



République Algérienne Démocratique et populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur

Et de la Recherche Scientifique

**UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMEN**

Faculté des sciences de la nature et de la vie, de la terre et de l'univers

Département de Biologie

Laboratoire de physiologie, physiopathologie et biochimie de la nutrition



MEMOIRE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME

DE Master EN BIOLOGIE

Option : Physiopathologie cellulaire

**Thème**

Inscrit Sous le n°	077624
Date	15/06/14
Cote	15/06/14

**Effet d'un régime enrichi en chlorpyrifos  
chez le rat Wistar : étude de l'activité  
enzymatique des cholinestérases comme  
indicateur biologique**

Présenté par : M Benziane Ahmed Djihad

Soutenu le :

devant le jury composé de :

Présidente : Mme MERZOUK H

Professeur, Université de Tlemcen

Promotrice : Mme BABA-AHMED FZ

Maître de conférences, U. Tlemcen

Examineur : Mme BOUANANE S

Maître de conférences, U. Tlemcen

Année Universitaire : 2013-2014





République Algérienne Démocratique et populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur

Et de la Recherche Scientifique

**UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCCEN**

Faculté des sciences de la nature et de la vie, de la terre et de l'univers

Département de Biologie

Laboratoire de physiologie, physiopathologie et biochimie de la nutrition



---

MEMOIRE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME

DE Master EN BIOLOGIE

Option : Physiopathologie cellulaire

## Thème

Effet d'un régime enrichi en chlorpyrifos  
chez le rat Wistar : étude de l'activité  
enzymatique des cholinestérases comme  
indicateur biologique

Présenté par : M Benziane Ahmed Djihad

Soutenu le :

devant le jury composé de :

Présidente : Mme MERZOUK H

Professeur, Université de Tlemcen

Promotrice : Mme BABA-AHMED FZ

Maître de conférences, U. Tlemcen

Examineur : Mme BOUANANE S

Maître de conférences, U. Tlemcen

Année Universitaire : 2013-2014

## Remerciements

Je voudrais témoigner ma reconnaissance à Madame BABA AHMED FZ, Maître de conférences à l'université de Tlemcen, de m'avoir encadré dans ce travail. Je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance et gratitude. Je vous remercie pour m'avoir donné la chance de travailler avec vous, d'être toujours présente et prête à aider vos étudiants.

J'adresse mes sincères remerciements à Madame MERZOUK H, professeur à l'Université de Tlemcen et Directrice du laboratoire de Physiologie, Physiopathologie et Biochimie de la Nutrition « PPABIONUT », de l'intérêt qu'elle a bien voulu porter à ce travail en acceptant de présider le jury.

Mes vifs remerciements vont également à Mme : Mme BOUANAN S , Maître de conférences, à l'Université de Tlemcen et membres du jury pour l'intérêt qu'elle a porté à ce sujet en acceptant d'examiner ce travail et de l'enrichir par ses propositions.

Ma gratitude s'adresse à toute l'équipe de physiologie animale et nutrition, et tous les membres du laboratoire de Physiologie, Physiopathologie et Biochimie de la nutrition « PPABIONUT »,

Enfin, je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## Dédicace

*Je souhaite dédier ce mémoire à tous les membres de ma famille. Je voudrais tout particulièrement exprimer ma reconnaissance à mes parents, qui ont été pour moi un modèle et n'ont cessé de m'encourager aussi de leur patience, leur réconfort et leur affectueux soutien tout au long de ce travail m'ont été d'une très grande aide.*

*A tous les enseignants et enseignantes qui ont contribué à ma formation. Et à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

# Sommaire

<b>Introduction</b>	1
<b>Etats actuel du sujet</b>	
1. Les pesticides	3
1.1. Définition	3
1.2. Classification	3
1.3. Pesticides et santé	8
1.3.1. Situation dans le monde	8
1.3.2. Pesticides et toxicité	9
1.3.2.1. Toxicité aiguë	9
1.3.2.2. Toxicité chronique	10
1.3.2.3. Pesticides et cancers	10
1.3.2.4. Pesticides et effets neurologiques	11
1.3.2.5. Pesticides et effets sur la reproduction	11
1.4. Pesticides en Algérie	15
1.5. Les voies d'exposition	15
2. Le biorécepteur : acétylcholinestérase	17
2.1. Rôle physiologique et structure	17
2.2. Mécanisme d'inhibition	23
3. Métabolisme hépatique	25
<b>Matériels et méthodes</b>	
1. Protocole expérimental	27
1.1. Choix des animaux	27
1.2. Préparation de la solution de chlorpyrifos ethyl	28
2. Paramètres biochimiques	29
2.1. Dosage de l'activité de la butyrylcholinestérase	29
2.2. Détermination de l'activité cholinérasique cérébrale	30
2.3. Détermination des teneurs en protéines totales	31
2.4. Détermination de l'activité enzymatique des transaminases	31
2.5. Détermination cinétique des phosphatases alcalines	32
3. Analyse statistique	32
<b>Résultats</b>	33
<b>Discussion</b>	37
<b>Conclusion</b>	42
<b>Annexes</b>	43
<b>Références bibliographiques</b>	45

## Liste des abréviations

**ACh** : Acéthylecholine

**AChE** : Acéthylecholinestérase

**BChE** : butyrylcholinestérases

**BTC** : Iodure de butyryl thiocholine

**ChE** : Cholinestérase

**DDT** : Dichlorodiphényltrichloroéthane

**DL** : Dose létale

**DNOC** : Dinitro-*ortho*-cresol

**DTNB** : dithiodinitrobenzène

**NADPH** : Nicotinamide Adénine Diphosphate réduit.

**OP** : Organophosphorés

**PAL** : Phosphatase alcaline

**TC** : thiocholine

**GTO** : aspartate aminotransférase

**TGP** : alanine aminotransférase

**TNB** : thionitrobenzène

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Structure générale des organophosphorés.	8
<b>Figure 2</b> : mode d'exposition de l'homme et des milieux par les pesticides	16
<b>Figure 3</b> : Hydrolyse de l'acétylcholine par l'AChE au niveau de la synapse cholinergique	18
<b>Figure 4</b> : représentation schématique de l'acétylcholinestérase	21
<b>Figure 5</b> : La physiologie hépatique	26
<b>Figure 6</b> : Acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque), DTNB ou réactif d'Ellman.	29
<b>Figure 7</b> : Teneurs plasmatiques en transaminases (TGP TGO) et en phosphatases alcalines (PAL) chez les rats témoins et expérimentaux.	34
<b>Figure 8</b> : activité de la butyrylcholinestérase en umoles de substrat /mn/ml) chez les rats témoins et expérimentaux.	35
<b>Figure 9</b> : activité de la butyrylcholinestérase au niveau du cerveau (umoles de substrat /mn/ml) et teneurs en protéines totales (mg/tissu) chez les rats témoins et expérimentaux.	36

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Classification et caractéristiques des groupes de pesticides	5
<b>Tableau 2 :</b> Toxicité des principales familles de pesticides	12

## Les tableaux en annexes

<b>Tableau A1 :</b> Teneurs plasmatiques en transaminases (TGP TGO) et en phosphatases alcalines (PAL) chez les rats témoins et expérimentaux.	43
<b>Tableau A2 :</b> activité de la butyrylcholinestérase en umoles de substrat /mn/ml) chez les rats témoins et expérimentaux.	43
<b>Tableau A3 :</b> activité de la butyrylcholinestérase au niveau du cerveau (umoles de substrat /mn/ml) et teneurs en protéines totales (mg/tissu) chez les rats témoins et expérimentaux.	44





*Introduction*

---

Les pesticides constituent un groupe très hétérogène de substances chimiques adaptées à la lutte contre les plantes et les animaux indésirables : herbicides, fongicides, insecticides, acaricides, nématicides et rodenticides principalement. Ces produits phytosanitaires possèdent tous une toxicité d'intensité variable pour l'homme (**Cherin et al, 2012**).

La toxicité aiguë des pesticides résulte d'une mauvaise utilisation, d'un usage accidentel (accidents domestiques) ou d'une intoxication volontaire souvent gravissime. Les pesticides organophosphorés et les carbamates sont à l'origine des empoisonnements par les pesticides les plus fréquents. L'exposition se fait essentiellement par voie cutanéomuqueuse, respiratoire (inhalation) et orale. Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS) il y a chaque année dans le monde un million d'empoisonnements graves par les pesticides, à l'origine d'environ 220 000 décès par an (**Cherin et al, 2012**). Les intoxications aiguës par les pesticides sont responsables d'une grande mortalité mondiale, en particulier dans les pays en voie de développement à fort potentiel agricole (**Thabet et al, 2009**).

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 pesticides ont été mis en évidence chez l'animal. La question des risques pour l'homme est donc posée tant au niveau professionnel qu'à celui du consommateur (**Merhi 2008**).

L'utilisation des pesticides soulève un certain nombre de préoccupations environnementales (**Agrawal et Sharma, 2010**).

En Algérie, les agriculteurs utilisent depuis très longtemps une grande quantité de pesticides (**Bouziani, 2007**). Récemment, dans notre pays, l'usage des pesticides ne cesse de se multiplier dans de nombreux domaines et en grandes quantités. C'est le milieu agricole d'abord qui utilise des tonnes de pesticides, ces produits sont consacrés en majorité pour le traitement des cultures, la lutte contre les rongeurs et pour augmenter la production agricole.

L'Algérie est un grand consommateur de pesticides : 30 000 tonnes sont "épandues" chaque année. "Les conséquences sanitaires de l'exposition à ces milliers de composants chimiques, par le biais de l'eau et de l'alimentation, sont massives et inquiétantes", avance-t-on encore. Mais le risque est multiplié par quatre si le pesticide employé est périmé ou de mauvaise qualité (**Reguieg-Issaad, 2013**).

Les pesticides, à la fois efficaces, d'un coût relativement faible et faciles d'emploi, ont contribué au développement de systèmes de production intensifs, qui peuvent bénéficier de marchés et de prix agricoles favorables, et de la relative sous-évaluation des conséquences environnementales de leur usage (**Multigner, 2005 ; Quandt, 2010**). S'ils permettent de détruire les insectes ou autres, qui peuvent se révéler indésirables pour l'agriculture, ils provoquent des pollutions graves de l'environnement, qui ont des conséquences sur la santé humaine. En effet, ces pesticides posent un véritable problème de santé publique, comme le cancer, malformations congénitales, problèmes d'infertilité et problèmes neurologiques (**Grzywacz, 2011**).

Les cholinestérases sont les principales enzymes cibles des organophosphorés. Les deux enzymes présentes dans le sang (butyrylcholinestérase, BChE ; acétylcholinestérase, AChE) sont des marqueurs biologiques des effets toxiques systémiques de ces composés. L'activité des BChE plasmatiques est un outil courant de dépistage rapide d'une intoxication, et un marqueur de la persistance du toxique de l'organisme. L'activité des AChE érythrocytaires est un meilleur reflet de l'inhibition des enzymes similaires présentes dans le système nerveux. La détermination de cette activité permet un diagnostic de sévérité de l'intoxication provoquées par les pesticides en général (**Jalady, 2013**).

L'objectif principal de notre étude repose sur la perturbation du fonctionnement du système nerveux par l'inhibition d'une enzyme essentielle à son bon fonctionnement : la cholinestérase et sur le dysfonctionnement de la fonction hépatique suite à l'exposition aux insecticides par gavage chez les rats mâles « Wistar ». Les paramètres à doser sont : les transaminases, les phosphatases alcalines et l'activité cholinestérasique. Ce travail, demeure très partiel dans le domaine de la toxicologie des pesticides.



*Etat actuel*

---

*sur le sujet*

## **I. Les pesticides**

Le monde agricole a connu une révolution qui l'a progressivement fait passer à une activité industrielle. L'augmentation des rendements s'est faite en parallèle à une utilisation intensive de produits phytosanitaires (**Karami-Mohajeri et Abdollahi, 2011**). Aujourd'hui, on assiste à une explosion de l'utilisation de ces produits souvent désignés avec une nuance péjorative par le public sous le terme de « pesticide » (**Benzine, 2006**).

### **I.1. Définition**

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

### **I.2. Classification**

Le monde des pesticides est très complexe et avec des classes chimiques extrêmement diverse et l'utilisation de ces substances en agriculture mais aussi en voirie et en jardinerie est massive (**Narbonne, 2008**).

Les organophosphorés, les organochlorés et les carbamates représentent les trois principaux groupes chimiques synthétiques des pesticides (**Mitra et al, 2011**).

Les pesticides regroupent les herbicides, les fongicides, les insecticides, les nématocides, les acaricides, les rodenticides, les molluscides et les algicides, selon les cibles vers lesquelles ils sont plus particulièrement destinés (**Penel et Vansteene, 2007**).

D'après l'EPA (Environmental Protection Agency), les principaux groupes (**Tableau 1**) et sous-produits de pesticides sont :

1. Les insecticides, destinés à tuer les insectes sont principalement des composés chlorés, des organophosphorés, des carbamates, des pyréthrénoïdes, des produits botaniques et biologiques.
2. Les herbicides, permettant d'éliminer les mauvaises herbes sont des phénoxydes, des triazines, des amides, des carbamates, des dinitro-anilines dérivés d'urée, des sulfonilurées et uraciles.
3. Les fongicides, permettant la destruction de champignons pathogènes sont principalement des composés inorganiques, des dithiocarbamates, des benzimidazoles, des triazoles ou diazoles, des diazines et des morphines.
4. Les huiles minérales.
5. Les régulateurs de croissance de plantes.
6. Les rodenticides, permettant la destruction des rongeurs.

Selon les textes relatifs à la réglementation européenne, on distingue 2 grands groupes (**Merhi, 2008**) :

- les produits phytopharmaceutiques (au sens de la Directive 91/414/CE du 15 Juillet 1991) : ils sont utilisés principalement pour la protection des végétaux en agriculture contre les attaques de champignons parasites, d'insectes, d'acariens, de rongeurs champêtres ou encore pour lutter contre les adventices ou "mauvaises herbes". Leurs utilisations peuvent s'élargir dans d'autres secteurs (sylviculture, aménagement des paysages et entretien des abords d'axes de transport, jardinage amateur). Le décret n°94-359 du 5 mai 1994 relatif au contrôle des produits phytopharmaceutiques désigne par produits phytosanitaires les substances actives et les préparations contenant une ou plusieurs substances actives qui sont présentes sous la forme dans laquelle elles sont livrées à l'utilisateur et destinées à :

**Tableau 1** : Classification et caractéristiques des groupes de pesticides (Ben oujji 2012).

	Classes	Exemples	Utilisation/Action	Caractéristiques
<b>Insecticides</b>	Organochlorés	DDT, aldrine lindane, chlordane	Paralyse et mort des insectes	Bioaccumulation Bioamplification
	Organophosphorés	Parathion, Diazinone, Malathion	Neurotoxique	Persistances dans les milieux Hydrosolubles
	Carbamates	Carbaryl Aldicarbe	Neurotoxique	Hydrosolubles
<b>Herbicides</b>	Les Triazines	Atrazine	Agit sur la photosynthèse Utilisé dans les cultures de maïs	Très hydrosoluble Toxique pour le phytoplancton et les algues d'eau douce
	Dérivé des pyridines	Paraquat	Dés herbant de la vigne	Lésions pulmonaires irréversibles
	Les Urées substituées	Diuron	Inhibiteur de la photosynthèse	Toxicité faible pour l'homme
	Les acides organiques	Glyphosate	Dés herbant total	Toxicité faible due à la pénétration difficile dans les feuilles
<b>Fongicides</b>		Pentachlorophénol (PCP)	Tue les champignons lignivores	Hautement toxique pour l'homme

- ✚ protéger les végétaux ou les produits végétaux contre tous les organismes nuisibles ou à prévenir leur action.
  - ✚ exercer une action sur les processus vitaux des végétaux, pour autant qu'il ne s'agisse pas de substances nutritives (par exemple, les régulateurs de croissance).
  - ✚ assurer la conservation des produits végétaux, pour autant que les substances ou produits ne fassent pas l'objet de dispositions particulières du Conseil ou de la Commission concernant les agents conservateurs ;
  - ✚ détruire les végétaux indésirables, ou détruire des parties de végétaux
  - ✚ freiner ou prévenir une croissance indésirable des végétaux.
- Les biocides (au sens de la directive 98/8/CE) : les produits dénommés anciennement « pesticides à usage non agricole » sont maintenant appelés « produits biocides ». Ils concernent « les substances actives et les préparations contenant une ou plusieurs substances actives destinées à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à en prévenir l'action ou les combattre de toute autre manière par une action chimique ou biologique». Les biocides sont destinés à des usages domestiques, par exemple dans des applications comme la protection du bois contre les champignons ou les termites, les insecticides ménagers, les produits antiparasitaires (anti-acariens, antipuces), etc.

Malgré leur rôle très important en raison de leur capacité à limiter les insectes, les mauvaises herbes et les autres parasites, la plupart des pesticides présentent un risque potentiel pour la santé humaine, les animaux ou l'environnement car ils sont extrêmement toxiques et peuvent provoquer des problèmes de santé graves tels que certains cancers, des malformations congénitales, des problèmes d'infertilité, des problèmes neurologiques, un affaiblissement du système immunitaire, et d'autres effets qui peuvent apparaître au cours du temps (Ben oujji 2012 ).



L'influence des pesticides sur la santé humaine et l'environnement dépend en grande partie de la quantité appliquée, de leurs propriétés toxicologiques et écotoxicologiques et de leur persistance dans le sol et dans l'eau (**ID EL Mouden omar 2010**). L'organisation mondiale de la santé (**OMS**) classe les pesticides par dangerosité en se basant sur leur dose létale (DL) médiane orale ou cutanée, et plus sur la DL50 (nombre de milligramme de matières actives par kilogramme de masse corporelle, nécessaire pour tuer 50% d'un échantillon test d'animaux).

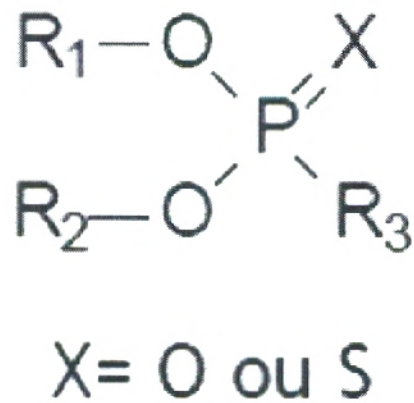
Chaque pesticide peut être placé dans une des quatre classes suivantes :

- ✚ Ia, extrêmement dangereux.
- ✚ Ib, très dangereux.
- ✚ II, modérément dangereux.
- ✚ III, légèrement dangereux.

### **I.2.1 Les organophosphorés**

Parmi les pesticides, les composés organophosphorés (OP) sont les plus utilisés et les plus variés sur le marché actuellement, ils représentent plus de 40 % des insecticides employés aujourd'hui dans le monde (**Andreescu, 2002**). Ces produits font partie de la seconde génération d'insecticides, ils ont été développés à partir d'armes chimiques utilisées durant la Seconde Guerre Mondiale (**Istamboulie, 2009**). Les OP présentent une structure générale incluant un groupement phosphate (P=O) ou phosphorothioate (P=S) (**Figure 1**), un groupement partant R3, sensible à l'hydrolyse et échangeable avec des réactifs nucléophiles, et deux substituants R1 et R2 possédant une stabilité accrue vis-à-vis de l'hydrolyse (**Elisabeth, 2008**). Leur action insecticide, tout comme leur toxicité pour les Hommes, vient de l'inhibition irréversible de l'acétylcholinestérase (AChE), qui se trouve bloquée sous une forme phosphorylée inactive. Cette inhibition provoque l'accumulation du neurotransmetteur acétylcholine au niveau de la synapse, provoquant une sur-stimulation cholinergique et ainsi une paralysie du système nerveux entraînant la mort de l'insecte (**Fournier, 1988**). Pour les êtres humains, l'exposition à ces produits peut être à l'origine d'intoxications aiguës (crises

cholinergiques) ou entraîner la mort par paralysie musculaire (arrêt cardiaque). L'importance des risques encourus par l'homme implique donc la mise en place de directives permettant de limiter la présence de pesticides organophosphorés dans l'eau et dans l'alimentation.



**Figure 1** : Structure générale des organophosphorés.

### I.3. Pesticides et santé

#### I.3.1. Situation dans le monde

L'utilisation des pesticides a connu un développement important au cours des dernières décennies. Elle a fortement contribué à l'amélioration des rendements agricoles et permis un énorme progrès dans la maîtrise des ressources alimentaires (**Camard et Magdelaine, 2010**).

La France se situe parmi les tous premiers pays utilisateurs des pesticides au niveau mondial (**Baldi et Lebailly, 2007**). On parle d'environ 80 à 100 000 tonnes/an de pesticides sur le territoire français (**Narbonne, 2008**). Les pesticides les plus couramment utilisés sont les herbicides (42%) suivi par les fongicides (37%) et les insecticides (9%) (**Lebailly et al., 2009**).

C'est le premier consommateur européen et le quatrième consommateur mondial de pesticides derrière les Etats-Unis, le Brésil et le Japon (**Camard et Magdelaine, 2010**).

Le Maroc importe annuellement une quantité moyenne de 8000 tonnes de pesticides à usage agricole dont les insecticides occupent la première place (35-40 %) suivis des fongicides (35%), les herbicides (15 %). Le reste (10%) est constitué par les autres catégories de pesticides (nématocides, acaricides, ...etc.) (**Benzine, 2006**).

### **I.3.2. Pesticides et toxicité**

L'intoxication aux pesticides est une cause importante de morbidité et de mortalité à travers le monde (**Achour et al, 2011**).

Les pesticides, de par leurs propriétés intrinsèques, représentent un danger potentiel pour l'homme en cas de contact inopiné (**Tableau 2**). Leur usage, professionnel ou domestique, suscite de nombreuses interrogations quant aux conséquences délétères qu'ils pourraient avoir sur la santé. Si les effets des intoxications aiguës sont assez bien connus, les conséquences à long terme, suite à des expositions chroniques, le sont beaucoup moins (**Multigner, 2005**).

#### **I.3.2.1 Toxicité aiguë**

En population générale, les effets aigus des pesticides, faisant suite à une exposition à de fortes doses, s'observent rarement. Ils surviennent en cas d'empoisonnements accidentels (jardiniers amateurs, accidents chez des enfants) ou volontaires (suicides) (**Camard et Magdelaine, 2010**).

Selon le rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (**OMS**), le nombre annuel d'intoxications par pesticides est estimé entre 1 et 5 millions, dont plusieurs milliers de cas mortels.

Les résultats d'une étude rétrospective réalisée au Maroc montrent qu'il s'agissait essentiellement d'intoxications isolées (93,7 %) qui se sont produites à domicile dans 81,9 % des cas, en milieu professionnel (3,8 %), dans un lieu public (1,4 %) et au sein des écoles (1,03 %) (**Rhalem et al., 2009**).

Les pays en développement sont particulièrement touchés par ce fléau en raison d'un manque de réglementation, de systèmes de surveillance et d'une insuffisance

d'accès aux systèmes d'information. Selon un rapport commun publié par la FAO (Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture), le PNUE (Programme des Nations unies pour l'environnement) et l'OMS, les pays en développement qui n'utilisent que 25 % des pesticides produits dans le monde, enregistrent 99% des intoxications mortelles dues à ce type de produit. (**Idrissi et al., 2010**)

Le risque d'exposition est important, chez les agriculteurs qui utilisent fréquemment des doses importantes de produits. Les effets observés sont des brûlures au niveau des yeux, des lésions cutanées, des troubles neurologiques et hépatiques, des manifestations digestives et respiratoires, des troubles cutanéomuqueux et rhino-pharyngiques (**Camard et Magdelaine, 2010**).

#### **I.3.2.2. Toxicité chronique**

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

#### **I.3.2.3. Pesticides et cancers**

La part réelle des expositions environnementales ou professionnelles (notamment aux pesticides) comme facteurs de risque des cancers est sans doute sous-estimée.

C'est particulièrement vrai pour la France qui est le premier utilisateur de pesticide en Europe. On estime aujourd'hui que la part attribuable aux expositions professionnelles représenterait 2 à 8 % de la mortalité par cancer (soit 3000 à 12000 décès par année en France) (**Baldi et Lebailly, 2007**).

Certains pesticides ont montré des interférences potentielles avec le bon fonctionnement des régulations hormonales et ont été baptisés perturbateurs endocriniens. Leur implication dans la genèse de certains cancers

hormonodépendants (cancer de la prostate et du sein) est vraisemblable, mais toutefois pour un nombre limité de molécules (**Karami-Mohajeri et Abdollahi, 2011**).

Les données épidémiologiques du cancer du sein, en faveur d'une véritable pandémie, et le caractère bien établi de son estrogéno-dépendance suggèrent de nouveaux facteurs de risque qui pourraient impliquer les xénoestrogènes, en particulier les pesticides organochlorés (**Fenichel et Brucker-Davis, 2008**).

Les pesticides organochlorés sont des perturbateurs endocriniens, qui peuvent agir en perturbant la fonction physiologique des hormones endogènes et donc, éventuellement, augmenter le risque de cancer de la prostate (**Kumar et al, 2010**).

#### **I.3.2.4. Pesticides et effets neurologiques**

Les pesticides sont le principal facteur de l'environnement associé à l'étiologie des troubles neurodégénératifs chez l'homme (**Astiz et al, 2009**).

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative d'origine multifactorielle faisant intervenir des facteurs environnementaux et génétiques. Parmi les facteurs de risques environnementaux, les résultats d'études épidémiologiques et toxicologiques sont en faveur d'une association entre l'exposition aux pesticides et la maladie de Parkinson (**Moisan et Elbaz, 2011**).

#### **I.3.2.5. Pesticides et effets sur la reproduction**

L'exposition aux pesticides peut être une cause majeure des troubles de la reproduction chez l'homme et l'animal (**Casas et al, 2010**). Chez des familles d'agriculteurs, l'étude a rapporté des cas de retards de fécondité, avortements spontanés, morts fœtales, accouchements prématurés, tératogénèse, mais aussi des anomalies de l'appareil sexuel (**Narbonne, 2008**)(tableau 2).

**Tableau 2 :** Toxicité des principales familles de pesticides (Onil et Louis 2001)

CLASSE	NATURE DES EFFETS TOXIQUES	SYMPTÔMES	
		INTOXICATION AIGUË	INTOXICATION CHRONIQUE
<p>Nitrophénols (dérivés) <b>DNOC*</b> <b>Dinocap</b></p>	<p>Irritants cutanés et oculaires. Augmentation de l'activité cellulaire et de la production de chaleur</p>	<p><b>MODÉRÉS À SÉVÈRES :</b> Sensation de chaleur, assèchement de la peau, augmentation du rythme respiratoire, nausées, problèmes gastriques, somnolence, sudation excessive, tachycardie, cyanose, collapsus et coma. Atteintes hépatiques, rénales et du système nerveux central possibles.</p>	<p>L'intoxication chronique au DNOC a été associée à des symptômes de type hyperthyroïdien. Le dinocap est un sensibilisant cutané possible. La formation de cataractes et des atteintes hépatiques ont été observées. Chez les animaux, des atteintes rénales et gastriques ont été observées.</p>
<p>Organochlorés <b>Dicofol</b> <b>Diénochloré</b> <b>Endosulfan</b> <b>Lindane</b> <b>Méthoxychloré</b> Etc.</p>	<p>Atteinte du système nerveux central (interférence avec la transmission des impulsions nerveuses). Une partie importante de la</p>	<p><b>LÉGERS :</b> Étourdissement, nausées, vomissements, céphalées, désorientation, perturbations de l'équilibre. <b>MODÉRÉS À SÉVÈRES :</b> Hyperexcitabilité, anxiété, faiblesses</p>	<p>Des altérations de l'activité électrique du cerveau et des altérations cellulaires au niveau du foie et des reins sont possibles. Certains de ces produits ont</p>

	dose absorbée peut-être accumulée dans les tissus adipeux	musculaires, incoordination, tremblements, convulsions, coma, arrêt respiratoire	induit des cancers chez l'animal.
Organophosphorés <b>Chlorpyrifos</b> <b>Diazinon</b> <b>Malathion</b> <b>Méthamidophos</b> <b>Parathion</b> <b>Etc.</b> Carbamates <b>Aldicarbe</b> <b>Carbaryl</b> <b>Propoxur</b> <b>Etc.</b>	Inhibition irréversible des cholinestérases. Une toxicité additive importante est possible avec les organophosphorés. Une neuropathie retardée a été observée avec certains organophosphorés. Avec les insecticides carbamates, l'inhibition des cholinestérases est plus facilement réversible et les effets sont généralement moins importants.	<b>LÉGERS :</b> Céphalées, étourdissements, transpiration, larmolements, salivation, vision trouble, serrements de poitrine, fasciculations des muscles (paupières, lèvres et langue). <b>MODÉRÉS :</b> Douleurs abdominales, nausées, vomissements, diarrhée, hypersécrétions bronchiques, bradycardie ou tachycardie, fasciculations musculaires, tremblements, faiblesse et fatigue. <b>SÉVÈRES :</b> Myosis intense, transpiration, incontinence, confusion, œdème pulmonaire, respiration difficile, cyanose,	L'exposition répétée aux organophosphorés (OP) peut avoir un effet cumulatif. L'exposition chronique aux OP a parfois été associée à des atteintes du système nerveux central ou à des effets sur les fonctions neurophysiologiques périphériques. La possibilité de problèmes hépatiques, rénaux, immunologiques, cardiovasculaires, endocriniens, respiratoires, hématologiques, oculaires, gastrointestinaux et des modifications du comportement ont aussi été soulevées dans le cas des organophosphorés. L'apparition de certaines formes de cancer a aussi

		défaillance cardiorespiratoire, convulsions, perte de conscience et coma.	été associée à l'utilisation des OP. - Des effets chroniques n'ont que rarement été rapportés pour les carbamates
<b>Pyréthriinoïdes</b> <b>Cyperméthrine</b> <b>Deltaméthrine</b> <b>Fenvalérate</b> <b>Perméthrine</b> <b>Pyréthrines</b> <b>Etc.</b>	Faible toxicité systémique. Irritants cutanés et oculaires. Réactions allergiques possibles	<b>LÉGERS :</b> Irritations et sensations temporaires de brûlures lors de contact cutané ou oculaire. <b>MODÉRÉS À SÉVÈRES</b> (ingestion d'une forte dose) : Salivation, douleurs épigastriques, nausées, vomissements, céphalées, étourdissements, fatigue, fasciculations musculaires, convulsions, perte de conscience.	Les pyréthrines naturelles sont parfois associées à des réactions allergiques.



#### **I.4 Pesticides en Algérie**

Les enquêtes auprès des agriculteurs et des revendeurs ont permis de donner un aperçu sur les pesticides en Algérie, dont l'utilisation est faible comparée aux pays développés.

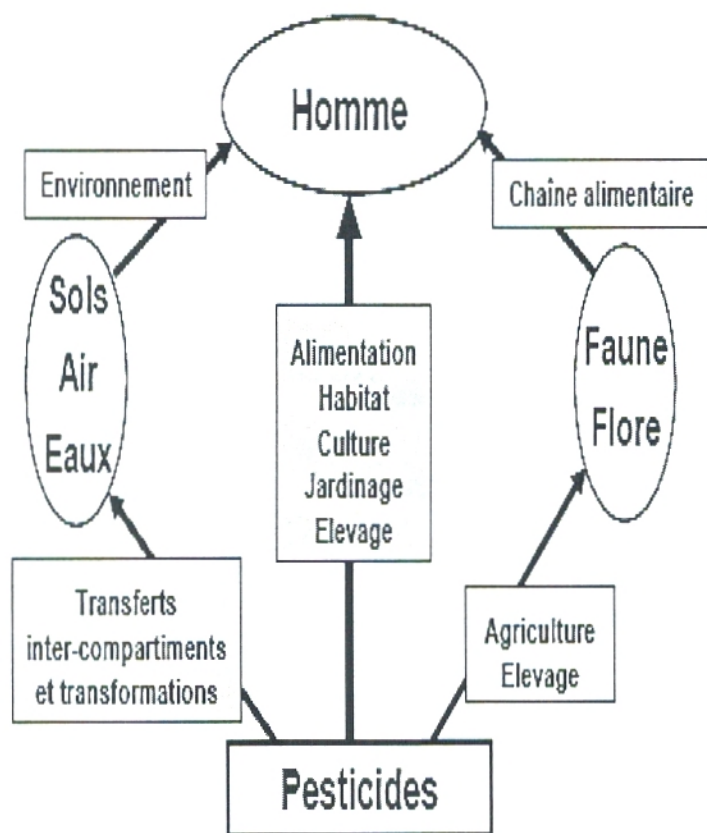
Les pesticides les plus utilisés en Algérie sont les fongicides et les insecticides contrairement aux pays développés où les herbicides occupent la première place. Malgré cette faible utilisation, il a été relevé en matière de santé, un taux relativement élevé de cas d'allergie parmi les utilisateurs de pesticides et qui peut s'expliquer (**Dahoun - Tchoulak et Moussaoui, 2003**).

#### **I.5. Les voies d'exposition**

Les voies d'exposition sont trois :

- ✦ Exposition respiratoire (par inhalation)
- ✦ Exposition orale (par ingestion)
- ✦ Exposition par contact cutané

La figure 2 explique le mode d'exposition de l'homme et des milieux par les pesticides (**CPP 2002**) .



**Figure 2** : mode d'exposition de l'homme et des milieux par les pesticides (CPP 2002)

## II. Le biorécepteur : acétylcholinestérase

Le terme de cholinestérase a été proposé en 1932 pour décrire une enzyme capable d'hydrolyser l'acétylcholine (Lejus et al, 1998). Quelques années plus tard, des commissions internationales de nomenclature biochimique ont entériné l'existence de deux formes distinctes de ChE qui diffèrent par leur origine, leur structure, leur spécificité d'action et leur fonction physiologique (Cardon et al, 2005)

Le biorécepteur est l'élément du biocapteur qui doit assurer la reconnaissance moléculaire du composé à détecter. Il doit présenter, par rapport à cette substance cible, une bonne affinité, une bonne sélectivité, ainsi qu'une réponse rapide (Déjous, 2005). Au moins trois types de molécules biospécifiques peuvent jouer le rôle de biorécepteur : les immunoespèces (anticorps, antigène), les enzymes et les acides nucléiques (ADN, ARN), qui servent à concevoir respectivement des capteurs immunologiques, des capteurs enzymatiques, et des biopuces. Il est également possible de concevoir des biocapteurs à base de cellules entières.

Dans notre étude, le biorécepteur utilisé est une enzyme qui appartient à la famille des hydrolases : l'acétylcholinestérase dont les caractéristiques sont présentés ci-dessous.

### II.1 Rôle physiologique et structure

Dans les jonctions neuromusculaires et interneurales, la terminaison nerveuse libère un médiateur chimique, l'acétylcholine, qui va permettre la transmission de l'influx nerveux. Lors d'une stimulation nerveuse, l'acétylcholine libérée des terminaisons nerveuses dans l'espace synaptique, active les récepteurs cholinergiques post-synaptiques. L'interaction de l'acétylcholine avec le récepteur provoque une dépolarisation de la membrane postsynaptique, générant ainsi un potentiel d'action qui assure la transmission du signal nerveux.

L'hydrolyse de l'acétylcholine par une enzyme (acétylcholinestérase), permet au système de revenir à son état de repos (Bocquené et al, 1997) (figure 3)

L'acétylcholinestérase ou « enzyme parfaite » (**Quinn, 1987**), est une des enzymes les plus efficaces et les plus rapides connues actuellement (une efficacité d'hydrolyse (turnover) de 1000 à 20 000 molécules /seconde selon l'espèce).

Elle appartient à la famille des hydrolases et elle est exprimée au niveau du système nerveux central et des muscles, son rôle comme décrit ci-dessus est d'hydrolyser le neurotransmetteur acétylcholine afin de terminer la transmission de l'influx nerveux et restaurer ainsi l'excitabilité des synapses cholinergiques.

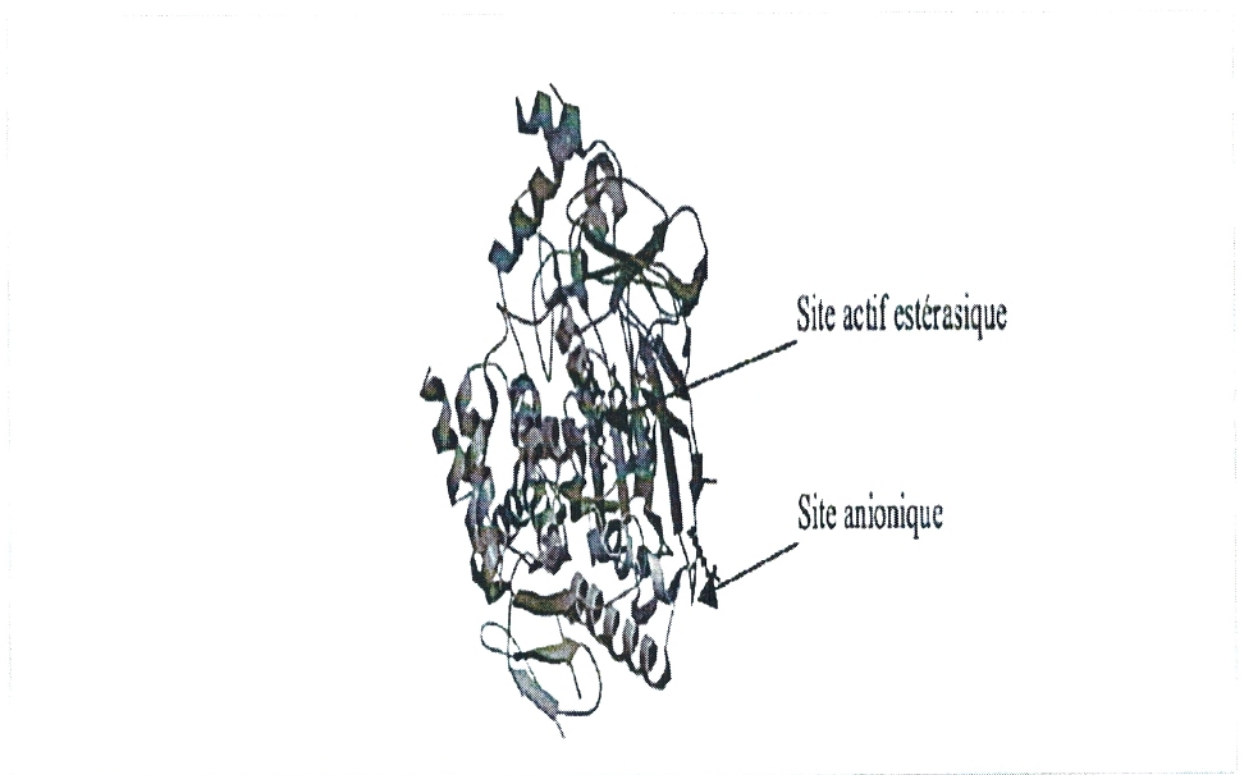
L'acétylcholinestérase est une protéine complexe qui possède un centre actif, une multitude de sites périphériques et de nombreux domaines hydrophobes (**figure 4**). Le site actif, région particulière de l'enzyme où se déroule la réaction enzymatique, possède une taille restreinte par rapport à la taille globale de l'enzyme. Ce site actif de l'AChE possède un site catalytique qui peut être décomposée en 2 parties :

- Le sous-site anionique responsable de la stabilisation du substrat lors de la catalyse par fixation de l'ammonium quaternaire de la partie choline de l'ACh. Il était admis, jusque dans les années 1990, que cette liaison se faisait par interaction électrostatique entre la charge positive de l'ammonium et la charge négative d'un groupement carboxyle libre de l'enzyme (**Rosenberry, 1975**). Cette interaction est stabilisante, mais en réalité un transfert de charge entre la charge positive de l'ammonium quaternaire de l'ACh et les électrons  $\pi$  du noyau indole du Tryptophane (Trp) l'est beaucoup plus (**Gallivan et Dougherty, 1999**). Ce sous-site est composé d'une majorité de résidus aromatiques et il est estimé que plus de 50% de l'énergie de stabilisation provient de ce dernier (**Badiou, 2007**).
- Le sous-site estérasique, contenant la triade catalytique Ser200, His440 et Glu327 (numérotation d'après la séquence de l'AChE de *Torpedo californica* qui est la première structure tridimensionnelle résolue), Cette triade est localisée à la base d'une gorge étroite de 20 Å de profondeur (**Sussman et al, 1991**) et qui est alignée de 14 résidus aromatiques. Ce site constitue le lieu de la catalyse (**Eldefrawi, 1985**) ainsi que la cible de certains insecticides, qui agissent en bloquant de manière irréversible

l'enzyme (**Remy et al., 1995**). Dans un premier temps, la partie acétyle de la molécule d'ACh se fixe et forme un intermédiaire tétrahédrique. Le trou oxyanion favorise la formation de cette intermédiaire en accueillant l'oxygène négativement chargé du carbonyle de l'ACh. L'His440 joue un rôle important en se comportant comme un catalyseur pour la formation et la décomposition de l'intermédiaire. Au sein du sous-site estérasique se trouve une petite cavité hydrophobe appelée, poche acyle, qui stabilise le groupement méthyle de la partie acétate et confère un rôle de sélectivité du substrat. La mutagenèse dirigée a montré que le remplacement des résidus impliqués dans la poche acyle induisait une spécificité plus large de substrat. L'hydrolyse de l'ACh implique la participation du N de l'imidazole de l'histidine qui va attirer le proton de l'hydroxyle de la sérine du site actif, le rendant plus mobile et favorisant l'interaction de l'oxygène de la sérine avec le centre électrophile de l'ACh. Une fois le complexe intermédiaire non covalent enzyme substrat formé ( $k+1$ ), l'AChE est acétylée par estérification de l'hydroxyle de la sérine active ( $k2$ ) et la partie choline est libérée. L'enzyme est régénérée ( $k3$ ) lorsque l'atome d'oxygène d'une molécule d'eau, électronégatif, attaque le site électrophile du carbonyle du groupement acétyle produisant de l'acide acétique (**Badiou, 2007**).

En plus de ce site, l'enzyme possède également un second site actif, appelé "site périphérique anionique" comportant des groupements périphériques secondaires qui permettent la fixation de ligands (**Marcel, 1999**).

L'utilisation de l'AChE pour la détermination des insecticides a été largement décrite et la littérature propose une gamme variée de systèmes impliquant cette enzyme en solution ou immobilisée. Ces systèmes sont basés sur la détermination de l'activité de l'enzyme avant et après contact avec l'inhibiteur, la diminution d'activité induite est alors fonction de la concentration de l'insecticide. Ce principe représente la base analytique des biocapteurs à AChE pour la détection des insecticides (**Istamboulie, 2009**).



**Figure 4** : représentation schématique de l'acétylcholineestérase (kryger et al, 1999 )

Il existe chez l'homme deux cholinestérases différant par leur origine, leur lieu de synthèse, leur structure, leur spécificité d'action, leur fonction physiologique et l'indication de la mesure de leur activité.

- Acétylcholinestérase ou cholinestérase globulaire ou encore cholinestérase vraie

Elle a une affinité presque exclusivement spécifique pour son substrat naturel, l'acétylcholine. Elle est synthétisée dans le globule rouge (où son rôle n'est pas connu) et le tissu nerveux. Elle est présente essentiellement au niveau des synapses dans le tissu nerveux et à la jonction neuromusculaire, dans la substance grise, les poumons et la rate. Son rôle physiologique est d'assurer le fonctionnement des synapses acétylcholinergiques, en évitant l'accumulation du neurotransmetteur. Elle est aussi présente de façon anormale dans le liquide amniotique au cours du défaut de fermeture du tube neural. (**Lauwerys, 1999**)

- Butyrylcholinestérase ou cholinestérase sérique ou pseudocholinestérase

Elle a une affinité beaucoup plus large ; elle peut hydrolyser un grand nombre d'esters synthétiques et naturels, y compris l'acétylcholine et la succinylcholine. Elle est retrouvée dans le plasma ou le sérum, dans le foie (siège de sa synthèse), le pancréas, l'intestin et d'autres tissus. Son rôle physiologique n'est actuellement pas connu. Le dosage de chacune de ces enzymes est effectué par une technique colorimétrique, mesurant la cinétique d'hydrolyse à l'aide d'un substrat défini :

la butyrylthiocholine pour la cholinestérase sérique (très stable à température ambiante), l'acétylthiocholine pour la cholinestérase globulaire. (**Lauwerys , 1999**) (**Cardon et al 2005**)

La mesure de l'activité enzymatique de la cholinestérase sérique est indiquée comme témoin de l'intoxication par les insecticides organophosphorés au cours du suivi biologique des travailleurs exposés et à chaque fois qu'une intoxication aiguë accidentelle est suspectée. Il est inutile d'évaluer son inhibition au cours d'une intoxication par les carbamates, car la liaison est rapidement réversible (y compris dans le tube d'échantillon après le prélèvement). Elle est utile également pour évaluer une atteinte hépatique grave (diminution de sa synthèse) et rechercher

une anomalie de production qualitative se traduisant par un ralentissement de la destruction de certains types de curarisants : son activité est dans ce cas généralement au-dessous de la normale. La mesure de l'activité de la cholinestérase globulaire permet de confirmer une intoxication aiguë ou chronique par un pesticide organophosphoré. Dans le liquide amniotique, cette même cholinestérase est présente au cours d'une pathologie grave de l'embryogenèse se traduisant par un défaut de fermeture du tube neural. (**Lauwerys , 1999**)

## **II.2 Mécanisme d'inhibition**

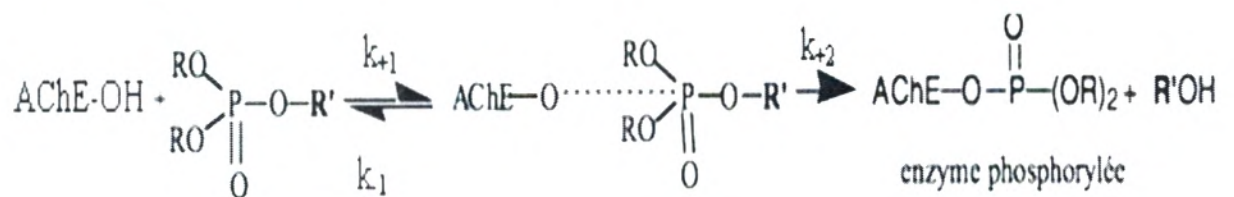
Les OP, très lipophiles, franchissent aisément toutes les barrières biologiques et se fixent de façon covalente aux cholinestérases de la jonction synaptique des fibres du système nerveux central, non dosables en pratique courante. Ils se fixent également aux acétylcholinestérases érythrocytaires (AChE-Er) et aux pseudocholinestérases ou « butyrylcholinestérases » du foie et du plasma. Ces dernières sont très sensibles mais peu spécifiques, renseignant généralement sur une exposition à un inhibiteur des cholinestérases. Même si une faible quantité franchit la barrière hématoencéphalique, elle suffit pour inhiber en quelques secondes pratiquement toute l'activité acétylcholinestérasique (AChE) (**Worek et al , 2005**) ,( **Bismuth , 1993**). Il s'agit d'une véritable lésion biochimique puisque les OP viennent occuper, en le phosphorylant, le site estérasique de l'enzyme, s'opposant ainsi à l'hydrolyse physiologique de l'acétylcholine en choline et en acide acétique. Soixante-quinze grammes d'acétylcholine sont normalement hydrolysables en une heure par 1mg d'enzyme (**Bismuth,1993**). La déphosphorylation de l'enzyme inhibée par l'OP est très lente ; dans un deuxième temps, la phosphorylation devient irréversible par déalkylation ; c'est le phénomène d'« aging » ou vieillissement de l'enzyme qui devient, d'une part, non fonctionnelle et, d'autre part, non réactivable (**Worek et al 2005**),( **Worek et al 2004**). Dans ce cas, c'est la synthèse de nouvelles cholinestérases qui permettra le retour à une activité fonctionnelle normale. Le résultat de l'inhibition des cholinestérases est l'accumulation d'acétylcholine ; ce dernier est le médiateur chimique de la transmission de l'influx nerveux au niveau des ganglions du



système nerveux autonome et de la jonction neuromusculaire (récepteurs nicotiques), des fibres postganglionnaires du système parasympathique (récepteurs muscariniques, inhibés par l'atropine) et du système nerveux central (**Milan Jokanovic et al 2006**)

Les produits organophosphorés (insecticides, gaz de combat) sont des inhibiteurs puissants et irréversibles des cholinestérases, conduisant à une accumulation synaptique d'acétylcholine (**Lauwerys ,1999**)

Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase peuvent être classés selon leurs modes d'action, on cite les inhibiteurs pseudo-irréversibles, irréversibles, analogue d'état de transition et les inhibiteurs réversibles. L'inhibition de l'AChE par de nombreux neurotoxiques tels que les métaux lourds et les organophosphorés provoque une transmission permanente de l'influx nerveux, causant de nombreuses anomalies telles que la paralysie et même la mort (**Matozzo et al., 2005**). Parmi les inhibiteurs de l'AChE, les plus connus sont certains gaz de combat et les insecticides organophosphorés et carbamates. Le mécanisme d'inhibition par ces derniers est basé sur la formation d'un complexe carbamylé ou phosphorylé qui est plus stable que la forme acétylée. Cependant la forme carbamylée s'hydrolyse rapidement (inhibition réversible) alors que la réactivation de la forme phosphorylée est beaucoup plus lente (inhibition quasi-irréversible) voire impossible (inhibition irréversible) selon la nature de l'organophosphoré (**Lotti, 1995**). Le mécanisme d'inhibition de l'acétylcholinestérase par les organophosphorés est représenté ci-dessous :



L'inhibition commence par la formation du complexe enzyme-inhibiteur (complexe de Michaelis), suivie par la phosphorylation qui inactive l'enzyme de manière irréversible

## II. Métabolisme hépatique

Le foie est un organe plein situé dans la cavité abdominale (**Martin et al., 2008**). Il est responsable de plusieurs fonctions métaboliques, fournissant au corps l'énergie qui lui est nécessaire. Il régularise la production, le stockage et la libération des sucres, des graisses et du cholestérol. Le foie aide à nettoyer le sang et à débarrasser l'organisme des poisons.

Les pesticides sont des poisons très dangereux et le foie ne peut pas se débarrasser d'eux. Des dommages sévères du foie peuvent survenir après une sérieuse intoxication ou après avoir travaillé avec les pesticides pendant plusieurs années (**Liz et Alan, 2004**) (**figure 5**).

Chez les mammifères, les insecticides organophosphorés (OP) sont rapidement métabolisés, principalement par le foie, même si une petite fraction reste stockée dans les tissus adipeux (**Bakke and Price, 1976; Kamrin, 1997**).

Ce métabolisme se fait par des voies différentes. L'une d'entre elles est la désulfuration oxydative de la double liaison avec le phosphore, par un cytochrome P450 du foie (qui est spécifique à l'OP). (**Costa, 2006**).

Toutefois, dans une étude, une légère augmentation des enzymes sériques hépatiques (les transaminases) a été observée et corrélée avec la concentration de dieldrine sérique chez des travailleurs exposés aux pesticides (**Morgan et Roan 1974 ; Morgan et Lin 1978**).

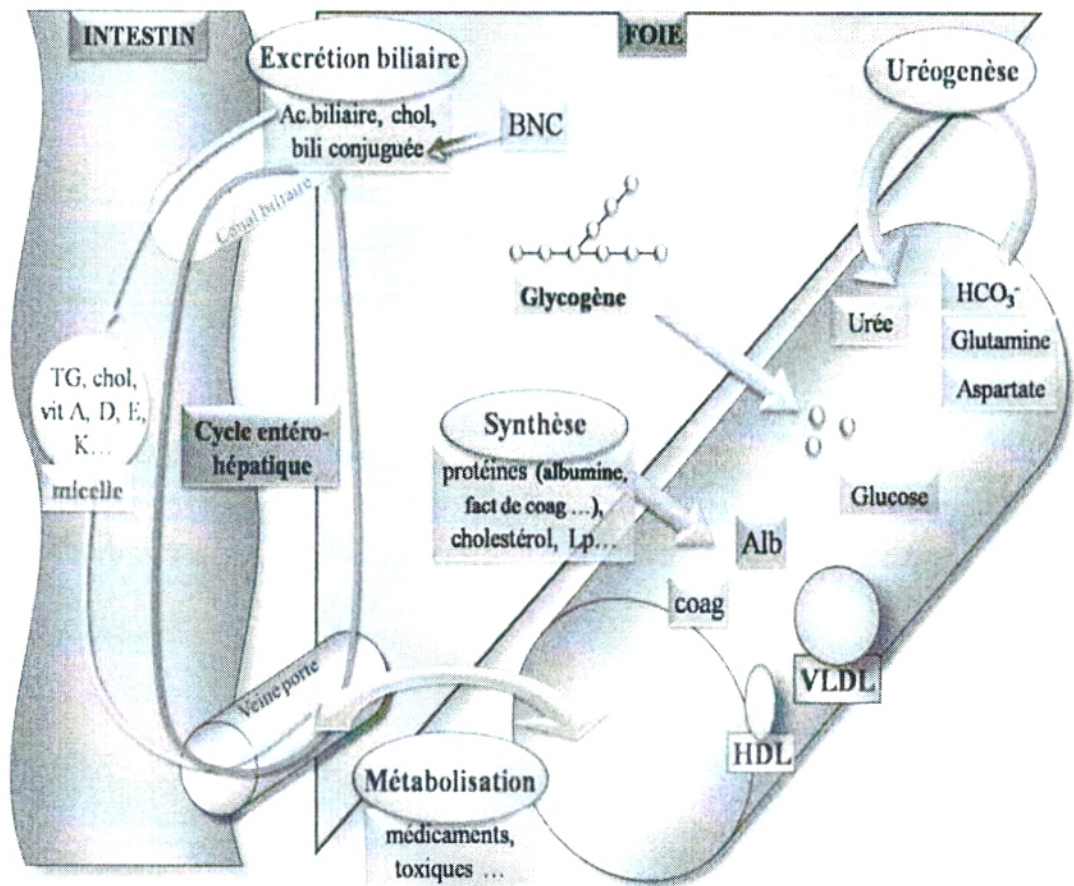


Figure 5: La physiologie hépatique (Martin et al, 2008)



## I. Protocole expérimental

### I.1 Choix des animaux

Le travail a porté sur des rats adultes mâles de type « Wistar » élevés à l'animalerie au niveau du département de Biologie, Faculté des sciences de la nature, de la vie, des sciences de la terre et de l'univers, Université de Tlemcen.

Les rats sont maintenus dans des conditions favorables d'élevage à une température de 25 à 30°C et un taux d'humidité entre 60 et 70%. Ces animaux sont nourris par le régime standard à 19 % de protéines, fabriqués par l'ONAB (Office Nationale d'Aliment de Bétail, Remchi Wilaya de Tlemcen), et boivent de l'eau de robinet à volonté.

Après une semaine d'adaptation, chaque rat a été gavé 3 fois par semaine pendant trois mois.

Ainsi, deux lots de rats sont répartis comme suit :

- **1<sup>er</sup> lot témoin** : constitué de 4 rats recevant par gavage de l'huile de maïs (0.8 ml par 200 g de poids corporel).
- **2<sup>ème</sup> lot expérimental** : constitué de 4 rats recevant par gavage de l'huile de maïs contenant x à une dose de DL50/10 (5,62 µl dans 0,8 ml d'huile de maïs par 200 g de poids corporel/jour).

La dose gavée par le chlorpyrifos aux rats est :

- DL50 = 135mg/kg
- DL50/10 = 13,5 mg/kg

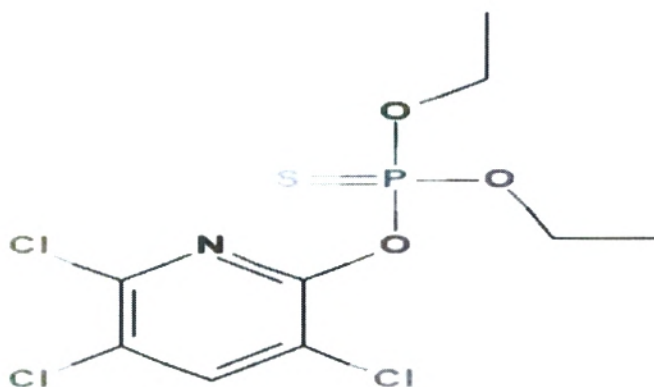
Les gavages sont réalisés un jour sur deux pendant trois mois d'expérimentation. Le poids corporel et la nourriture ingérée sont notés quotidiennement.

A la fin de l'expérimentation (après trois mois), les rats de chaque lot sont anesthésiés à l'aide d'une injection intra péritonéale d'une solution de chloral à 10% (0,3 ml par 100g de poids corporel), après 12 heures de jeûne. Le sang est

prélevé par ponction dans l'aorte abdominale. Une quantité de sang est recueillie sur des tubes héparinés puis centrifugé à 3000 tours/min pendant 15 minutes. Le plasma est immédiatement utilisé pour le dosage de l'activité de la butyrylcholinestérase plasmatique. Le culot des tubes héparinés est récupéré, lysé avec 2 volumes d'eau distillée glacée puis incubé pendant 15 min au réfrigérateur (2-8 °C). Celui-ci est centrifugé à 4000 t/min pendant 10 min. le surnageant récupéré constitue le lysa érythrocytaire qui servira pour le dosage de l'activité de la butyrylcholinestérase érythrocytaire. Le cerveau est soigneusement prélevé, rincés avec du NaCl à 9‰, ensuite pesés puis mis dans un bac de glace (4°C). Une partie aliquote de l'organe est broyée à l'ultraturax dans le tampon phosphate/EDTA, pH=7,2, additionné de SDS, 1% (sodium dodécyl sulfate) (1/1, v/v), et centrifugation à 3000 tours pendant 10minutes. L'homogénat obtenu sert pour le dosage des protéines et pour l'activité de la butyrylcholinestérase cérébrale.

### **I.2 Préparation de la solution de chlorpyrifos ethyl :**

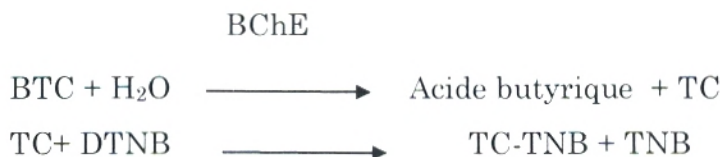
**Utilisation** : le chlorpyrifos ethyl est un insecticide organophosphoré à large spectre. Son nom pour l'utilisation professionnelle est le Dursban, de **Formule moléculaire brute** : C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>3</sub>PS et de **Structure chimique** :



## II. Paramètres biochimiques

### II.1 Dosage de l'activité de la butyrylcholinestérase

L'activité cholinestérasique est mesurée au niveau de trois compartiments : sang total dilué au 1/100, plasma dilué au 1/20 et érythrocytes dilués au 1/100 par la méthode colorimétrique de Ellman (Ellman, et al., 1961). Le substrat utilisé est l'iodure de butyryl thiocholine (pour BChE), qui est hydrolysé respectivement en acide butyrique et en thiocholine. Le groupement thiol de la thiocholine réduit le DTNB en TNB (acide 5-thio (2-nitrobenzoïque)), composé jaune qui possède une absorbance maximale à 412-415 nm. L'augmentation de la coloration dans le temps indique la formation de thiocholine qui est le reflet de l'activité de l'enzyme, selon la réaction suivante :

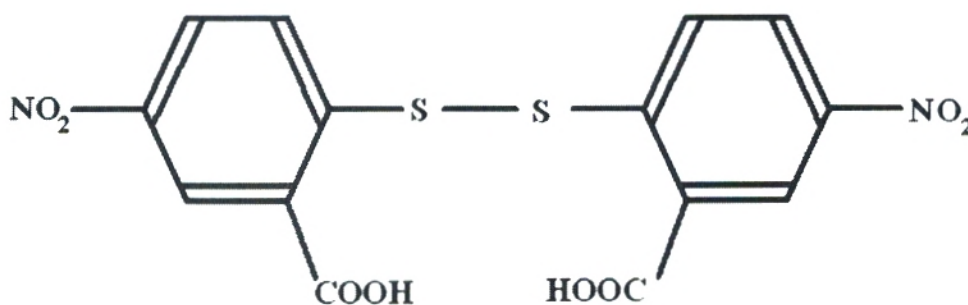


BTC : Iodure de butyryl thiocholine

TC : thiocholine

DTNB : dithiodinitrobenzène

TNB : thionitrobenzène



**Figure 6** : Acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque), DTNB ou réactif d'Ellman.

Le Chromogène : composé incolore qui après réaction chimique se transforme en composé doué de propriétés chromatiques.

La variation de densité optique de chaque échantillon est convertie en unité qui représente le nombre de micromoles de substrat hydrolysé; par minute et par ml d'échantillon. Cette unité est fonction de la dilution de l'enzyme, du coefficient d'extinction du D.T.N.B., de la Do nette/mn.

Selon l'équation suivante :

$$A = \frac{\Delta Do}{1.36 \times 10^4} \times \frac{3.2}{0.1} \times \frac{\text{dilution de l'échantillon}}{10^3} \times 10^6$$

Avec

- A = Activité cholinestérasique (en umoles de substrat hydrolysé/mn/ml d'échantillon) ,
- D. O. nette/mn = Densité optique nette par minute,
- $1,36 \cdot 10^4$  = Coefficient d'extinction du DTNB ;
- 3,2/0,1 = Taux de dilution de l'enzyme dans la cuvette
- $10^3$  = Moles de substrat/ml;
- $10^6$  = umoles de substrat/ml.

## II.2 Détermination de l'activité cholinestérasique cérébrale

Les dosages sont effectués sur les parties droites des prélèvements conservées à -80°C jusqu'au moment du dosage. L'activité ChE et les taux de protéines sont déterminés sur les structures cérébrales. Après broyage et extraction de celles-ci, réalisés selon le protocole suivant :

- homogénéisation des structures cérébrales au potter de Thomas (1300 tr/min), refroidi par de la glace fondante, dans 700  $\mu$ L d'une solution de saccharose 0,32 mol.L-1 / TRIS/HCl 50 mmol.L-1 pH 7,4 ; - centrifugation de l'homogénat 15 min à 1000 g à 8°C ; - le surnageant est prélevé et conservé sur de la glace pilée jusqu'à l'analyse qui intervient dans la demi-heure : mesure de l'activité ChE et dosage des protéines.



### **II.3. Détermination des teneurs en protéines totales**

Les protéines totales sont dosées sur l'homogénat du cerveau par la méthode de LOWRY et al. (1951) utilisant l'albumine sérique bovine comme standard (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA).

Cette méthode est basée sur l'utilisation du réactif de biuret. Les ions cuivre en milieu alcalin réagissent avec les liaisons peptidiques des protéines pour former un complexe coloré. La lecture se fait à une longueur d'onde de 550 nm (Kit Spinreact).

### **II.4. Détermination de l'activité enzymatique des transaminases (TGO, TGP) (kit Spinreact)**

Les transaminases permettent le transfert du groupement aminé d'un acide aminé sur un acide  $\alpha$  cétonique. L'acide aminé est alors transformé en acide cétonique correspondant et l'acide  $\alpha$  cétonique en acide aminé. Les deux principales réactions de transamination sont catalysées par les transaminases glutamo-oxaloacétique (TGO) et glutamo-pyruvique (TGP). La détermination des activités enzymatiques des transaminases se fait au niveau des organes (foie, cœur, rein, muscle) et permet d'apprécier l'atteinte tissulaire et la cytolyse (Valdiguie, 2000).

L'enzyme transaminase catalyse le transfert du groupe amine de l'aspartate (pour la TGO) ou de l'alanine (pour la TGP) vers l'oxaloglutarate avec formation de glutamate et d'oxaloacétate (pour la TGO) ou du pyruvate (pour la TGP). Les mesures sont effectuées à l'aide de réactions couplées pour permettre l'utilisation du coenzyme NADH/H<sup>+</sup> dont on mesure la diminution d'absorbance. Ainsi, l'oxaloacétate est réduit en malate ou le pyruvate en lactate grâce à des déshydrogénases (MDH ou LDH) couplées à NADH/H<sup>+</sup>. La vitesse d'oxydation du NADH est proportionnelle à l'activité enzymatique des transaminases. Elle est déterminée par mesure de la diminution de l'absorbance à 340 nm.

## II.5. Détermination cinétique des phosphatases alcalines (kit Spinreact)

Les phosphatases alcalines (PAL) sont des enzymes capables de libérer de l'acide phosphorique à partir de ses esters. Elles sont actives à PH alcalin voisin de 8.5. Ces enzymes sont trouvées en grande quantité dans le foie, les voies biliaires, l'os, le placenta et le globule blanc.

La détermination de l'activité des phosphatases alcalines par la méthode cinétique se fait selon les réactions suivantes :



La DO du p-nitrophénol libéré est proportionnel à l'activité des PAL et mesurée à une longueur d'onde de 405nm

**Calcul :** activité PAL (U/L) = Facteur \* deltaDO/mn

Le facteur est donné par le fabricant

## III. Analyse statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard. Après analyse de la variance la comparaison des moyennes est réalisée par le test 't' de Student entre les deux groupes de rats (témoins, expérimentaux) Cette analyse est réalisée grâce au logiciel STATISTICA, version 4.1 (STATSOFT, TULSA, OK). Les différences sont considérées significatives à  $P < 0,05$ .



***Résultats***  
et interprétations

### **1. Teneurs plasmatiques en transaminases (TGP TGO) et en phosphatases alcalines (PAL) chez les rats témoins et expérimentaux.**

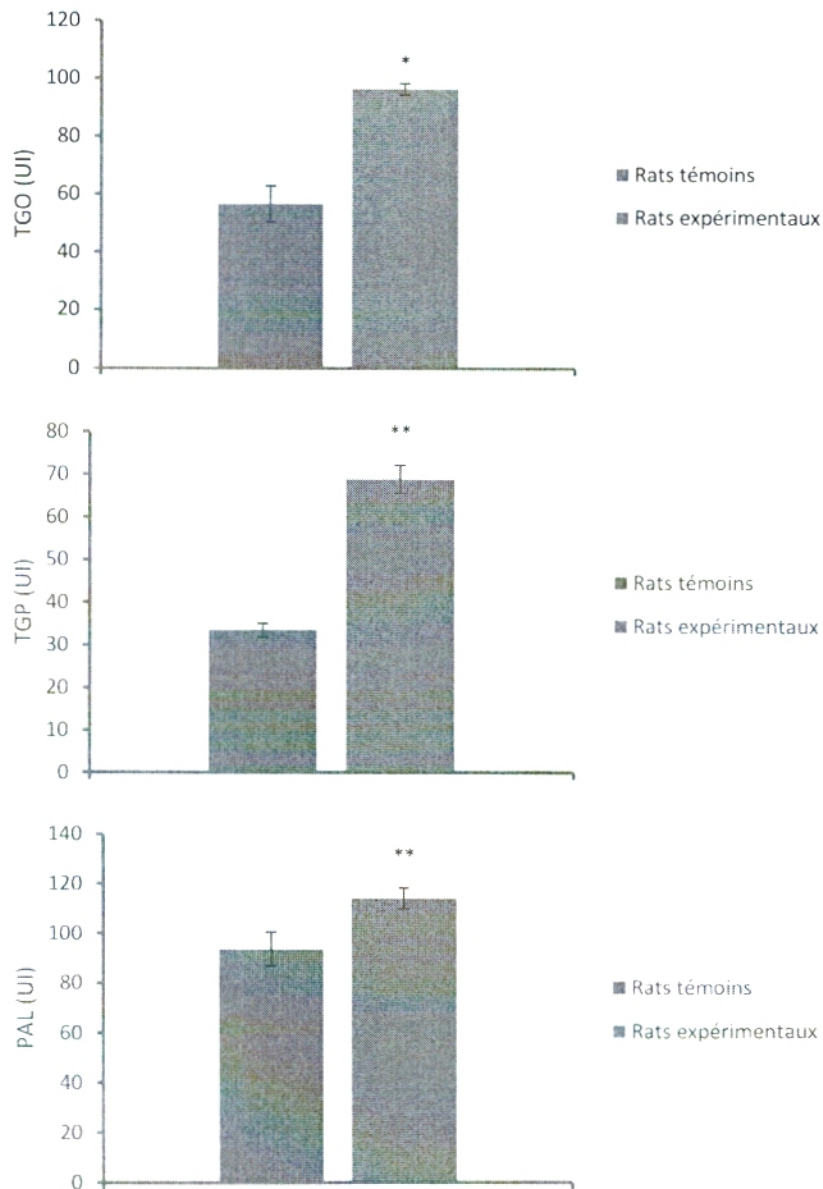
Chez les rats traités par chlorpyrifos à la dose DL50/10, les teneurs plasmatiques en transaminase (TGP, TGO) augmentent significativement par rapport aux rats témoins. Cette augmentation concerne aussi bien pour les teneurs plasmatiques en phosphatases alcalines (**Figure 7, Tableau A1 en Annexe**)

### **2 : activité de la butyrylcholinesterase en umoles de substrat /mn/ml) chez les rats témoins et expérimentaux.**

Le chlorpyrifos à la dose DL50/10 chez les rats expérimentaux entraîne une diminution significative de l'activité de la butyrylcholinesterase au niveau de trois compartiments ; le sang total, plasma et érythrocytes par rapport aux rats témoins (**Figure 8, Tableau A2 en Annexe**)

### **3 : activité de la butyrylcholinesterase au niveau du cerveau (umoles de substrat /mn/ml) et teneurs en protéines totales (mg/tissu) chez les rats témoins et expérimentaux.**

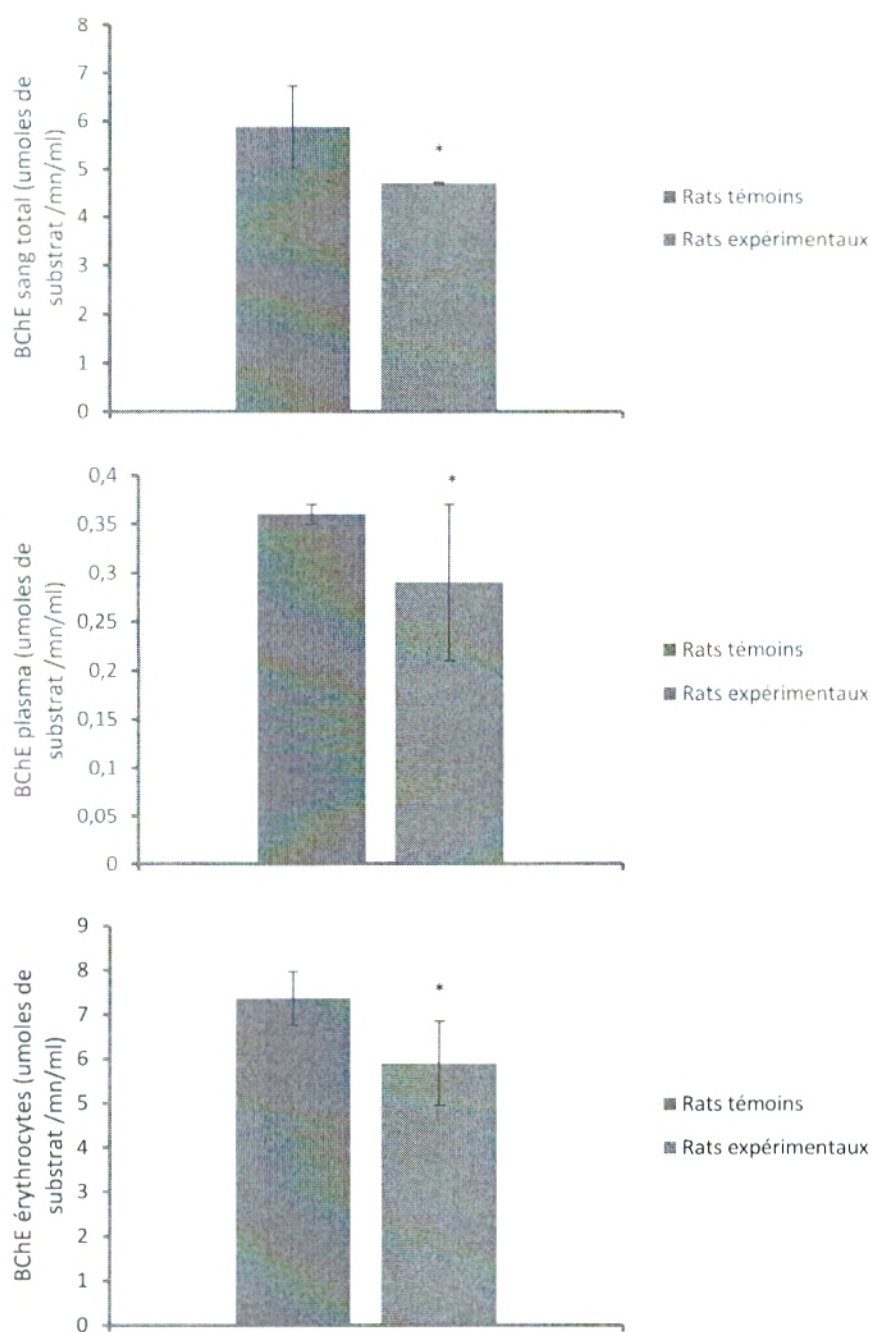
Au niveau cérébral les résultats ont montré une diminution significative de l'activité de la butyrylcholinesterase chez les rats traités par le pesticide. Par contre, les teneurs en protéines totales augmentent d'une manière très significative chez les rats expérimentaux par rapport aux témoins (**Figure 9, Tableau A3 en Annexe**)



**Figure 7** : Teneurs plasmatiques en transaminases (TGP TGO) et en phosphatases alcalines (PAL) chez les rats témoins et expérimentaux.

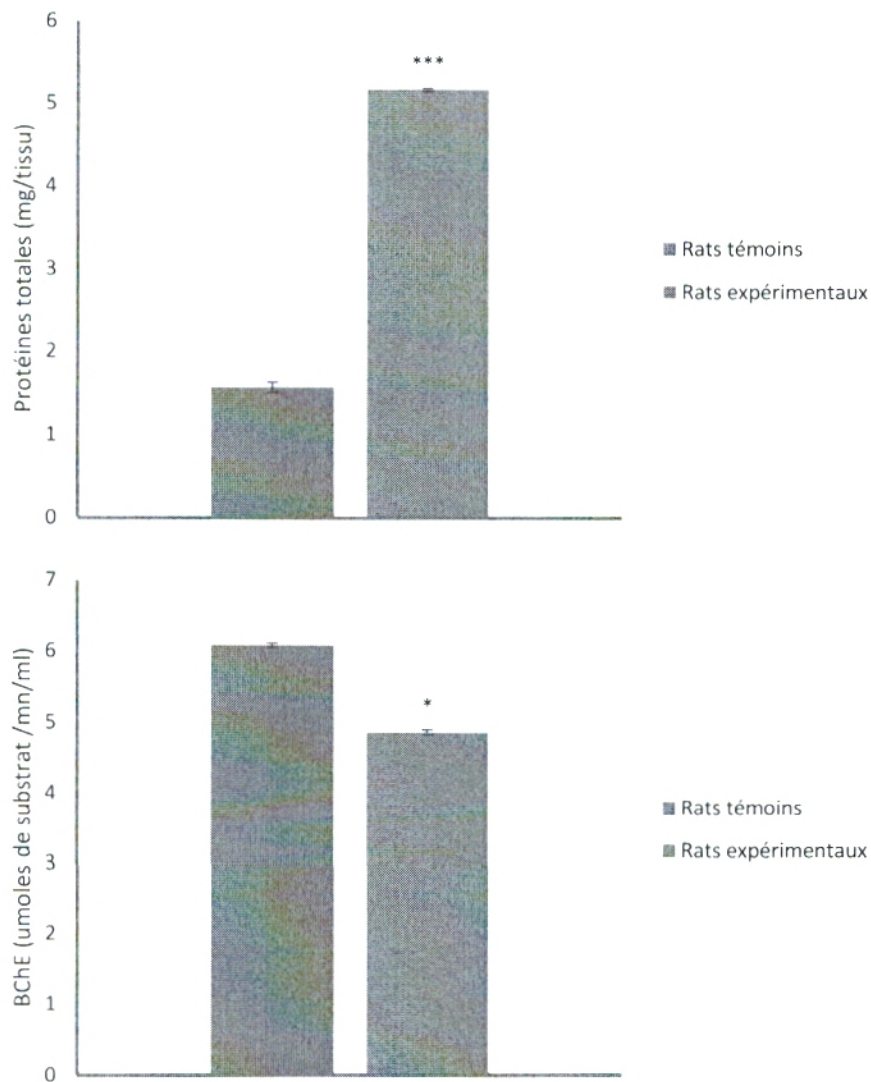
Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Ecart type. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et les rats expérimentaux est effectuée par le test "t" de Student après analyse de variance. \*  $p < 0,05$  différence significative

\*\* $p < 0,01$  différence très significative



**Figure 8** : activité de la butyrylcholinesterase en umoles de substrat /mn/ml) chez les rats témoins et expérimentaux.

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Ecart type. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et les rats expérimentaux est effectuée par le test "t" de Student après analyse de variance. \*  $p < 0.05$  différence significative



**Figure 9** : activité de la butyrylcholinesterase au niveau du cerveau (umoles de substrat /mn/ml) et teneurs en protéines totales (mg/tissu) chez les rats témoins et expérimentaux.

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Ecart type. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et les rats expérimentaux est effectuée par le test "t" de Student après analyse de variance. \*  $p < 0.05$  différence significative

\*\* $p < 0,01$  différence très significative, \*\*\* $p < 0.001$  différence très très significative



*Discussion*

---



La première utilisation des pesticides en agriculture date de l'antiquité. Leur développement a ensuite suivi celui de la chimie minérale. Les composés alors employés étaient des dérivés de composés minéraux ou de plantes comme par exemple, ceux à base d'arsenic, de cuivre, de zinc, de manganèse ou de sulfate de nicotine. Puis, à partir de la seconde guerre mondiale, les pesticides ont bénéficié du développement de la chimie organique.

L'exposition aux pesticides se fait pour une partie de la population via une profession (agriculteur ou famille d'agriculteur, manipulateur de produit), d'autre part la contamination de l'environnement peut aussi induire une exposition humaine par l'intermédiaire de la consommation des résidus de pesticides dans les aliments et l'eau potable (**OMS, 2010**).

Un récent rapport de la banque mondiale estime que 355.000 personnes dans le monde meurent chaque année d'empoisonnement involontaire dû à des pesticides (Weinberg, 2009). Le risque de pathologie résultant d'une exposition aux produits phytosanitaires est en grande partie supporté par les travailleurs agricoles, et l'incidence 114.3 /million travailleurs-an était 145 fois supérieure à celle de tous les autres travailleurs (**Lee et al. 2011**).

Les pesticides sont partout : eau, air, sol, mais aussi dans le corps humain (sang, cordon ombilical, lait maternel...). Ils se dégradent difficilement. Les pesticides sont toxiques, même en très faible quantité, pour les utilisateurs et la population (**Samuel et Laurent, 2001**).

Un grand nombre de pesticides peuvent causer le cancer, menacer la reproduction et avoir des effets néfastes sur les systèmes nerveux, immunitaire ou hormonal (**Garrido et al 2004 ; OIT, 2010**).

Les organophosphorés et les carbamates sont des composés souvent responsables d'intoxications aiguës. La tranche d'âge la plus touchée se situe entre 20 et 30 ans, avec une prédominance féminine pour les intoxications au carbamates et masculine pour les organophosphorés (**Biljana et al 2008**).

Parmi les organophosphorés on trouve le Chlorpyrifos [0,0-diethyl 0-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl) phosphorothioate] qui est un insecticide appliqué dans le

monde entier pour le contrôle de parasites agricoles et des moustiques. L'exposition humaine arrive par des résidus dans la nourriture, le contact de peau et la dispersion aérienne.

Dans notre étude, les rats expérimentaux ont reçu l'insecticide par gavage le chlorpyrifos à la dose DL50/10 pendant trois mois. Les paramètres à doser sont : les transaminases, les phosphatases alcalines et l'activité cholinestérasique.

Les cholinestérases sont des enzymes qui participent au fonctionnement du système nerveux central (cerveau et moelle épinière) et du système nerveux périphérique (nerfs et jonctions nerf-muscle ou nerf-glande). Il existe deux cholinestérases différentes dans l'organisme humain: l'acétylcholinestérase, retrouvée dans les globules rouges du sang, ainsi que dans les poumons, la rate, les terminaisons des nerfs et la substance grise du cerveau, et la pseudo-cholinestérase (butyrylcholinestérase) retrouvée dans le sérum sanguin mais aussi dans le foie, les muscles, le pancréas, le cœur, et la substance blanche cérébrale. L'acétylcholinestérase participe à une transmission correcte du courant nerveux en agissant à la jonction entre deux neurones par destruction de l'acétylcholine, une substance qui permet la transmission du signal aux extrémités des neurones (ou nerfs). Une diminution de l'activité de l'enzyme entraîne une augmentation d'acétylcholine à ces extrémités nerveuses. Cela peut entraîner une hyperstimulation (excitation) des nerfs de l'organisme.

Par ailleurs, les insecticides contenant des organophosphorés peuvent diminuer l'activité de la cholinestérase et pseudo-cholinestérase. Le dosage des cholinestérases sert à détecter une anomalie de ces enzymes due à des facteurs acquis ou suite à l'exposition aux pesticides (**Mégarbane. 2013**). En effet, les organophosphorés, très lipophiles, franchissent aisément toutes les barrières biologiques et se fixent de façon covalente aux cholinestérases de la jonction synaptique des fibres du système nerveux central. Ils se fixent également aux acétylcholinestérases érythrocytaires (AChE) et aux pseudo-cholinestérases du foie et du plasma.

Dans notre étude, Le chlorpyrifos à la dose DL50/10 chez les rats expérimentaux entraîne une diminution significative de l'activité de la butyrylcholinestérase au niveau de trois compartiments ; le sang total, plasma et érythrocytes par rapport aux rats témoins. Cette diminution concerne aussi bien pour l'activité de la butyrylcholinestérase au niveau du cerveau. Nos résultats sont en accord avec les auteurs cités précédemment. En effet, d'après ces auteurs ce sont des esters de l'acide phosphorique ou de l'acide thiophosphorique, représentés respectivement par le dichlorvos, cette famille d'insecticides a pour cible principale les acétylcholinestérases (toute espèces vivantes confondues) dont elle inhibe irréversiblement l'activité. Toute fois le mode d'action des organophosphorés est plus complexe, et d'autres effets sont régulièrement découverts, qui sont souvent liés au premier. Pour le principal effet c'est une Action toxique liée à l'inhibition des cholinestérases, enzymes présentes au niveau du SNC, muscles, globules rouges et plasma. Leur rôle est de détruire l'acétylcholine, libérée lors du passage de l'influx nerveux, L'enzyme est essentielle au contrôle normal de la transmission des impulsions nerveuses à partir de fibres nerveuses et musculaires lisses des cellules, les cellules glandulaires, ainsi que dans le système nerveux central (SNC). La perte de l'enzyme permet l'accumulation de l'ACh périphériquement au jonctions neurofacteurs (effets muscariniques), au niveau des jonctions nerf-muscle, ganglions et autonome (effets nicotiniques), ainsi centralement au niveau des jonctions nerveuses cholinergiques avec les muscles lisses et des cellules de la glande, la concentration élevée de ACh provoque la contraction musculaire, aussi l'excès d'ACh peut être excitatrices (cause secousses musculaires), mais aussi d'affaiblir ou de paralyser la dépolarisation de la cellule (**Thabet et al 2009 ; Worek et al, 2005**).

Une cellule hépatique, comporte au niveau de sa paroi les enzymes suivantes : la gamma GT, la phosphatase alcaline (PAL) et la 5'Nucléotidase. Ensuite au niveau du cytosol, se trouve l'ALAT majoritaire et l'ASAT. Le taux sanguin d'ALAT est logiquement élevé en cas de lyse des cellules du foie (cytolyse). C'est le cas lors des hépatites, qu'elles soient virales ou d'autres origines (**De Ritis et al., 1955**)

Les transaminases sont des enzymes ayant une activité métabolique importante à l'intérieur des cellules. Leur augmentation sérique reflète une lésion cellulaire en particulier au niveau hépatique, cardiaque, rénal ou musculaire. (**De Ritis et al 1955**).

La phosphatase alcaline (ou PAL) (EC 3.1.3.1) est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse d'une liaison ester monophosphate pour donner un ion phosphate et un groupement hydroxyle libre. Les phosphatases alcalines ont une spécificité de substrat faible et sont capables de retirer des groupements phosphates de nombreuses molécules, comme des nucléotides, des protéines ou autres. Ce processus est appelé déphosphorylation. Comme son nom l'indique, la phosphatase alcaline a une activité plus importante en milieu alcalin ( $\text{pH} > 7$ ). La PAL est présente chez de nombreux organismes des bactéries à l'homme, c'est aussi une enzyme fréquemment utilisée dans le domaine de la recherche (**Savova et Kirev 1992**).

Dans notre étude, les rats traités par chlorpyrifos à la dose DL50/10, les teneurs plasmatiques en transaminase (TGP, TGO) augmentent significativement par rapport aux rats témoins. Cette augmentation concerne aussi bien pour les teneurs plasmatiques en phosphatases alcalines, sont liés à la nécrose des hépatocytes par l'insecticide.

Les protéines sont des composés biologiques macromoléculaires, largement distribués dans l'organisme. Ils agissent comme des éléments structurels ou de transport. Les protéines du sérum sont le divisé en deux fractions, albumine et des globulines, La plupart sont fabriquées par le foie. Ils interviennent dans le transport de différentes substances dans le sang dont les lipides (acides gras), le fer ou de nombreux médicaments. Elles participent également à la coagulation du sang, aux défenses immunitaires ou au maintien de la pression sanguine (**Burtis et al 1999**). Leur dosage est utilisé pour évaluer l'état d'hydratation, l'état nutritionnel, le fonctionnement du foie, du rein ou différents états pathologiques tels qu'une inflammation ou une altération des défenses immunitaires. Les diminutions de la concentration de protéines totales dans le sang ou hypoprotidémies sont, soit dues à une carence d'apport (dénutrition), soit à un

défaut de synthèse (insuffisance hépatique), soit à une fuite anormale au niveau de la peau (brûlures étendues), au niveau du rein (syndrome néphrotique, glomérulonéphrites) (**Tietz et al 1995**).

Nos résultats ont montré une forte augmentation des teneurs en protéines totales au niveau du cerveau chez les rats expérimentaux par rapport aux témoins. En effet, certains pesticides comme le Lindane, l'Endosulfan, la Dieldrine et l'Eldrine peuvent entraîner une inhibition des récepteurs GABAergiques et une activation des récepteurs glutaminergiques dans les cellules neuronales de mammifères, induisant un syndrome d'hyperexcitabilité qui peut évoluer jusqu'à l'apparition de convulsions (**Sunol et al, 2008**). Ceci est lié probablement à la lyse neuronale signe de la maladie d'Alzheimer chez les personnes exposées aux pesticides.

Ces résultats préliminaires confirment la présence d'altérations de la fonction hépatique et inhibition de l'activité de la cholinestérase reflétant une neurotoxicité induite par l'insecticide le chlorpyrifos chez les rats wistar.



*Conclusion*

---

Le lien entre l'exposition aux pesticides et la santé est difficile à mettre en évidence. Cependant, de nombreuses études épidémiologiques ont soulevé l'existence possible d'un effet de ces polluants sur le système nerveux, la fertilité masculine et féminine, les altérations du système immunitaire, les troubles du comportement, l'augmentation de l'incidence de certains cancers, et plus récemment de certaines maladies métaboliques comme le diabète, l'obésité ou les maladies cardiovasculaires....

Quelle que soit la source d'exposition (Cutanée, respiratoire ou digestive), l'absorption d'un composé est facilitée par certaines propriétés chimiques, dont la taille et la lipophilie. Ainsi, les composés de l'environnement de faible poids moléculaire et très lipophiles vont pénétrer facilement dans l'organisme et atteindre la circulation sanguine, certains produits échappent au système de détoxification et se déposent dans les sites adipeux de l'organisme en particulier le tissu adipeux, en modulant les fonctions physiologiques ou le développement de ce tissu.

La présente étude a montré que l'exposition répétée aux organophosphorés a entraîné la détérioration des paramètres biochimiques de rats illustrant des changements pathologiques dans certains tissus tels que le foie et le cerveau.

Nous avons mis en évidence des perturbations de l'activité cholinestérasique chez les rats traités par le chlorpyrifos. En effet nos résultats ont montré une diminution considérable de l'activité de la BChE au niveau des érythrocytes, le sang total et au niveau du cerveau.

D'autre part nos résultats ont montré une augmentation des taux des transaminases (TGO, TGP) et la phosphatase alcaline dans le plasma et une augmentation du taux des protéines totales au niveau du cerveau chez les rats expérimentaux.

L'étude de la toxicité des insecticides organophosphorés serait donc d'un grand intérêt, tant pour la sante publique que pour aider à évaluer le réel rendement économique de ces substances.





**Tableau A1 :** Teneurs plasmatiques en transaminases (TGP TGO) et en phosphatases alcalines (PAL) chez les rats témoins et expérimentaux.

Paramètres	Rats témoins	Rats expérimentaux
TGO (UI)	56,62 ± 6,18	96,24 ± 2,02*
TGP (UI)	33,5 ± 1,64	68,89 ± 3,22**
PAL (UI)	93,60 ± 6,9	114,10 ± 4,2**

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart type. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et les rats expérimentaux est effectuée par le test "t" de Student après analyse de variance. \* p < 0.05 différence significative \*\*p<0,01 différence très significative

**Tableau A2 :** activité de la butyrylcholinesterase en umoles de substrat /mn/ml) chez les rats témoins et expérimentaux.

Paramètres	Rats témoins	Rats expérimentaux
Sang total	5,87 ± 0,86	4,7 ± 0,02*
plasma	0,36 ± 0,01	0,29 ± 0,08*
érythrocytes	7,36 ± 0,60	5,89 ± 0,95*

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart type. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et les rats expérimentaux est effectuée par le test "t" de Student après analyse de variance. \* p < 0.05 différence significative \*\*p<0,01 différence très significative

**Tableau A3 :** activité de la butyrylcholinestérase au niveau du cerveau (umoles de substrat /mn/ml) et teneurs en protéines totales (mg/tissu) chez les rats témoins et expérimentaux.

Paramètres	Rats témoins	Rats expérimentaux
Protéines totales	1,57 ± 0,06	5,17 ± 0,02***
BChE	6,08 ± 0,03	4.86± 0,04*

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart type. La comparaison des moyennes entre les rats témoins et les rats expérimentaux est effectuée par le test "t" de Student après analyse de variance. \* p < 0.05 différence significative \*\*p<0,01 différence très significative



**Références**  

---

*Bibliographiques*

1. ACTA. (2005). Index phytosanitaire , Association de Coordination de Technique Agricole
2. Agrawal A, Sharma B (2010). Pesticides induced oxidative stress in mammalian systems: a review. *Int. J. Biol. Med. Res.* 1: 90 -104.
3. Andreescu S. (2002). Biocapteurs à acetylcholinesterase pour la détection sensible et spécifique des insecticides organophosphorus. Thèse de doctorat de l'université de Perpignan.
4. Andreescu S., Barthelmebs L., Marty J-L. (2002). Immobilisation of AChE on screen-printed electrodes; Comparative study between three immobilisation methods; Applications to the detection of organophosphorus insecticides. *Anal. Chim. Acta.*, 464, 171-180.
5. Astiz M, de Alaniz MJ, Marra CA (2009). Effect of pesticides on cell survival in liver and brain rat tissues. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72: 2025-2032.
6. Badiou, A. (2007). Caractérisation Cinétique et Moléculaire du Biomarqueur Acétylcholinestérase chez l'Abeille, *Apis mellifera*. Thèse de doctorat de l'université de Paul Cézanne.
7. Bakke, J. E., and Price, C. E. (1976). Metabolism of O,O-dimethyl-O-(3,5,6-trichloro-2- pyridyl) phosphorothioate in sheep and rats and of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in sheep. *J Environ Sci Health B* 11, 9-22.
8. Baldi I, Lebailly P (2007). Cancers and pesticides. *Rev. Prat.* 57: 40-44.
9. BEN OUJJI 2012 , Développement de biocapteurs enzymatiques associés à des polymères à empreinte moléculaire (MIPs) pour la détection sélective et sensible des organophosphorés utilisés en oléiculture . THÈSE Présentée pour obtenir le grade de DOCTEUR de l'Université Ibn Zohr d'Agadir et de l'Université Via Domitia de Perpignan
10. Benzine M (2006). Les pesticides : toxicite, résidus et analyse. *J. Techn. Lab.* 1: 18-23.
11. Biljana A, Safiyya MA, Sin Eng C. Interethnic variability of plasma paraxonase (PON1) activity towards organophosphates and PON1 polymorphisms among Asian populations: A short review. *Ind Health* 2008;46:309-17.
12. Bismuth C. Armes chimiques. description et risques toxiques. *Reanim Urg* 1993;2:625-33.

13. Bouziani M., (2007). L'usage immodéré des pesticides. De graves conséquences sanitaires. Le guide de médecine et de la santé. Santémaghreb. [Consulté le, 11/12/2011].  
<http://www.santetropicale.com/santemag/algerie/poivue51.htm>.
14. Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
15. Cardon N, Vaillant C, Cren P, Gruffat B, Rappold JP, Corbé H (2005), Intoxication aiguë au pesticide organophosphoré et activités des cholinestérases Annales de Biologie Clinique. 63, N°3, 329-34,
16. Camard JP, Magdelaine C (2010). Produits phytosanitaires risques pour l'environnement et la santé: connaissances des usages en zone non agricole. Institut d'aménagement et d'urbanisme, Observatoire regional de santé d'île-de-France (IAU/ ORS). 58p.
17. Campoy, C., Jimenez, M., Olea-Serrano, M.F., Moreno Frias, M., Canabate, F., Olea, N., Bayés, R. et Molina-Font, J.A., (2001). Analysis of organochlorine pesticides in human milk: preliminary results. Early Hum dev. 65 Suppl; S 183-190;
18. Casas E, Bonilla E, Ducolomb Y, Betancourt M (2010). Differential effects of herbicides atrazine and fenoxaprop-ethyl, and insecticides diazinon and malathion, on viability and maturation of porcine oocytes in vitro. Toxicol in Vitro. 24: 224-30.
19. CEC (2002). Making the environment Healthier for Our Kids-An overview of environmental challenges to the health of North America's children.
20. Commission of the European Communities, (2007). Monitoring of pesticides residues in products of plant origin in the European Union, Norway, Iceland and Liechtenstein 2005.
21. Costa, L. G. (2006). Current issues in organophosphate toxicology. *Clin Chim Acta* 366, 1-13
22. CPP, (2002). Risques sanitaires liés à l'utilisation des produits phytosanitaires. Comité de la Prévention et de la Protection. <http://www.ecologie.gouv.fr/PPP-Rapport-2002-02-Risques.html>
23. Dahoun -Tchoulak Y, Moussaoui K M (2003). Utilisation des pesticides en Algérie : enquêtes et analyse. Organisation de la recherche biomédicale et en sante en Algérie. Activités de l'agence nationale pour le développement de la recherche en santé (ANDRS).169p.

24. De Ritis F, Coltorti M, Giusti G (1955). Transaminase activity of the blood in viral hepatitis. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1955; 31: 394-396
25. EEA, and WHO, E. (2002). *Children's Health and Environment: A review of evidence.*
26. Eldefrawi A. T. (1985). Acetylcholinesterases and anticholinesterases. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (G. A. Kerkut and L. I. Gilbert, eds.), pp. 115-130. Pergamon Press, Oxford.
27. Elisabeth, L. (2008). *Matériaux mésomorphes à empreinte moléculaire pour le développement d'un capteur de pesticides. Thèse de doctorat de l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*
28. Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V. Jr., et Featherstone R. M. (1961), A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology.*
29. Fenichel P, Brucker-Davis F (2008). Breast risk cancer and environmental endocrine disruptors. *Gynecol. Obstet. Fertil.* 36: 969-977.
30. Fournier, J. (1988). *Chimie des pesticides, Cultures et Techniques, Nantes*
31. Gallivan J. P. et Dougherty D. A. (1999). Cation- $\pi$  interactions in structural biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 9459-64.
32. Garrido Frenich, A., Martínez Vidal J.L., López López T., Cortés Aguado S., Martínez Salvador I., *J. Chrom. A*, 1048 (2004) 199-206.
33. ID EL MOUDEN OMAR 2010 , *Quantification des résidus de pesticide sur la tomate et le poivron et l'étude de la dégradation de difenoconazole sous l'effet de photo-oxydants atmosphériques à l'interface solide /gaz. Thèse en Co-tutelle Présentée à l' Ecole Nationale des Sciences Appliquées d'Agadir pour obtenir le grade de : Docteur en Sciences*
34. Idrissi M, Ait Daoud N, Ouammi L, Rhalem N, Soulaymani A, Soulaymani Bencheikh R (2010). Intoxication aigue par les pesticides : données du centre anti poison du Maroc. *Toxicologie Maroc-N°4-1er trimestre.* 5.
35. Istamboulie, G. (2009). *Biocapteur associant l'acétylcholinestérase et la phosphotriestérase pour un contrôle environnemental des insecticides organophosphorés. Thèse de doctorat de l'université de Perpignan.*

36. Jalady AM et Dorandeu F (2013) Intérêt du dosage des cholinestérases dans le cadre des intoxications aux organophosphorés ; *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* 32 : 856–862
37. Joseph G. Grzywacz, Sara A. Quandt, Quirina M. Vallejos and Lara E. Whalley, Haiying Chen and Scott Isom, Dana B. Barr, Thomas A. Arcury(2011). Job Demands & Pesticide Exposure among Immigrant Latino Farmworkers. *J Occup Health Psychol.* v. 15(3): 252–266. PMC2913248.
38. Jurewicz, J., Hanke, W., Johansson, C., Lundqvist, C., Ceccatelli, S., van den Hazel, P.,Saunders, M., and Zetterstrom, R., 2006. Adverse health effects of children's exposure to pesticides: what do we really know and what can be done about it. *Acta Paediatr Suppl.* 95(453); 71-80.
39. Kamrin, M. A. (1997). Environmental risk harmonization: federal/state approaches to risk assessment and management. *Regul Toxicol Pharmacol* 25, 158-165
40. Karami-Mohajeri S, Abdollahi M (2011). Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: a systematic review. *Hum. Exp. Toxicol.* 30: 1119-1140.
41. Kryger, G., Silman I., Sussman J. L. (1999). Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept®): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Structure*, 7, 297-307.
42. Kumar V, Yadav CS, Singh S, Goel S, Ahmed RS, Gupta S, Grover RK, Banerjee BD (2010). CYP 1A1 polymorphism and organochlorine pesticides levels in the etiology of prostate cancer. *Chemosphere.* 81: 464-8.
43. Lackmann, G. M., Schaller, K. H., and Angerer, J., 2004. Organochlorine compounds in breast-fed vs. bottle-fed infants: preliminary results at six weeks of age. *Sci Total Environ.* 329(1-3); 289-293.
44. Lauwerys RR. Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles : Insecticides organophosphorés. – 4e édition. Paris : Masson, 1999 ; pp. 774-782.
45. Lebailly P, Bouchart V, Baldi I, Lecluse Y, Heutte N, Gislard A, Malas JP (2009). Exposure to pesticides in open-field farming in France. *Ann. Occup. Hyg.* 53: 69-81.
46. Lee Soo-Jeong, Louise mehler, John Beckman, Brienne Diebolt-Brown, Joanne Prado, Michelle Lackovic, Justin Waltz, Prakash Mulay, Abby Schwartz, Yvette

- Mitchell, Stephanie Moraga-McHaley, Rita Gergely, et Geoffrey M. Acute Pesticide Illnesses Associated with Off-Target Pesticide Drift from Agricultural Applications: 11 States, 1998–2006 *Environ Health Perspect.* 2011 August; 119(8): 1162–1169.
47. Liz Highleyman et Alan Franciscus (2004). Une série de fiches de renseignements rédigées par des experts en matière de maladies du foie. Hepatitis C Support Project HCSP • VERSION 1.0.
48. Lotti, M., (1995). Cholinesterase inhibition: complexities in interpretation. *Clin. Chem.*, vol. 41 no. 12 1814-1818.
49. Lu, C., Barr, D. B., Pearson, M. A., and Waller, L. A., 2008. Dietary intake and its contribution to longitudinal organophosphorus pesticide exposure in urban/suburban children. *Environ Health Perspect.* 116(4); 537-542.
50. Lu, C., Toepel, K., Irish, R., Fenske, R. A., Barr, D. B., and Bravo, R., 2006. Organic diets significantly lower children's dietary exposure to organophosphorus pesticides. *Environ Health Perspect.* 114(2); 260-263.
51. Luc Multigner (2005). Effets retardés des pesticides sur la santé humaine. *Environnement, Risques & Santé*. Vol. 4, n° 3, 187-94, Synthèse (INSERM), U 625, Campus de Beaulieu, Université Rennes 1, Avenue Général Leclerc, 35042 Rennes cedex.
52. Lejus C, Blanloeil Y, Burnat P, Souron R. Les Cholinestérases. *Ann Fr Anesth Reanim* 1998;17:1122–35.
53. Marcel V., Palacios L.G., Pertuy C., Masson P., Fournier D. (1998). Two invertebrate acetylcholinestérase show activation followed by inhibition with substrate concentration. *Biochem. J.*, 329, 329-334.
54. Martin Catala, Jean-Michel Andre, Cherardi R, Jacques Poirier (2008). *Histologie : organes, systèmes et appareils*. Université Pierre et Marie Curie. Service d'Histologie - Embryologie. pp109-122.
55. Matozzo V, Tomei A, Marin M.G. (2005). Acetylcholinesterase as a biomarker of exposure to neurotoxic compounds in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Mar. Pollut. Bull.* 50: 1686–1693.
56. Mégarbane B Mesure de l'activité des cholinestérases pour intoxication par un composé organophosphoré ; *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* 32 (2013) 825–826



57. 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 de l'Institut National Polytechnique de Toulouse.
58. Mitra A, Chatterjee C, Mandal, FB (2011). Synthetic chemical pesticides and their effects on Birds. *J. Environ. Toxicol.* 5: 81-96.
59. Moisan F, Elbaz A (2011). Maladie de Parkinson et exposition aux pesticides. *Environ. Ris. Sant.* 10: 372-384.
60. Narbonne J -F (2008). Pesticides and health. *Sci. Alim.* 28: 213-221.
61. OIT, Organisation internationale du Travail Emerging risks and new patterns of prevention in a changing world of work. ISBN 978-92-2-123342-8 Genève, 2010.
62. OMS, Organisation Mondiale de la Santé 2010 prévenir la maladie grâce à un environnement sain.
63. Onil samuel et Louis Saint-Laurent 2001 guide de prévention pour les utilisateurs de pesticides en agriculture maraichère ; Institut de recherche en santé et en sécurité du travail du Québec
64. P. Cherina ; E. Voronskab, N. Fraouceneb, C. de Jaegerb Toxicité aiguë des pesticides chez l'homme ; *Médecine & Longévité* ; Volume 4, Issue 2, June 2012, Pages 68–74
65. Penel N, Vansteene D (2007). Cancers and pesticides: current data. *Bull. Cancer.* 94: 15-22.
66. Quandt ,Sara A., Haiying Chen, Joseph G. Grzywacz, Quirina M. Vallejos, Leonardo Galvan, and Thomas A. Arcury(2010). Cholinesterase Depression and Its Association with Pesticide Exposure across the Agricultural Season among Latino Farmworkers in North Carolina. *Environ Health Perspect.* v. 118(5): 635–639. PMC2866678
67. Reguieg-Issaad, 2013 Alerte aux pesticides périmés ; <http://www.liberte-algerie.com/algerie-profonde/alerte-aux-pesticides-perimes-oran-195981>
68. Remy, M.H., Frobert Y., Grassi J. (1995). Characterization of monoclonal antibodies that strongly inhibit *Electrophorus electricus* acetylcholinesterase. *J. Biochem.*, 231,651-658

69. Rhalem N, Khattabi A, Achour S, Soulaymani A, Soulaymani Bencheikh R (2009). Facteurs prédictifs de gravité de l'intoxication aux pesticides : expérience du Centre Antipoison du Maroc. *Ann. Toxicol. Anal.* 21: 79-84.
70. Rosenberry T. L. (1975). Acetylcholinesterase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 43, 103-218.
71. Samuel O., St-Laurent L, Direction de la toxicologie humaine, Institut national de santé publique du Québec, Publication de l'IRSST, Rapport RG-273, 87 pages, 2001.
72. Saunders, M., Fox, D., Salisbury, C., Strokes, V., Palmer, A., and Preece, A., 2004. Placental transfer and foetal uptake of pesticides. *Toxicology and applied pharmacology.* 197(341).
73. Savova M et Kirev T Alkaline phosphatase activity in serum of guinea fowl bearing bone tumours induced by osteopetrosis virus strain PTS-56. *Avian Pathol.* 1992 ;21(4):667-73.
74. Soso A.B., Barcellos L.J.G., Ranzani-Paiva M.J., Kreutz L.C., Quevedo M.R., Anziliero D., Limna M., Bolognesi da Silva L., Ritter F., Bedin A.C. and Finco J.A., 2007. Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23 : 308-313
75. Stéphanie T (2006). Les pesticides en milieu agricole : état de la situation environnementale et initiatives prometteuses. Direction des politiques en milieu terrestre, Service des pesticides, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs. 90 p.
76. Sussman, J. L., Harel M., Frolov F., Oefner C., Goldman A., Toker L. et Silman I. (1991). Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science.* 253, 872-9.
77. Thabet H, Brahmi N, Kouraïchi N, et al. Intoxications par les pesticides organophosphorés : nouveaux concepts. *Réanimation* 2009;18,7: 633 -9.
78. Tietz N W et al. *Clinical Guide to Laboratory Tests*, 3rd ed AACC 1995.
79. WHO Classes (The World Health Organisation recommended classification of pesticides by hazard, 2004)
80. Worek F, Koller M, Thiermann H, Szincz L. Diagnostic aspects of organophosphate poisoning. *Toxicology* 2005;214:182-9.

## Résumé :

Les intoxications aiguës par les pesticides organophosphorés (OP) sont responsables d'une lourde mortalité mondiale, en particulier dans les pays en voie de développement à fort potentiel agricole. Ces produits OP sont responsables d'intoxications de gravité variable selon la nature du composé et des quantités ingérées. Le présent travail porte sur l'étude de l'effet de la toxicité sur l'activité cholinestérasique et quelques paramètres de la fonction hépatique chez les rats mâles Wister gavés par l'insecticide « le chlorpyrifos ». Les rats adultes reçoivent pendant trois mois le chlorpyrifos par gavage à la dose DL50/10. A la fin de l'expérimentation le sang est récupéré pour déterminer l'activité de la butyrylcholinestérase et les paramètres de la fonction hépatique. Le cerveau est prélevé pour l'activité de la butyrylcholinestérase cérébrale et le dosage des protéines. Nos résultats montrent que le chlorpyrifos induit une augmentation des teneurs en transaminases et en phosphatases alcalines reflétant un dysfonctionnement de la fonction hépatique. De plus, une inhibition des cholinestérases sanguine et cérébrale, avec une augmentation des teneurs en protéines cérébrale reflétant une neurotoxicité chez les rats suite à l'exposition au chlorpyrifos.

Mots clés ; insecticide, rat, activité de la cholinestérase, paramètres biochimiques

## Abstract :

The aiguës poisonings by organophosphate pesticides are responsible for a heavy world mortality. In particular in developing countries with great agricultural potential, these products are responsible for poisonings of variable gravity according to the nature of the compound and the ingested quantities. The present work concerns the study of the effect of the toxicity on the cholinesterase activity and some parameters of the hepatic function of the male Wister rats filled up by the insecticide << Chlorpyrifos >>. The adult rats receive during three months the chlorpyrifos Has the dose DL50/10 by force-feeding. At the end of the experiment the blood is got back to determine the activity of the butyrylcholinesterase and the parameters of the hepatic function. The brain is taken for the activity of the cerebral butyrylcholinesterase and the dosage of proteins. Our results show that the chlorpyrifos leads an increase of the contents of transaminases and in alkaline phosphatases reflecting a dysfunction of the hepatic function, furthermore, an inhibition of the blood and cerebral cholinesterases with an intellectual increase of protein contents reflecting a neurotoxicity to rats further to the exhibition to the chlorpyrifos.

Keywords; insecticide, rat, cholinesterase activity, biochemical parameters

## ملخص :

التسممات الحادة بالمبيدات الفوسفورية عضوية مسؤولة عن حصيلة ثقيلة للوفيات في العالم، خاصة في الدول النامية ذات مستوى زراعي مرتفع، تلك المواد فوسفورية عضوية مسؤولة عن تسممات مختلفة الخطورة وفق طبيعة المادة والكمية المتناولة. العمل الحالي يهتم بدراسة تأثير التسمم على وظيفة الكولين استيراز و بعض معايير وظائف الكبد عند الفئران ويستار زقت بمبيد الحشرات <<الكلوربيريفوس>>. الفئران البالغة حصلت لمدة 3 أشهر على الكلوربيريفوس DL50/10 بواسطة التزقيم، في نهاية التجربة يتم استرجاع الدم من أجل تحديد نسبة عمل البييتيريل كولين استيراز ومعايير وظائف الكبد. يسترجع الدماغ أيضا لتحديد نسبة عمل البييتيريل كولين استيراز الدماغية و تحديد كمية البروتينات. نتائجنا أظهرت أن الكلوربيريفوس يسبب ارتفاع كمية الترانزاميناز والفوسفاتيز القلوية هذا يعكس خلل في وظيفة الكبد بالإضافة الى كبح الكولين استيراز الدموية والدماغية مع ارتفاع في كمية البروتينات الدماغية هذا يعكس وجود حالة تسمم عصبي عند الفئران بعد تعرضها للكلوربيريفوس.

الكلمات الدلالية؛ مبيد الحشرات، فأر، وظيفة الكولين استيراز، المعايير البيوكيميائية