant and animal foods, but not the case for water since the limit values of 0,1 µg/l and 0,5 µg/l which are fixed at European level according to other considerations are not specific to the pesticides studied. These limit values are maintained while the scientific data acquired since then renders them even more obsolete. The result is now a lack of clarity [67]. In Algeria, every effort should be made to intensify the cooperation of all stakeholders involved in the pesticide problem, to assess the risks to the different users and to take the necessary measures.

CONCLUSION

Tribenuron-methyl and metribuzin used at the indicated concentrations gave comparable results in weight and decreased anti-ovalbumin IgG in experimental animals. The results of the immunochemical assays show an immunomodulatory effect of the two herbicides studied. The effects observed were dose-dependent on reference to norms which today and at European level were disputed. For this purpose it is important to reconsider the validity of these standards in order to fix them according to the toxicity data. In Algeria, some producers judging the manufacturer's doses low, often have to increase or multiply the frequencies of treatments. This was problematic when crops were close to harvest. It was therefore necessary to improve the knowledge of the peasant world in the field of pesticides and to ensure the conditions of their detention. A toxicovigilance system must be established as pesticides can be incorporated into the soil and integrated into food webs and potentially biomagnified in food chains.

References

- [1] Commissariat général au développement durable (CGDD), Évaluation des risques liés aux pesticides pour les écosystèmes aquatiques. Recommandations issues du programme de recherche «Pesticides», 2015. 218: 1.

- [2] Vernier, F., Rousset, S., Les mesures agroenvironnementales à enjeu «eau/pesticides»: évaluation environnementale et économique de l'impact de modifications des pratiques agricoles par modélisation intégrée à partir de scénarios d'évolution (ECCOTER), rapport final, programme Pesticides (APR 2009), 2014, :49 .
- [3] Rappe, A., Pesticides et santé, Ed : Association Pharmaceutique Belge, Bruxelles, 1992, 484p
- [4] Béchaux, C., Zetlaoui, M., Tressou, J., et al. *Food Chem Toxicol*, 2013. 59: 191.
- [5] Calvet, R., Barriuso, E., Bedos, C., et al. Les pesticides dans le sol, conséquences environnementales, Ed : France agricole, 2005, 21
- [6] Quirós-Alcalá, L., Bradman, A., Nishioka, M., et al.. *Eskenazi, Environ Health*, 2011. 10:19-34
- [7] Thibaudier, JM., Freulet, JM., Archives des Maladies professionnels et de l'environnement, 2010. 71: 167.
- [8] Multigner, L., Kadhel, P., Huc-Terki, F., et al. Auger, *Epidemiology* 2006, 17: S372.
- [9] Xia, Y., Cheng, S., Bian, Q., et al., *Toxicol Sci*, 2005, 85, 615.
- [10] Slutsky, M., Levin, JL., Levy, BS., *Int J Occup Environ Health*, 1999. 5: 116.
- [11] Graillot, V., Takakura, N., Hegarat, LL., et al., *Environ Mol Mutagen*, 2012. 53: 173.
- [12] Morais, S., Dias, E., Pereira, ML., Carbamates: Human Exposure and Health Effects. M. Jokanovic (edn) - The Impact of Pesticides, WY Academy press, Cheyenne, 2012, 21, 38.
- [13] Xu, X., Dailey, AB., Talbott, EO., et al. Environmental Health Perspective, 2010, 118, 60.
- [14] Boada, LD., Zumbado, ML., Henríquez-Hernández, A., et al. *Environmental Health*, 2012. 11: 28.
- [15] Juricek, L., Coumoul, X., Cahiers de Nutrition et de Diététique, 2014. 49: 74.
- [16] Baldi, I., Gruber, A., Rondeau, V., et al. *oem.bmj*, 2011. 68: 108.
- [17] Costello, S., Cockburn, M., Bronstein, J., et al. *American Journal of Epidemiology*, 2009, 169, 919.
- [18] Bouziani, M., *Santé Maghreb*, 2007. 45.
- [19] Moussaoui, KM., Boussahel, R., Tchoulak, Y., et al., Utilisation, évaluation et impacts des pesticides en Algérie. Ecole Nationale Polytechnique, Alger, Algérie, 2001. 31.
- [20] Belhadi, A., Mehenni, M., Reguieg, L., et al. *Revue Agriculture*, 2016. 1: 09.
- [21] Madani, FZ., Hafida, M., Merzouk, SA., et al., *Biomarkers*, 2016, 21, 138.
- [22] Anderson, SE., Inhalation Toxicology, 2010. 22: 125.
- [23] Keil, DE., *Toxicology Science*, 2009. 108: 110.
- [24] Instanes, CE., *Toxicology letters*, 161. 219-25
- [25] Fukuyama, TE., *Toxicology*, 2011. 289: 132.
- [26] Sobel, ES., Gianini, J., Butfiloski, EJ et al. Roberts, Environ Health Perspect, 2005. 113: 323.
- [27] Gu, JY., Qian, CH., Tang, W., et al.. Scherbaum, M. Schott, C. Liu, *Horm Metab Res*, 2009. 41: 471.

- [28] Kadeche, L., Bourogaa, E., Boumendjel, A., et al., *Int. J. Pharm. Sci. Rev*, 2016. 40: 38-46
- [29] Demers, S., Guide de bonnes pratiques en production cunicole. Edition le lapin du Quebec, 2013. 27
- [30] <http://www.cuniculture.info/ Docs/Elevage/Tropic-01.html>.
- [31] <http://www.cals.uidaho.edu/edcomm/pdf/CIS/CIS1185.pdf>
- [32] FAO, FAO specifications and evaluations for plant protection products. Tribenuron-methyl, 2011: 1.
- [33] Mukherjee, I., Das, TK., Kumar, A., et al. *Environ Monit Assess*, 2015. 187: 610.
- [34] Directive n° 98/83/CE du 03/11/98, modifiée par Directive (UE) n° 2015/1787 du 6 octobre 2015, relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine.
- [35] Bean, ES., Polyclonal Antibodies, In: G.C. Howard and D.R. Bethell : Basic methods in antibody production and characterization, Ed: CRC Press, Boca Raton-USA, 2000. 31.
- [36] Clark, A., Befus, D., O'Hashi, P., et al. Lignes directrices: production d'anticorps, 2002. 44.
- [37] Baldrige, JR., Lacy, MJ., Adjuvants. In: G.C. Howard and D.R. Bethell : Basic methods in antibody production and characterization, Ed: CRC Press, Boca Raton-USA, 2000, 19.
- [38] Perry-Clark, LM., Meunier, LD., *Laboratory Animals Science*, 1991. 41: 495.
- [39] Smith, PA., Prieskorn, DM., Knutsen, CA., et al., *Laboratory Animal Science*, 1988. 38: 623.
- [40] Engvall, E., Perlmann, P., *Immunochemistry*, 1971. 8: 871.
- [41] Unger, TM., Shellenberger, TE., A teratological evaluation of Sencor (R) in mated female rabbits: 80051. Rapport final. Étude non publiée, MRID 00087796 (1981), citée au renvoi 11.
- [42] Chiali, FZ., Merzouk, H., Merzouk, SA., et al., *Pestic Biochem Physiol*, 2013. 106: 38.
- [43] MERHI, M., Thèse de Doctorat. (Institut national polytechnique de Toulouse, France, 2008)
- [44] McKinlay, R., Plant, JA., Bell, JN., et al., *Environ Int*, 2008. 34:168.
- [45] Ait, M., Cadi, El., El Jaoudi, R., et al., *Gynécologie Endocrinologie*, 2011. 13:102.
- [46] Praznoczy, C., Pepin, P., Observatoire régional de santé d'Ile-de-France. La santé observée en Seine-Saint-Denis. *Fiches Santé-environnement*, 2008. 32.
- [47] Bleeke, MS., Smith, MT., Casida, AE., *Pestic. Biochem. Physiol*, 1985. 23:123.
- [48] MSNBS, Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada : document technique – la métribuzine. Ministère de la Santé nationale et du Bien-être social. Évaluation non publiée préparée par la Direction des aliments, 1989. 3p.
- [49] Pest Management Regulatory Agency (PMRA). Tribénuron-méthyle, *Document des décisions* - E95-04. 1995. 1.
- [50] Heyman, B., *Annu. Rev. Immunol*, 2000. 18: 709.

-
- [51] Li, Z., Woo, CJ., Iglesias-Ussel, MD., Scharff, *Genes Dev*, 2004. 18: 1.
- [52] Jackson, DA., Elsawa, SF., *Biomolecules*, 2015. 5: 20.
- [53] Lebranchu, Y., Blanco, G., Dantal, J., Cibles et mécanismes d'action *des immunosuppresseurs*, 2012. 80.
- [54] Theus, SA., Lau, KA., Tabor, DR., et al., *J Leukoc Biol*, 1992. 51: 366.
- [55] Filipov, NM., Pinchuk, LM., Boyd, BL., et al. *Toxicol Sci*, 2005. 86: 324.
- [56] Fournier, M., Friborg, J., Girard, D., et al. *Toxicol Lett*, 1992. 60: 263.
- [57] Corsini, E., Birindelli, S., Fustinoni, S., *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005. 208: 178.
- [58] Seth, V., Ahmad, RS., Suke, SG., *Clin Biochem*, 2005. 38: 678.
- [59] Descotes, J., Modification de l'immunité en relation avec l'exposition de l'homme aux substances, in : *Afsset, Bulletin de veille scientifique*, 2007. 16-17
- [60] Haluzová, I., Modrá, H., Blahová, J., et al. *Interdiscip Toxicol*, 2011. 4: 85.
- [61] Elia, AC., Waller, WT., Norton, SJ., *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, 2002. 68: 809.
- [62] Velisek, J., Stara, A., Kolarova, J., et al., *Pest. Biochem. Physiol*, 2011. 100: 305.
- [63] Stara, A., Kristan, J., Zuskova, E., et al. *Pest. Biochem. Physiol*, 2013. 105: 18.
- [64] Husak, VV., Mosiichuk, NM., Maksymiv, IV., et al. Lushchak, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2016. 45: 163.
- [65] Corsini, E., Codeca, I., Mangiaratti, S., *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007. 222: 202.
- [66] Lah, K., *ToxiPedia*, 2014. 2: 45.
- [67] CPP (Comité de la Prévention et de la Précaution), Risques sanitaires liées à l'utilisation des produits phytosanitaires. Edition : Ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement, France, 2002. 47.