

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA
Faculté Des Sciences Agronomiques, Vétérinaires et Biologiques

Département de Biologie



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention de diplôme de
Master en Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Option : Biosignalisation Cellulaire et Moléculaire, Immunologie

**Purification des polynucléaires neutrophiles
humains et contribution à la recherche de l'effet
cytotoxique de Plomb et de Mercure sur la survie
des neutrophiles**

Présenté par :

M^{elle} AIT GUENISSAID Zineb

Devant le jury :

M ^f MOHAMED SAID R.	MAA, USDB,	Président
M ^{me} BENAZOUZ F.	MAA, USDB,	Examinatrice
M ^{me} BIREM Z.	MAB, USDB,	Examinatrice
M ^f HOUALI K.	MCA, Mouloud MAMMERI, Tizi-Ouzou,	Promoteur
M ^{elle} SAADI L.	MCB, USDB,	Co-promotrice

2012 - 2013

REMERCIEMENT

Il est rare qu'un travail soit le fruit d'une seule personne, celui-ci ne fait partie des exceptions, aussi qu'il nous soit permis d'exprimer notre profonde reconnaissances à :

Mr HOUALL.K mon promoteur pour son suivi et pour la patience avec laquelle il a dirigé ce mémoire ; je lui adresse mes vifs remerciements pour les précieux conseils qu'il m'a donné.

Je tiens a remercier aussi ma co-promotrice Mme SAADI. L pour l'aide qu'elle ma apportée lors de l'élaboration de ce modeste travail.

Je tiens a remercier les membre de jury :M' MOHAMED SAID R., M^{me} BENAZOUZ F., M^{me} BIREM Z. pour leur participation au Jury. Ils ont également contribué par leurs nombreuses remarques et suggestions à améliorer la qualité de ce mémoire, et je leur en suis très reconnaissante.

Sans oublier tous mes enseignants qui m'ont suivis durant mon cursus scolaire du primaire à l'université.

Aussi au laboratoire du département biologie de l'université MOULOUD MAAMRI et en particulier Mme BEDOUHAN. S.

Sans oublier les responsables du laboratoire de l'hôpital NEDIR MOHAMED de TIZI OUZOU pour leurs contributions.

Je tiens enfin à exprimer toute ma sympathie et ma reconnaissance à tous ceux et celles qui m'ont encouragés de prés ou de loin.

DÉDICACE

Merci ALLAH (mon dieu) de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir ; la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve.

Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma mère Ouiza KEBBAS.

A mon père Belkacem, école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années de mes études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger.

Que dieu les gardes.

A mes adorables sœurs : Manel et Yasmine.

A mes amis.

A tous ceux qui me sont chers.

A tous ceux qui m'aiment.

A tous ceux que j'aime.

Résumé

La présente étude porte sur l'analyse des polynucléaires neutrophiles (PNs) exposés aux métaux lourds : le Plomb et le mercure. Elle a été effectuée sur 10 prélèvements de sujets sains dont la tranche d'âge se situe entre 20 et 25 ans. Nous avons traité les polynucléaires neutrophiles avec du Hg chez cinq sujets et avec le Pb chez les cinq autres.

Pour mener à bien cette étude, nous nous sommes appuyés sur la technique classique d'isolement des neutrophiles Dextran/Ficoll à partir du sang humain. Nous avons traité ces cellules avec différentes concentrations de Pb et de Hg. Nous avons incubé ces dernières au bain marie à 37°C pendant 30 min, 60 min et 90 min. Ensuite, nous avons observé et compté les cellules vivantes.

Notre étude révèle que le temps d'incubation et l'augmentation des concentrations en Pb et en Hg de 0µg , 50 µg , 100 µg à 200 µg ont une influence importante sur la viabilité des polynucléaires neutrophiles humains. Nous avons noté une diminution successive du pourcentage de la viabilité de ces derniers en comparaison au contrôle non traité à 0 µg avec le Pb et le Hg.

Aussi, l'analyse des pourcentages des neutrophiles vivants en contact avec les métaux lourds indique que les cellules exposées au Hg présentent une forte diminution par rapport à celles exposées au Pb. Le plomb et le mercure ont, en définitive, un effet cytotoxique sur la viabilité des PMNs.

Mots clés : polynucléaires neutrophiles, Plomb, Mercure, isolement des neutrophiles, viabilité PMNs.

Abstract

The present study is about the analysis of polynuclear neutrophiles (PMNs) exposed to heavy metals : Lead (Pb) and Mercury (Hg). It was carried out on 10 healthy subjects whose age bracket ranged between 20 and 25 years. We treated polynuclear neutrophiles with Hg on five subjects and with Pb on the other five.

To successfully carry out this study, we relied on the classical technique of insulation of neutrophiles known as Dextran/Ficoll starting from human blood. We treated these cells with various concentrations of Hg and Pb. We had the latter incubated in a Marie bath at 37°C for 30 min, 60 min and 90 min. Then, we observed and counted the alive cells.

Our study reveals that the incubation time and the increase in the Pb and Hg concentrations from 0µg, to 50 µg, to 100 µg and finally to 200 µg have a significant influence on the viability of human polynuclear neutrophiles. We noted a successive reduction of the viability percentage of the latter by comparing them with the sample which was not treated at 0 µg with Pb and Hg.

Moreover, the analysis of the percentages of the living neutrophiles put in contact with heavy metals, indicates that the cells which were exposed to Hg present a strong reduction as compared with those exposed to Pb. Lead and mercury have, ultimately, a cytotoxic effect on the viability of PMNs.

Key words: polynuclear neutrophiles, Lead, Mercury, insulation of the neutrophiles, PMNs viability.

ملخص

تتمثل هذه الدراسة في تحليل الخلايا ذات النواة المفصصة (العدلات) المعرضة للمعادن الثقيلة الرصاص و الزئبق . لقد اجريت على 10 مواضيع سليمة تتراوح شريحة اعمارها من بين 20 الى 25 سنة.

لقد قمنا بمعالجة الكريات البيضاء المفصصة النوى بالزئبق لدى خمسة مواضيع، و بالرصاص لدى الخمسة الاخرين.

للقيام بهذه الدراسة ارتكزنا على التقنية الكلاسيكية لعزل العدلات ديكسترون / فيكول انطلاقا من دم بشري. لقد قمنا بمعالجة هذه الخلايا بمختلف تركيزات الرصاص و الزئبق. ثم قمنا بترخيم هذه الأخيرات في حمام مريم على 37 درجة مئوية لمدة 30 دقيقة، 60 دقيقة و 90 دقيقة. ثم قمنا بملاحظة و تعداد الخلايا الحية.

أظهرت دراستنا بان مدة الترخيم و زيادة تركيزات الرصاص و الزئبق من 0 μg ، 50 μg ، 100 μg الى 200 μg ذات تأثير مهم على قابلية حياة العدلات البشرية. فسلنا انخفاضا متتابعا لنسبة قابلية الحياة لهذه الأخيرة مقارنة بالمراقبة الغير معالجة في 0 μg بالرصاص و الزئبق. كما يبين أيضا تحليل نسب العدلات المفصصة النوى الحية في اتصال مع المعادن الثقيلة، أن الخلايا المعرضة للزئبق تظهر انخفاضا شديدا مقارنة بتلك المعرضة للرصاص.

في الختام للرصاص و الزئبق تأثير سيتوتوكسيكي على قابلية حياة الخلايا ذات النواة المفصصة (العدلات).

المفتاح : الخلايا ذات النواة ألمفصصة، الرصاص، الزئبق، عزل الخلايا ذات النواة المفصصة (العدلات)، قابلية الحياة للخلايا الخلايا ذات النواة ألمفصصة.

Sommaire

Introduction	01
Chapitre I: Rappels Bibliographiques	
I.1. Généralités sur les neutrophiles.....	02
I.1.1. Structure des neutrophiles.....	02
I.1.2. Rôles des neutrophiles.....	04
I.2. Effets toxique de certains métaux lourds chez l'Homme.....	06
I.2.1. Effets toxiques du Plomb.....	06
I.2.2. Effets toxiques du Mercure.....	07
Chapitre II : Matériels et Méthodes	
II.1. Matériels.....	09
II.1.1. Echantillonnage.....	09
II.1.2. Appareillage et réactifs.....	09
II.2. Méthodes.....	09
II.2.1. Isolement des polynucléaires neutrophiles humains	10
II.2.2. Traitement des polynucléaires neutrophiles avec les métaux lourds	13
II.2.3. Analyse statistique.....	14
Chapitre III : Résultats et discussion	
III.1. Résultats.....	15
III.1.1. Dénombrement des polynucléaires neutrophiles.....	15
III.1.2. Effet du traitement au plomb sur la viabilité des neutrophiles.....	16
III.1.3. Effet du traitement au mercure sur la viabilité des neutrophiles.....	19
Conclusion	24
Références Bibliographique	25
Annexes	29

Liste des abréviations

CD : Class de différenciation.

CR: Récepteur du complément.

DAF: Facteur d'accélération de décomposition.(Decay-accelarating factor)

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique.

ERO: Espèces réactives de l'oxygène.

fMLP: formyl-méthyl-leucyl-phénylalanine.

FPR : Récepteur des formyl peptides.

FRO: formes réactives de l'oxygène.

HClO: acide hypochlorique.

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

Hg : Mercure.

HgCl₂ : Chlorure de mercure.

IgE : Immunoglobuline E

IgG : Immunoglobuline G

KCl : Chlorure de potassium.

KH₂PO₄: Monopotassium phosphate..

MeHg : Methylmercure.

MGG : May-Grünwald Giemsa.

NADPH: Nicotinamide adénine dinucleotide phosphate réduit.

NaCl : Chlorure de Sodium.

Na₂HPO₄ : Hydrogénophosphate de sodium.

Pb : Plomb

PBS : Tampon phosphate salin.

Phox: phagocyte oxidase.

PMN: Polymorphonucléaires neutrophiles.

PN: Polynucléaires neutrophiles.

O₂⁻ : superoxyde de l'oxygène.

TNF α: Facteur de necrose tumorale α.

Liste des Figures

Figure 1 : schéma représentatif d'un polynucléaire neutrophile.....	02
Figure 2 : Granulocyte neutrophile au grossissement X500.....	02
Figure 3 : Phagocytose et métabolisme oxydatif du neutrophile.....	05
Figure 4 : les voies impliquées dans l'apoptose contre des effets nécrotiques de Hgcl ₂ dans les macrophages murins.....	09
Figure 5 : Séparation des érythrocytes.....	10
Figure 6 : Elimination des érythrocytes par centrifugation.....	11
Figure 7 : Séparation du Ficoll de la solution mélange.....	11
Figure 8 : Lyse des érythrocytes contaminants et récupération des neutrophiles.....	12
Figure 9 : Observation des polynucléaires neutrophiles humains Grossissement x400 ; Coloration au bleu de trypan et au cristal violet.....	15
Figure 10 : Effet du traitement aux différentes concentrations du plomb sur la viabilité des neutrophiles après 30 minutes d'incubation.....	16
Figure 11 : Effet du traitement aux différentes concentrations du plomb sur la viabilité des neutrophiles après 60 minutes d'incubation.....	17
Figure 12 : Effet du traitement aux différentes concentrations du plomb sur la viabilité des neutrophiles après 90 minutes d'incubation.....	18
Figure 13 : Effet du traitement aux différentes concentrations du plomb sur la viabilité des neutrophiles.....	18
Figure 14 : Effet du traitement aux différentes concentrations du mercure sur la viabilité des neutrophiles après 30 minutes d'incubation.....	19
Figure 15 : Effet du traitement aux différentes concentrations du mercure sur la viabilité des neutrophiles après 60 minutes d'incubation.....	20
Figure 16 : Effet du traitement aux différentes concentrations du mercure sur la viabilité des neutrophiles après 90 minutes d'incubation.....	21
Figure 17 : Effet du traitement aux différentes concentrations du mercure sur la viabilité des neutrophiles.....	21

Liste des tableaux

Tableau I : contenu des granules et des vésicules sécrétoires du neutrophile.....	03
Tableau II : Exposition des polynucléaires neutrophiles isolés aux différentes concentration de Plomb et de mercure.....	14
Tableau III : Récapitulatif de l'étude statistique de l'effet du Plomb.....	37
Tableau VI : Récapitulatif de l'étude statistique de l'effet du mercure.....	38



Introduction

INTRODUCTION

Les neutrophiles humains constituent un puissant système de défense chez l'Homme contre les agents pathogènes principalement les bactéries et les champignons. Ils participent aux phénomènes inflammatoires, car ils sont les premiers phagocytes à être recrutés vers le foyer inflammatoire. Cette protection est assurée par deux fonctions : la phagocytose et la bactéricidie. (Gougerot-Pocidalò, 2002).

Les neutrophiles étaient considérés, jusqu'aux années 2000, comme les parents pauvres de l'immunologie. Les recherches biologiques se sont penchées d'avantage sur l'étude des macrophages contrairement aux neutrophiles et ce, malgré l'omniprésence de ces derniers dans la pratique médicale humaine et vétérinaire quotidienne. Cependant, ces neutrophiles meurent par apoptose à leur contact avec le plomb et le mercure qui ont une action toxique sur les neutrophiles (Tournier, 2009).

Le plomb est classé, comme un agent potentiellement cancérigène chez l'Homme. Il peut causer des troubles neurologiques, hématologiques, gastro-intestinales, reproductives, immunologiques et apoptotiques (Patrick, 2006 ; Xu *et al.*, 2008).

Quant au mercure, il a des effets cancérigènes sur l'organisme. C'est un élément néphrotoxique et neurotoxique (Man, 2010). Suite à d'autres études, les chercheurs se sont intéressés à étudier les effets du Plomb et mercure sur les fonctions du neutrophile et pas sur la viabilité de ces derniers.

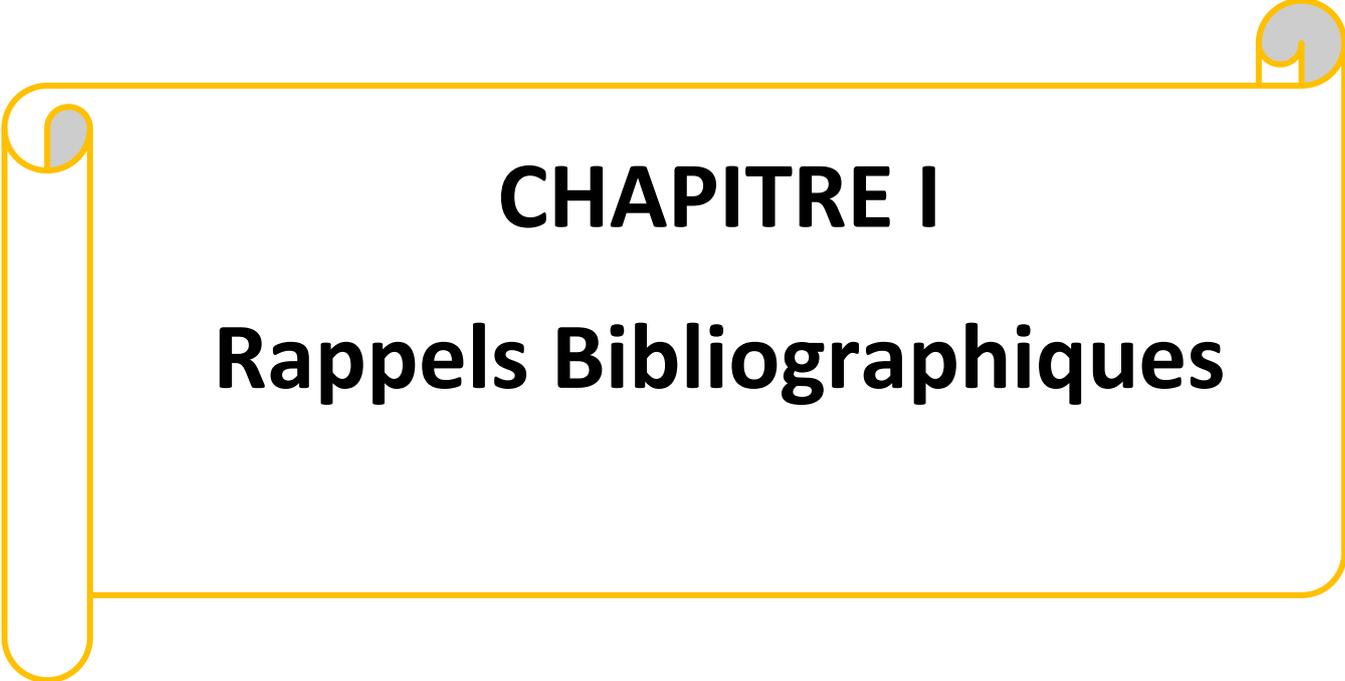
En définitive, notre étude s'intéressera au traitement *in vitro* des neutrophiles (PNs) isolés, avec différentes concentrations de plomb et de mercure. Nous allons tenter également d'évaluer les effets de ces métaux sur la survie des PNs.

Ce mémoire comporte trois chapitres :

Le premier chapitre sera consacré aux éléments théoriques relatifs aux généralités sur les polynucléaires neutrophiles ainsi qu'à l'effet toxique de plomb et de mercure sur l'Homme.

Le deuxième chapitre étudiera les matériels et les méthodes que nous avons utilisés afin de tester les effets de plomb et de mercure sur les neutrophiles, deux protocoles sont mis au point, l'un pour isoler les PNs et l'autre pour évaluer les effets du plomb et mercure avec des concentrations croissantes sur la survie des neutrophiles.

Le troisième chapitre portera sur l'interprétation de nos résultats sur le pourcentage de viabilité des PNs exposés au plomb et au mercure.

A decorative yellow border that resembles a scroll, with rounded corners and a vertical strip on the left side. It frames the chapter title.

CHAPITRE I

Rappels Bibliographiques

I.1. GENERALITES SUR LES NEUTROPHILES

I.1.1. Structure des neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles sont les leucocytes les plus abondants dans la circulation sanguine. Chez l'Homme, dans la sous-famille des granulocytes, les neutrophiles sont les plus nombreux, constituant à eux seuls plus de 95% de cette population cellulaire totale (Goldsby et *al.*, 2001). Les neutrophiles (figure 1) de 10 à 20 μm de diamètre possèdent un noyau polylobé de 2 à 5 lobes avec une chromatine dense. Leur cytoplasme est abondant, d'aspect dense et bourré de fines granulations (Tizard, 2004) (tableau I).

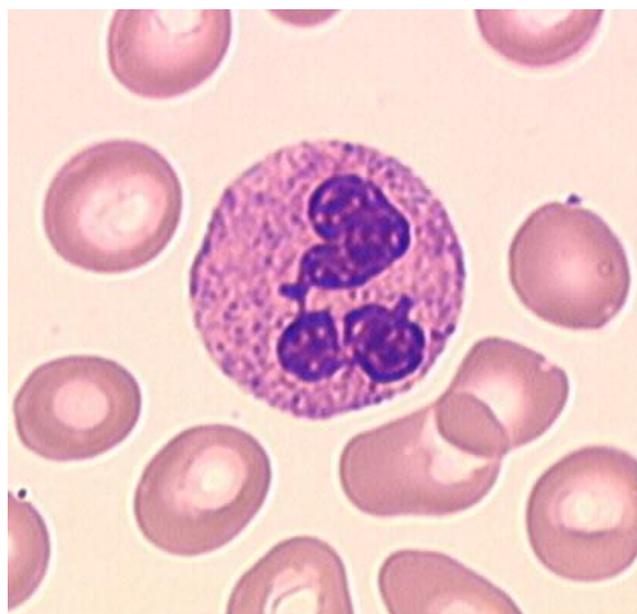
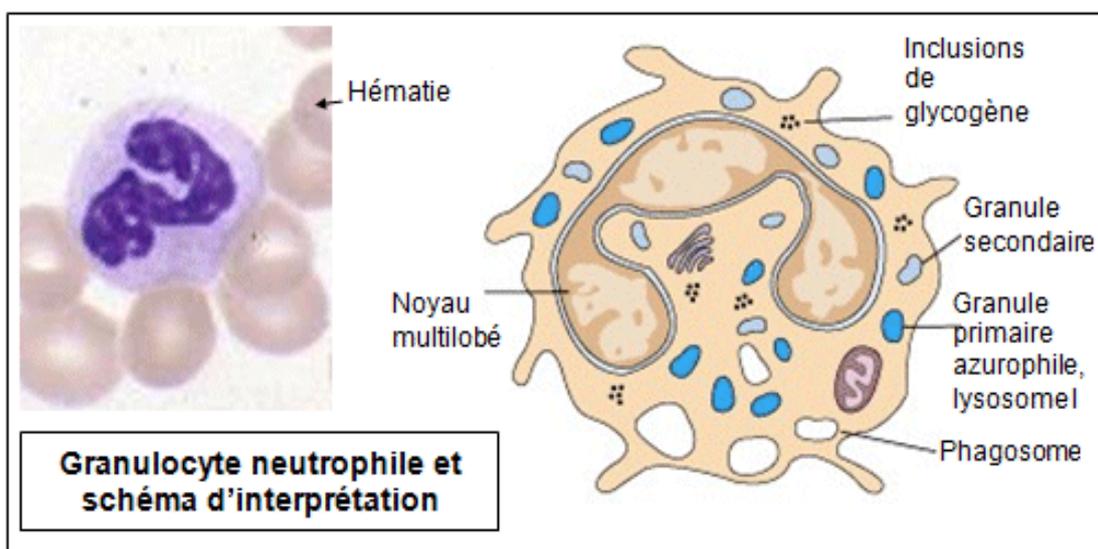


Figure 2 : Granulocyte neutrophile au grossissement X500

Tableau I : Contenu des granules et des vésicules sécrétoires du neutrophile (Faurouchou et Borregaard, 2003)

Granulations Azurophiles (primaires)	Granulations Spécifiques (secondaires)	Granulations Tertiaires	Vésicules Sécrétoires
Myéloperoxydase Lysozymes Elastases Cathepsines B, D et G Protéinases Hydrolases acides Defensines Protéines cationiques Inactivateur de C5a	Lactoferrine Transcobalamine Collagénases Activateur du complément Activateur du plasmagène Chimio-attractant des monocytes Inhibiteur de protéines kinase C Récepteurs du fMet-Leu-Phe Récepteurs du C3bi (CR3)	Gélatinases Récepteurs du C3b Cytochrome b559 Phosphatase alcaline	Phosphatase alcaline CD10 CD11b/CD18 CD13, CD14 CD16, CD45 CR1, C1q-R Cytochrome b ₅₅₈ Decay Accelerating Factor Leukolysine Protéines Plasmatiques

Les polynucléaires neutrophiles sont répartis en deux secteurs : le secteur circulant ou les neutrophiles libres dans la circulation sanguine. Ce secteur est le seul mesuré directement lors d'une numération sanguine. Le secteur marginal comporte les polynucléaires plaqués contre les parois des vaisseaux notamment dans la rate, le foie et les poumons. Ce secteur n'est pas mesuré lors de la numération alors qu'il représente une quantité égale au secteur circulant. Ces polynucléaires marginés sont fonctionnels et immédiatement disponibles (Parham et *al.*, 2003 ; Tizard, 2004).

I.1.2. Rôles des neutrophiles

Les neutrophiles sont un atout très important pour l'immunité innée, et surtout pour la réaction inflammatoire, car ils sont les premiers leucocytes à migrer, en très grand nombre, vers le foyer inflammatoire (Rosenberg et Gallin, 1999). Cette population cellulaire a aussi la capacité de synthétiser un grand nombre de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance, en réponse à une large variété de stimuli (Cassatella, 1999).

Suite à la phagocytose de pathogène, le neutrophile stimulé produit de façon extrêmement rapide de molécules dérivées de l'oxygène qui exercent une activité bactéricide et fongicide. L'oxygène consommé est converti enzymatiquement en anion superoxyde de l'oxygène (O_2^-) par le complexe multimérique nicotinamide adénine dinucleotide phosphate réduit (NADPH) oxydase dans la membrane cytoplasmique. Ces anions qui sont libérés du côté de la face externe de la membrane peuvent agir à l'extérieur du neutrophile et à l'intérieur du phagosome. Les radicaux O_2^- sont transformés en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est converti en acide hypochlorique (HClO) (Roos et *al.*, 2003). Il est probable que HClO induit une libération du fer à partir de multiples sites enzymatiques bactériens. Le fer participe à la production secondaire des radicaux hydroxyles qui sont des puissants bactéricides (Kobayashi et *al.*, 2005).

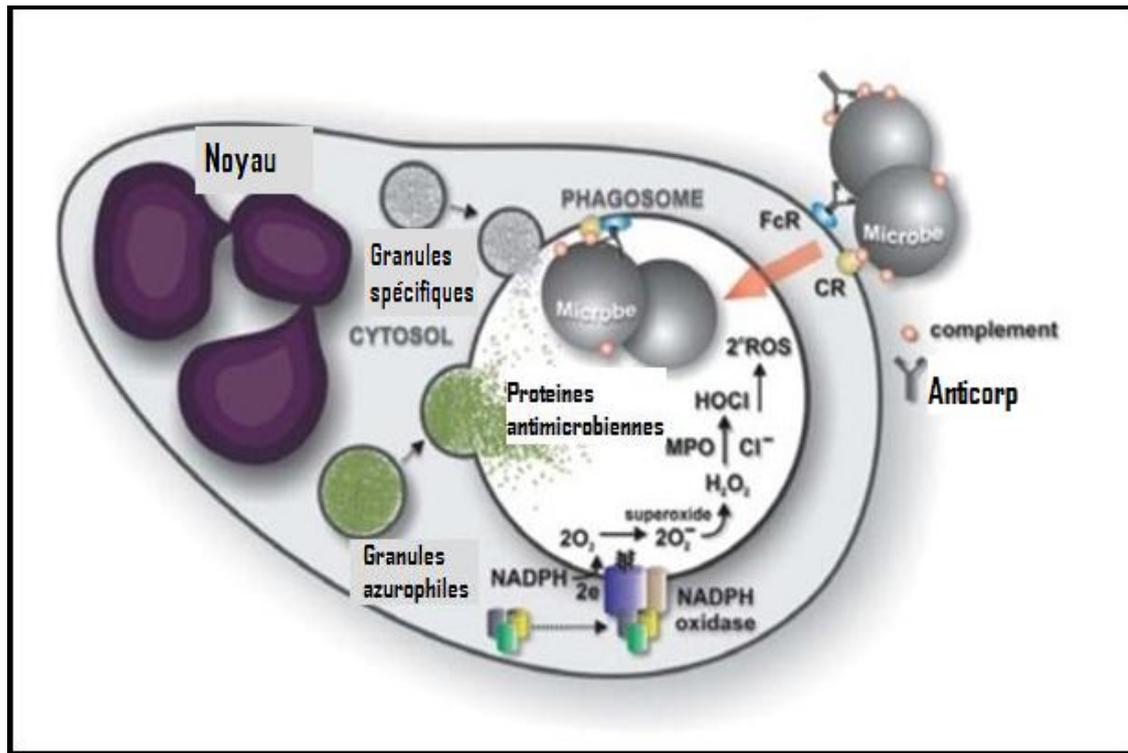


Figure 3 : Phagocytose et métabolisme oxydatif du neutrophile
(Kobayashi et al., 2005).

Après stimulation du neutrophile par un ionophore du calcium les granules sont exocytosés par ordre : les vésicules sécrétoires contenant de l'albumine, granules à gélatinase, les granules spécifiques et enfin les granules azurophiles. Ces derniers sont les plus doués d'une activité microbicide assurée par des enzymes lytiques ou à des protéines cationiques sans activité enzymatique mais qui, en raison de leur puissant effet bactéricide, ont été qualifiées de protéines antibiotiques (Bach et Chatenoud, 2002).

I.2. EFFETS TOXIQUES DE CERTAINS METAUX LOURDS CHEZ L'HOMME

I.2.1. Effets toxiques du Plomb

La présence d'intoxications massives chez les travailleurs professionnellement exposés au plomb a attiré l'attention sur les effets délétères de ce métal toxique sur l'organisme humain (Lauwarys, 2007).

Le plomb est un métal utilisé par l'Homme depuis des millénaires :

- les canalisations du réseau de distribution publique de l'eau est une source non négligeable d'apport de ce métal par ingestion d'eau contaminée (Garnier., 2005)
- l'introduction des alkyls de plomb dans l'essence a provoqué la diffusion de ce polluant non seulement autour des voiries des grands centres urbains, mais aussi à longue distance (Winston. et Robbins, 1973).
- l'accumulation massive du plomb dans les couches superficielles du sol reste très accessible au contact de l'Homme, surtout des enfants. Cette accumulation représente une menace permanente sur la santé des populations (Squinazi., 2002)

Le plomb pénètre essentiellement dans l'organisme par voie digestive et pulmonaire. Il est d'abord transporté par le sang et se fixe ensuite dans les différents tissus et en particulier au niveau de l'os (80 à 90 % du plomb total présent dans l'organisme) ou sa demi-vie est longue, de 10 à 20 ans. Ce toxique ainsi accumulé pourra par exemple être mobilisé à partir du squelette chez la femme enceinte et venir contaminer le fœtus (Slama. et Cordier., 2013)

Il modifie la biologie de la cellule en perturbant de nombreuses voies métaboliques et différents processus physiologiques. Il inhibe les enzymes de la biosynthèse de l'hème, catalyse des réactions de peroxydation des lipides et interfère avec les processus médiés par le calcium au niveau membranaire et cytosolique (Bettaïya., 1996)

Le plomb peut ainsi altérer certains mécanismes neurobiologiques jouant un rôle essentiel dans le développement cérébral. Ces éléments peuvent être mis en regard des effets du plomb sur le développement cognitif de l'enfant et des déficits d'apprentissage observés lors d'intoxications systémiques expérimentales (Banks *et al.*, 1997).

Les effets de l'exposition au plomb sur la reproduction se manifestent par une infertilité, la naissance d'enfants morts nés, des avortements spontanés ou des malformations. Le temps d'exposition semble jouer un rôle important dans l'apparition des effets toxiques sur la spermatogénèse, la fonction leydigienne et le système neuro-endocrinien (Lauwarys , 2007).

Différents aspects de l'action immunomodulatrice du plomb ont été investigués chez l'animal et chez l'Homme exposés au plomb. Les données restent limitées et les résultats inconstants.

Des études expérimentales ont montré que les souris exposées à de faibles niveaux de plomb ont développé une sensibilité accrue aux infections virales et bactériennes (Dyatlov et Lawrence, 2002 ; Gupta *et al.*, 2003). De plus, le plomb aggrave l'atteinte glomérulaire et le lupus érythémateux disséminé (Lauwarys, 2007). Ce métal et ses composés inorganiques sont possiblement cancérogènes pour l'Homme professionnellement exposé (Poëy et Philibert, 2000).

Le diagnostic d'une intoxication au plomb repose aujourd'hui sur la mesure de la plombémie. La prise en charge thérapeutique d'un sujet intoxiqué est déterminée par le niveau de la plombémie. Le traitement médical est basé sur l'utilisation de chélateurs (Lauwarys, 2007).

I.2.2. Effets toxiques du Mercure

Le mercure (Hg) est un métal liquide est très mobile. Il existe sous différentes formes dans l'environnement. Une fois rejeté, le mercure persiste dans l'environnement ou il circule sous diverses formes entre l'air, l'eau, les sédiments, le sol et l'ensemble des organismes vivants. La population générale est exposée aux vapeurs de mercure par l'atmosphère et les amalgames dentaires, alors que l'alimentation, particulièrement le poisson, est la principale source d'absorption du MeHg (Lauwarys, 2007).

Les vapeurs de mercure entraînent un effet toxique sur le système nerveux central d'où la présence de tremblement qui peut être accompagné d'une variété d'effets neuropsychologiques (Lauwarys, 2007)

L'Hg s'accumule dans le cortex rénal au niveau des tubules proximaux et la zone superficielle de la médullaire externe (Zalups, 2000). Une forte exposition au mercure élémentaire ou inorganique peut causer un syndrome néphrotique classique. Des cas ont été signalés en cas d'exposition professionnelle aux vapeurs de Hg et suite à l'application cutanée de crème à base de sels de mercure ou encore suite au traitement aux diurétiques mercuriels (Sin et Tsang, 2003).

En général, les manifestations rénales décelées chez les sujets exposés chroniquement à l'Hg sont discrètes, consistant en une protéinurie et une enzymurie modérées suggérant l'existence de lésions glomérulaires et tubulaires (Who, 2003).

Dans les intoxications graves et prolongées, l'état général s'altère, l'appétit diminue, les diarrhées sont fréquentes. un état de cachexie s'installe (Lauwarys, 2007)

Popescu et *al.* (1979) ont observé une élévation du nombre d'aberrations chromosomiques dans les lymphocytes de travailleurs exposés aux vapeurs de mercure. Cependant, une étude suggère que des expositions modérées aux vapeurs de mercure pourraient encore interférer avec la fonction bactéricide des neutrophiles et stimuler l'immunité humorale.

Plusieurs études ont mis en évidence un titre élevé d'anticorps anti-ADN chez les travailleurs exposés aux vapeurs de mercure (Cardenas et *al.*, 1993).

Les effets immunotoxiques potentiels du mercure ont été investigués chez les rongeurs et incluent l'induction d'un dysfonctionnement auto-immunitaire ainsi que celle d'une immunosuppression. Ces effets comprennent des signes d'atteinte systémique et spécifique de certains organes, l'induction d'auto-anticorps spécifiques, l'activation polyclonale de cellules T et B, l'augmentation du taux sérique d'IgG1 et IgE, une perturbation de la régulation des cytokines et une glomérulonéphrite à complexes immuns. Chez l'Homme, les données actuelles ne permettent pas de préciser l'action immunomodulatrice du mercure (Silbergeld et *al.*, 2005).

La régulation positive du calcium induite par le mercure peut causer la production accrue de ROS. Ceci peut activer p38 descendant. L'activation de p38 peut médié la caspase-3, est la signalisation pour l'apoptose induite par le mercure. (Sang Hyun Kim et Raghbir, 2004).

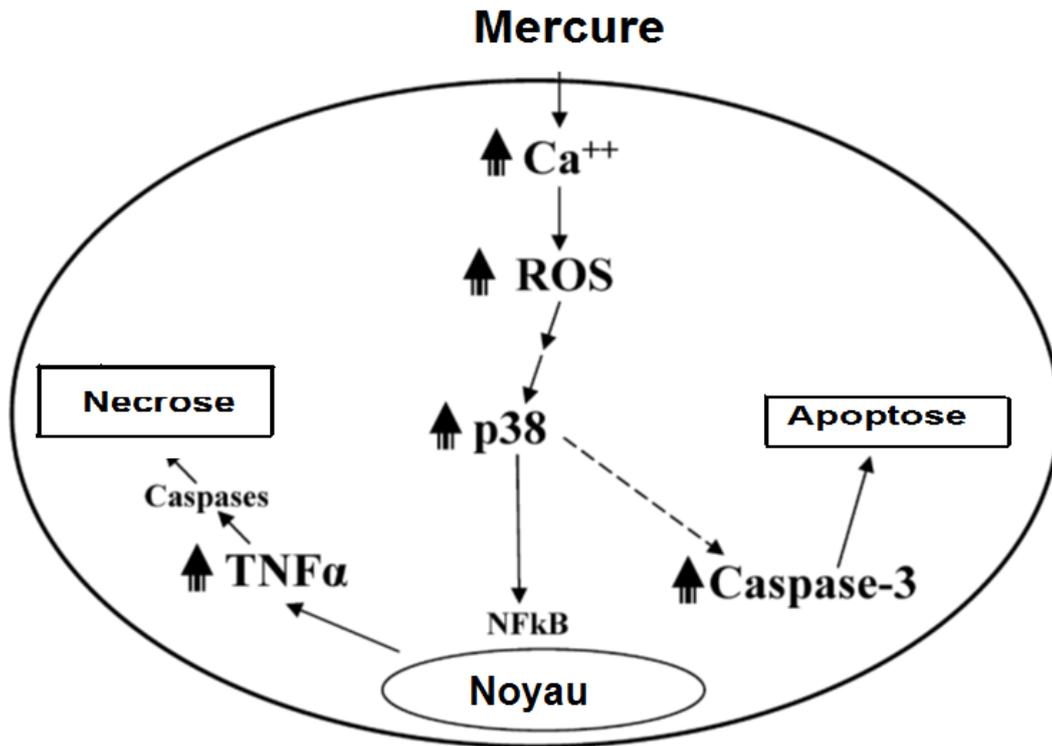
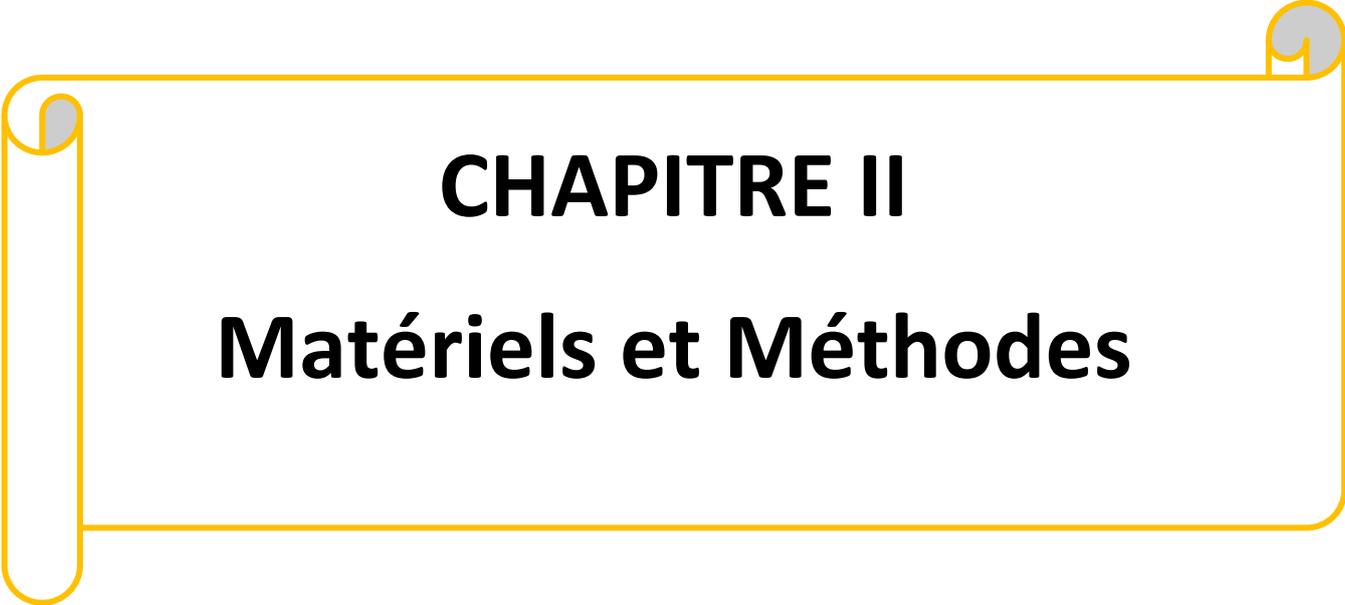


Figure 4 : les voies impliquées dans l'apoptose contre des effets nécrotiques de HgCl₂ dans les macrophages murins.

A decorative yellow border with rounded corners and a scroll-like effect on the left and right sides, framing the text.

CHAPITRE II

Matériels et Méthodes

L'objectif de notre étude est la recherche des effets de deux métaux lourds, plomb et mercure sur la viabilité des polynucléaires neutrophiles (PNs) humains isolés. Cette étude est réalisée au niveau du laboratoire de biochimie appliquée et biotechnologie du département de biologie moléculaire et cellulaire à l'université MOULOUD Mammeri de TIZI-OUZOU durant une période de 4 mois à partir de mois de Mars.

II.1. MATERIEL

II.1.1. Echantillonnage

Notre étude est effectuée à partir du sang de 10 sujets sains volontaires. Le sang est recueilli dans des tubes contenant 10% de l'acide éthylènediamine tétra-acétique (EDTA). Pour le traitement des PNs isolés avec les métaux lourds, nous avons utilisée le Plomb (LABAB) et le mercure (LABAB) (annexe 01) à des concentrations croissantes de 0 µg, 50 µg, 100 µg jusqu'à 200 µg.

II.1.2. Appareillage et réactifs

Le matériel non biologique (appareillage et réactifs) est spécifique à l'isolement des PNs, leurs coloration et comptage (annexe 01).

II.2. METHODE

II.2.1. Isolement des polynucléaires neutrophiles humains

II.2.1.1. Principe

Afin d'isoler les PNs, nous avons suivi les étapes de la technique classique Dextran/Ficoll (Munteanu et Dinu., 2004). Les solutions utilisées possèdent des propriétés de fractionnement des cellules sanguines grâce à leur composition en macromolécules telles que le Dextran et le Ficoll qui forment des gradients de densité différent (Sroka et *al.*, 2009).

II.2.1.1. Protocole d'isolement des neutrophiles

L'isolement des PNs est effectué en utilisant plusieurs solutions préparées avant d'entamer l'isolement.

- Le Dextran, polymère de glucose avec un poids moléculaire de 105-106, peut être employé pour la séparation de cellules, mais sa grande viscosité le rend difficile à manipuler. Une solution de 40% de Ludox (le nom commercial de la silice colloïdale produite par Dupont) est souvent combinée avec des polysaccharides tel que le Dextran pour former les gradients qui sont employés pour isoler les divers types de cellules tels que les cellules sanguines (Munteanu et Dinu., 2004). Le Dextran T500 à 2% est préparé en ajoutant 10g de Dextran à 500ml de sérum physiologique stérile (0,9% NaCl). Après agitation, le mélange est filtré puis gardé à 4°C.
- Le tampon phosphate salin (PBS) est composé de 2,68mM de KCl, 0,14M NaCl, 8,10mM Na₂HPO₄, 1,21mM KH₂PO₄ (sans Ca⁺⁺ et sans Mg⁺⁺) avec un pH= 7,4.
- Le cristal violet est composé de 0,5ml d'acide acétique, 10mg de cristal violet complétés à 100 ml avec de l'eau distillée.

La technique d'isolement suit les étapes suivantes :

- Le sang est transféré dans un flacon de 50 ml.
- Nous avons rajouté au sang volume à volume du Dextran T500 à 2% qui facilite la sédimentation des érythrocytes,
- Après avoir mélangé délicatement le contenu, ce dernier est laissé sédimenter pendant 25 à 30 minutes à température ambiante (figure 3).

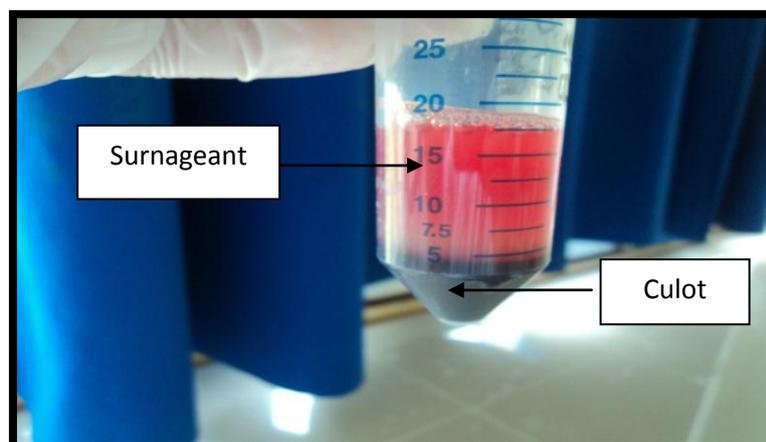


Figure 5 : Séparation des érythrocytes.

- Le surnageant est séparé du culot puis centrifugé à 400g (1600 tours/minutes) à 18°C pendant 8 minutes (Figure 4).

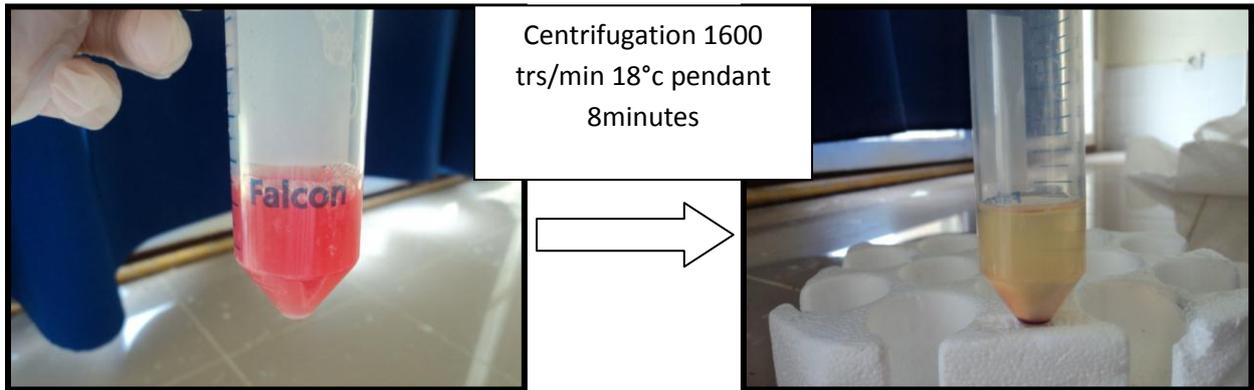


Figure 6 : Elimination des érythrocytes par centrifugation.

- Après élimination du surnageant, le culot (leucocytes et érythrocytes contaminants) est vortexé puis mélangé avec 8ml de PBS. Le mélange est ensuite centrifugé à 400g (1600 tr/min) à 18°C pendant 6 minutes. Nous ajoutons au culot 8 ml du PBS.
- Nous avons ajouté ensuite délicatement et sans mélanger deux volumes de la solution obtenue (8ml) sur un volume de Ficoll (4ml) qui est un polymère de sucrose et de l'épichlorhydrin. Le Ficoll se dépose en bas du flacon et la solution en haut (figure 5).

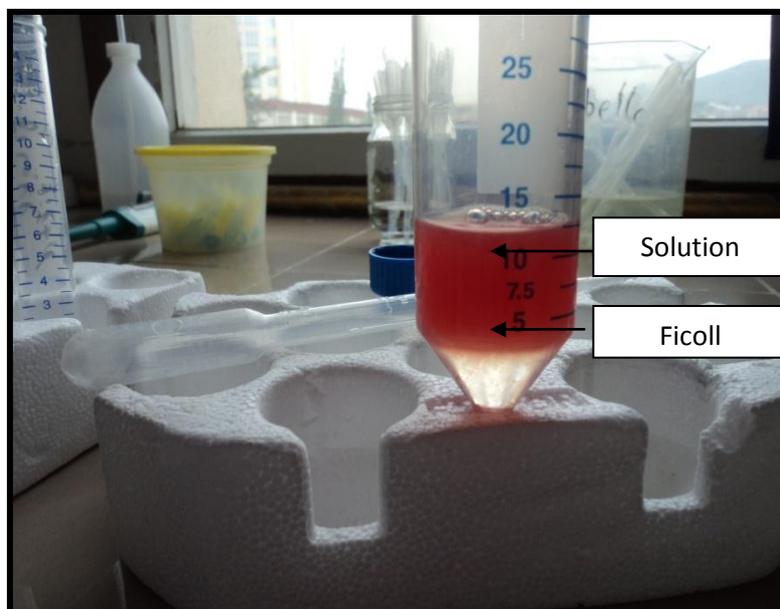


Figure 7 : Séparation du Ficoll de la solution mélange.

- Les solutions sont centrifugées à 400g (1600 tr/min) pendant 30 min à 18°C, ce qui nous a permis d'obtenir trois phases : une Phase ou le surnageant contenant le Ficoll, une autre Phase contenant les monocytes-lymphocytes dont leur densité est plus faible que le Ficoll et la dernière Phase présentée par le culot contenant les PN et les globules rouges contaminants. Ces derniers sont plus denses et passent à travers le Ficoll et sédimentent au fond du tube.
- A l'aide d'une pipette Pasteur, nous avons prélevé l'anneau des monocytes-lymphocytes et éliminé délicatement le surnageant afin de préserver le culot qui est ensuite remué.
- Afin d'assurer la lyse des globules rouges contaminants, nous avons ajouté 3 volumes (24 ml) d'eau glacée stérile en mélangeant pendant 30 à 40 secondes, puis un volume (8ml) de NaCl 1,8%. Le mélange est complété avec du PBS froid jusqu'à arriver à 40 ml et centrifugé à 400g (1600 tr/min) à 18 °C pendant 8 minutes. Après la centrifugation, le surnageant est éliminé et gardé le culot qui contient que les PN (figure 6).

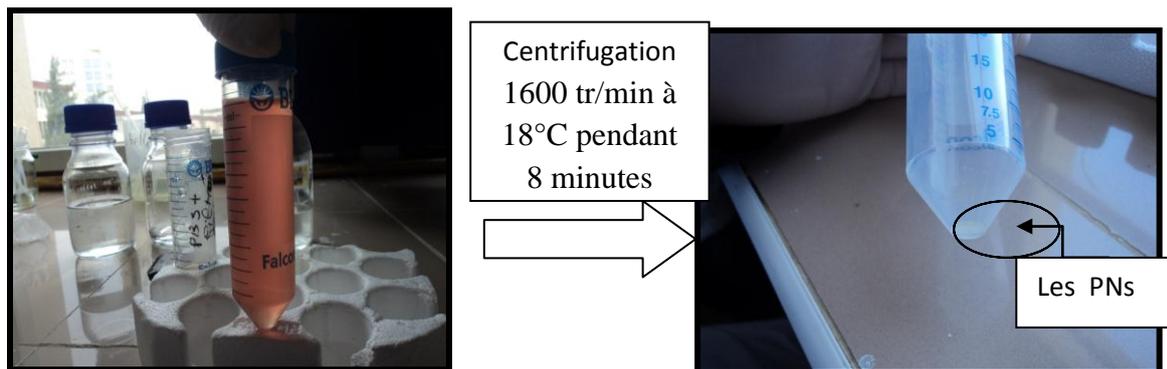


Figure 8 : Lyse des érythrocytes contaminants et récupération des neutrophiles.

- Nous avons rajouté 3ml de PBS au sédiment pour arriver à l'osmolarité normale. Les tubes sont ensuite mis dans la glace afin d'éviter le regroupement des PN.

- Nous avons ajouté aux PNs purifiés du bleu de trypan (0,4%), qui nous a permis de colorer les cellules mortes. Le colorant a tendance à entrer dans les cellules qu'il rencontre. Une fois dans la cellule, la molécule en question entraîne un mécanisme d'exclusion qui va éjecter cette molécule dans le milieu extérieur. Ce mécanisme nécessitant de l'énergie, seules les cellules possédant une source d'ATP peuvent le mettre en place. Ainsi, une cellule vivante expulsera la molécule et restera blanche au microscope, au contraire une cellule morte n'aura pas les moyens de la rejeter et deviendra bleu. D'autre part, la membrane intacte empêche l'entrée de la coloration dans le cytoplasme, alors qu'au contraire chez une cellule morte, la membrane lésée laisse passer le colorant ce qui aboutit à la coloration de la cellule en bleu.
- Nous avons ajouté à la suspension du cristal violet qui nous permet de colorer les cellules vivantes
- Nous déposons un petit volume de suspension (20µl) sur une cellule de MALASSAZ. L'observation et le comptage se font au microscope photonique au grossissement x400.

Le nombre de cellules est donné par la formule suivante :

$$N = n \times 10 \text{ (10 lignes dans chaque lame de MALASSAZ)} \times 3 \text{ (FDL)} \times 1000 \text{ ml} \times V$$

n: le nombre de PN par ligne comptée ; N :le nombre totale des PNs ; V : Volume total des PNs préparés ; FDL : Facteur de dilution.

- Nous avons compté le nombre de PN par 3 lignes jusqu'à arrivé à 100 cellules.

II.2.2. Traitement des polynucléaires neutrophiles avec les métaux lourds

Notre étude est portée sur 10 sujets dont cinq d'entre eux sont traités par le plomb et les cinq autres par le mercure.

II.2.2.1. Préparation de la solution mère

Nous avons préparé une solution mère à 10 mg de plomb dans 10 ml d'eau distillée (Mathieu *et al.*, 2003). Le même protocole est appliqué pour le mercure

Après avoir dénombré les PNs contenus dans notre échantillon, nous nous adaptons de manière à exposer à chaque fois 5×10^5 cellules à une concentration différente en métaux lourds.

Tableau II : Exposition des polynucléaires neutrophiles isolés aux différentes concentrations de plomb et de mercure.

[Pb] , [Hg] µg/ml	0	50	100	200
Volume de cellules (µl)	X	X	X	X
Solution mere du Pb (µl)	0	5	10	20
PBS (1ml)	1000 - X	1000 - X	1000 - X	1000 - X

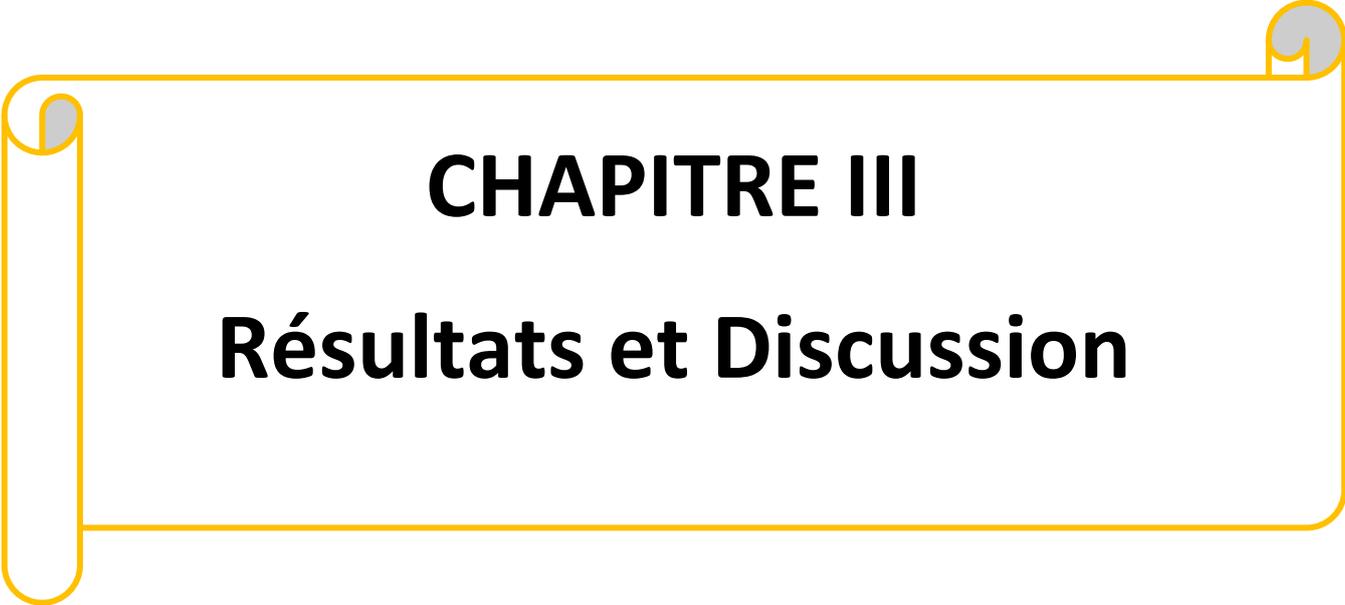
X : volume de PN.

II.2.2.2. Traitement des neutrophiles

Les PNs sont incubés au bain marie à 37°C avec différentes concentrations de Pb et Hg à savoir a 0 µg, 50 µg , 100 µg et 200 µg. L'évaluation du nombre de cellules mortes se fait chaque 30 minute, par coloration au bleu de trypan suivi d'une observation en microscopie photonique. La lecture est faite à 30, 60 et à 90 minutes d'incubation.

II.2.3. Analyse statistique

Après la collecte des différentes données, les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage, en moyennes plus ou moins l'intervalle de confiance.

A decorative yellow border with rounded corners and a scroll-like effect on the left and right sides, framing the chapter title.

CHAPITRE III

Résultats et Discussion

III.1. RESULTATS

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à la recherche de l'effet du plomb et du mercure sur la viabilité des polynucléaires neutrophiles chez des sujets sains.

III.1.1. Dénombrement des polynucléaires neutrophiles

Après avoir isolé, traité et coloré les polynucléaires neutrophiles (figure 7a) avec le bleu de trypan et le cristal violet, nous les avons observé et compté au microscope photonique. La figure 7b représente les PNs vivants en transparent et les PNs morts en bleu.

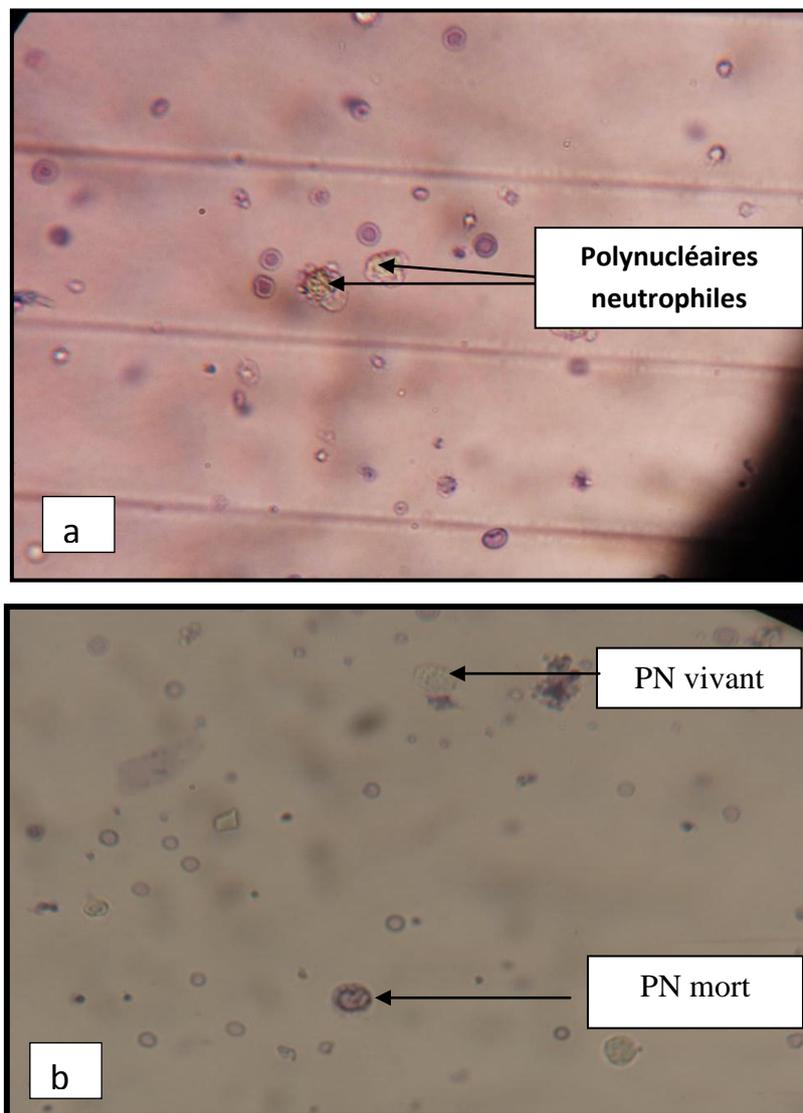


Figure 9 : Observation des polynucléaires neutrophiles humains
Grossissement x400 ; Coloration au bleu de trypan et au cristal violet.

Le pourcentage de PN's vivants est très élevé chez les témoins (PN's non traités avec les métaux lourds) atteint 83,3% de viabilité avec un nombre moyen des cellules vivantes de $83,3 \pm 8,27$.

Après avoir dénombré les PN's nous avons aussi remarqué que les hommes présentent un nombre très important de neutrophiles par rapport au femmes qui présentent un nombre réduit de PN's

D'après travaux ultérieurs, les chercheurs ont révélés des altérations importantes dans les cellules de la lignée blanche exposée au plomb. Ils ont noté, à l'aide d'un microscope à contraste de phase, de nombreuses vacuoles, des granulations irrégulières dans une partie étant probablement des granulations toxiques. Par ailleurs, des recherches en cytochimie ont montré une augmentation des lipides dans les neutrophiles exposés au plomb et une diminution des phosphatases alcalines (Castagnou et Guyotjeannin, 1969).

III.1.2. Effet du traitement au plomb sur la viabilité des neutrophiles

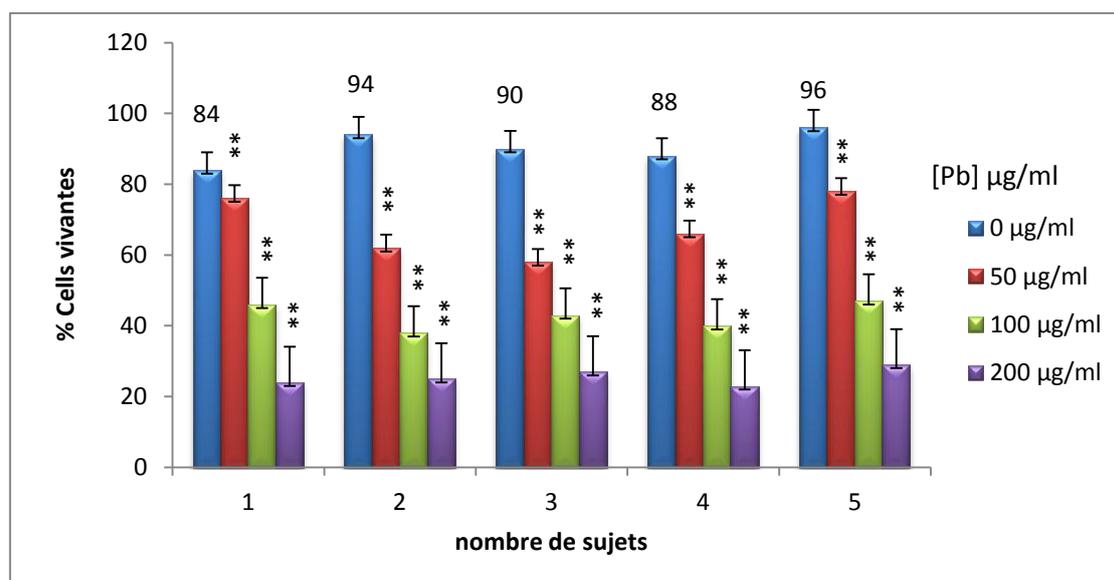


Figure 10 : Effet du traitement aux différentes concentrations du plomb sur la viabilité des neutrophiles après 30 minutes d'incubation.

**** :** Différence est très significative.

D'après les résultats rapportés dans le tableau III (annexe 03) et par la figure10, nous constatons qu'après 30 minutes d'incubation des neutrophiles avec le plomb et en comparaison avec le témoin (0µg), le pourcentage des neutrophiles vivants diminue au fur et à mesure que les concentrations de plomb augmentent. Le pourcentage moyen atteint 75,22%

avec 50 μ g, 47,35% avec 100 μ g et 37,65% avec 200 μ g. Le nombre moyen des cellules vivantes est respectivement, $68,00 \pm 8,72$, $42,80 \pm 3,83$ et $25,60 \pm 2,41$. Alors que la moyenne est de $90,40 \pm 4,77$ avec 0 μ g de plomb.

Les mêmes résultats sont obtenus après 60 et 90 minutes d'incubation avec différentes concentrations de plomb. Après 60 minutes le pourcentage de viabilité est de 62,42%, 41,35% et 38,43% avec une moyenne de viabilité de $53,60 \pm 12,34$, $34,40 \pm 5,18$ et de $20,60 \pm 6,31$ respectivement. Avec 0 μ g de plomb, la moyenne est de $83,20 \pm 4,15$ (tableau III de l'annexe 03 et la figure 11).

Après 90 minutes le pourcentage de viabilité est de $74,80 \pm 5,02$ avec 0 μ g, 55,08% ($41,20 \pm 3,70$) avec 50 μ g, 37,17% ($27,80 \pm 7,56$) avec 100 μ g et de 24,06% ($18,00 \pm 10,07$) 200 μ g de plomb (tableau III de l'annexe 03 et la figure 12).

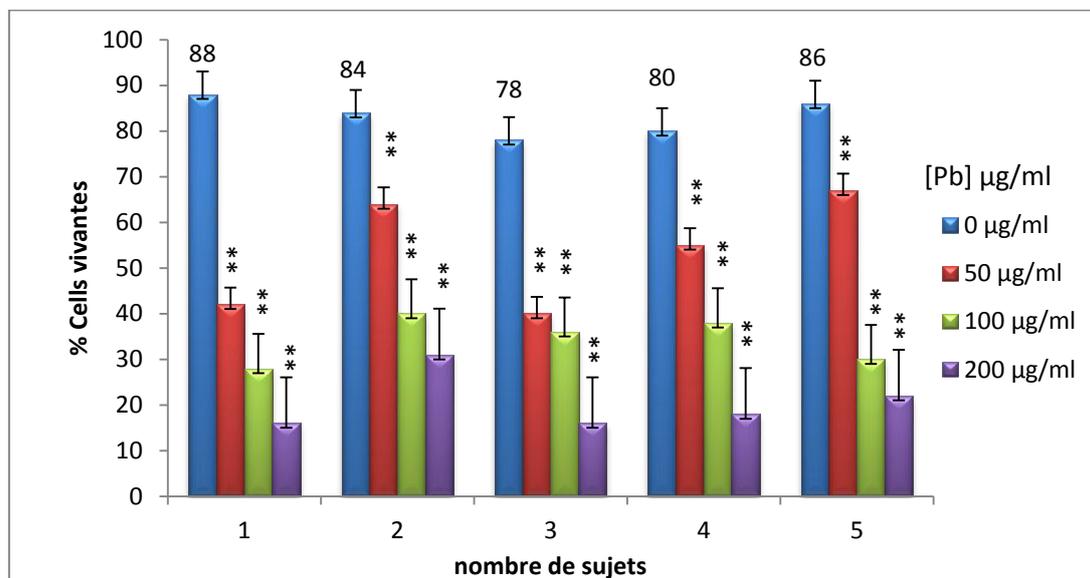


Figure 11 : Effet du traitement aux différentes concentrations du plomb sur la viabilité des neutrophiles après 60 minutes d'incubation. ** : Différence est très significative.

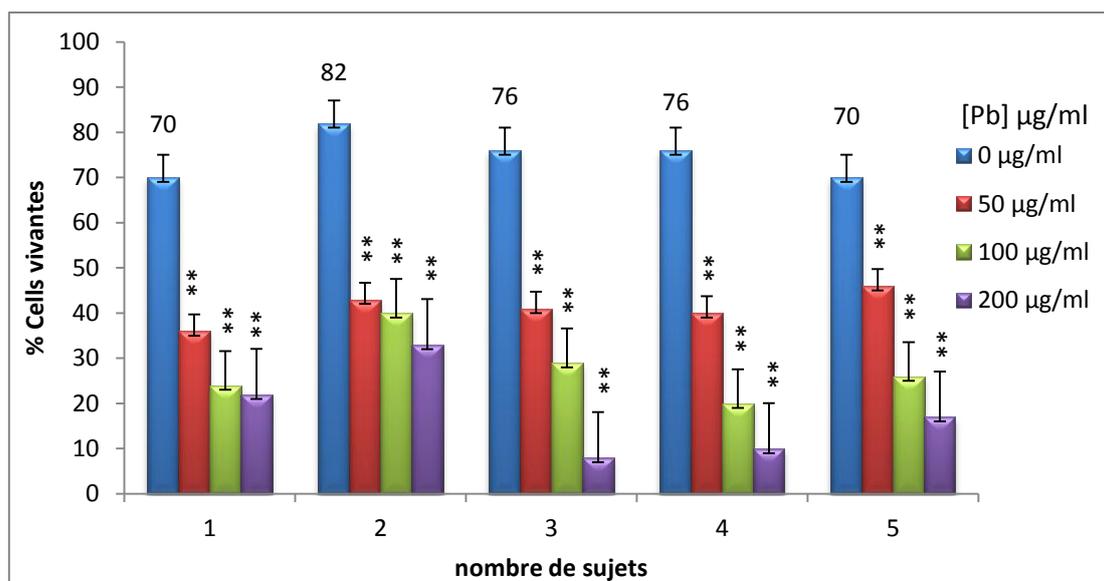


Figure 12 : Effet du traitement aux différentes concentrations du plomb sur la viabilité des neutrophiles après 90 minutes d’incubation. ** : Différence est très significative.

D’après les résultats de notre étude et en comparaison avec le témoin (0µg), le pourcentage de viabilité des polynucléaires neutrophiles chez tous les sujets exposés au plomb baisse en fonction de la concentration et du temps d’incubation (figure 13).

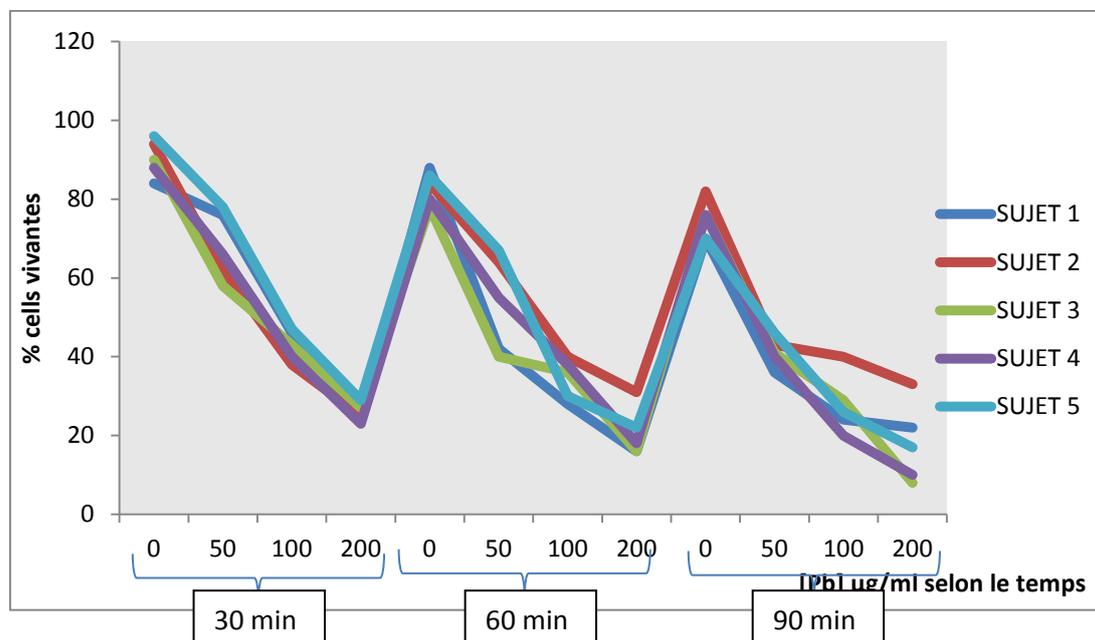


Figure 13 : Effet du traitement aux différentes concentrations du plomb sur la viabilité des neutrophiles.

Nos résultats sont en contradiction avec ceux de Rabitto *et al.*, (2005) qui ont constaté l'augmentation du nombre des cellules phagocytaires telles que des neutrophiles et des macrophages chez les individus exposés au plomb. Cette exposition entraîne la présence des foyers de nécrose dans le cytoplasme qui mène à la mort de la cellule.

Il est connu que le plomb joue, *in vitro*, un rôle de catalyseur des réactions de peroxydation des lipides (Gurer *et al.*, 1998), potentiellement responsable de la toxicité du plomb sur les différents organes. Dominguez *et al.* (1995) ont mis en évidence, sur les fibroblastes humains, l'effet cytotoxique du plomb à des concentrations très élevées ; la durée de vie des cellules exposées diminue et la peroxydation des lipides augmente.

III.1.2. Effet du traitement au mercure sur la viabilité des neutrophiles

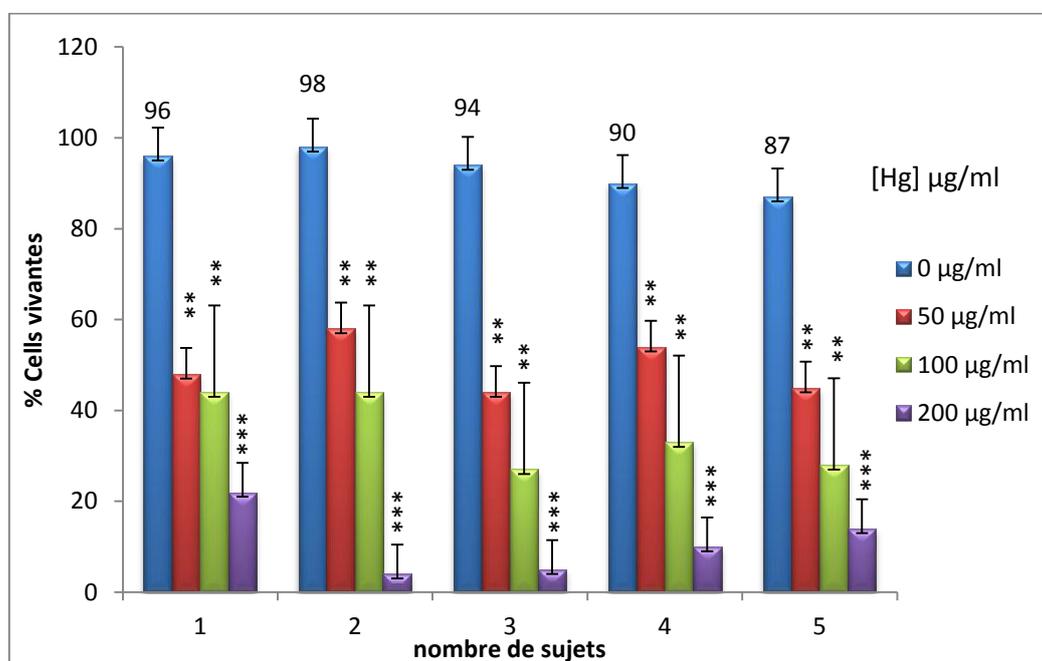


Figure 14 : Effet du traitement aux différentes concentrations du mercure sur la viabilité des neutrophiles après 30 minutes d'incubation. ** : Différence est très significative, *** : Différence hautement significative.

D'après les résultats rapportés dans le tableau VI (annexe 03) et par la figure 14, nous constatons qu'après 30 minutes d'incubation des neutrophiles avec le mercure et en comparaison avec le témoin (0µg), le pourcentage des neutrophiles vivants diminue au fur et à mesure que les concentrations de mercure augmentent. Le pourcentage moyen viabilité diminue brusquement atteint 53,55% avec 50µg, 37,85% avec 100µg et 11,83% avec 200µg.

Le nombre moyen des cellules vivantes est respectivement, $49,80 \pm 6,02$, $35,20 \pm 8,35$ et $11,00 \pm 7,35$. Alors que la moyenne est de $93,00 \pm 4,47$ avec $0\mu\text{g}$ de mercure.

Les mêmes résultats sont obtenus après 60 et 90 minutes d'incubation avec différentes concentrations de mercure. Après 60 minutes le pourcentage de viabilité des cellules continue a diminué est atteint 47,12, 33,65 et 9,13 avec une moyenne de viabilité de $39,20 \pm 13,37$, $28,00 \pm 6,20$ et de $7,60 \pm 6,23$ respectivement. Tandis que à une concentration de $0\mu\text{g}$ de mercure, la moyenne est de $83,20 \pm 4,97$ (tableau VI de l'annexe 03 et la figure 15).

Après 90 minutes d'incubation, le pourcentage des cellules vivantes continue à diminuer à chaque concentration par rapport au témoin qui présente un pourcentage de survie de $75,20 \pm 5,7$ avec $0\mu\text{g}$, 43,35% ($32,60 \pm 17,57$) avec $50\mu\text{g}$, 34,84% ($26,20 \pm 19,08$) avec $100\mu\text{g}$ et de 11,70% ($8,80 \pm 6,46$) $200\mu\text{g}$ de mercure (tableau VI) de l'annexe 03 et la figure 16).

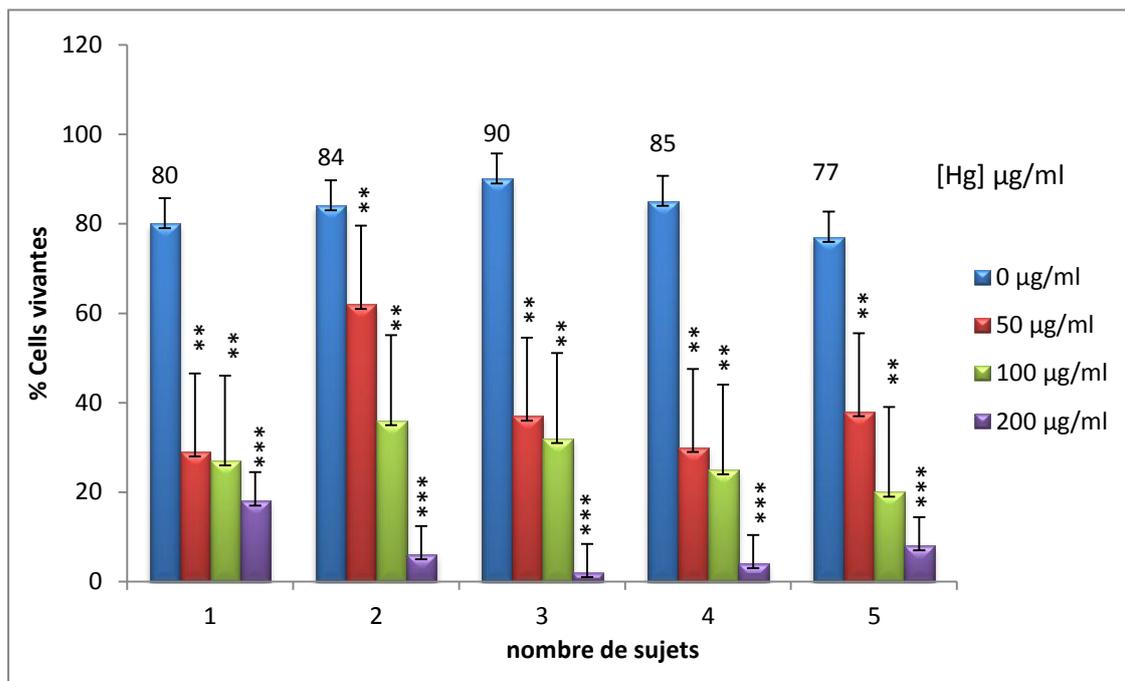


Figure 15 : Effet du traitement aux différentes concentrations du mercure sur la viabilité des neutrophiles après 60 minutes d'incubation. ** : Différence est très significative, *** : Différence hautement significative

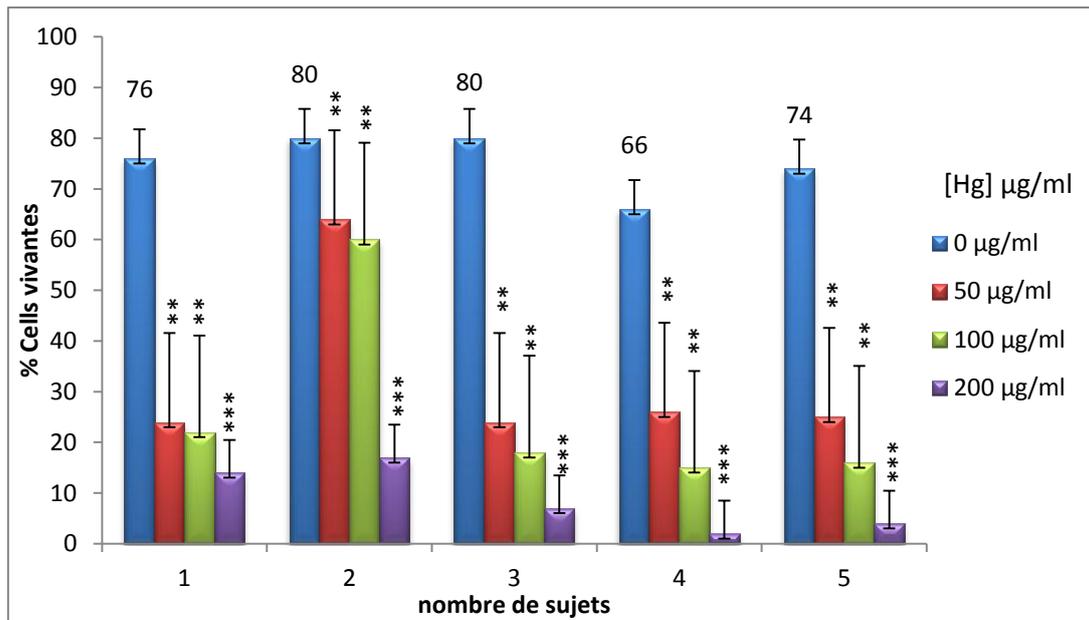


Figure 16 : Effet du traitement aux différentes concentrations du mercure sur la viabilité des neutrophiles après 90 minutes d’incubation. ** : Différence est très significative, *** : Différence hautement significative.

En fin nous avons conclu à chaque fois que les cellules restent une longue durée au contact avec le mercure donc les PMNs meurent ce qui explique la diminution du pourcentage des cellules vivantes à chaque fois que nous avons augmenté les concentrations, ce ci est du a la cytotoxicité du mercure sur les polynucléaires neutrophiles

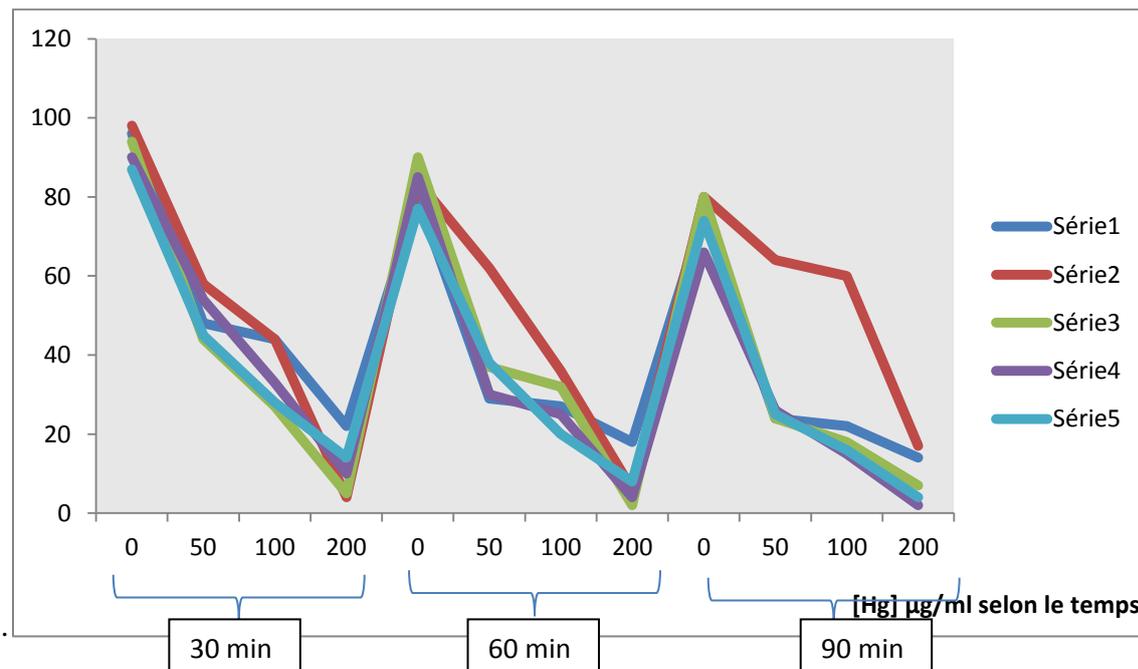


Figure 17 : Effet du traitement aux différentes concentrations du mercure sur la viabilité des neutrophiles.

Comparativement à d'autres recherches et selon (Freitas *et al.*, 2010) qui ont examiné La viabilité des neutrophiles par l'analyse de bleu de trypan après exposition au mercure à différentes concentrations (0-1 μ M) pendant 1h. Ils ont remarqué que le Hg a cette concentration n'affectent pas la viabilité des cellules, correspond à une viabilité \geq 98%. Ainsi Leonard *et al.*, 2006; ont montré que le Mercure s'est avéré un inducteur efficace de la mort des neutrophiles, avec une diminution significative de 79% à 28% de cellules totales viables ($p < 0.05$) détectées à 0.3 μ M HgCl₂. À 1 μ M de HgCl₂, 100% des cellules étaient nécrotiques.

D'autres études ont été menées sur d'autres cellules de système immunitaire tels que les macrophages et les lymphocytes T. Sang Hyun Kim et Raghurir, (2004) ont signalé que 58 μ M de HgCl₂ induit la mort de 50% des macrophages après 24 heures d'expositions au HgCl₂. ISSA *et al.*, (2003) ont montré que 60% de cellules ont survécu après exposition de 16 h à 100 μ M du HgCl.

Guo *et al.*, (1998) ont rapporté que 20 et 40 μ M de HgCl₂ ont induit l'apoptose dans 43% et 52% de cellules, dans les lymphocytes T. Les concentrations en mercure dans le sang in vivo d'une population normale sont inférieures d'environ 500 fois à ceux qui causent la toxicité in vitro (ISSA *et al.*, 2003). Le traitement avec cette concentration en mercure a lancé l'apoptose et la nécrose dans les macrophages murins. Ca₂⁺, ROS, p38, et caspase 3 étaient tous impliqués dans l'apoptose et la nécrose. Cependant, TNF α a semblé être responsable seulement de la nécrose dans ce modèle.



Conclusion

Conclusion

Notre étude est basée sur l'évaluation de la toxicité de plomb et de mercure sur la viabilité des polynucléaires neutrophiles isolés à partir de 10 prélèvements de sujets sains.

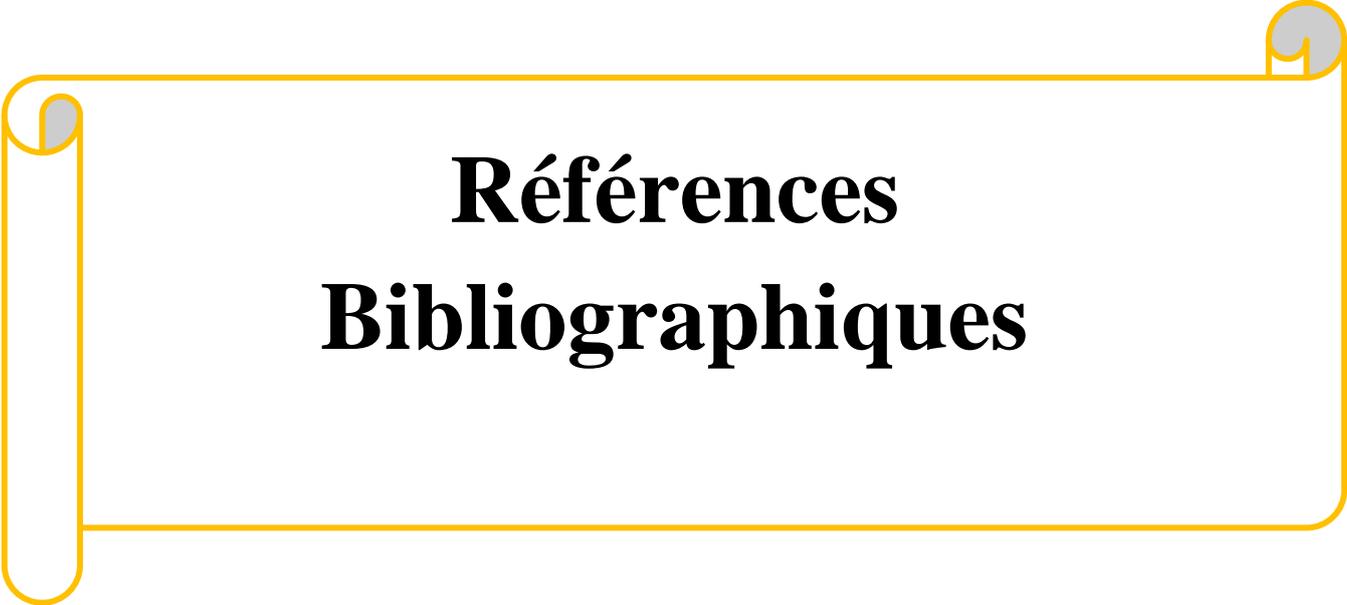
Ce pendant nous avons mis ces métaux en contact avec les polynucléaires neutrophiles. Nous avons varié leurs concentrations afin d'observer leurs effets sur la viabilité des neutrophiles. Après incubation pendant 30 min, 60 min et 90 min, nous avons remarqué que le nombre de PNs vivants diminue à chaque fois qu'on augmente les concentrations de Pb et Hg.

L'analyse des pourcentages des neutrophiles vivants en contact avec les métaux lourds révèle que les cellules exposées au mercure présentent une forte diminution par rapport à celles exposées au plomb.

L'exposition du système immunitaire au Pb et au Hg entraîne à l'immunosuppression ou à l'immunodysregulation.

Cette étude gagnerait à être approfondie en améliorant les techniques d'isolement des neutrophiles et les méthodes de comptages. Il serait intéressant de traiter l'effet d'autres métaux lourds sur les PNs, aussi d'étudier l'effet de ces métaux sur les autres cellules du système immunitaire.

En somme, il est indispensable de mettre en place des stratégies préventives pour contrer l'exposition humaine aux métaux lourds. Cette prévention contribuera à la diminution des maladies chroniques causées par ces molécules. En diminuant l'usage des métaux lourds dans l'agriculture, l'industrie ainsi que dans le secteur médical, nous limiterons leur bio-accumulation continue dans la nature, la chaîne alimentaire et enfin dans le corps humain.

A decorative yellow border with rounded corners and a scroll-like effect on the left and right sides, framing the text.

Références Bibliographiques

1. **Aykin-Burns N., Franklin E.A. and Ercal N. 2005** - Effects of N-acetylcysteine on lead-exposed PC-12 cells. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **49** : 119-123.
2. **Bach J.F et Chatenoud L. 2002** - Immunologie. *Edition De Boeck* , 4^{ème} Ed., P : 102_104.
3. **Banks E.C., Ferretti L.E. and Shucard D.W. 1997** - Effects of low-level lead exposure on cognitive function in children: a review of behavioral, neuropsychological and biological evidence. *Neurotoxicology.*, **18** : 237-281.
4. **Bettaiya R., Yallapraoada P.R., Hall E. and Rajanna S. 1996** - In vitro effect of lead on Ca²⁺ ATPase in synaptic plasma membranes and microsomes of rat cerebral cortex and cerebellum. *Ecotoxicol Environ Safety.*,**33** : 157-162
5. **Bolin C.M., Basha R., Cox D., Zawia N.H., Maloney B., Lahiri D.K. and Cardozo-Pelaez F. 2006** - Exposure to lead and the developmental origin of oxidative DNA damage in the aging brain. *Faseb. J 2006.*, **20** : 788-790.
6. **Cardenas A., Roels H., Bernard A.M., Barbon R., Buchet J.P., Lauwerys R.R., Rosello J., Hotter G., Mutti A., Franchini I., Fels L.M., Stolte H., De Broe M.E., Nuyts G.D., Taylor S.A. and Price R.G. 1993** - Markers of early renal changes induced by industrial pollutants. Application to workers exposed to mercury vapour. *Br. J. Ind. Med.*, 17-50
7. **Cassatella M.A. 1999** - Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv. Immunol.*, **73** : 369-509
8. **Castagnou R. et Guyotjeannin C.H. 1962** - Toxicologie industrielle médicamenteuse et agricole , Tome VII. *Librairie Maloine*, Paris. P : 04-556.
9. **Dyatlov V.A. and Lawrence D.A. 2002** - Neonatal lead exposure potentiates sickness behavior induced by *Listeria monocytogenes* infection of mice. *Brain Behav. Immun.*, **16** , 477.
10. **Faurschou M. and Borregaard N. 2003.** - Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.*, **5(14)** : 1317-27.
11. **Freitas M., Lima J.L., Porto G. and Fernandes E. 2010** - Metal-induced oxidative burst in isolated human neutrophils. *Microchemical Journal.*, **96(4)** : 167–171.

12. **Garnier R. 2005** - Toxicité du plomb et de ses dérivés. *EMC. Toxicologie-Pathologie.*, **2(2)** : 67-88.
13. **Goldsby R., Kindt T. J. et Osborne B A. 2001** - Immunologie. 4^{ème} éd., Paris: *Dunod.*, P : 688.
14. **Gougerot-Pocidallo M.A. 2002** - Regulation of human neutrophil oxidative burst by pro- and anti-inflammatory cytokines. *J. Soc. Biol.*, **196(1)** : 37-46.
15. **Gupta P., Husain M.M., Shanker R., Dogra R.K., Seth P.K. and Maheshwari R.K. 2003** - Exacerbation of soft tissue lesions in lead exposed virus infected mice. *Biomed. Environ. Sci.*, P : 16 - 369.
16. **Gurer O., Sabir U. and Ozgunes H. 2004** - Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. *Toxicology.*, **195(7)** : 147_154.
17. **Issa Y., Watts D.C., Duxbury A.J., Brunton P.A., Watson M.B. and Waters C.M. 2003** - Mercuric chloride: toxicity and apoptosis in a human oligodendroglial cell line MO3. *Biomaterials.*, **24 (6)** : 981– 987.
18. **Kindt TJ., Goldsby RA. et Osborne BA. 2008** - Immunité innée, In : Immunologie, 6^{ème} éd. Paris : *Dunod.* P : 52-75.
19. **Kobayashi SD., Voyich JM. and Deleo F. 2005** - Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. *Microbes Infect.*, **5(14)** : 44-1337.
20. **Lauwerys R. 2007** - Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles. *Edition ELSEVIER MASSON*, 5^{ème} éd., Paris. P : 4-642.
21. **Leonard I., Dora R., Passino R., Peter G., Meier and Geneva M. 2006** - Effects of polychlorinated biphenyls, hexachlorocyclohexanes, and mercury on human neutrophil apoptosis, actin cytoskeleton, and oxidative state. *Environmental Toxicology and Pharmacology.*, **22(9)** :179–188.
22. **Man R. 2010** - Métaux lourds et leurs effets sur la santé. *revue Recto-Verseau.*, **213**.
23. **Mathieu H., Le Moigne F., Panteix G., Derache P., Jouzier E. 2003** - Développement d'une méthode de dosage de la plombémie par chronopotentiométrie. *John Libbey Eurotext. Annales de Biologie Clinique.*, **61 (6)** : 667-72.

24. **Munteanu A. and Dinu. 2004** - Fraction of granulocytes from whole human blood by centrifugation. Practical hints. *Romanian j. Biophys.*, **14(5)** : 53_58.
25. **Parham P., Atanassov C. et Masson PL. 2003** - L'immunité anti-infectieuse, In : Le système immunitaire.. 1^{ère} éd. Paris : *De Boeck*. P : 201-240.
26. **Patrick L. 2006** - Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Altern. Med. Rev.*, **11** : 114-127.
27. **Poey J. et Philibert C. 2000.** - Toxicité des métaux, *revue française des laboratoires, Elsevier.*, **323** : 35_43.
28. **Popescu H.L., Negru L. and Lancranjan I. 1979** - chromosome aberrations induced by occupational exposure to mercury. *Arch. Environ. Health.*, **34** : 461.
29. **Rabbitto I.S., Alves Costa J.R.M., Silva de Assis H.C., Pelletier E., Akaishi F.M., Anjos A., Randi M.A.F. and Oliveira Ribeiro C.A. 2005** - Effects of dietary Pb and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. *Ecotoxicology and Environmental Safety.*, **60 (9)** : 147–156.
30. **Rosenberg H.F. and Gallin J I. 1999** -Inflammation, in *Fundamental Immunology*, 4^{ème} edition, *Lippincott-Raven: Philadelphia*. P : 1051-1066.
31. **Ross D., Van Bruggen R. and Meischl C. 2003** - Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect.*, **5(14)** : 1307-15.
32. **Sang Hyun Kim and Raghbir P. 2004** - Mercury-induced apoptosis and necrosis in murine macrophages: role of calcium-induced reactive oxygen species and p38mitogen activated protein kinase signaling. *Toxicology and Applied Pharmacology.*, **196** : 47_57.
33. **Silbergeld E.K., Silva L.A. and Nyland J.F. 2005** - Mercury and autoimmunity : implications for occupational and environmental health. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, P : 207-282.
34. **Sin K.W. and Tsang H.F. 2003** - Large-scale mercury exposure due to a cream cosmetic : community case series. *Hong Kong Med. J.*, P : 9-329.

35. **Slama R. et Cordier S. 2013** - Impact des facteurs environnementaux physiques et chimiques sur le déroulement et les issues de grossesse. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction.*, **42(5)** : 413-444.
36. **Sroka J., Kordecka A., Włosiak P., Madeja Z. and Korohoda W. 2009** - Separation methods for isolation of human polymorphonuclear leukocytes affect their motile activity. *European Journal of Cell Biology.*, **88(8)** : 531–539.
37. **Tizard I.R. 2004** - Neutrophils and their products, In: Veterinary immunology : an introduction. 7^{ème} éd. *Philadelphia : Saunders.*, P : 24-34.
38. **Tournier A.C. 2009** - Les polymorphonucleaires neutrophiles et leurs sécrétions en dermatologie des carnivores domestiques étude bibliographique. *Thèse de Doctorat vétérinaire.*, Paris, P : 7_42.
39. **Who. 2003** - Elemental mercury and inorganic mercury compounds : human health aspects. *Concise International Chemical Assessment Document 50.* Geneva.
40. **Winston K. and Robbins. 1973** - Determination of lead in gasoline by heated vaporization atomic-absorption spectrometry. *Analytica. Chimica. Acta.*, **65(2)** : 285-290.
41. **Xu J., Lian L., Wu C., Wang X.F., Fu W.Y. and Xu L.H. 2008** - Lead induces oxidative stress, DNA damage and alteration of p53, Bax and Bcl-2 expressions in mice. *Food and Chem. Toxicol.*, **46** : 1488-1494.
42. **Zalups R.K. 2000** - Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacol. Rev.*, P : 52 - 113.



Annexes

1.1. Réactifs

Les réactifs qui ont été utilisés dans notre étude sont :

- Dextran T500 (pharmacia ou GE Healthcare ou Sigma) à 2% filtré
- Sérum physiologique stérile (0,9% NaCl)
- Ficoll (pharmacia ou GE Healthcare ou Sigma)
- Colorant Bleu de trypan et cristal violet (Sigma)

Caractéristique du Plomb

Le plomb est un élément organique

- Densité du plomb : 11,340 Kilos au mètre cube
- Température de fusion du plomb : 327°C
- Température d'ébullition du plomb : 1755°C

Caractéristique du mercure

Le Mercure est un élément inorganique

- Masse molaire : 200,59
- Densité du mercure : 13,55
- Point de fusion : 38,9°C
- Point d'ébullition : 356,6°C

1.2. Appareillages



Figure 18 : bain marie



Figure 19 : pH mètre (Hanna Instruments)

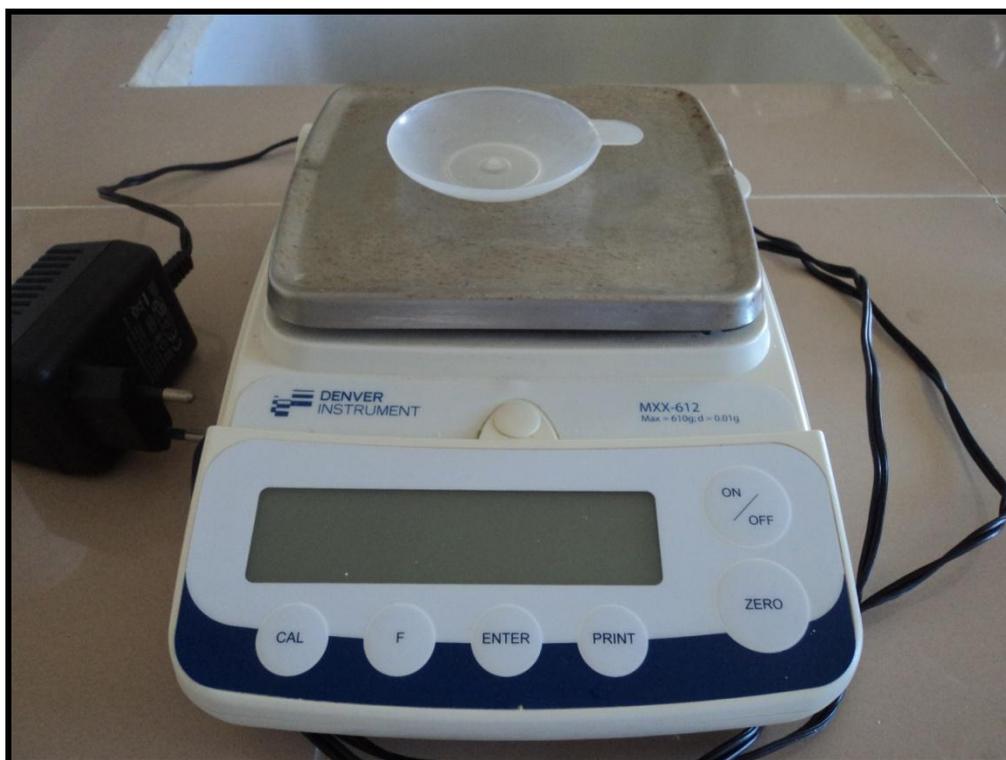


Figure 20 : Balance (Denver instrument, MXX-612, Max= 610g, d= 0,01)



Figure 21 : centrifugeuse (SIGMA 3 – 16 PK)



Figure 22 : Agitateur (Magnetic Stirrer HI 190M)



Figure 23 : plaque chauffante (Labinco, Model L – 81)



Figure 24 : Micropipettes



Figure 25 : Microscope photonique



Figure 26 : Lame de MALASSEZ

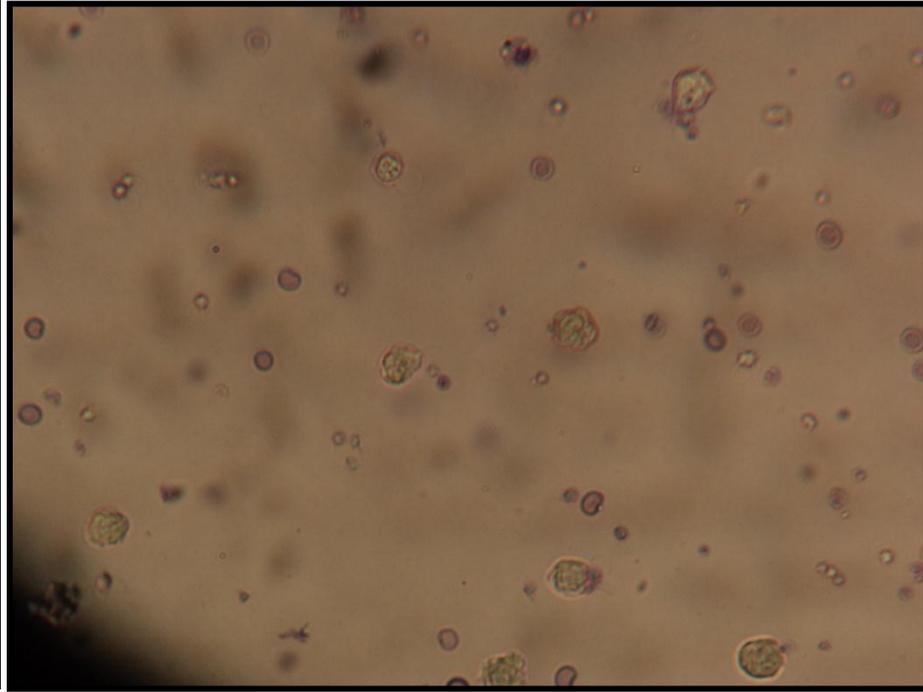


Figure 27 : Observation des polynucléaires neutrophiles humains à 0µg
Grossissement x400

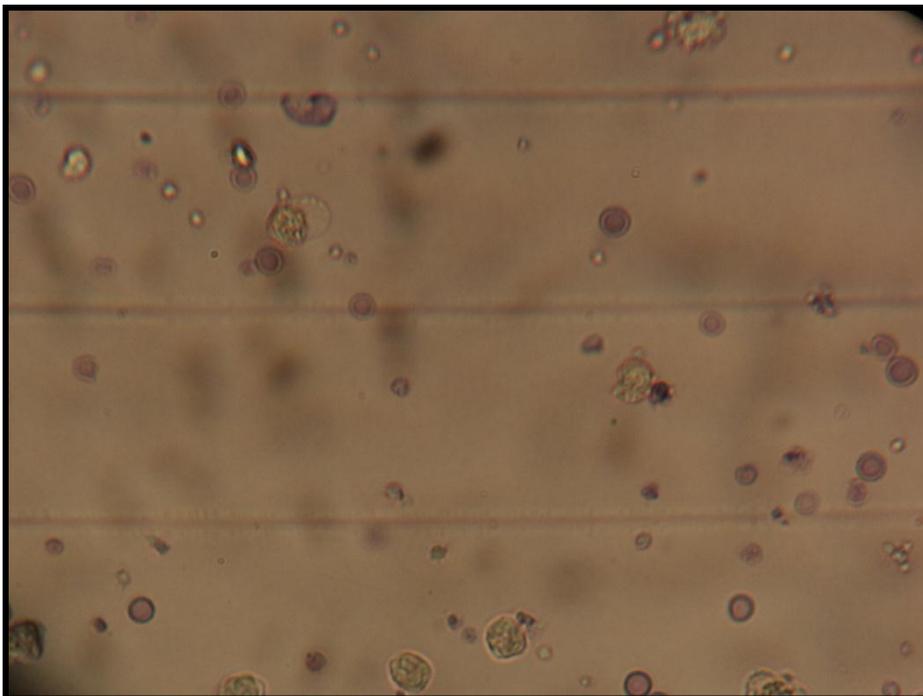


Figure 28 : Observation des polynucléaires neutrophiles humains à 50µg
Grossissement x400

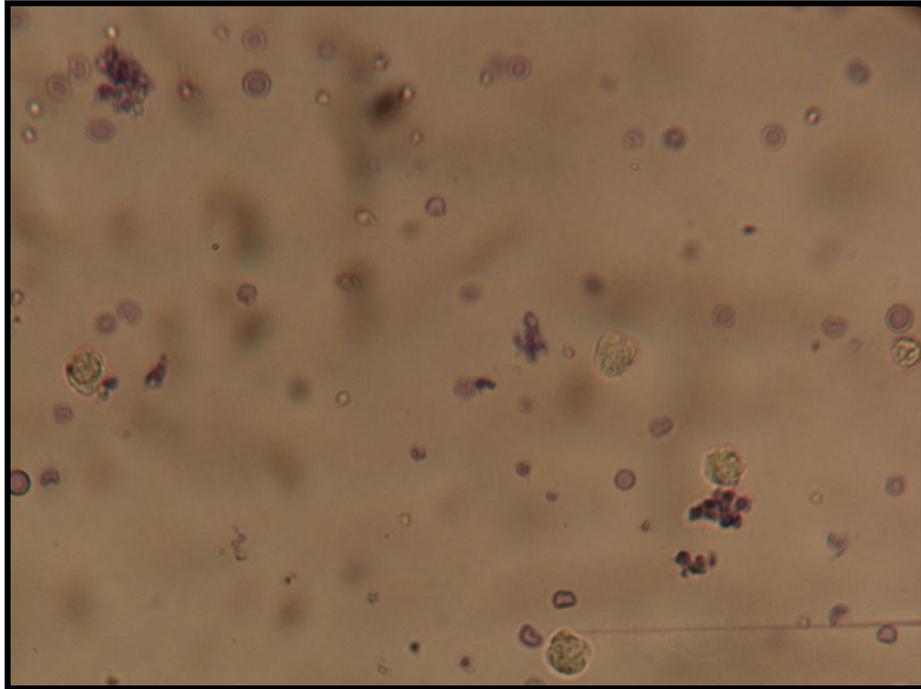


Figure 29 : Observation des polynucléaires neutrophiles humains à 100µg
Grossissement x400

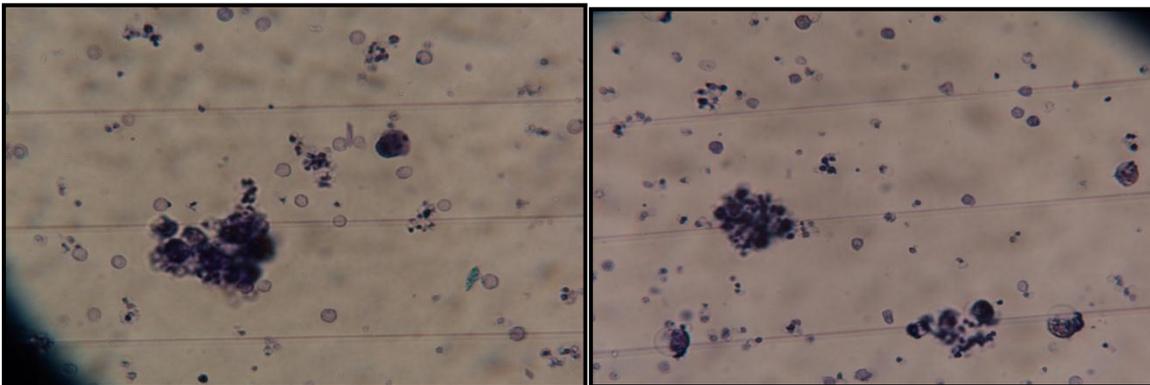


Figure 30 : Observation des polynucléaires neutrophiles humains à 200µg
Grossissement x400

Tableau III : Récapitulatif de l'étude statistique de l'effet du Plomb

		[pb] (µg/l)	0	50	100	200	0	50	100	200	0	50	100	200
	Date	Temps (min)	30	30	30	30	60	60	60	60	90	90	90	90
Essai 1	28/05/2013	% Cells vvtes	84	76	46	24	88	42	28	16	70	36	24	22
Essai 2	02/06/2013	% Cells vvtes	94	62	38	25	84	64	40	31	82	43	40	33
Essai 3	16/06/2013	% Cells vvtes	90	58	43	27	78	40	36	16	76	41	29	8
Essai 4	17/06/2013	% Cells vvtes	88	66	40	23	80	55	38	18	76	40	20	10
Essai 5	24/06/2013	% Cells vvtes	96	78	47	29	86	67	30	22	70	46	26	17
Moyenne			90,40	68,00	42,80	25,60	83,20	53,60	34,40	20,60	74,80	41,20	27,80	18,00
ecart type			4,77	8,72	3,83	2,41	4,15	12,34	5,18	6,31	5,02	3,70	7,56	10,07
Test de student				0,00100272	1,2239E-07	3,70898E-09		0,00094861	1,88031E-07	7,38358E-08		2,08201E-06	2,8157E-06	3,42241E-06
Ratio			100	75,22	47,35	37,65	100	64,42	41,35	38,43	100	55,08	37,17	24,06

Tableau VI :Récapitulatif de l'étude statistique de l'effet du mercure.

		[Hg] (µg/m ³)	0	50	100	200	0	50	100	200	0	50	100	200
	Date	Temps (min)	30	30	30	30	60	60	60	60	90	90	90	90
Essai 1	04/06/2013	% Cells viv	96	48	44	22	80	29	27	18	76	24	22	14
Essai 2	18/06/2013	% Cells viv	98	58	44	4	84	62	36	6	80	64	60	17
Essai 3	19/06/2013	% Cells viv	94	44	27	5	90	37	32	2	80	24	18	7
Essai 4	20/06/2013	% Cells viv	90	54	33	10	85	30	25	4	66	26	15	2
Essai 5	23/06/2013	% Cells viv	87	45	28	14	77	38	20	8	74	25	16	4
Moyenne		Moy	93,00	49,80	35,20	11,00	83,20	39,20	28,00	7,60	75,20	32,60	26,20	8,80
ecart type			4,47	6,02	8,35	7,35	4,97	13,37	6,20	6,23	5,76	17,57	19,08	6,46
Test de student				1,244E-06	8,00386E-07	2,4686E-08		0,0001247	2,95E-07	2,56275E-08		0,00087	0,00058	1,4E-07
Ratio			100	53,55	37,85	11,83	100	47,12	33,65	9,13	100	43,35	34,84	11,70