



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur

Et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEM

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 chlorpyrifosur quelques marqueurs du statut oxydant/antioxydant chez le rat wistar

Présenté par : Ouahiani Mouaâdh

Soutenu le : 8 juin 2014

Présidente : Mme MERZOUK H.

Promotrice : Mme BOUANANE S.

Examineur : Mme BABA-AHMED FZ.

devant le jury composé de :

Professeur, Université de Tlemcen

Maître de conférences, U. Tlemcen

Maître de conférences, U. Tlemcen

Année Universitaire : 2013-2014

Remerciements

Je témoigne que c'est par la grâce de Dieu le tout puissant et miséricordieux, d'aide incessante, qu'il m'a porté et d'orientation imminente qu'il m'a accordé pour achever ce travail.

Mes sincères remerciements s'adressent :

À mon encadreur Mme BOUANANE S., Maitre de conférences à l'Université de Tlemcen, pour son attention, générosité scientifique et compréhension. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma haute considération et de mon profond respect.

A Mme MERZOUK H., Professeur à l'Université de Tlemcen, de l'intérêt qu'elle a porté à mon travail en acceptant de présider le jury. Recevez mon profond respect.

Je remercie aussi Mme BABA AHMED FZ., Maitre de conférences à l'Université de Tlemcen, qui m'a fait l'honneur d'examiner mon travail. Recevez mon profond respect.

Je remercie aussi tous ceux qui mon aider de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.

LISTE DES ABREVIATIONS

AChE : acétylcholinestérases.

ADN : acide désoxyribonucléique.

ALT : alanine aminotransférase.

AST : aspartate aminotransférase.

CAT Ery: Catalase érythrocytaire.

CAT : catalase.

CuZn : cuivre/zinc.

DDT : dichlorodiphényltrichloréthane.

DL : dosage létale.

DNPH: Di NitroPhényl Hydrazine.

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique.

EOA: Espèces Oxygénées Activées.

ERO : espèces réactives de l'oxygène.

FAO: Food and agriculture organization of the united nations (Organisation d'alimentation et d'agriculture des nations unies)

GPx : glutathion peroxydase.

GSH: glutathion réduit.

GSHPX : glutathion peroxydases.

GSSG : Glutathion disulfure.

GST: glutathion transférase.

H⁺ : ion hydrogène.

H₂O₂: peroxyde d'hydrogène.

HCl : acide chlorhydrique.

HCl⁻ : anion chlorhydrique.

HO₂^o : radical hydroperoxyde.

INRA : Institut national de la recherche agronomique.

MDA Ery: Malondialdéhyde érythrocytaire.

MDA Pla: Malondialdéhyde plasmatique.

MDA: malondialdéhyde.

Mn-SOD: Superoxyde dismutase à manganèse.

NADPH oxidase: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase.

NO•: Monoxyde d'azote.

ONOO- : peroxydinitrite.

O₂•- : Anion superoxyde.

O₂•- : ion superoxide.

O₂^{°-}: anion superoxide.

OCl- : anion hypochlorite.

•OH: radical hydroxyle.

OH°: Radical hydroxyle.

OH•: Radical hydroxyle.

OMS : Organisation mondiale de la Santé.

ONOO- : peroxydinitrite.

-OOH : hydroperoxydes.

OP : organophosphorés.

PC Ery: Protéines carbonylées érythrocytaires.

PC Pla: Protéines carbonylées plasmatiques.

PC: Protéines Carbonylées.

ROS: Reactive oxygen species.

SH: Groupement thiol.

SOD: superoxyde dismutase.

SS : disulfure.

TBA: Acide Thio Barbiturique.

TCA: Acide Tri Chloroacétique.

Ti O S04: Titanium Oxyde Sulfate.

TNB: Acide thionitrobenzoïque.

Tyr hydroxylée: tyrosine hydroxylée.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
Etat actuel	
1- Les Pesticides	3
1-1-définition	3
2- Classification des pesticides	4
3- Toxicité des pesticides	5
3-1-Les voies d'exposition aux pesticides	5
3-2-Toxicité aiguë	6
3-3- Intoxications chroniques	6
4-Les effets des pesticides sur la santé.....	7
4-1- Atteintes neurologiques	7
4-2- Troubles comportementaux et psychiques	7
5- Généralités sur les organophosphorés.....	7
5-1- Structure chimique et classification des OP.....	7
5-2- Le chlorpyrifos.....	9
6- Stress oxydatif	9
6-1- Définition.....	9
6-2- Les espèces réactives de l'oxygène (ERO).....	10
6-2-1-Nature des ERO.....	11
6-2-2- Le système de défense antioxydante	11
6-3- Antioxydants enzymatiques	14
6-3-1- Les superoxydes dismutases (SOD).....	14
6-3-2- Les catalases.....	14
6-3-3- Les glutathion peroxydases (GSHPX).....	14
6-4- Antioxydants non enzymatiques.....	16
6-4-1- Vitamine E.....	16
6-4-2- Vitamine C (acide ascorbique)	16
6-4-3- carotène.....	16
6-4-4- Glutathion.....	16
6-5- Mesure de la capacité antioxydante.....	17
7- Les marqueurs biologiques du stress oxydatif	17
7-1- Les marqueurs de peroxydation lipidique	17
7-2-Les marqueurs d'oxydation des protéines	18
8- Stress oxydant et pesticides.....	18
MATERIEL ET METHODES	
1-Protocole expérimental.....	20

1-1-Choix d'animaux	20
1-2-Régimes.....	20
1-3-Sacrifices et prélèvement sanguin.....	20
2-Détermination du statut oxydant/ antioxydant.....	21
2-1-Dosage du malondialdéhyde (MDA).....	21
2-2-Détermination des protéines carbonylées.....	21
2-3-Détermination de l'activité des enzymes antioxydantes érythrocytaires.....	21
2-3-1-Dosage de l'activité de la catalase (Méthode d'Aebi, 1974).....	21
2-3-2-Dosage du Glutathion réduit (GSH) (Méthode d'Ellman, 1959).....	22
3-Analyse statistique.....	22

RESULTATS ET INTERPRETATION

1- Marqueurs du statut oxydant/antioxydant chez les rates témoins et les rates expérimentales.....	23
1-1- Marqueurs du statut oxydant chez les rates traitées par le chlorpyrifos à la dose DL50/25 comparées aux rates témoins.....	23
1-1-1-Teneurs en malondialdéhyde (MDA) plasmatique et érythrocytaire.....	23
1-1-2- Teneurs en protéines carbonylées (PC) plasmatiques et érythrocytaires.....	23
1-2- Marqueurs du statut antioxydant chez les rates traitées par le chlorpyrifos à la dose DL50/25 comparées aux rates témoins.....	23
1-2-1- Evaluation de l'activité de la catalase (CAT) érythrocytaire.....	23
1-2-2- Teneurs en glutathion réduit (GSH) érythrocytaire.....	23
DISCUSSION.....	27
CONCLUSION.....	29
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	30
ANNEXES.....	39

LISTE DES TABLEAUX

Tableau1 : Les principales familles des insecticides, herbicides et des fongicides.....	6
---	---

Tableaux en annexes

Tableau A1 : Marqueurs du statut oxydant (MDA, protéines carbonylées plasmatiques et érythrocytaires) chez les rates témoins et les rates expérimentales (DL 50/25 de chlorpyrifos).....	39
Tableau A2 Marqueurs du statut antioxydant érythrocytaire (Activité de la catalase, le glutathion réduit).....	39

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure commune aux esters organophosphorés.....	8
Figure 2 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie.....	12
Figure 3 : balance entre antioxydants et pro – oxydants	13
Figure 4 : les principales étapes de production des espèces réactives de l'oxygène.....	15
Figure 5 : Teneurs en MDA érythrocytaire et plasmatique chez les rates témoins et expérimentales.....	24
Figure 6 : Teneurs en protéines carbonylées érythrocytaires et plasmatiques chez les rates témoins et expérimentales.....	25
Figure 7 : Activité de la catalase et teneurs du GSH érythrocytaire chez les rates témoins et expérimentales.....	26

Introduction

L'utilisation des pesticides est un problème majeur de santé publique, tuant au moins 250-370,000 personnes chaque année. (**Bocquené et al., 2005 ; Eddleston et al., 2012**).

Les pesticides sont des contaminants ou des facteurs de risques les plus dangereux, ils peuvent aussi entraîner les maladies cardiovasculaires, l'obésité et le diabète sucré... (**Abdel-Rahim et al., 2009**).

Les produits phytosanitaires ou pesticides sont utilisés contre différents types d'agresseurs qui peuvent être des virus, des bactéries, des champignons, des plantes (mauvaises herbes), des invertébrés (exemple : insectes, acariens, nématodes) et des vertébrés (exemple : rongeurs, oiseaux). Les pesticides sont regroupés en trois grandes familles, les herbicides, les insecticides et enfin les fongicides (**Bonnemain, 2002**). Ces trois classes représentent respectivement 47%, 29% et 18%. Cette répartition est en fonction des zones géographiques ; ainsi en France, les pourcentages respectifs s'établissent respectivement à 38, 10 et 40% pour un chiffre d'affaire de 2 milliards d'euros. Au cours de ces dernières années, les ventes des produits phytosanitaires ont légèrement baissé et une forte restructuration de l'agrochimie s'est opérée.

Les études épidémiologiques montrent aussi les personnes exposées aux pesticides ont plus de risque de développer de nombreuses maladies telles que le cancer, les malformations congénitales, les problèmes d'infertilité, les problèmes neurologiques ou encore un système immunitaire affaibli (**Baldi et Lebailly, 2007**).

Les intoxications aiguës par les pesticides de classe organophosphorés (OP) sont responsables d'une lourde mortalité mondiale, en particulier dans les pays en voie de développement à fort potentiel agricole. Ces intoxications sont à une fréquence avoisinant trois millions d'intoxications par an dans le monde entier et une mortalité de l'ordre de 200 000 personnes par an (**Thabet et al., 2009**).

L'action des organophosphorés sur la synapse cholinergique entraîne une inhibition des cholinestérases, et comporte classiquement trois syndromes : muscarinique, nicotinique et encéphalique (**Thabet et al., 2009**).

L'intoxication aiguë par les insecticides organophosphorés est de pronostic variable selon le mode d'absorption (inhalation, ingestion, ou passage transcutané), la nature des produits et les quantités absorbées et bien sûr selon la qualité et la quantité ou la dose du pesticide utilisé (**Landier et al., 1995**).

Les organophosphorés peuvent provoquer des complications respiratoires et des

complications cardiaques qui sont plus rares mais très graves. Cette complication peut survenir précocement ou dans un délai de 15 jours après l'intoxication et représente la cause essentielle du décès tardif et inexplicable au cours de ces intoxications (**Alaoui Mdaghri et al., 2010**).

Le pesticide organophosphoré le plus utilisé dans le monde est le chlorpyrifos [O, O -diéthyl -O- (3, 5, 6 -trichloro- 2-pyridyl) - phosphorothioate]. C'est un composé largement utilisé comme insecticide. Le chlorpyrifos, comme les autres composés organophosphorés, est connu pour produire des effets toxiques par l'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE) (**FilizDemir et al., 2011**).

Les pesticides en général et le chlorpyrifos en particulier possèdent la capacité de l'augmentation du stress oxydatif grâce à l'augmentation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (**RiadhBadraoui et al., 2007**). L'augmentation du stress oxydatif, cause pour les différentes pathologies, est le résultat de déséquilibre entre les oxydants (malondialdéhyde (MDA), les hydroperoxydes (ROOH), les protéines carbonylées), et les antioxydants (qui neutralisent ROS tels que la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase, le glutathion réduit, et la catalase (**Badraoui et al., 2007**)).

L'objectif principal de cette étude a porté sur la détermination de l'effet du gavage du rat Wistar par le chlorpyrifos à une dose de DL50/25 sur quelques marqueurs du statut oxydant/antioxydant. Les paramètres déterminés sont : le malondialdéhyde, les protéines carbonylées, le glutathion réduit et l'activité de la catalase.

1- Les Pesticides :

1-1- Définition :

Les pesticides sont des produits ou des substances chimiques, biologiques destinés à détruire les organismes vivants considérés comme nuisibles (animaux, plantes, bactéries et champignons) (**Zeliger, 2011**). Ce sont des substances xéno-biotiques utilisées en agriculture (**Fdil, 2004**).

Le Code international , de conduite pour la distribution et l'utilisation des pesticides , définit ainsi les pesticides comme toute substance ou association de substances qui est destinée à repousser, détruire ou combattre les ravageurs, y compris les vecteurs de maladies humaines ou animales, et les espèces indésirables de plantes ou d'animaux causant des dommages ou se montrant autrement nuisibles durant la production, la transformation, le stockage, le transport ou la commercialisation des denrées alimentaires, des produits agricoles, du bois et des produits ligneux, ou des aliments pour animaux, ou qui peut être administrée aux animaux pour combattre les insectes, les arachnides. (**FAO, 2003**). Actuellement, les pesticides sont séparés en deux groupes, selon leurs utilisations:

Les pesticides à usage agricole ou produits phytopharmaceutiques : désignent les substances chimiques minérales ou organiques, de synthèse ou naturelles. Ces produits sont utilisés pour la protection des végétaux contre les maladies et les organismes nuisibles.

Les pesticides à usage non agricole ou biocides : qui sont similaires aux premiers, utilisés par exemple en hygiène publique (lutte anti-vectorielle) et dans d'autres applications comme la conservation du bois, la désinfection, ou certains usages domestiques.

Les pesticides se présentent sous diverses formes (poudres, granulés, émulsions, préparations micro-encapsulées, aérosols...). Parmi les solvants utilisés pour la formulation ou lors de l'utilisation des pesticides, certains sont parfois plus toxiques que les pesticides utilisés ; de plus, certains résidus de pesticides sont également plus toxiques que les pesticides dont ils sont issus. Les pesticides peuvent être utilisés seuls ou en association (**Cemagref, 2005**).

2 -Classification des pesticides :

Les pesticides se répartissent en près de 150 familles chimiques et l'hétérogénéité de ce vaste ensemble de produits rend difficile toute classification (**Hazard and Guidelines, 2004**). Il existe principalement trois grandes familles de produits phytosanitaires selon la nature des cibles visées, les herbicides, les fongicides et les insecticides.

- Les herbicides : sont les pesticides les plus utilisés dans le monde, ils sont destinés à éliminer ou ralentir les végétaux cibles nommés mauvaises herbes.
- Les fongicides : permettent de combattre la prolifération des champignons phyto-pathogènes
- Les insecticides : sont utilisés pour la protection des végétaux contre les insectes nuisibles.

À celles-ci s'ajoutent des produits divers tels que les acaricides (contre les acariens), les nématicides (contre les nématodes), les rodenticides (contre les rongeurs), les taupicides (contre les taupes), les molluscicides (contre les limaces et les escargots), les corvicides et les corvifuges (contre les corbeaux et les oiseaux ravageurs de culture) (**El Bakouri, 2006**).

Le deuxième système de classification tient compte de la nature chimique de leurs composants actifs (Tableau 1). Les principaux groupes chimiques comprennent les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates, les pyréthrinoides (**Merhi, 2008**).

➤ Les organochlorés

Le dichlorodiphényltrichloréthane ou DDT est la molécule la plus symbolique et connue parmi les insecticides organochlorés.

Le DDT, en dépit de sa contribution substantielle à la protection de la santé des populations *via* la lutte anti moustique et au contrôle de nombreuses maladies transmissibles, a été stigmatisé par Rachel Carlson dans son ouvrage « Le Printemps silencieux » (**Abou-Donia et al., 2006**) qui souligne les dangers qu'il pourrait entraîner à long terme sur l'environnement en général et sur la santé de l'homme en particulier du fait de sa persistance dans l'environnement. (**Multigner et al., 2012**).

Ils représentent un facteur de risque pour la santé et accélérateur principal des différentes pathologies (tumeurs du foie, du poumon ou des tissus hématopoïétiques ou

d'effets oestrogéniques sur la glande mammaire et les cancers du sein) (**Multigner et al., 2012**).

➤ **Les organophosphorés :**

Les organophosphorés (OP) sont des toxiques potentiellement létaux en cas d'intoxication aiguë. Ces intoxications souvent volontaires sont fréquentes, particulièrement dans les pays en voie de développement avec une fréquence avoisinant trois million d'intoxications par an dans le monde entier et une mortalité de l'ordre de 200 000 personnes par an. La prise en charge essentiellement symptomatique et antidotique, reste parfois difficile en raison de la non-disponibilité des moyens de réanimation dans certains pays ou encore du peu de preuve concernant les différentes thérapeutiques utilisées. D'autres thérapeutiques sont actuellement en cours d'évaluation telles que le sulfate de magnésium ou l'alcalinisation et pourront éventuellement enrichir dans le futur l'arsenal thérapeutique dans ce type d'intoxication (**Thabet et al., 2009**).

➤ **Les pyréthrinoides :**

contiennent plusieurs caractéristiques communes : une partie acide, un ester central, et une partie alcool, les pyréthrinoides sont les insecticides actuellement les plus souvent employés dans les formulations à usage agricole et vétérinaire, mais aussi dans les préparations à usage domestique (**Testud et Grillet., 2007 ; Grandjean et al., 2008**).

➤ **Les carbamates :**

sont doués de propriétés insecticides, vu leur faible stabilité dans le sol et la toxicité généralement faible de leur produits, ils sont de plus en plus employés pour remplacer les insecticides organochlorés trop persistants (**Dion et al., 2007**).

3- Toxicité des pesticides :

3-1- Les voies d'exposition aux pesticides :

L'exposition de l'homme aux pesticides relève de trois types de voies : orale (alimentation), respiratoire (air) et cutanée. Les chiffres de l'OMS indiquent que la contamination des aliments par les pesticides est la voie d'exposition de loin la plus importante. Les évaluations de risque attribuent 90 % de l'exposition à l'alimentation contre 10 % à l'eau et une part moindre à l'air 17% (**Gérin et al., 2003**).

Tableau 1: Les principales familles des insecticides, herbicides et des fongicides (El Bakouri, 2006) :

Insecticides	Herbicides	Fongicides
Organochlorés Organophosphorés Carbamates	Phytohormones Dérivés de l'urée Carbamates Triazines et Diazines Dérivés de pyrimidines Dérivés des dicarboximides Dérivés de l'oxyquinoleine Dérivés des thiadiazines et Thiadiazoles	Carbamates et Dithiocarbamates Dérivés du benzène Dérivés des quinones Amides Benzonitriles Toluidines organophosphorés

3-2- Toxicité aiguë

Les intoxications aiguës par les pesticides sont celles où, quelques heures après une exposition importante, des symptômes apparaissent rapidement. Ce sont les affections causées par les pesticides que les médecins connaissent le mieux.

Les personnes les plus fréquemment victimes d'intoxications aiguës par les pesticides sont les agriculteurs, qui manipulent et appliquent ces pesticides sur leurs cultures. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a estimé qu'il y a chaque année dans le monde 1 million de graves empoisonnements par les pesticides, avec quelques 220 000 décès. (Hazard and Guidelines, 2004).

Les troubles aigus dus aux pesticides frappent les muqueuses et la peau (40 % des cas étudiés), le système digestif (34 % des cas), le système respiratoire (20 %), le reste de l'organisme (24 %). Les pesticides organophosphorés et les carbamates sont à l'origine des cas d'empoisonnements par les pesticides les plus fréquents (Seidle, 2010).

La sévérité de l'intoxication varie en fonction de la toxicité intrinsèque du pesticide et de la dose absorbée. Par ailleurs, la voie d'exposition (orale, cutanée ou respiratoire) ainsi que les susceptibilités individuelles pourront aussi jouer un rôle important sur la sévérité des symptômes observés (Onil, 2002).

3-3- Intoxications chroniques :

L'intoxication chronique (ou la toxicité à long terme) survient par suite de l'absorption répétée de faibles doses de pesticides (dans l'eau ou dans les aliments). Plusieurs études

ont montré qu'une grande partie de la population mondiale est fortement contaminée par des pesticides ou par leurs résidus qui se concentrent plus particulièrement dans les graisses, le cerveau, le sang, le lait maternel, le foie, le placenta, le sperme et dans le sang du cordon ombilical (Onil, 2002).

4-Les effets des pesticides sur la santé :

4-1- Atteintes neurologiques :

Les effets neurotoxiques constituent l'une des manifestations les plus fréquentes des intoxications aiguës aux pesticides. La possibilité d'effets neurologiques retardés suite à des expositions chroniques et répétées a donc constitué une voie logique d'investigation. Certaines manifestations retardées peuvent se produire suite à un épisode d'intoxication unique et aiguë (Onil, 2002). Il s'agit de l'apparition d'un syndrome dénommé intermédiaire, caractérisé dans un premier temps par une paralysie des nerfs crâniens, une faiblesse musculaire proximale et une faiblesse musculaire respiratoire et, plus tard, par l'installation d'une poly neuropathie. Cependant, la plupart des effets chroniques ou retardés des pesticides vont apparaître à la suite d'expositions d'intensités plus faibles mais répétées et se caractérisent par des troubles neuropsychiques et comportementaux ou par des atteintes du système nerveux central à l'origine d'atteintes neurodégénératives (Parkinson) (Multigner et al, 2012).

3-1- Troubles comportementaux et psychiques :

Les pesticides organochlorés ou organophosphorés, sont associés à une diminution progressive des capacités neurocomportementales et à l'apparition de troubles neuropsychologiques tels que difficultés de concentration, troubles de la mémoire ou anxiété (Multigner et al., 2012).

5-Généralités sur les organophosphorés :

5-1- Structure chimique et classification des OP :

Les composés OP ont une structure chimique et un mode d'action communs. Leur formule générale a été définie par Schrader (Figure 1). Le substituant X est celui qui sera soumis à l'hydrolyse ; selon sa valeur, quatre classes principales peuvent être définies :

- la classe I où X contient un ammonium quaternaire ; les OP de cette classe possèdent un puissant pouvoir toxique et ne sont pas utilisés en agriculture ;

Etat actuel

- la classe II : X = F ; les OP de la classe II sont aussi toxiques que ceux de la classe I, ils possèdent une forte tension de vapeur. Ces deux propriétés expliquent leur utilisation prédominante comme gaz de combat (tabun).
- la classe III : X = CN, OCN, SCN ou un halogène autre que F ; les OP de la classe III ont une toxicité intermédiaire entre les classes II et IV. Certains, comme le sarin, ont été également utilisés comme gaz de combat ;
- la classe IV : X = autre substituant ; les OP de la classe IV regroupent la plupart des produits en agriculture (**Thabet et al., 2009**).

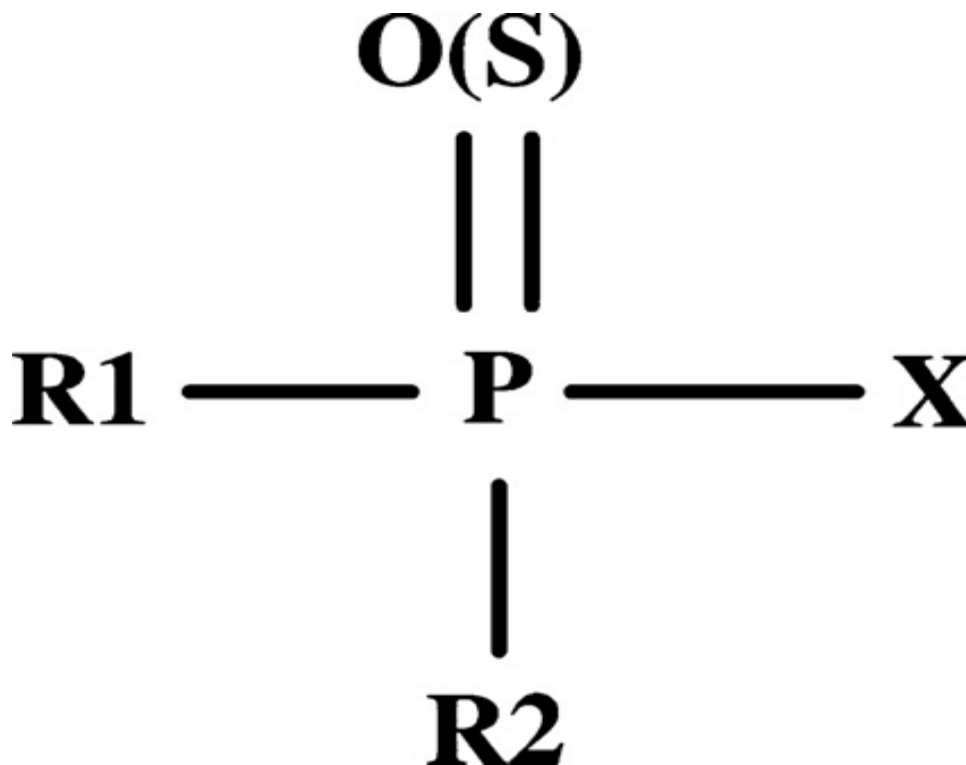


Figure 1 : Structure commune aux esters organophosphorés.

X : déterminant majeur des classes; R1 et R2 : groupement dimethoxy, diethoxy, autre dialkoxy, diamino, chlore ou autre dialkoxy substitue, trithioalkyl, triphenyl (**H. Thabet et al,2009**).

5-2- Le chlorpyrifos :

Le chlorpyrifos ($C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$) est un insecticide organophosphoré utilisé dans la lutte contre les moustiques, les mouches et divers nuisibles dans les cultures, par épandage sur le sol ou le feuillage, les nuisibles de maison et les larves aquatiques. Il sert aussi à lutter contre les ectoparasites chez l'agneau et les bêtes à cornes (**Ottawa, 1987**). La pression de vapeur du chlorpyrifos est de $2,49 \times 10^{-3}$ Pa à $25^\circ C$; sa solubilité dans l'eau est de 2 mg/L à $25^\circ C$ (**Suntio et al., 1988**).

Le chlorpyrifos est fortement absorbé par le sol. Il persiste dans le sol pendant des périodes allant de 60 à 120 jours (**Bethesda, 1988**). Sa dégradation est principalement attribuable à l'action microbienne. Ses produits de dégradation comprennent le trichloro-3,5,6 pyridinol-2, qui est ensuite scindé en composés organochlorés et en dioxyde de carbone. La vitesse d'hydrolyse du chlorpyrifos dans l'eau augmente en fonction du pH et de la température ainsi qu'en présence de cuivre. De 30 à 60% de tout le chlorpyrifos présent en phase aqueuse peut disparaître en moins de 24 heures par adsorption, dégradation et vaporisation (**Hughes et al., 1980**).

Ce dernier est responsable des effets cholinergiques aigus exercés par son métabolite actif : le chlorpyrifos-oxon qui inhibe l'acétylcholinestérase, empêchant ainsi l'hydrolyse de l'acétylcholine, ce qui mène à une stimulation massive des récepteurs cholinergiques. Les signes de toxicité incluent un dysfonctionnement autonome, des fasciculations, des saisies et des convulsions, et une détresse respiratoire (**Abou-Donia et al., 2006 ; Stapleton et Chan, 2009**).

Des études récentes indiquent que l'exposition aux pesticides produit le stress oxydant par la génération des radicaux libres et induit la peroxydation lipidique dans les tissus des mammifères et des autres organismes (**Banerjee et al., 1999 ; Banerjee et al., 2001**). Toutefois, seuls les effets des molécules séparées ont été étudiés, mais les risques associés aux mélanges des pesticides sont loin d'être estimés (**Ross et al., 2006**).

6- Stress oxydatif :

6-1- Définition :

Le stress oxydant est communément défini comme un déséquilibre entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydantes d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire. Cette définition ne rend pas justice à la notion de stress qui est avant tout une réponse à une modification des conditions habituelles de vie cellulaire. Lorsque des espèces réactives de l'oxygène (ERO) commencent à s'accumuler dans la

cellule, ils peuvent être neutralisés par des molécules de défenses antioxydantes présentes dans la cellule comme le glutathion, les vitamines E et C, la bilirubine, l'acide lipoïque, et des enzymes comme la catalase, la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase, les peroxyrédoxines...(**Delattre et al.,1998 ; Morel et Barouki, 1998**). Dans un premier temps, la cellule ne modifie pas ses propriétés biologiques. Si les ERO continuent à s'accumuler, une adaptation plus consistante de la cellule est nécessaire avec l'induction de gènes codant des enzymes antioxydantes, des protéines chaperons, des enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN et des protéines. On observe aussi une répression des systèmes susceptibles de libérer des ERO, notamment la chaîne respiratoire, les cytochromes P450 et la NADPH oxydase (**Morel et Barouki, 1999 ; Barouki et Morel, 2001-2005**). Dans ces conditions, nous pouvons parler de stress dans la mesure où la cellule a adapté ses fonctions biologiques, notamment son expression génique, aux modifications de son environnement. Souvent, l'induction des enzymes antioxydantes est perçue comme le révélateur de l'existence d'un stress oxydant, même si ceci a été remis partiellement en cause dans des expériences de génomique récentes (**Desaint et al., 2004**). À un stade ultime, la cellule peut suivre la voie de l'apoptose ou de la sénescence.

Selon cette définition, il est aisé de détecter un stress oxydant provoqué par une élévation aiguë des ERO. La situation est plus complexe lorsque l'on recherche un stress oxydant chronique au cours duquel, d'une part, les élévations des ERO sont atténuées par des boucles de régulation et d'autre part, les inductions des enzymes antioxydantes et réparatrices sont plus modestes, ces enzymes étant parfois elles-mêmes altérées par oxydation.

6-2- Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) :

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont des dérivés de l'oxygène, hautement réactifs et instables, participant au vieillissement des protéines, à la peroxydation lipidique, et à l'altération de l'ADN. Longtemps considérés comme des agents toxiques responsables de dysfonctions et de mort cellulaires ; il est actuellement admis que les ERO sont de véritables seconds messagers impliqués dans l'expression de gènes, et la régulation des fonctions de prolifération et de mort cellulaire (**Dhalla et al., 2000 ; Patel, 2000**).

6-2-1- Nature des ERO :

Les cellules génèrent divers types des ERO de réactivité différente:

- L'ion superoxyde $O_2^{\circ-}$ et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 représentent une classe peu active. $O_2^{\circ-}$ peut interagir avec H^+ pour donner HO_2° qui serait la forme réactive d' $O_2^{\circ-}$, capable d'initier la peroxydation lipidique. $O_2^{\circ-}$ peut se dismuter en H_2O_2 , réagir avec NO° pour former du peroxyde d'azote $ONOO^-$ ou avec des métaux de transition en formant des radicaux plus réactifs.
- Le radical hydroxyle OH° est beaucoup plus réactif et peut attaquer la plupart des molécules biologiques et former des radicaux secondaires. Ces ERO peuvent se transformer selon la réaction d'Haber-Weiss, par l'intervention de la superoxyde dismutase (SOD) et de métaux de transition comme Fe^{++} ou Cu^{++} , libres, ou complexés (hème), qui sont des activateurs de l'oxydation.
- L'oxygène singulet (1O_2) peut être généré par des réactions photochimiques et chimiques (par exemple, la réaction de H_2O_2 avec OCl^- produit 1O_2). 1O_2 est relativement réactif et peut former des peroxydes (**Griendling et al., 2000; Patel, 2000**). Ces espèces sont susceptibles de générer des dommages oxydatifs au niveau de diverses cibles moléculaires tels que: les lipides, les protéines et l'ADN (**Victor et al., 2009**) (figure2).

6-2-1-Le système de défense antioxydante :

L'équilibre entre les effets positifs et négatifs des EOA est donc particulièrement fragile. La production des EOA sera strictement régulée par notre organisme qui a développé des défenses antioxydantes pouvant nous protéger contre les effets potentiellement destructeurs des EOA. Ces systèmes se composent:

- d'enzymes (superoxydesdismutases Cu-Zn et Mn, catalase, glutathion peroxydases, couple thiorédoxine - thiorédoxine réductase, hème oxygénase, heatshock protéines),
- de protéines transporteuses du fer et du cuivre (transferrine, ferritine, céruléoplasmine),
- de molécules antioxydantes de petite taille (glutathion, acide urique, bilirubine, glucose, vitamines A, C, E, ubiquinone, caroténoïdes, flavonoïdes),
- d'oligo-éléments (cuivre, zinc, sélénium) indispensables pour l'activité des enzymes antioxydantes.

Un système de défense secondaire composé d'enzymes dont le rôle consiste à empêcher l'accumulation dans la cellule de protéines ou d'ADN oxydés et à dégrader leurs

fragments toxiques, complète la panoplie des moyens de protection contre les EOA (figure 3) (Sies, 1991).

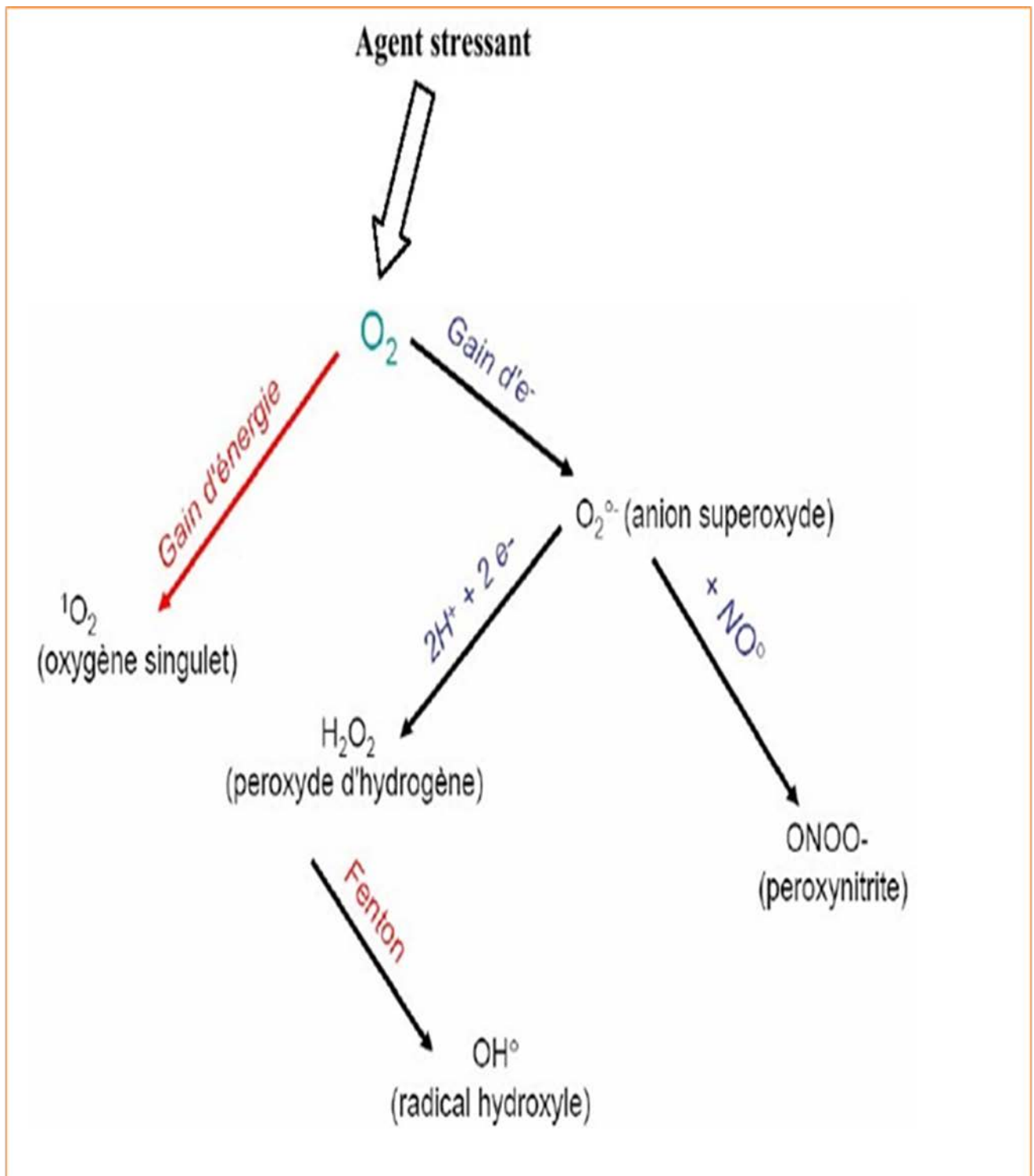


Figure 2 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Behrend et al., 2003).

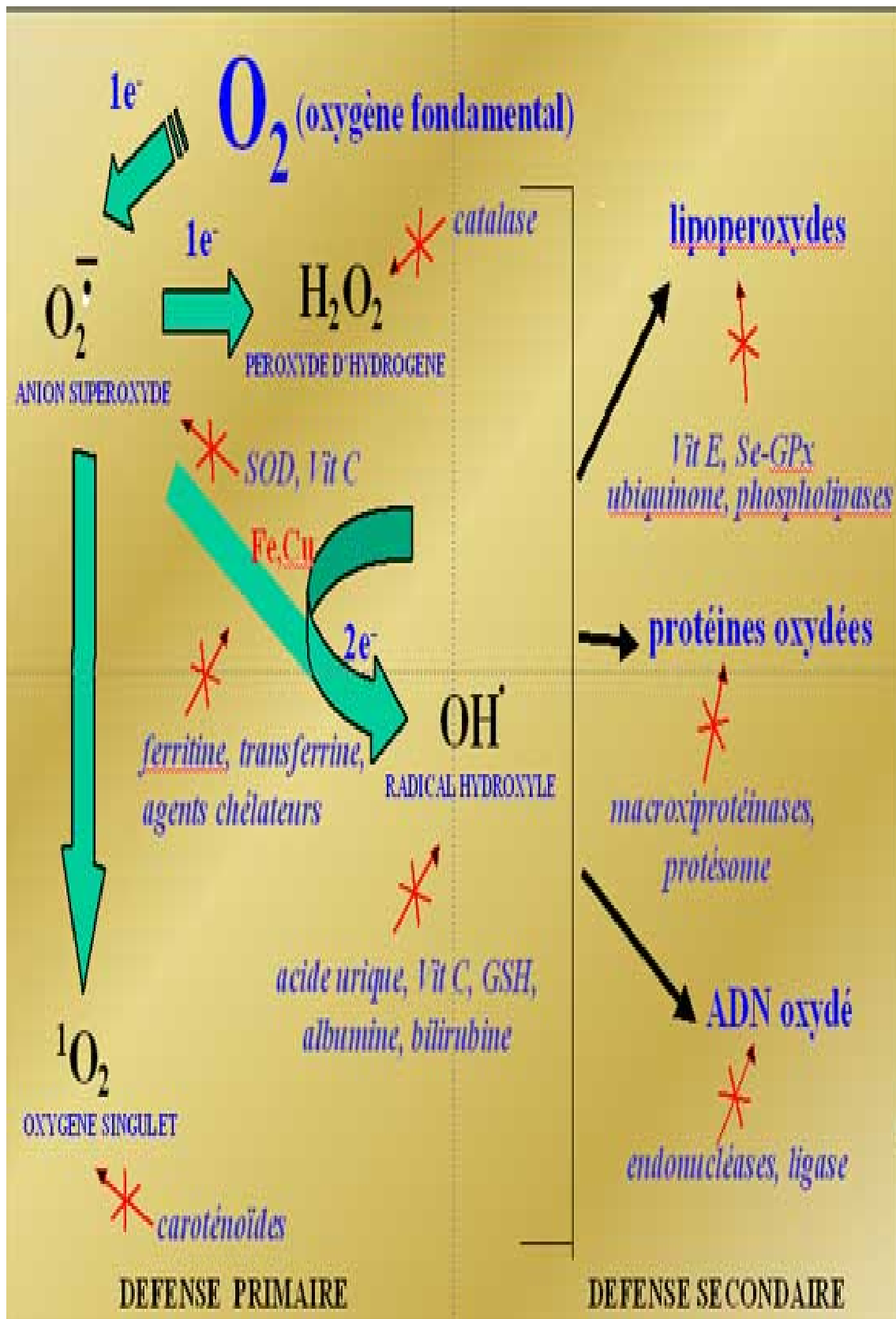


Figure 3 : Balance entre antioxydants et pro -oxydants (Sies, 1991).

6-3- Antioxydants enzymatiques :

6-3-1-Les superoxydes dismutases (SOD) :

Les SOD éliminent les radicaux superoxydes par dismutation du radical en H_2O_2 et en OH^+ et OH (Mn SOD dans la mitochondrie, CuZn SOD dans le cytosol et les érythrocytes). Elles permettent d'éliminer les radicaux superoxydes mais provoquent l'apparition de peroxyde d'hydrogène diffusible et dangereux à distance. La synthèse des SOD subit un rétrocontrôle négatif par les fortes concentrations de peroxyde d'hydrogène. L'activité des SOD est dépendante des apports nutritionnels en cuivre et à un moindre degré en zinc (Mc Cord et Fridovich, 1988 ; Nelson et al., 1994).

6-3-2-Les catalases :

Elles réduisent le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 en libérant de l'oxygène et de l'eau. Elles sont localisées surtout dans les peroxysomes. Elles n'éliminent pas la totalité du peroxyde d'hydrogène, mais leur rôle est très important surtout en présence d'ions ferreux en permettant d'éliminer l'excès de peroxyde d'hydrogène afin que la réaction de Fenton ne puisse pas s'amplifier. Elles sont quantitativement moins efficaces que les glutathion peroxydases (Lindau-Sehpard et Shaffer, 1993).

6-3-3-Les glutathion peroxydases (GSHPX) :

Les GSHPX réduisent le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et les hydroperoxydes lipidiques. Pour leur fonctionnement, elles utilisent le glutathion réduit (GSH) comme cofacteur sur lequel elles transfèrent l'oxygène, le transformant en glutathion oxydé (GSSG) (Figure 4). Dans la cellule, dans les conditions physiologiques, la forme glutathion réduit est prédominante (95 %). Les GSHPX connues sont des enzymes à sélénium. Le sélénium est intégré dans la protéine sous forme de sélélocystéine. Le facteur limitant de la synthèse des sélénotéines, et donc des GSHPX, est la teneur intracellulaire en sélénium (Vitoux et al., 1996). Le stress oxydant selon sa nature et son intensité peut entraîner une modification de la synthèse des GSHPX pour une meilleure adaptation cellulaire ou une inactivation de l'enzyme. Il est important de noter que la lutte contre les radicaux libres passe par un effet complémentaire des SOD et des GSHPX.

En effet, le radical superoxyde n'est pas particulièrement agressif pour les milieux biologiques, les SOD seules ont donc un effet ambigu générant du peroxyde d'hydrogène qui, lui, est très cytotoxique expérimentalement surtout en présence de traces de fer. Il faut donc la Présence concomitante des SOD et des GSHPX pour

obtenir un effet protecteur Optimum contre les radicaux libres (Michiels et al., 1991 ; Escobar et al., 1996).

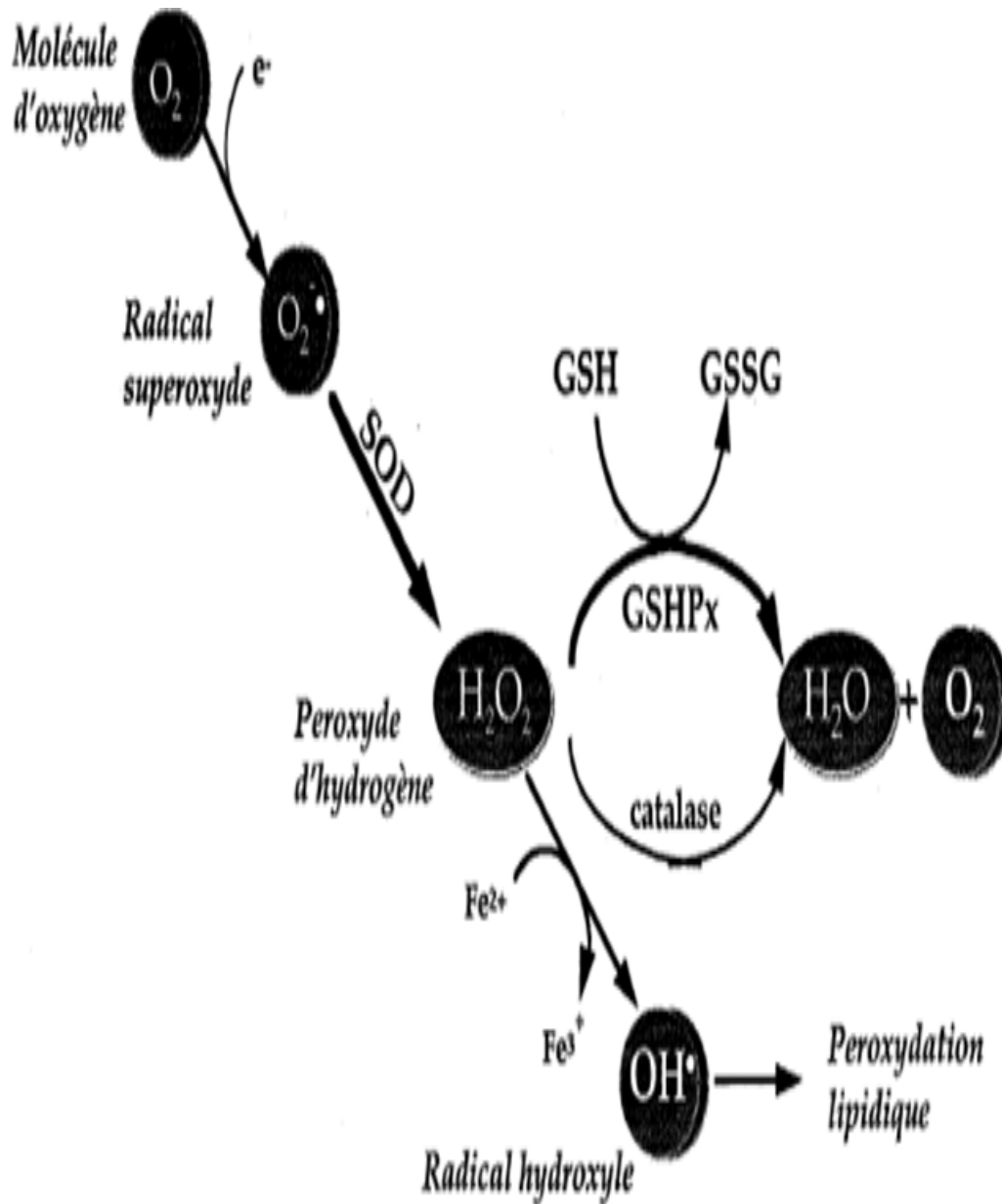


Figure 4: Principales étapes de production des espèces réactives de l'oxygène

6-4- Antioxydants non enzymatiques :

6-4-1-Vitamine E :

La vitamine E est l'antioxydant liposoluble qui a la plus grande concentration molaire cellulaire (Meydani, 1995). Elle agit *in vivo* et *in vitro* en neutralisant les radicaux libres, devenant elle-même un radical non toxique. La réduction de la vitamine E oxydée est assurée par la vitamine C. Les concentrations de ces deux vitamines sont donc nécessairement liées pour la protection contre la peroxydation lipidique. La vitamine E permet de diminuer la peroxydation lipidique dans la membrane cellulaire et au sein des LDL (Allard et al., 1994). Elle est très active dans la résistance à l'oxydation des LDL (Azzi et al., 1995 ; Nenseter et Drevon, 1996). L'oxydation des LDL est précédée par une disparition séquentielle des antioxydants endogènes, en particulier de la vitamine E et des caroténoïdes, ce qui semble confirmer le rôle protecteur de ces composés (Carpenter et al., 1995). Dans le plasma, la vitamine E est transportée par les LDL. Elle est distribuée aux cellules par le récepteur du cholestérol.

6-4-2-Vitamine C (acide ascorbique) :

L'acide L- ascorbique, ou vitamine C, est considérée comme le plus important antioxydant dans les fluides extracellulaires. C'est un piègeur très efficace des ions superoxydes, du peroxyde d'hydrogène, de l'hypochlorite, des radicaux hydroxyles et pyroxyles et de l'oxygène singulet. Elle agit en régénérant la vitamine E *in vivo*, mais peu *in vitro*. *In vivo*, elle est maintenue sous forme réduite par l'action de la déshydroascorbate réductase qui utilise le glutathion comme cofacteur (Berliner et Heineche, 1996).

6-4-3-carotène :

Le carotène est apporté par l'alimentation. Il est doué de plusieurs capacités, c'est le précurseur de la vitamine A, il capte l'oxygène singulet sous faible pression d'oxygène et avec les autres caroténoïdes, il a le pouvoir de terminer les réactions en chaîne de lipoperoxydation. Il protège les structures cellulaires contre l'agression oxydante : il s'oppose à la cyto- et à la génotoxicité de nombreux agents (Allard et al., 1994).

6-4-4-Glutathion :

Le glutathion joue un rôle majeur dans la protection des lipides, des protéines et des acides nucléiques contre l'oxydation (Stamler et Slivka, 1996). En situation de stress oxydant, son rôle protecteur et détoxifiant résulte principalement de sa fonction de coenzyme des GSHPX. Il fait aussi l'objet d'interactions synergiques avec d'autres

composants du système de protection antioxydante tels que la vitamine C ou la vitamine E.

6-5- Mesure de la capacité antioxydante :

Par le dosage des vitamines E, C, carotène et autres caroténoïdes ; dosage des éléments traces : sélénium, cuivre, zinc, manganèse, mesure de l'activité enzymatique : SOD - GSHPX - catalase ; dosage du glutathion. Tous ces dosages sont très fréquemment utilisés mais leur interprétation est délicate. Par exemple, l'évaluation de l'activité enzymatique des GSHPX doit toujours être complétée par une mesure du sélénium plasmatique sans oublier que la teneur cellulaire en glutathion réduit est un facteur essentiel à l'activité des GSHPX. L'ensemble de ces composés peut être estimé en déterminant la capacité antioxydant totale du sérum : les techniques proposées pour cette estimation globale utilisent la mesure de la propriété antioxydante du plasma vis-à-vis d'une source de radicaux libres générés *in vitro*. La diminution de la capacité antioxydante indique un risque accru mais n'est pas une preuve absolue qu'un stress se soit passé (Miller et al., 1993).

7- Les marqueurs biologiques du stress oxydatif :

Les ERO peuvent interagir avec différentes molécules comme les acides nucléiques, les lipoprotéines, ou encore les acides gras afin de former des dérivés oxydés pouvant être décelés dans des échantillons biologiques comme le plasma, le sérum ou l'urine.

Le fait de déceler ces dérivés est la preuve de l'existence d'un stress oxydatif. (Pincemail et al., 1999).

7-1- Les marqueurs de peroxydation lipidique :

La peroxydation lipidique étant l'effet le plus anciennement connu des radicaux libres et le plus simple à mesurer, les dérivés de l'oxydation lipidique sont les composés les plus souvent étudiés lorsque l'on recherche un stress oxydatif. Un certain nombre de produits de dégradation des lipides et des lipoprotéines pourra se retrouver après une peroxydation :

- dans l'air expiré, on retrouvera des alcanes (éthane, pentane) qui peuvent être mesurés par chromatographie en phase gazeuse après recueil des gaz expirés (Lemoyne et al., 1987) .

- dans le sang, on retrouvera surtout des diènes conjugués, des hydroperoxydes, des aldéhydes (**Esterbauer, 1996**).

Le dosage le plus utilisé est le dosage du malondialdéhyde (MDA), c'est un produit de décomposition oxydative des lipides insaturés. Il peut être également formé à partir de composés non lipidiques tels que l'acide ascorbique, les acides aminés, le désoxyribose ou le saccharose lorsqu'ils sont exposés à l'action des hydroxyles ; ou formé in vivo lors de la biosynthèse des eicosanoides. Le MDA est aussi un excellent substrat des peroxydases. Les lipoperoxydes plaquettaires sont à l'origine d'une partie du MDA sanguin (**HajMouhamed et al., 2012**).

7-2- Les marqueurs d'oxydation des protéines :

En présence d'ERO, les protéines peuvent se dénaturer, se fragmenter ou perdre leurs structures primaire et secondaire. Les dommages oxydatifs au niveau des protéines (et des acides aminés) peuvent se manifester de diverses manières (**Davies, 1987-1999**) :

-apparition de groupements hydroperoxydes (-OOH),
- oxydation du squelette carboné de la chaîne polypeptidique conduisant à une fragmentation des protéines et à l'apparition de groupements carbonyles,
- oxydation des chaînes latérales des acides aminés avec formation de ponts disulfure, de méthionine sulfoxyde et de groupements carbonyles. La mise en évidence de groupements carbonyles dans les protéines oxydées est de loin la technique qui est la plus utilisée (**Pantke et al., 1999**). Toutefois, l'apparition de ces groupements reflète plutôt une modification globale dans la protéine et n'est sans doute pas aussi spécifiquement représentative de la présence d'un stress oxydant que la détection de Tyr hydroxylée.

8- Stress oxydant et pesticides

Les pesticides sont considérés comme des facteurs de risque pour la santé, et les vecteurs pour les maladies humaines ou animales, à partir de l'augmentation de la production de radicaux libres qui s'accumulent en outre dans la cellule, par l'altération des mécanismes de défense antioxydante, y compris la désintoxication, ou par augmentation de la peroxydation des lipides en tant que résultat de l'interaction entre les espèces réactives de l'oxygène (membranes ERO) et cellulaires et sous-cellulaires (**Abdollahi et al., 2004 ; Agrawal et Sharma, 2010 ; Gamet-Payrastre, 2011**). Le stress oxydatif a été rapporté jouer un rôle important dans la toxicité de divers pesticides, y compris les organophosphorés, N -méthylcarbammates, les organochlorés,

Etat actuel

les pyréthriinoïdes, les triazines, les néonicotinoïdes, les dithiocarbamates et le paraquat (Possamaï et al., 2007; Mansour et al., 2009; Pal et al., 2009 ; Raina et al., 2009 ; Ahmad et al., 2010 ; El-Gendy et al., 2010 ; Singh et al., 2010). Les études épidémiologiques chez l'homme, exposé à long terme à un mélange de pesticides, ont rapporté que les enzymes antioxydantes sont stimulées avec une peroxydation lipidique dans les érythrocytes même en l'absence d'une diminution de l'acétylcholinestérase - AChE (Ogut et al., 2011).

1- Protocole expérimental

1-1- Choix d'animaux :

Notre travail a été réalisé sur la lignée de rats blancs *Wistar* élevés au niveau de l'animalerie du département de Biologie, Faculté des Sciences de la nature et de la vie, Sciences de la terre et de l'univers, Université de Tlemcen. L'élevage est réalisé dans une pièce éclairée 12 heures par jour, et dont la température est maintenue constante (22 à 25°C). Les animaux ont un accès libre à la nourriture et à l'eau.

1-2- Régimes :

L'étude comprend la progéniture des rats *Wistar* femelles dont le poids était compris entre 180 et 220g, ces rates reçoivent le régime standard, et sont soumises au gavage pendant une période de 3 mois : 2 mois avant accouplement et gestation. Les rates sont réparties en deux lots :

- Un lot témoin constitué de 4 femelles qui consomment le régime standard et sont gavées avec de l'huile de tournesol
- Un lot expérimental constitué de 4 femelles qui consomment le régime standard et sont gavées avec un pesticide : chlorpyrifos avec une DL 50/25.
- Après trois semaines de gestation, mise bas et sevrage, la progéniture est soumise aussi au gavage jusqu'à l'âge adulte (J90). Cette étude ne concerne que les rats mâles.

1-3- Sacrifices et prélèvement sanguin

A J90 de la naissance, les rats mâles sont anesthésiés au chloral 10% (0.3 ml par 100g de poids corporel) et sont sacrifiés. Le sang est prélevé par ponction dans l'aorte abdominale. Ce dernier est collecté sur des tubes EDTA, après centrifugation à 3000 tours/min pendant 15 min, le plasma est séparé du culot, ce plasma est conservé dans des tubes épendorfs étiquetés pour le dosage des marqueurs plasmatiques du stress oxydatif. Le culot est récupéré, lysé avec 2 volumes d'eau distillée glacée, puis incubé pendant 15 minutes au réfrigérateur (2-8°C). Celui-ci est ensuite centrifugé à 4000 tours/min pendant 10 minutes pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant récupéré constitue le lysat érythrocytaire qui servira pour le dosage des paramètres érythrocytaires du statut oxydant/antioxydant.

2- Détermination du statut oxydant/ antioxydant :

2-1- Dosage du malondialdéhyde (MDA):

Le malondialdéhyde est le marqueur le plus utilisé de la peroxydation lipidique notamment par la simplicité et la sensibilité de la technique. Ce dosage est réalisé selon la méthode de Nourooz-Zadeh et al. (1996), par un traitement acide à chaud, les aldéhydes réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un produit de condensation chromogénique consistant en deux molécules de TBA et une molécule MDA l'absorption intense de ce chromogène se fait à 532nm ; la concentration en MDA plasmatique, ou érythrocytaire, est calculée en utilisant le coefficient d'extinction du complexe MDA-TBA ($\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$).

2-2- Détermination des protéines carbonylées:

Les protéines carbonylées du plasma ou érythrocytaires (marqueurs de l'oxydation protéique) sont mesurées par la réaction au 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH) selon la méthode de Levine et al. (1990). Le plasma ou le lysat sont incubés 1h à température ambiante avec du DNPH, ou avec seulement du HCl pour le blanc. Par la suite, les protéines sont précipitées avec l'acide trichloroacétique (TCA) et lavées trois fois par l'éthanol : ethylacetate 1 :1 et 3 fois par le TCA. Le culot est solubilisé dans une solution de guanidine. Les lectures se font à 350 et 375nm. La concentration des groupements carbonylés est calculée selon un coefficient d'extinction de $21.5 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$).

2-3-Détermination de l'activité des enzymes antioxydantes érythrocytaires :

2-3-1- Dosage de l'activité de la catalase (Méthode d'Aebi, 1974) :

Cette activité enzymatique est mesurée par analyse spectrophotométrique du taux de décomposition du peroxyde d'hydrogène. Le milieu réactionnel contient le lysat dilué au 1/500 (source de l'enzyme catalase), la solution de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et le réactif de coloration titanium oxyde sulfate (Ti O SO_4). En présence de la catalase, la décomposition du peroxyde d'hydrogène conduit à une diminution de l'absorption de H_2O_2 en fonction du temps. La lecture se fait à 420 nm. Les concentrations en H_2O_2 restant sont déterminées à partir d'une gamme étalon de H_2O_2 . L'activité de la catalase est exprimée en U /min/ml.

2-3-2- Dosage du Glutathion réduit (GSH) (Méthode d'Ellman, 1959)

Le dosage du glutathion réduit (GSH) est réalisé par la méthode colorimétrique qui repose sur les propriétés réductrices des groupements thiols (SH). En présence des groupements SH de l'échantillon, le pont disulfure (SS) contenu dans le réactif d'ELLMAN ou DTNB (5-5' dithionitrobenzoic acid) va être réduit et donner des dérivés thiols aromatiques colorés [TNB : thionitrobenzoïque]. Le TNB à pH (8-9) alcalin, présente une absorbance à 412nm avec un coefficient d'extinction de $13.6 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3- Analyse statistique :

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart type. La comparaison des moyennes est réalisée par le test « t » de Student pour les deux lots de rats étudiés (témoins et expérimentaux). Cette analyse est réalisée grâce au logiciel STATISTICA (version 4.1 Statsoft). Les différences sont considérées significatives à $p < 0.05$ et hautement significatives à $p < 0.01$.

1. Marqueurs du statut oxydant/antioxydant chez les rats témoins et les rats expérimentaux :

Notre étude est basée sur la détermination de quatre marqueurs du stress oxydatif, dont deux sont des paramètres oxydants et deux sont des antioxydants.

1.1. Marqueurs du statut oxydant chez les rats traitées par le chlorpyrifos à la dose DL50/25 comparées aux rats témoins :

1.1.1. Teneurs en malondialdéhyde (MDA) plasmatique et érythrocytaire (figure 5, tableau A1 en annexe) :

Les teneurs plasmatiques et érythrocytaires en MDA sont élevées d'une manière hautement significative chez les rats expérimentaux par rapport aux rats témoins.

1.1.2. Teneurs en protéines carbonylées (PC) plasmatiques et érythrocytaires (figure 6, tableau A1 en annexe)

Une augmentation hautement significative est observée pour les PC érythrocytaires chez les rats expérimentaux comparés à leurs témoins. Par contre, aucune différence n'est notée concernant les teneurs des PC plasmatiques entre les deux lots de rats.

1.2. Marqueurs du statut antioxydant chez les rats traités par le chlorpyrifos à la dose DL50/25 comparés aux rats témoins

1.2.1. Evaluation de l'activité de la catalase (CAT) érythrocytaire (figure 7, tableau A2 en annexe) :

L'activité de cette enzyme antioxydant est significativement élevée ($p < 0.05$) chez les rats expérimentaux par rapport à leurs témoins.

1.2.2 Teneurs en glutathion réduit (GSH) érythrocytaire (figure 7, tableau A2 en annexe) :

Une diminution hautement significative du GSH érythrocytaire est notée chez les rats expérimentaux comparés aux rats témoins.

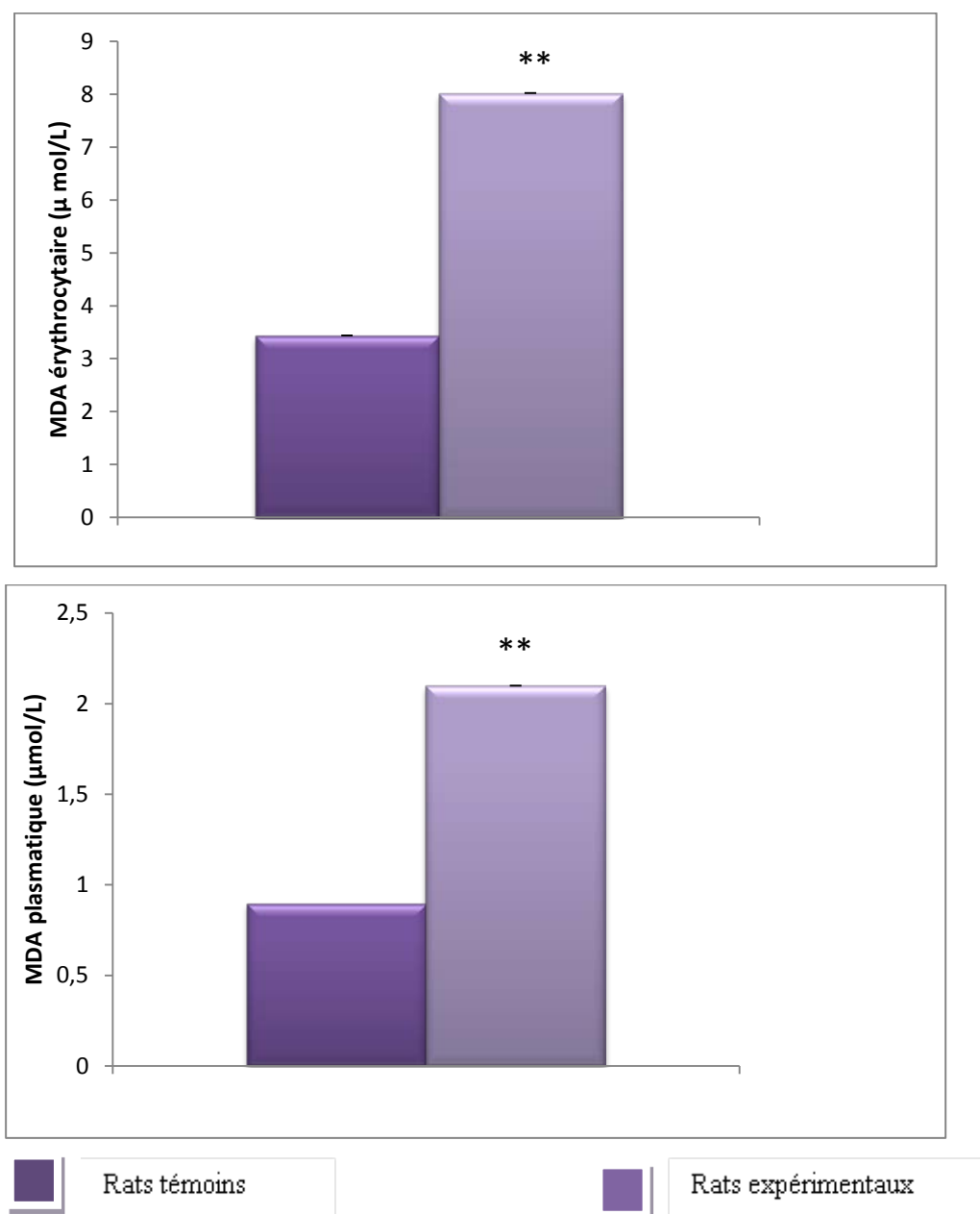


Figure 5 : Teneurs en MDA érythrocytaire et plasmatique chez les rats témoins et expérimentaux :

Chaque valeur représente la moyenne \pm erreur standard (ES), n=4. Les rats témoins sont nourris au régime standard gavés à l'huile de tournesol; les rats expérimentaux sont nourris également de régime standard mais gavés à l'insecticide, chlorpyrifos, avec une DL50/25

La comparaison des moyennes est effectuée par le test « t » de Student.

Rats expérimentaux comparés aux rats témoins : **p<0.01

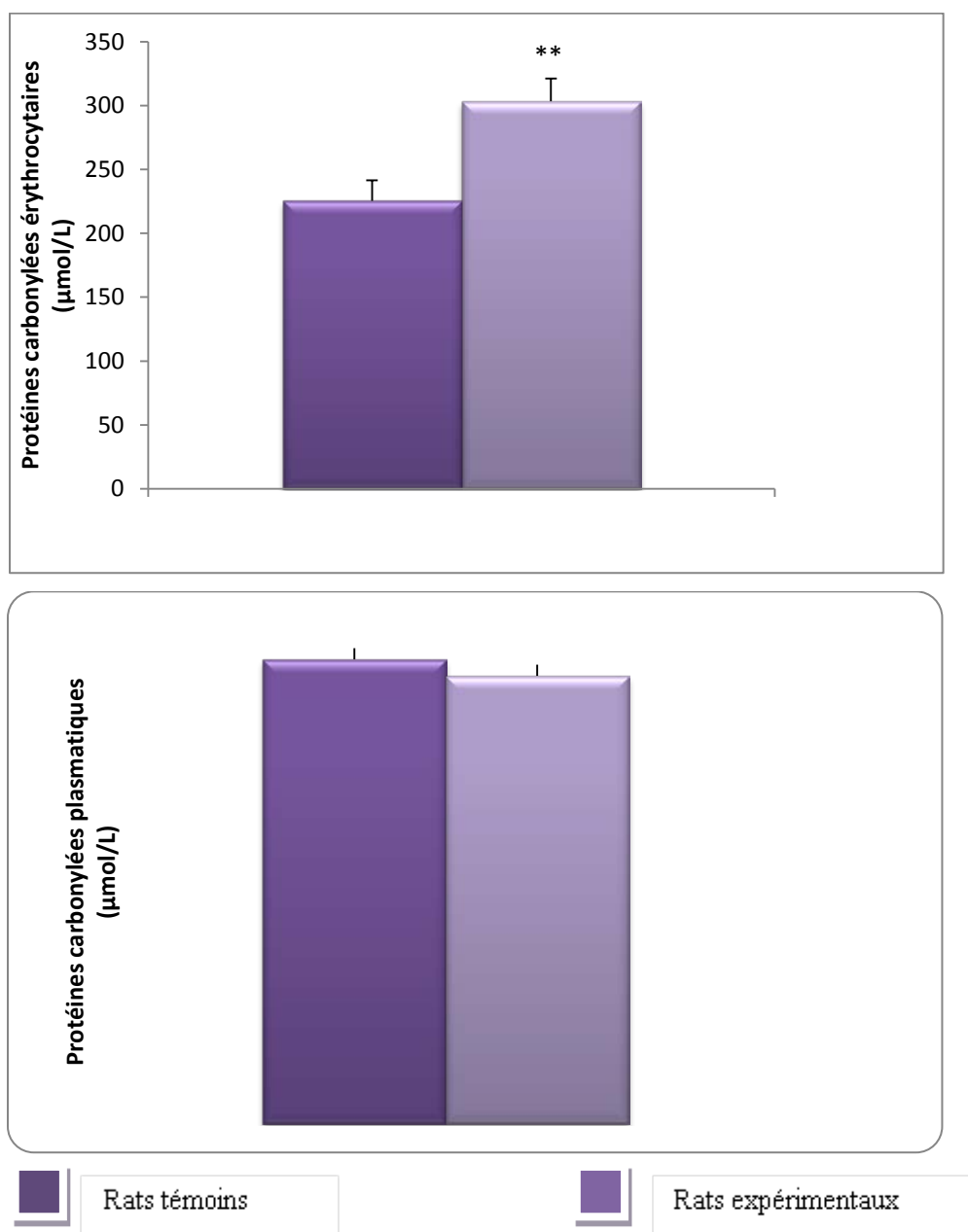


Figure 6: Teneurs en protéines carbonylées érythrocytaires et plasmatiques chez les rats témoins et expérimentaux :

Chaque valeur représente la moyenne \pm erreur standard (ES), n=4. Les rats témoins sont nourris au régime standard gavés à l'huile de tournesol; les rats expérimentaux sont nourris également de régime standard mais gavés à l'insecticide, chlorpyrifos, avec une DL50/25

La comparaison des moyennes est effectuée par le test « t » de Student.

Rats expérimentaux comparées aux rats témoins : **p<0.01

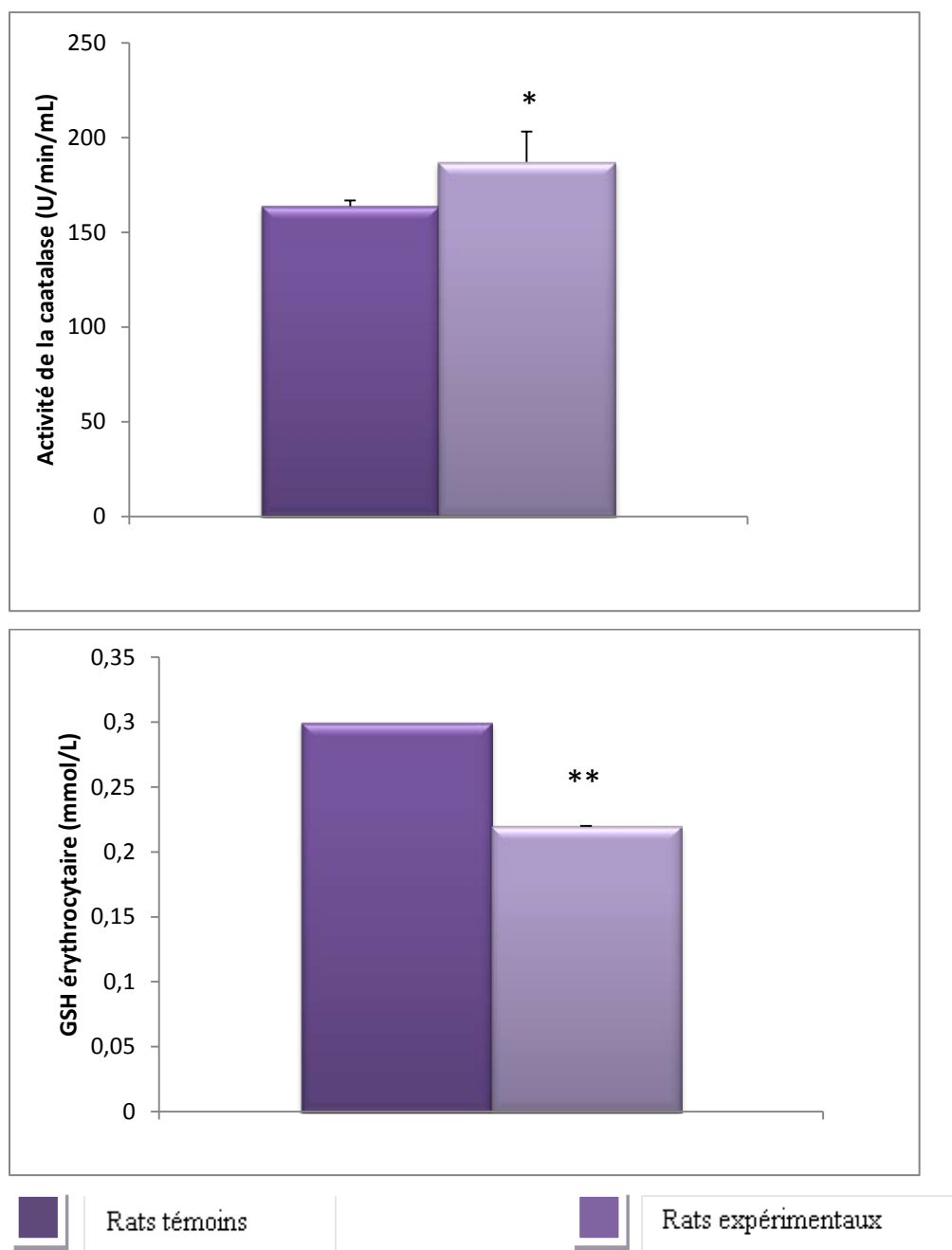


Figure 7 : Activité de la catalase et teneurs du GSH érythrocytaire chez les rats témoins et expérimentaux :

Chaque valeur représente la moyenne \pm erreur standard (ES), n=4. Les rats témoins sont nourris au régime standard gavés à l'huile de tournesol; les rats expérimentaux sont nourris également de régime standard mais gavés à l'insecticide, chlorpyrifos, avec une DL50/25
La comparaison des moyennes est effectuée par le test « t » de Student.
Rats expérimentaux comparées aux rats témoins : *p<0.05 ; **p<0.01

Discussion

Les pesticides organophosphorés sont des dérivés de molécules de phosphore, essentiellement utilisés comme insecticide. Ce sont des neurotoxiques dont l'action ne se prolonge pas dans le temps. Le chlorpyrifos, comme tous les autres organophosphorés, exerce son action notamment par une inhibition de l'activité des acétylcholinestérases (**Richardson et al., 1993 ; Amitai et al., 1998**). En dépit de ce mode d'action spécifique, les effets toxiques de chlorpyrifos se manifestent également par des dysfonctionnements hépatiques sévères. Il a été montré que l'exposition aiguë ou chronique à cet insecticide induisait une élévation importante des transaminases AST et ALT (**Goel A et al., 1998**).

Le stress oxydant se définit comme un déséquilibre entre production d'ERO et les défenses antioxydantes. L'oxygène est nécessaire pour le transfert d'électrons couplés aux phosphorylations oxydatives qui sont la principale source d'énergie de l'organisme. Son absence, l'anoxie, est mortelle à court terme. Elle entraîne la chute d'ATP dans la cellule par l'interruption du processus énergétique (**Delattre et al., 1998 ; Morel et Barouki, 1998**).

La majorité des réactions de stress oxydatif se font par les ERO qui peuvent, en effet, entraîner de profondes modifications dans la structure de substrats biologiques comme les protéines, les lipides, les lipoprotéines ou l'acide désoxyribonucléique (ADN) (**Pincemail et al., 1998-1999**).

Grace à la présence d'antioxydants, il existe un équilibre physiologique subtil entre la production et l'élimination des ERO. C'est ainsi que plusieurs auteurs proposent le stress oxydant comme le mécanisme clé de la toxicité du chlorpyrifos (**Miyazaki et al., 2001 ; Mahaboob Khan et Kour, 2007**).

Dans la présente étude, nos résultats indiquent que les teneurs érythrocytaires et plasmatiques en MDA, marqueur de la peroxydation lipidique, sont significativement augmentées, à J90, chez les rats gavés par le chlorpyrifos à une dose de DL50/25. Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres études qui ont mis en évidence une augmentation de la peroxydation lipidique après traitement par les pesticides (**Kehrer, 1993 ; Ahmed et al., 2000**).

Certains auteurs ont pu démontrer une augmentation de la peroxydation lipidique dans les cellules érythrocytaires et le liquide plasmatique, suite à une exposition au chlorpyrifos. La toxicité engendrée par ce pesticide s'exerce notamment via sa biotransformation dans le foie par les monooxygénases à cytochrome P450 en des dérivés hautement réactifs causant

Discussion

un stress oxydant qui est très élevée chez des rates expérimentales par rapport aux témoins(Ahmed et al., 2000 ; Kurutas et al., 2006).

Les teneurs érythrocytaires en protéines carbonylées chez les rats expérimentaux sont significativement augmentées comparées aux valeurs obtenues chez leurs témoins. Cela résulte d'une diminution de l'élimination des composés carbonylés formés par l'oxydation des hydrates de carbone et des lipides ; et qui peuvent mener indirectement à la formation des produits avancés de la glycation protéique ou à la lipo oxydation (Bagnoux et al., 2009 ; Libetta et al., 2011).

La catalase est une enzyme héminique, responsable de la détoxification des quantités significatives de peroxydes d'hydrogène (H_2O_2). La catalase est un antioxydant enzymatique largement distribué dans tous les tissus animaux, et sa plus forte activité se trouve dans les globules rouges principalement et le foie (Sathishsekar et Subramanian, 2005).

L'augmentation de l'activité de la catalase peut présenter une réponse adaptative au stress oxydatif entraîné par les pesticides. La destruction de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la SOD et la CAT améliore la toxicité induite par le chlorpyrifos de la même façon que par des substances capables de piéger le radical hydroxyle ($\bullet OH$) (Sivajothi et al., 2008).

Le glutathion réduit (GSH) joue un rôle multifactoriel dans le mécanisme de défense antioxydante (Sathishsekar et Subramanian, 2005). C'est un piègeur direct des radicaux libres, un cosubstrat nécessaire pour l'activité GPx et la GST et participe dans la régénération de la vitamine E oxydée (Dominguez et al., 1998 ; Ravi et al., 2004). Par conséquent, les changements dans l'état redox du GSH peuvent être considérés comme un indicateur particulièrement sensible du stress oxydant (Taleb-Senouci et al., 2009). Dans cette étude nous avons constaté une baisse significative des taux érythrocytaires en GSH chez les rats expérimentaux par rapport aux rats témoins ; cela est du peut être à une diminution de la synthèse du GSH ou une augmentation de sa dégradation au cours du stress oxydant causé par le chlorpyrifos.

Les pesticides, produits chimiques toxiques, posent un véritable problème de santé publique, à la fois pour les utilisateurs, mais aussi pour la population. En effet, les pesticides peuvent aussi être très nocifs, et ils sont soupçonnés de présenter un risque pour la santé de l'homme et pour son environnement en s'accumulant dans les écosystèmes.

Dans le but d'évaluer les effets toxiques du chlorpyrifos, insecticide organophosphoré, notre étude a été réalisée sur des rats wistar mâles, afin d'évaluer quelques paramètres du statut oxydant /antioxydant (MDA, PC, Cat, GSH).

Nos résultats montrent qu'à j 90, les rats gavés au CPF à DL50/25 présentent des teneurs plasmatiques et érythrocytaires en MDA élevées témoignant d'une peroxydation lipidique. Cet insecticide entraîne aussi une oxydation des protéines au niveau érythrocytaire par ailleurs, une diminution est notée au niveau des teneurs du GSH, avec une augmentation de l'activité de la catalase qui tend à rétablir l'équilibre.

Les pays en développement, le manque d'information sur les dangers des pesticides, ainsi que la pauvreté, et le manque d'infrastructures de santé dans les milieux ruraux font en sorte que les pesticides soient une menace majeure pour la santé et l'environnement. Pour cela, l'utilisation des pesticides en général, les insecticides en particulier pose un véritable problème en Algérie, par la non réglementation et le non respect des normes sanitaires.

Enfin, il serait intéressant de prolonger la durée d'exposition des animaux au gavage à cet insecticide, afin de savoir si les perturbations du statut oxydant/antioxydant observées pourraient aboutir à l'apparition de pathologies.

Références Bibliographiques

- Abdel-Rahim EA, Abdel-Rahim GA, Fayed SA, Ghada IM (2009).** Antioxidant diet as protective agents against biochemical perturbation effects induced by cypermethrin on lipids and protein fractions as well as kidneys function of blood rat. *Journal Australian Journal of Basic and Applied Sciences* Vol. 3 No. 1 pp. 267-276
- Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaiee A (2004).** Pesticides and oxidative stress: a review. *Med. Sci. Monit.* 10:141–147.
- Abou-Donia MB, Khan WA, Dechkovskaia AM, Goldstein LB, Bullman SL, Abdel-Rahman A (2006).** In utero exposure to nicotine and chlorpyrifos alone, and in combination produces persistent sensorimotor deficits and Purkinje neuron loss in the cerebellum of adult offspring rats. *Arch Toxicol.* 80 : 620-31.
- Aebi H (1974).** Evaluation de l'activité de la catalase. *Catalase In methods of enzymatic analysis* 2nd ed. H.U. Bergmeyer. Verlag chimie GmbH. Weinheim. 2: 673 - 684.
- Agrawal A, Sharma B (2010).** Pesticides induced oxidative stress in mammalian systems: a review. *Int. J. Biol. Med. Res.* 1: 90 -104.
- Ahmad I, Shukla S, Kumar A, Singh BK, Patel DK, Pandey HP, Singh C (2010).** Maneb and paraquat-induced modulation of toxicant responsive genes in the rat liver: comparison with polymorphonuclear leukocytes. *Chem. Biol. Interact.* 188: 566–579.
- Ahmed RS, Seth V, Pasha ST, Banerjee BD (2000).** Influence of dietary (Zingiber officinalesRosc) on oxidative stress induced by malathion in rats. *Food Chem Toxicol.* 38: 443-50.
- Allard J, Royall D, Kurian R, Muggli R, Jeejeebhoy K (1994).** Effects of b - carotene supplementation on lipid peroxidation in humans. *Am J Clin Nutr.* 59:884-90.
- Alaoui Mdaghri Y, Mossadeq A, Faroudy M, Sbihi A (2010).** Complications cardiaques au cours de l'intoxication aux organophosphorés. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie.* 59 (2): 114-117.
- Amitai G, Moorad D, Adani A, Doctor BP (1998).** Inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by chlorpyrifos-oxon. *BiochemPharmacol.* 56: 293-9.
- Antonio F. Hernández, Marina Lacasaña, Fernando Gil, Miguel Rodríguez-Barranco, Antonio Pla, Olga López-Guarnido (2013).** Evaluation of pesticide-induced oxidative stress from a gene–environment interaction perspective. *Toxicology.* Volume 307: 95–102.
- Azzi A, Boscoboinik D, Mari!ley D, Ozer NK, Stiuble B, Tasinato A (1995).** Vitamin E: a sensor and an informa-tion transducer of the cell oxidation status. *Am J Clin Nutr.* 62 (suppl): 1337S-46S.
- B. Ezzahiri, M. Bouhache, M. Mihi (2009).** Index. phytosanitaire Maroc.
- Baldi B , Lebaily P (2007).** Cancers and pesticides, *Rev.Prat.*57:40-44.

Références Bibliographiques

- Banerjee BD, Seth V, Ahmed RS (2001).** Pesticide induced oxidative stress: perspective and trends. *Rev Environ Health.* 16 : 1-40.
- Banerjee BD, Seth V, Bhattacharya A, Pasha ST, Chakraborty AK (1999).** Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free radical scavengers. *Toxicol Lett.* 107 : 33-47.
- Bagnoux A-S, Morena M, Badiou S, Dupuy A-M, Canaud B, Cristol J-P (2009).** Stress carbonylé et modification oxydatives des protéines au cours de l'insuffisance rénale chronique. *Annales de biologie clinique.* 67(2):153-8
- Barouki R, Morel Y (2005).** Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress : mechanisms and biological implications. *Biochem Pharmacol.* 61 : 511-6..
- Baynes JW, Thorpe SR (1999).** Role of oxidative stress in diabetic complications. A new perspective on an old paradigm. *Diabetes.* 48: 1-9.
- Behrend L, Henderson G, Zwacka RM (2003).** Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochemical Society transactions.* 31: 1441-1444.
- Berliner JA, Heineche JW(1996).** The role of oxidized lipo-proteins in atherogenesis. *Free Rad Biol Med.* 20: 707-27.
- Bethesda, MD (1988).** Hazardous Substances Databank.Toxicology Data Network.U.S. National Library of Medicine.
- Carpenter KLH, Cheeseman KH, Van Der Veen C, Taylor SE, Walker MK, Mitchinson MJ (1995).** Depletion of alpha-tocopherol in human atherosclerotic lesions. *Free Rad Res.* 23: 549-58.
- Claiborne A. (1985).** Catalase activity. Dans : *CRC Handbook of methods for oxygen radical research.* Édition Greenwald R.A.: 283-284.
- Dany Mercan Unilabs (2010).** *Stress Oxydatif A.R.L.p.*
- Davies MJ (1999).** Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Rad Biol Med* 27: 1151-1163.
- Davies MJ (1987).** Stable markers Proteins damage and degradation by oxygen radicals: general aspects. *JBC* 262: 9895-9901.
- Delattre J, Théron P, Bonnefont-Rousselot D.** Espèces réactives de l'oxygène, antioxydants et vieillissement. In : Delattre JB, Bonnefont-Rousselot D, eds. *Radicaux libres et stress oxydant.*
- Desaint S, Luriau S, Aude JC, et al (2004).** Mammalian antioxidant defenses are not inducible by H₂O₂. *J Biol Chem.* 279 : 31157-63.

Références Bibliographiques

Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T (2000). Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens.* 18 : 655-73.

Dion Sylvain, (2007). Guide de classement des ingrédients actifs par groupes chimiques, Québec, ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs : 35 p.

Dominguez Z, Ruiz E, Gussinye M, Carrascosa A (1998). Oxidative stress at onset and in early stages of type diabetes in children and adolescents. *Diabetes care.* **21**: 1736 - 1742.

EL Bakouri H (2006) Développement de nouvelles techniques de détermination des pesticides et contribution à la réduction de leur impact sur les eaux par utilisation des substances organiques naturelles. Thèse de doctorat. Université Abdelmalek Essaadi, faculté des sciences et techniques. Tanger. 203 p.

El-Gendy KS, Aly N-M-, Mahmoud FH, Kenawy A, El-Sebae AK, (2010). The role of vitamin C as antioxidant in protection of oxidative stress induced by imidacloprid. *Food Chem. Toxicol.* 48: 215–221.

Ellman GL (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics.* **82**:70-77.

Ehrmann DA (2005). Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med.* 352: 1223-1236.

Escobar JA, Rubio MA, Lissi EA(1996). Superoxide dismutase and catalase inactivation by singlet oxygen and peroxy radicals. *Free Rad Biol Med.* 20: 285-90.

Esterbauer H (1996). Estimation of peroxidative damage, a critical review. *Path Bio/1996.* 44: 25-8.

Fdil F (2004). Etude de la dégradation des herbicides chlorophénoxyalcanoniques par des procédés photochimique et électrochimique. *Applications environnementales* : 8-25.

FAO 2003. International code of conduct on the distribution and use of pesticides. Rome. FAO. 36 p.

Filiz Demir, Fatma Gökce Uzun, Dilek Durak, Yusuf Kalender (2011). Le stress oxydatif subaiguë chlorpyrifos-induite dans les érythrocytes de rat et des effets protecteurs de la catéchine et la quercétine. *Pesticide Biochemistry and Physiology* Volume 99, Issue 1 : 77–81.

Gamet-Payrastre Laurence (2011). Effets physiopathologiques des mélanges de pesticides. Original Research Article *Cahiers de Nutrition et de Diététique.* Volume 46, Issue 2 : 82-85.

Gérin M, Gosselin P, Cordier S et al. (2003) Environnement et santé publique. *Fondements et pratiques.* p

Ghislaine B (2004). Produits phytosanitaires. *Biologie clinique* EMC Elsevier. 0140: 90-50.

Références Bibliographiques

Gilles Bocquené, Alain Franco (2005). Pesticide contamination of the coast line of Martinique. Original Research Article Marine Pollution Bulletin, Volume 51, Issues 5–7: 612-619.

Goel A, Chauhan DP, Dhawan DK (2000). Protective effects of zinc in chlorpyrifos induced hepatotoxicity: a biochemical and trace elemental study. Biol Trace Elem Res.74 : 171-83.

Grandjean P, Bellinger D, Bergman A, Cordier S, Davey-Smith G, et coll (2008). The faroes statement : human health effects of developmental exposure to chemicals in our environment. Basic Clin Pharmacol Toxicol , **102** : 73-75

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M (2000) . NAD(P)H oxidase : Role in cardiovascular biology and diseases. 86 : 494-501.

Haj Mouhamed D, Ezzaher A, Neffati F, Douki W, Gaha L, Dalle-Donne I, Giustarini D, Milzano A, Colombo R (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. ClinChimActa. 329: 23-38.

Harold I Zeliger (2011). Pesticides Human Toxicology of Chemical Mixtures. Second Edition: 173-185.

Hazard and guidelines (2005). OMS/IPCS. The WHO recommended classification of pesticides.

Hughes DN, Boyer MG, Papst MH, Fowle CD, Rees GAV et Baulu P (1980). Persistence of three organophosphorus insecticides in artificial ponds and some biological implications. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 9: 269.

INRA – Cemagref (2005): Institut Nationale de la Recherche Agronomique- Centre national du Machinisme Agricole, du Génie Rural, des Eaux et des Forêts Pesticides, agriculture et environnement : réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux. Rapports INRA.

INRA, Cemagref (2006). Chapitre 2. Connaissances de l'utilisation des pesticides. 61 p. In Pesticides, agriculture et environnement. Rapport d'expertise scientifique collective. INRA. Cemagref.

Inserm (2005). Effets retardés des pesticides sur la santé humaine Environnement, Risques & Santé. Volume 4, Numéro 3, 187-94, Synthèse Luc Multigner , Institut national de la santé et de la recherche médicale.

Jean-Louis Bonnemain (2002). Biologie et pathologie végétales Modes d'action des produits phytosanitaires sur les organismes pathogènes des plantes (Mode of action of agrochemicals towards plant pathogens). Pierre Leroux Unité de phytopharmacie et médiateurs chimiques, Inra, route de Saint-Cyr.

Références Bibliographiques

- Jean-Louis Bonnemain (2003).** Modes d'action des produits phytosanitaires sur les organismes pathogènes des plantes Original Research Article Comptes Rendus Biologies. Volume 326, Issue 1: 9-21.
- Kehrer JP (1993).** Free radical as mediator of tissue injury and disease. Crit Rev Toxicol. 23: 21-48.
- Kurutas EB, Doran F, Ciralik H (2006).** The effect of endosulfan on lactic dehydrogenase enzyme system in liver of musculus: a histochemical study. Eur J Gen Med. 3 : 148-51.
- Landier C, Ernouf P, O'Byrne P, Furet Y, Codjia M (1995).** Intoxication aiguë sévère par les organophosphorés. Étude toxicocinétique et électroencéphalographique. Original Research Article Urgences Médicales, Volume 14, Issue 5 : 213-215.
- Lemoyne M, Van Gossum A, Kurian R, Ostro M, Axler J, Jeejeebhoy KN (1987).** Breath pentane analysis as an index of lipid peroxidation: a functional test of vitamin E status. Am J Clin Nutr. 46 : 267-72.
- Levine RL, Garland D, Olivier CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shantiel S, Stadman ER (1990).** Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods Enzymol. 186: 464 - 478.
- Libetta C, Sepe V, Esposito P, Galli F, Dal Canton A (2011).** Oxidative stress and inflammation : implications in uremia and hemodialysis , Clinical Biochemistry 44:1189-1198.
- Lindau-Sehpard B, Shaffer J (1993).** Expression of human catalase in acatalasemic murine SVB2 cells confers protection from oxidative damage. Free Rad Biol Med.15: 581-8.
- Najjar MF (2012).** Étude d'un marqueur du stress oxydant chez les fumeurs: le malondialdéhyde Immuno-analyse et biologie spécialisée 27 : 153—158
- Nourooz - Zadeh J, Tajaddidi - Sarmadi J, Lingkle, Wolff SP (1996).** Low density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxydes in plasma. Biochem J. 313: 781–786.
- Mahaboob Khan S, Kour G (2007).** Subacute oral toxicity of chlorpyrifos and protective effect of green tea extract. Pestic Biochem Physiol. 89: 118-23.
- Mansour SA, Mossa AT, Heikal TM (2009).** Effects of methomyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat erythrocytes: in vitro studies. Toxicol. Ind. Health. 25: 557–563.
- Maqvi SM, Vaishnai C (1993).** Bioaccumulative potential and toxicity of endosulfan insecticide to non-target animals. Comp Biochem Physiol.105: 347-61.
- Margaret E. Sears and Stephen J. Genuis(2012).** Environmental Determinants of Chronic Disease and Medical Approaches: Recognition, Avoidance, Supportive Therapy, and Detoxification. J Environ Public Health. 356798. PMC3270432.

Références Bibliographiques

Mc Cord JM, Fridovich I (1988). Superoxide dismutase: the first twenty years. *Free Rad Biol Med.* 5: 363-9.

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. Université de Toulouse. 13 : 249 p.

Meydani M (1995). Vitamin E. *Lancet.* 345: 170-5.

Michael Eddleston, Jonathan M. Street, Ian Self, Adrian Thompson, Tim King, Nicola Williams, Gregorio Naredo, KosalaDissanayake, Ly-MeeYu, Franz Worek, HaraldJohn, SionaghSmith, Horst Thiermann, John B. Harris, R. Eddie Clutton (2012). A role for solvents in the toxicity of agricultural organophosphoruspesticides. *Original Research Article Toxicology, Volume 294, Issues 2–3: 94-103.*

Michiels C, Raes M, Roubion A, Remacle J (1991). Association of antioxidant systems in the protection of human fibroblasts against oxygen derived free radicals. *Free Rad Biol Med.* 14: 323-34.

Miller NJ, Rice-Evans C, Davies M J, Gopinathan V, Milner A (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci.* 84: 407-12.

Miyazaki Z, Hodgson GC (2001). Chronic toxicity of dursban and its metabolites, 3, 5, 6-trichloro-2 pyridinol in chickens. *Toxicol App Pharmacol.* 23: 391-8.

Morel Y, Barouki R (1998). Influence du stress oxydant sur la régulation des gènes. *Med Sci (Paris).* 14 : 713-21.

Morel Y, Barouki R (1999). Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J.* 342 : 481-96.

Multigner L, Ndong JR, Giusti A, Romana M, Delacroix-Maillard H, Cordier S, et al. Chlordecone exposure and risk of prostate cancer. *J Clin Oncol* 2010;28: 3457–62.

Nelson SK, Bose SK, Mc Cord JH (1994). The toxicity of high dose superoxide dismutase suggests that superoxide can both initiate and terminate lipid peroxidation in the reperfused heart. *Free Rad Biol Med.* 16: 195-200.

Nenseter MS, Drevon CA (1996). Dietary polyunsaturates and peroxidation of low density lipoprotein. *Current Opinion in Lipidology.* 7: 8 -13.

Nourooz - Zadeh J, Tajaddidi - Sarmadi J, Lingkle, Wolff SP (1996). Low density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxydes in plasma. *Biochem J.* **313**: 781–786.

Références Bibliographiques

Onil Samuel (2002). Les risques à la santé associés à l'utilisation de pesticides à des fins esthétiques. Catégories : Mesures de protection et prévention, Pesticides, Produits domestiques et médicaments : 2705.

Ottawa (1987). Environnement Canada/Agriculture Canada. Sondage auprès des fabricants de pesticides enregistrés.

Ou P, Nourooz-Zadeh J, Tritschler HJ, Wolff S (1996). Activation of aldose reductase in rat lens and metal-ion chelation by aldose reductase inhibitors and lipoic acid. *Free Radic Res.* **25**: 337 - 346.

Pal R, Ahmed T, Kumar V, Suke SG, Ray A, Banerjee BD (2009). Protective effects of different antioxidants against endosulfan-induced oxidative stress and immunotoxicity in albino rats. *Indian J. Exp. Biol.* **47**: 723–729.

Pantke U, Volk T, Schmutzler M et al (1999). Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery. *Free Rad Biol Med.* **27**:1080-1086.

Patel RP, Moellering D, Murphy-Ullrich J, JO H, Beckman JS, Darley-Usmar VM (2000). Cell signaling by reactive nitrogen and oxygen species in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med.* **28** : 1780-94.

Pincemail J, Meurisse M, Limet R, Defraigne Jo (1999). L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour la médecine. *Vaisseaux, cœur, poumons.* **4(5)** :1-7.

Pincemail J, Meurisse M, Limet R, Defraigne JO (1998). Espèces oxygénées activées en médecine humaine: une approche didactique. *Vaisseaux, Coeur, Poumons.* **3**: 133-8.

Pincemail J, Meurisse M, Limet R, Defraigne JO (1999). Espèces oxygénées activées, antioxydants et cancer. *Medi-Sphere.* **97**: 29-33

Possamai FP, Fortunato JJ, Feier G , Agostinho FR, Quevedo J, Wilhelm Filho D, Dal-Pizzol F (2007). Oxidative stress after acute and sub-chronic malathion intoxication in Wistar rats. *Environ. Toxicol.Pharmacol.* **23**: 198–204.

Raina R, Verma PK, Pankaj NK, Prawez S (2009). Induction of oxidative stress and lipid peroxidation in rats chronically exposed to cypermethrin through dermal application. *J. Vet. Sci.* **10**: 257–259.

Ravi K, Ramachandran B, Subramanian S (2004).Effect of Eugenia Jambolana seed kernel on antioxidant defense system in streptozotocin-induced diabetes in rats.*Life Sciences.* **75**: 2717 – 2731.

Riadh Badraoui, Zouhaier Sahnoun, Nouha Bouayed Abdelmoula, Ahmed Hakim, Moncef Fki, Tarek Rebaï (2007). Peut état des antioxydants épuisement par Tetradifon induire génotoxicité secondaire chez les rats Wistar femelles par le stress oxydatif? *Pesticide Biochemistry and Physiology* Volume 88, Issue 2: 149–155

Références Bibliographiques

Richardson RJ, Moore TB, Kayyali US, Fowke JH, Randall JC (1993). Inhibition of hen brain acetylcholinesterase and neurotoxic esterase by chlorpyrifos in vivo and kinetics of inhibition by chlorpyrifosoxon in vitro: application to assessment of neuropathic risk. *Fundam Appl Toxicol.* 20: 273-9.

Ross JH, Driver JH, Lunchick C, Wible C, Selman F (2006). Pesticide exposure monitoring databases in applied risk analysis. *Rev Environ Contam Toxicol.* 186 : 107-32.

Robineau P, Mercier T (2012). Quelle évaluation pour les produits phytopharmaceutiques ? Which assessment for plant protection products? *Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement* Volume 73, Issue 6 : 927–933.

Sathishsekar & Subramanian, (2005). Antioxidant properties of *Momordica Charantia* (bitter melon) seeds on streptozotocin induced diabetic rats. *Asia Pac J Clin Nutr.* 14(2): 153-158.

Seidle, T., Robinson, S., Holmes, T. et al. (2010). Cross-sector review of drivers and available 3Rs approaches for acute systemic toxicity testing. *Tox. Sci.* 16, 382-396.

Sies H. (1991). Oxidative stress : introduction. In : *Oxidative stress, oxidants and antioxidants.* H. Sies Ed. London : London Academic Press: pp XV-XXII.

Singh M, Sandhir R, Kiran R(2010). Oxidative stress induced by atrazine in rat erythrocytes: mitigating effect of vitamin E. *Toxicol. Mech. Methods.* 20: 119–126.

Sivajothi V, Dey A, Jayakar B, Raj Kapoor B (2008). Antihyperglycemic, Antihyperlipidemic and Antioxidant Effect of *Phyllanthus rheedii* on Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research.* 7 (1): 53 - 59.

Stamler JS, Slivka A (1996). Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. *Nutr Rev.* 54: 1-30.

Stapleton AR, Chan VT(2009). Subtoxic chlorpyrifos treatment resulted in differential expression of genes implicated in neurological functions and development. *Arch Toxicol.* 83 : 319-33.

Suntio LR, Shiu WY, Mackay D, Seiber JN et Glotfelty (1988). Critical review of Henry's Law constants for pesticides. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 103: 1.

Susan McCollister, RJ Kociba, DD McCollister, PJ Gehring (1974). Des études sur la toxicité aiguë et à long terme par voie orale du chlorpyrifos (O, O-diéthyl-O-(3,5,6-trichloro-2 pyridyl) phosphorothioate) de recherche d'origine de l'article *Alimentaires et cosmétiques Toxicologie*, Volume 12, Numéro 1 : 45-61.

Taleb-Senouci D, Ghomari H, Krouf D, Bouderbala S, Prost J, Lacaille-Dubois M A, Bouchenak M (2009). Antioxidant effect of *Ajugaiva* aqueous extract in Streptozotocin-Induced diabetic rats. *Phytomedicine: International journal of phytotherapy and Phytopharmacology.* 16 (6-7): 623-31

Références Bibliographiques

Thabet H, Brahmi N, Kouraïchi N, Elghord H, Amamou M (2009). Intoxications par les pesticides organophosphorés : nouveaux concepts Organophosphoruspoisoning: New concepts Réanimation. Volume 18, Issue 7 : 633-639.

Testud F, Grillet JP, Nisse C (2007). Effets à long terme des produits phytosanitaires : le point sur les données épidémiologiques récentes. Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement. 394-401.

Troy Seidle, Sally Robinson, Tom Holmes, Stuart Creton, Pilar Prieto, Julia Scheel, and Magda Chlebus(2010). Cross-Sector Review of Drivers and Available 3Rs Approaches for Acute Systemic Toxicity Testing. Toxicol Sci. 116(2): 382–396.

Victor VM, Rocha M, Banuls C, Sanchez-Serrano M, Sola E, Hernandez-Mijares A (2009). Mitochondrial complex I impairment in leukocytes from PCOS patients with insulin resistance. J Clin Endocrinol Metab. **94**: 3505-3512.

Vitoux D, Chappuis P, Arnaud J, Bost M, Accominotti M, Roussel AM (1996). Sélénium, glutathion peroxydase, peroxydes et fonctions plaquettaires. Ann Biol Clin. 54: 181-7.

Walid Ben Ameer, Souad Trabelsi, Yassine El Megdiche, Sihem Ben Hassine, Badreddine Barhoumi, Béchir Hammami, Ethel Eljarrat, Damia Barceló, Mohamed Ridha Driss (2013). Concentration of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in mullet (*Mugil cephalus*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) from Bizerte Lagoon (Northern Tunisia). Chemosphere. 90(9): 2372-2380.

Tableau A1: Marqueurs du statut oxydant (MDA, protéines carbonylées plasmatiques et érythrocytaires) chez les rats témoins et les rats expérimentaux (DL 50/25 de chlorpyrifos) :

	Rats témoins	Rats expérimentaux
MDA plasm. ($\mu\text{mol/L}$)	0.9	$2.1 \pm 0.14^{**}$
MDA éry. ($\mu\text{mol/L}$)	3.44 ± 0.51	$8.02 \pm 0.45^{**}$
PCAR plasm. ($\mu\text{mol/L}$)	44.5 ± 1.94	$40.3 \pm 1.94^*$
PCAR éry. ($\mu\text{mol/L}$)	225.6 ± 16.29	$303.4 \pm 18.73^{**}$

Chaque valeur représente la moyenne \pm erreur standard (ES), n=4. Les rats témoins sont nourris au régime standard gavés à l'huile de tournesol; les rats expérimentaux sont nourris également de régime standard mais gavés à l'insecticide, chlorpyrifos, avec une DL50/25.

La comparaison des moyennes est effectuée par le test « t » de Student.

Rats expérimentaux comparés aux rats témoins : $**p < 0.01$ (MDA plasma, éry), $*p < 0.05$ (PCAR plasm,éry).

Tableau A2: Marqueurs du statut antioxydant érythrocytaire :

	rats témoins	rats expérimentaux
Catalase (U/min/mL)	163.8 ± 3.81	$187.2 \pm 16.21^*$
Glutathion éryt. (mmol/L)	0.3	$0.22 \pm 0.01^{**}$

Chaque valeur représente la moyenne \pm erreur standard (ES), n=4. Les rats témoins sont nourris au régime standard gavés à l'huile de tournesol; les rats expérimentaux sont nourris également de régime standard mais gavés à l'insecticide, chlorpyrifos, avec une DL50/25

La comparaison des moyennes est effectuée par le test « t » de Student.

Rats expérimentaux comparés aux rats témoins : $*p < 0.05$; $**p < 0.01$

Résumé

Les pesticides, produits chimiques utilisés pour l'amélioration de la production agricole, possèdent une toxicité et des effets sur la santé humaine et l'environnement. L'objectif de ce travail est de déterminer l'effet du chlorpyrifos, insecticide organophosphoré, sur quelques paramètres du stress oxydatif chez des rats Wistar. Nos résultats montrent que le gavage des rats par cet insecticide à la dose DL50/25 entraîne une augmentation des protéines carbonylées, de la peroxydation lipidique évaluée par les teneurs en MDA et de l'activité de la catalase érythrocytaire; ainsi qu'une diminution du glutathion réduit.

En conclusion, l'exposition des rats au chlorpyrifos entraîne une altération du statut oxydant/antioxydant, signe de la toxicité de ce pesticide.

Mots clés : chlorpyrifos-stress oxydatif- rat wistar

Abstract

Pesticides, chemicals used to improve agricultural production, have toxicity and effects on human health and the environment. The objective of this work is to determine the effect of chlorpyrifos, organophosphorus insecticide on some parameters of oxidative stress in Wistar rats. Our results show that feeding rats with insecticide to DL50/25 dose causes an increase in protein carbonyl, lipid peroxidation assessed by levels of MDA and the activity of erythrocyte catalase; and a decrease in reduced glutathione

In conclusion, exposure of rats to chlorpyrifos leads to an alteration of oxidant/ antioxidant status, a sign of the toxicity of the pesticide.

Keywords: chlorpyrifos- oxidative stress- wistar rats

المخلص

المبيدات الحشرية والمواد الكيميائية المستخدمة لتحسين الإنتاج الزراعي، لديها السمية وآثارها على صحة الإنسان والبيئة. الهدف من هذا العمل هو تحديد تأثير الكلوربيريفوس، الفسفورية الحشرية على بعض المعلمات الاكسدة في فئران ويستار. نتائجنا تظهر أن تغذية الفئران بالمبيدات الحشرية لجرعة DL50/25 يسبب زيادة في البروتين الكربونيل، بيروكسيد الدهون المقررة من قبل مستويات MDA ونشاط كرات الدم الحمراء الكاتالاز؛ وانخفاض في خفض الجلوتاثيون.

في الختام، تعرض الفئران لالكلوربيريفوس يؤدي إلى تغيير حالة الأكسدة /المضادة للأكسدة، وهي علامة على سمية المبيد.

الكلمات المفتاحية: الكلوربيريفوس- الاكسدة- فئران ويستار

INTRODUCTION

ETAT ACTUEL

MATÉRIEL

ET

MÉTHODES

RÉSULTATS

ET

INTERPRÉTATION

DISCUSSION

CONCLUSION

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES