

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/FSNVST/2023

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

Présenté par :

M^{lle} YAHIAOUI Mina & M^{lle} TAMSSAOUT Ferroudja

Thème

**Effet protecteur des antioxydants à l'égard de la
cytotoxicité induite par le chlorpyrifos sur modèle
cellulaire**

Soutenu le : 02/07/2023

Devant le jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>		
<i>M^{me} BENBARA Tassadit</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Présidente</i>
<i>M. BOURNINE Lamine</i>	<i>MCA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Promoteur</i>
<i>M^{me} DJENADI Katia</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Examinatrice</i>

Année Universitaire : 2022/2023

Remerciements

Pour commencer, nous remercions notre grand Dieu tout puissant, qui nous a donné la force et le courage pour arriver au terme de notre mémoire. Nous lui exprimons notre reconnaissance pour sa grande générosité, ainsi que la foi, la volonté, la patience, la santé et la confiance qu'il nous a procuré durant toutes nos années d'études.

*Nous tenons à remercier sincèrement **M. Bournine** qui fut pour nous un promoteur très attentif et très motivé. Sans oublier notre co-promotrice **M^{me} Bournine**, qui nous a beaucoup aidé en étant tout le temps disponible. Nous vous sommes très reconnaissantes d'avoir accordé votre confiance pour la réalisation de ce modeste travail.*

*Nous tenons aussi à exprimer, nos sincères gratitudees à **M. Iguer-Ouada** le directeur du laboratoire de recherche à Bejaia qui nous a donnée l'autorisation de la réalisation de notre stage pratique dans son laboratoire.*

*Nous exprimons nos sincères remerciements aux membres du jury, l'examinatrice **M^{me}.Djenadi** et la présidente **M^{me}.Benbara** qui ont consacré leur temps pour évaluer notre travail.*

Nous ne saurons terminer nos remerciements sans citer tout le personnel administratif de la faculté SNV-ST de l'Université Akli Mohand Oulhadj - Bouira..

Mina et Ferroudja

Dédicace

J'ai l'honneur de dédier mon travail à mes chers parents qui m'ont beaucoup soutenue avec leurs encouragements et leurs motivations.

C'est grâce à eux que j'en suis arrivé et une grande part de mon mérite leur revient.

À mon très cher frère Ghilas qui m'a beaucoup aidé pendant mon parcours et je le remercie pour son soutien.

À mon oncle, sa femme et mes cousines Lina, Mannel et Talia qui ont eu la gentillesse de m'accueillir chez eux pendant mon stage à Béjaia.

À mon collègue Akram qui m'a beaucoup aidé et soutenu ainsi que mes collègues du club scientifique : Ouarda, Dahman, Massyl, Nada, Dahim, Aziz, Sirine ...

Sans oublier mon binôme Djoudja, mon cousin Yanis et ma cousine Amira.

MINA

Dédicace

J'ai l'honneur de dédier le fruit de mes années d'études :

*À mon cher papa qui m'a poussé et motivé académiquement, c'est
grâce à lui que j'ai atteint toutes mes objectifs*

*Merci à ma chère maman qui n'a jamais cessé de prier pour moi, de
me soutenir, et de me permettre d'atteindre mes objectifs.*

*À mes très chères sœurs : Katia et Ikram et à mes cher frère Amine et
Isalm*

À ma chère cousine ouezna

*À mon binôme Yahiaoui Mina, à tous mes amies (nawel ; ouerda ;
tina ; anias) que j'ai eu la chance d'avoir dans ma vie*

DJOUDDJA

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1

Chapitre I : Généralités sur les pesticides

I.1. Présentation des pesticides	3
I.2. Classification des pesticides	3
I.2.1. Selon la cible	4
I.2.2. Selon le mode d'action	4
I.2.3. Selon la structure chimique	5
I.2.4. Selon la dangerosité	9
I.3. Formulation des pesticides	10
I.4. Toxicité des pesticides	11
I.4.1. Modes et voies d'exposition	11
I.4.2. Types de toxicités	11
I.4.3. Métabolisme et mécanisme de toxicité	13
I.5. Effets des pesticides sur la santé	14
I.5.1. Perturbateurs endocriniens	14
I.5.2. Dommages génétiques	15
I.5.3. Stress oxydatif	15
I.5.4. Effets épigénétiques	16
I.5.5. Effets cancérigènes	16
I.5.6. Effets neurologiques	16
I.5.7. Effet sur le système immunitaire	17
I.6. Effet du chlorpyrifos sur la santé	17

I.6.1. Effets neurotoxiques	17
I.6.2. Effets sur le système endocrinien	18
I.6.3. Risques pour le développement fœtal	18
I.6.4. Effets sur le système respiratoire	18

Chapitre II : Généralités sur les érythrocytes

II.1. Structure et fonction	20
II.2. Erythropoïèse	20
II.3. L'hémoglobine	22
II.3.1. Synthèse de l'hémoglobine	23
II.3.2. Rôle de l'hémoglobine	23
II.4. La membrane plasmique	26
II.4.1. La bicouche lipidique	26
II.4.2. Cytosquelette	27
II.4.3. Physiopathologie de la membrane des érythrocytes	28
II.5. Stress oxydatif et vieillissement des érythrocytes	29
II.5.1. Système de défense contre les radicaux libres	30
II.5.2. Systèmes de réduction de la méthémoglobine	30
II.5.3. Vieillissement des érythrocytes	32

Chapitre III : Mécanismes de toxicité des pesticides

III.6. Induction d'un stress oxydatif	34
III.6.1. Oxydation physiologique et pathologique de l'hémoglobine	37
III.6.2. Peroxydation lipidique	389
III.6.3. Eryptose	40
III.6.4. Rôle du stress oxydant dans la cytotoxicité des pesticides	40

Chapitre IV : Matériel et méthodes

IV.1. Matériel	43
IV.1.1. Matériel biologique	43
IV.1.2. Produits chimiques	43
IV.1.3. Pesticide utilisé	43
IV.1.4. Anti-oxydants utilisés	43
IV.1.5. Appareillage	43
IV.2. Méthodes	44
IV.2.1. Effet cytotoxique du Chlorpyrifos	44
IV.2.1.1. Préparation des solutions du chlorpyrifos	45
IV.2.1.2. Pourcentage d'hémolyse	45
IV.2.1.3. Test de toxicité du pesticide	45
IV.2.2. Effet protecteur des vitamines	46
IV.2.2.1. Préparation des vitamines	46
IV.2.2.2. Application des vitamines	46
IV.2.3. Test TBARS	50
IV.2.3.1. Protocole du test TBARS	50
IV.2.4. Test de stabilité de l'hémoglobine	50
IV.2.4.1. Préparation de la solution de l'hémoglobine.....	50
IV.2.5. Protocole de la stabilité de l'hémoglobine	49
IV.2.6. Analyses statistiques	49

Chapitre V : Résultats

V.1. Effet cytotoxique du chlorpyrifos	52
V.2. Etude de l'effet cytoprotecteur des antioxydants sur les globules rouges	56
V.3. Test TBARS.....	60
V.4. Test de stabilité d'hémoglobine	61

Chapitre VI : Discussion

VI.1. Discussion 64

Conclusion Error! Bookmark not defined.

Références bibliographiques

Résumé

2,3 DPG	2,3 diphosphoglycérate
A	Absorbance
ABC	<i>ATP-Binding Cassette</i>
AChE	Acétylcholinestérase
ADN	Adenine dioxyribonucleotide
AhR	Aryl Hydrocarbon Receptor
ALAS	<i>5-aminolevilinat synthase</i>
ANOVA	Analyses de la variance
AP-1	Protéine activatrice-1
AR	<i>Androgen Receptor</i>
ARN	Adenine ribonucleotide
ATP	Adenin triphosphate
BFU-E	<i>Burst Forming Unit-Erytroid</i>
Bs	Erythroblastes Basophiles
CAR	<i>Constitutive Androstane Receptor</i>
CAT	Catalase
CFVF	Chlorfenvinphos
CL50	Concentration Létale 50
CPF	Chlorpyrifos
CYP450	Cytochrome P450
Cys93	Cystéine 93
DCT1	<i>Divalent Cation Transporter 1</i>
DDT	Dichlorodihényltrichloroéthane
DL50	Dose Létale 50
EDTA	Acide éthylène-diamine tétracétique
EMX	Enzymes du métabolisme des xénobiotiques
Epo	Erythropoïétine
ER	<i>Estrogen Receptor</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
GR	Globule Rouge
GSH	Glutathion réduit
Hb	Hémoglobine
HIF-1α	Facteur 1- α inductible par hypoxie

HNE	4-hydroxynonenal
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
LDL	<i>Low Density Lipid</i>
MA	Matière Active
MDA	Malondialdéhyde
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NF-κB	<i>Nuclear Factor-kappa B</i>
Nramp2	<i>Natural resistance-associated macrophage protein 2</i>
O	Erythroblastes Orthochromatiques
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCO₂	Pression partielle du dioxyde de carbone
pH	Potentiel hydrogène
PH	Phenylhydrazine hydrochloride
PO₂	Pression partielle d'oxygène
Pos	Erythroblastes Polychromatiques
PPAR	Récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes
ppm	Partie par million
Pr	Proérythroblaste
PXR	<i>Pregnane X Receptor</i>
RBC	<i>Red Blood Cell</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
rpm	<i>Round per minute</i>
Rs	Réticulocytes
SCF	Facteur de Cellule Souche
SNO-Hb	S-nitrosohemoglobin
SO	Stress oxydatif
SOD	Superoxide dismutase
STAT3	Transducteur de signal et activateur de transcription 3
TBA	Acide thiobarbiturique
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>
TCA	Acide trichloracétique
TfR	Récepteur de transferrine
TR	<i>Thyroidian Receptor</i>

Figure 1. Structure générale des organophosphorés selon la formule de Schrader	6
Figure 2. Formule générale des carbamates	8
Figure 3. Mécanisme de toxicité des pesticides au niveau moléculaire	15
Figure 4. Maturation de la lignée érythrocytaire.....	22
Figure 5. La courbe de dissociation de l’oxygène.....	24
Figure 6. Recyclage du NO dans les érythrocytes	26
Figure 7. Model schématique des composants de la membrane des érythrocytaires	28
Figure 8. Les différentes formes pathologiques des érythrocytes.....	29
Figure 9. Système enzymatique de neutralisation des radicaux libres	30
Figure 10. La voie anaérobie NADH-dépendante	30
Figure 11. La Voie aérobie NADPH – dépendante.....	31
Figure 12. Les voies non enzymatiques	32
Figure 13. La formation des MDA et HNE à partir d’acides gras polyinsaturés	38
Figure 14. Protocole de l’induction et protection de la cytotoxicité du chlorpyrifos après optimisation	49
Figure 15. Turbidité cellulaire obtenue après traitement des globules rouges avec différentes concentrations du CPF	52
Figure 16. Le pourcentage de l’hémolyse en testant différentes concentrations du CPF.....	53
Figure 17. Taux de l’hémoglobine intracellulaire après traitement avec différentes concentrations du CPF	54
Figure 18. Le taux de l’hémoglobine libérée après traitement avec différentes concentrations du CPF	54
Figure 19. Taux de la méthémoglobine intracellulaire après traitement avec différentes concentrations de CPF.....	55
Figure 20. Turbidité cellulaire après traitement avec le CPF et différents antioxydants	57
Figure 21. Taux de l’hémoglobine libérée après traitement avec le CPF et différents antioxydants.....	58
Figure 22. Taux de l’hémoglobine intracellulaire des globules rouges traités par le CPF et différents antioxydants	59

Figure 23. Taux de la méthémoglobine intracellulaire des globules rouges traités par le CPF et différents antioxydants..... 60

Figure 24. Le taux de méthémoglobine libéré après traitement avec le CPF et différents antioxydants..... 60

Figure 25. Le taux des MDA formés après peroxydation lipidique suite à un traitement avec le CPF et différents antioxydants 61

Figure 26. Taux de l'hémoglobine après contacte directe avec le CPF et les antioxydants...61

Figure 27. Taux de la méthémoglobine après contacte directe entre le CPF et l'hémoglobine avec test de protection aux antioxydants..... 62

Tableau I. Classification des pesticides selon l'OMS.	10
Tableau II. Les différents ROS et les systèmes antioxydants.	34
Tableau III. L'effet du stress oxydatif induit par les pesticides sur différents tissus.	40
Tableau IV. Liste des appareils utilisés lors de l'expérimentation.	44

Introduction

Les pesticides sont des substances chimiques utilisées dans l'agriculture pour lutter contre les ravageurs des cultures, les mauvaises herbes et les maladies des plantes. Bien qu'ils aient contribué à augmenter la production alimentaire, ils posent également des problèmes environnementaux et de santé [1]. L'utilisation des pesticides c'est intensifié pendant la deuxième guerre mondiale avec la découverte du DDT (dichloro-diphényle-trichloro-éthane) qui devient le pesticide le plus utilisé dans le monde vu son efficacité. Après cette période, un nombre important de pesticides ont été développés [2].

Au fil du temps, les pesticides synthétiques ont été développés pour une efficacité accrue dans le contrôle des ravageurs. Les pesticides modernes comprennent une gamme de produits chimiques tels que les insecticides, les herbicides, les fongicides, les nématicides et les rodenticides [3].

L'utilisation intensive des pesticides a permis d'augmenter considérablement les rendements agricoles et de protéger les cultures contre les pertes causées par les maladies et les ravageurs. Cependant, cela a également conduit à des conséquences indésirables. Les pesticides peuvent s'accumuler dans l'environnement. Ces effets néfastes sur l'environnement peuvent entraîner la perte de biodiversité, la pollution de l'eau et la dégradation des écosystèmes [4].

En ce qui concerne la santé humaine, l'exposition aux pesticides peut se produire de différentes manières. Les agriculteurs, les travailleurs agricoles et les applicateurs de pesticides sont les plus exposés en raison de leur manipulation directe des produits chimiques. Cependant, la population générale peut également être exposée par le biais de résidus de pesticides dans les aliments, l'eau potable et l'environnement en général [5] Lorsque les pesticides s'infiltrant dans le corps, ils se retrouvent rapidement dans le sang, qui est le véhicule des substances étrangères. C'est dans ce compartiment qu'ils agissent notamment sur les globules rouges (GRs), qui représentent leur première cible. La fonction principale des globules rouges est de transporter l'oxygène à travers l'hémoglobine (Hb). De par leur structure et leur fonction, les érythrocytes sont les cellules les plus sensibles au stress oxydatif (SO), c'est pourquoi ils possèdent un système antioxydant très développé. Un déséquilibre entre les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les antioxydants peut facilement se produire lors d'expositions élevées aux pesticides, entraînant la génération de SO. Les érythrocytes sont très sensibles au SO, entraînant une oxydation de l'hémoglobine (Hb) en méthémoglobine (metHb) et une oxydation des lipides membranaires, ce qui altère la fonction des érythrocytes et leur fait perdre l'intégrité de la membrane. Un stress oxydatif soutenu active les voies de signalisation menant à

l'apoptose et à l'inflammation. L'apoptose ou la mort programmée des globules rouges (éryptose) peut entraîner une anémie hémolytique chez les sujets exposés [6].

Des études se sont intéressées sur l'effet des pesticides sur les érythrocytes *in vivo* ou *in vitro*. Ces études ont révélé que l'exposition aux pesticides peut avoir des conséquences néfastes sur les érythrocytes. Les chercheurs ont découvert que l'exposition aux pesticides était associée à une augmentation du SO dans les érythrocytes, ce qui peut entraîner des dommages cellulaires. Ainsi, ces études démontrent que les pesticides ont des effets délétères sur les GRs à la fois *in vivo* et *in vitro* [6,7, 9, 15]. Ces effets comportent une diminution de la survie des GRs, une augmentation de la fragilité cellulaire, des altérations de leur forme et de leur structure, ainsi qu'une réduction de la capacité à transporter l'oxygène. Ces effets peuvent avoir des implications majeures pour la santé humaine, notamment en altérant la fonction respiratoire et en favorisant le développement de maladies liées au SO [16]. Néanmoins, l'impact direct des pesticides sur les GRs par l'exacerbation du SO à l'intérieur de ces cellules en particulier par la production de la metHb, n'a pas encore été suffisamment exploré dans la littérature. De plus, l'utilisation d'antioxydants pour contrecarrer les effets toxiques des pesticides sur les GRs reste un domaine de recherche inexploré.

Dans ce document nous allons parler, dans le premier chapitre, sur les pesticides de façon générale et nous présenterons les différents effets de ces derniers sur la santé. Dans le deuxième chapitre, nous allons aborder quelques généralités sur les érythrocytes qui représentent notre modèle d'étude. Dans le dernier chapitre, nous allons citer les différents mécanismes de toxicité induite par les pesticides en se basant sur le stress oxydatif. A la fin, nous allons présenter notre travail de recherche qui consiste à tester l'effet toxique d'un pesticide nommé chlorpyrifos (CPF) sur les GRs, optimiser un protocole de protection des vitamines C et E sur la cytotoxicité induite par le CPF, l'évaluation des taux des MDA induites par ce dernier et la détermination de l'effet directe entre l'hémoglobine et le pesticide.

Chapitre I

Généralités sur les pesticides

I.1. Présentation des pesticides :

Les pesticides sont des substances chimiques utilisées pour éliminer les organismes considérés comme nuisibles pour les cultures ou la santé humaine. Ils peuvent être appliqués à des plantes, des sols ou des animaux pour prévenir ou traiter les maladies et les ravageurs [17].

Selon la FAO (*Food and Agriculture Organization*) un pesticide représente : « 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 et les autres endo- ou écto-parasites. Le terme inclut les substances destinées à être utilisées comme régulateur de croissance des plantes, comme défoliant, comme agent de dessiccation, comme agent d'éclaircissage des fruits ou pour empêcher la chute prématurée de ceux-ci, ainsi que les substances appliquées sur les cultures, avant ou après la récolte, pour protéger les produits contre la détérioration durant l'entreposage et le transport. » [18]

La grande partie des pesticides sont utilisés à la fois dans l'agriculture et comme agent de lutte contre les maladies vectorielles, d'autres sont utilisés en sylviculture et pour l'élevage du bétail [19].

Un pesticide peut être soit un produit chimique synthétique ou biologique comme c'est le cas de *Bacillus thuringiensis*, dont on se sert dans le programme de lutte contre les moustiques vecteurs du paludisme [20].

La plupart des formulations des pesticides sont constitués de la matière active mélangée aux adjuvants qui ont pour rôle de faciliter leur utilisation [1].

I.2. Classification des pesticides :

Les pesticides sont classés selon la cible sur lesquelles ils agissent, selon leur mode d'action et selon leur structure chimique ou encore selon leur degré de dangerosité [1, 21, 18, 19]

I.2.1. Selon la cible :

1. **Insecticides** : Ces pesticides sont destinés à tuer les insectes et les parasites et ils agissent soit par contact ou inhalation ou bien par ingestion [1].

2. **Fongicides** : Ces pesticides sont utilisés pour tuer les champignons et les moisissures. Les fongicides peuvent avoir un mode d'action préventif en protégeant les plantes et empêcher ainsi l'apparition des maladies, comme ils peuvent être utilisés pour réprimer une maladie déjà développée [1].

3. **Herbicides** : Ces pesticides sont destinés à tuer les mauvaises herbes et les mauvaises plantes. Les herbicides de contact affectent la partie de la plante avec laquelle il entre en contact. Les herbicides systémiques sont absorbés par la plante et pénètrent dans celle-ci. Certains herbicides sont sélectifs et ne s'attaquent qu'à un petit nombre de plantes. Il existe également des herbicides qui affectent la plante émergée et les graines en empêchant leur germination. Alors que les herbicides non résiduels sont inactifs après leur application et ne contrôlent les plantes que sur une courte période, les herbicides résiduels se dégradent lentement et ils contrôlent les plantes pendant une longue période. Les régulateurs de croissance des plantes sont conçus pour contrôler la croissance des plantes [1].

4. **Nématocides**: Ces pesticides sont conçus pour tuer les nématodes, qui sont des parasites microscopiques [1].

5. **Rodenticides**: Ces pesticides sont utilisés pour tuer les rongeurs et les souris [1].

I.2.2. Selon le mode d'action :

Les **herbicides** sont des perturbateurs de la photosynthèse, perméabilisant de la membrane cellulaire, perturbateurs de la croissance (inhibition de la division cellulaire, perturbation de l'élongation, inhibiteurs de la synthèse de la cellulose), inhibiteurs de la synthèse des lipides, inhibiteurs de la synthèse d'acide aminés et inhibiteurs de la synthèse de pigments [21].

Toute cellule fongique subit trois processus vitaux : la production d'énergie, les échanges extracellulaires et la division cellulaire. Toute perturbation de ces processus entraîne soit la mort de la cellule, ce qui est appelé fongicide, soit l'arrêt temporaire du fonctionnement de la cellule, ce qui est appelé produit fongistatique. Il existe **des fongicides** affectant le processus respiratoire et des fongicides affectant la biosynthèse de chitine, des mélanines, des stérols et des acides nucléiques, et enfin des fongicides agissant sur les microtubules [22., 23]

Les insecticides peuvent avoir une action sur le système nerveux, le système respiratoire ou sur la croissance. Ceux qui ont une action sur la transmission axonale de l'influe nerveux se fixent sur les canaux à sodium et perturbent leur fonction. Tandis que les perturbateurs cholinergiques inhibent l'acétylcholinestérase qui est une enzyme qui dégrade l'acétylcholine en acétate et choline. Si l'acétylcholine n'est pas dégradée, elle se fixe donc sur son récepteur post-synaptique et provoque une hyperexcitation et mort de l'individu. Les insecticides peuvent aussi avoir une action sur le système respiratoire. Ceux-ci inhibent le site I de la chaîne mitochondriale (coenzyme Q oxydo-réductase), inhibent le complexe cytochrome bc1 et inhibent la phosphorylation oxydative [24].

I.2.3. Selon la structure chimique :

Il est important de connaître la classification chimique du pesticide si on cherche les détails de l'impact de ceux-ci et les précautions à tenir compte pendant l'application. Selon la structure chimique de la matière active on site les pesticides naturels et synthétiques. Les pesticides naturels sont généralement extraits de plantes. Les pesticides synthétiques sont catégorisés en deux grands groupes, les minéraux et les organiques. Comme pesticide minéral on peut citer les fongicides inorganiques ; la mixture Bordeaux $\text{Cu}(\text{OH})_2 \text{CaSO}_4$ et la malachite $\text{Cu}(\text{HO})_2 \text{CuCO}$ [25]. Les pesticides organiques sont représentés par quatre grandes familles :

a. Les organochlorés :

Les organophosphorés sont des pesticides organiques avec cinq ou plus atomes de chlore. Les organochlorés ont été les premiers pesticides organiques synthétiques utilisés en agriculture et dans la santé publique. La plupart d'entre eux ont été largement utilisés comme insecticides pour le contrôle d'un large éventail d'insectes, et ils ont un effet résiduel à long terme dans l'environnement puisqu'ils sont résistants à la plupart des dégradations chimiques et microbiennes. Les insecticides organochlorés perturbateurs du système nerveux entraînent des convulsions et la paralysie de l'insecte et de sa mort éventuelle. Certains des exemples représentatifs couramment utilisés des organochlorés sont le DDT, le lindane, l'endosulfan, l'aldrine, la dieldrine et le chlordane [25]. Bien que la production et l'application du DDT aient été interdites dans la plupart des pays développés, y compris aux États-Unis, depuis de nombreuses années, il est toujours utilisé dans la plupart des pays tropicaux en développement pour la lutte contre les vecteurs (en particulier là où le paludisme se répend) [19].

b. Les organophosphorés :

Les insecticides organophosphorés contiennent un groupe phosphaté comme cadre structurel de base défini par la formule de Schrader :

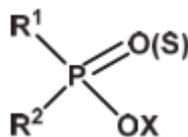


Figure 1. Structure générale des organophosphorés selon la formule de Schrader [25].

R1 et R2 sont généralement des groupes méthyliques ou éthyliques, l'O du groupe OX peut être remplacé par S dans certains composés, tandis que le groupe X peut prendre une grande diversité de formes [25].

Les insecticides organophosphorés sont généralement plus toxiques pour les vertébrés et les invertébrés en tant qu'inhibiteurs du cholinestérase conduisant à une superposition permanente de neurotransmetteur d'acétylcholine sur une synapse. En conséquence, les impulsions nerveuses ne parviennent pas à se déplacer à travers la synapse causant un tremblement rapide de muscles volontaires et donc la paralysie et la mort [19]. Contrairement aux organochlorés, les insecticides organophosphorés sont facilement décomposés dans l'environnement par diverses réactions chimiques et biologiques, les insecticides organophosphorés ne sont donc pas persistants dans l'environnement. Parmi les insecticides organophosphorés les plus utilisés on compte le parathion, le malathion, le diaznon et le glyphosate [25].

Le chlorpyrifos, en particulier, est l'un des composés organophosphorés les plus répandus et étudiés. Le chlorpyrifos a été homologué pour la première fois aux États-Unis en 1965 par la Compagnie Dow Chemical pour lutter contre le feuillage et les insectes nuisibles du sol. Il est formulé et commercialisé sous forme liquide, gel, granulaire, soluble, émulsifiable et fluide concentrés, matières microencapsulées, pastilles, comprimés, matières imprégnées, appâts, poudres mouillables, poussières et formulations prêtes à l'emploi. En raison de sa structure et de ses propriétés physicochimiques, le chlorpyrifos persiste relativement longtemps. En raison de sa nature non polaire, le chlorpyrifos a une faible solubilité dans l'eau et une grande répartition à partir de l'eau vers les solvants organiques. Sa stabilité hydrolytique diminue avec l'augmentation du pH. La volatilisation et la dégradation relativement faibles dans des conditions aérobies la rendent également plus persistante dans l'environnement [26].

Il est utilisé comme insecticide et acaricide à large spectre dans l'agriculture pour contrôler les ravageurs des cultures. Le chlorpyrifos agit en inhibant l'enzyme acétylcholinestérase, ce qui entraîne une accumulation de l'acétylcholine et des dommages au système nerveux des organismes ciblés. L'utilisation généralisée des composés organophosphorés, y compris le chlorpyrifos, a suscité des inquiétudes concernant leur impact sur la santé humaine et l'environnement. De nombreuses études ont été menées pour évaluer les risques associés à ces composés. Par exemple, une étude publiée dans *Environmental Health Perspectives* par Bouchard et al. (2011) a examiné l'association entre l'exposition prénatale aux organophosphorés, y compris le chlorpyrifos, et le développement neurocomportemental chez les enfants [27].

Les résultats de l'étude ont montré des associations entre l'exposition prénatale aux organophosphorés et des effets négatifs sur le développement cognitif et comportemental des enfants. Le mécanisme d'action des composés organophosphorés repose sur leur capacité à inhiber l'enzyme acétylcholinestérase (AChE), qui est responsable de la dégradation de l'acétylcholine, comme aussi est un neurotransmetteur impliqué dans la transmission des signaux nerveux. Lorsqu'un composé organophosphoré pénètre dans l'organisme, il subit une réaction de biotransformation qui le convertit en un métabolite actif. Ce métabolite actif se lie de manière covalente à l'AChE, formant un complexe enzyme-inhibiteur stable. Cette liaison covalente inhibe l'activité de l'AChE et empêche la dégradation normale de l'acétylcholine. En conséquence, l'accumulation d'acétylcholine se produit au niveau des synapses, les jonctions entre les cellules nerveuses. Cela entraîne une stimulation prolongée des récepteurs de l'acétylcholine, ce qui peut provoquer une suractivation des voies nerveuses et perturber les fonctions normales du système nerveux [28].

La dose, la durée d'exposition et la spécificité des composés influencent les effets de l'inhibition de l'AChE par les composés organophosphorés. Les troubles neurologiques tels que les tremblements, les convulsions, les troubles de la coordination, les problèmes respiratoires, les effets sur la cognition et d'autres problèmes de santé peuvent être des symptômes de l'intoxication aux composés organophosphorés. Il est important de noter que, pour la plupart des composés de cette classe, le mécanisme d'action des composés organophosphorés sur l'AChE est identique, bien qu'il puisse y avoir des variations mineures en fonction de la structure chimique spécifique de chaque composé [29].

Il convient également de souligner que l'utilisation des composés organophosphorés en tant qu'insecticides est souvent associée à des préoccupations en matière de santé humaine et d'impact environnemental en raison de leur toxicité. Des réglementations strictes sont mises en place dans de nombreux pays pour encadrer leur utilisation et minimiser les risques pour la santé humaine et l'environnement. Les utilisations courantes du chlorpyrifos comprennent le traitement des cultures agricoles pour prévenir les dommages causés par les insectes et les ravageurs. Il peut être appliqué par pulvérisation directe sur les plantes, le sol ou utilisé pour traiter les semences avant la plantation. Le chlorpyrifos agit en inhibant l'enzyme acétylcholinestérase, perturbant ainsi le système nerveux des insectes et les tuant [28].

c. Les carbamates :

Les carbamates sont des pesticides organiques dérivés de l'acide carbamique avec la formule générale :

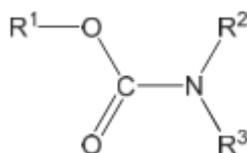


Figure 2. Formule générale des carbamates [25].

R1 est un groupe alcoolique, R2 est un groupe méthyle et R3 est habituellement de l'hydrogène [25].

Les carbamates d'oxime et d'aryle ont une toxicité assez élevée pour les insectes et les mammifères en tant qu'inhibiteurs du cholinestérase [19]. Cette toxicité varie en fonction de la structure chimique mais en générale ils ont une durée plus courte que celle des organophosphorés et organochlorés [30]. Les inhibitions cholinestérasiques des carbamates diffèrent de celles des organophosphorés en ce sens qu'elles sont spécifiques aux espèces et réversibles. Parfois, ils sont également utilisés comme poisons d'estomac et de contact ainsi que fumigeant. Ils peuvent être facilement dégradés dans un environnement naturel avec un minimum de pollution environnementale [19]. Certains des insecticides largement utilisés dans ce groupe comprennent le carbaryl, le carbofuran et l'aminocarbe [25].

d. Les pyréthroides :

Les pyréthroïdes sont des insecticides naturels dérivés du pyréthrum des extraits de fleurs de chrysanthème connues sous le nom de pyréthrine trouvées au Kenya. Il agit sur le système nerveux central, ce qui provoque des variations dans la dynamique des canaux sodiques de la membrane de la cellule nerveuse, ce qui entraîne une augmentation du temps d'ouverture des canaux sodiques. Le flux de cations de sodium traverse la membrane chez les vertébrés et les insectes. Une hyperexcitation neuronale peut résulter de ces actions. En raison de la grande demande de ces pesticides et du manque croissant d'huiles essentielles nécessaires à la fabrication des pyrèthres biologiques naturels, les scientifiques se sont tournés vers la production de pyréthroïdes synthétiques. La plupart des insecticides pyréthroïdes ont plusieurs caractéristiques en commun, notamment une faible toxicité pour les oiseaux et les mammifères ; une toxicité élevée pour les arthropodes, car ils nécessitent de très faibles doses pour tuer les insectes ; une toxicité élevée pour les poissons s'ils sont appliqués directement sur l'eau [30]. Bien que de nombreux insecticides pyréthroïdes puissent être absorbés par les insectes nuisibles lorsqu'ils marchent sur des résidus secs, ils ne sont pas efficaces pour pénétrer le sol et tuer les ravageurs souterrains parce qu'ils adhèrent étroitement au sol et à la matière organique. De plus, ils sont peu solubles dans l'eau [17].

La plupart des insecticides synthétiques sont non persistants, et sont facilement détruits après exposition à la lumière. Ils sont considérés parmi les insecticides les plus sûrs dans l'utilisation alimentaire [19].

I.2.4. Selon la dangerosité :

Selon le risque pour la santé associé aux pesticides et au comportement toxique des pesticides. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) les a classés en quatre catégories. L'OMS a mené une expérience sur des rats et d'autres animaux de laboratoire en administrant une dose de pesticide par voie orale et cutanée. Ils ont ensuite estimé la dose létale médiane (DL₅₀) qui entraîne la mort de 50 % des animaux exposés pour parvenir à cette conclusion. Le classement part de la plus faible à la plus forte toxicité dont les numéros de I à IV indique une toxicité : extrêmement toxique, hautement toxique, modérément toxique, légèrement toxique, respectivement [18] (Tableau I).

Tableau I. Classification des pesticides selon l'OMS [18].

Classe		DL ₅₀ pour le rat (mg/kg de poids corporel)		Exemples
		Voie orale	Voie cutanée	
Classe Ia	Extrêmement dangereux	<5	<50	Parathion, Dieldrin
Classe Ib	Très dangereux	5 à 50	50 à 200	Eldrin, Dichlorvos
Classe II	Modérément dangereux	50 à 2000	200 à 2000	DDT, Chlordane
Classe III	Légèrement dangereux	Plus de 2000	Plus de 2000	Malathion
Classe IV	Peu susceptible de présenter un danger aigu	5000 ou plus		Carbetamide, Cycloprothrin

I.3. Formulation des pesticides :

Les pesticides sont fabriqués à partir d'un mélange de matière active (MA) et d'ingrédients inertes. Les matières actives sont des produits chimiques qui visent à lutter contre les ravageurs, tandis que les matières inertes (comme l'eau, les solvants à base de pétrole, les agents mouillants, les épandeurs, les autocollants, les extendeurs) sont les matières ajoutées à la MA pour rendre les pesticides plus sécuritaires, plus efficaces et plus faciles à mesurer, mélanger et appliquer [19].

Les concentrés émulsionnables : sont de fines suspensions de gouttelettes d'huile dans l'eau et semblent de couleur laiteuse. Ils ne nécessitent pas d'agitation constante avant chaque application [25].

Les poudres mouillables : sont des suspensions de particules fines dans de l'eau. Ces suspensions nécessitent une agitation constante avant chaque application [25].

Granules : Les granulés sont obtenus en mélangeant la matière active avec de l'argile pour des applications extérieures [25].

Appâts : Ceux-ci sont obtenus en mélangeant la matière active avec la base alimentaire spécialement utilisée pour le contrôle des rongeurs [25].

Poussières : Les poussières ne peuvent pas être mélangées avec de l'eau et doivent être appliquées à sec. Les supports communs pour les poussières sont l'argile, le talc, le gel de silice ou la terre diatomée [25].

Fumigeant : Il s'agit d'insecticides gazeux habituellement emballés sous pression et entreposés sous forme de liquides. Certains sont des comprimés ou des pastilles qui libèrent du gaz lorsqu'ils sont mélangés à l'eau [25].

Souvent les adjuvants ajoutés à la matière active présentent des effets toxiques en plus de la toxicité de la matière initiale et parfois même leurs métabolites présentent une toxicité plus élevée que la substance initiale. Un effet cocktail peut subvenir lors d'une exposition simultanée à plusieurs substances ou une exposition à une formulation complexe [31].

I.4. Toxicité des pesticides :

I.4.1. Modes et voies d'exposition :

L'exposition aux pesticides se produit soit directement, c'est-à-dire dans le cadre de leur fabrication, utilisation professionnel ou domestique, ou bien indirectement par l'air, contacte de surfaces contaminées ou par ingestion d'aliments et eau contaminés. Quel que soit le mode d'exposition les pesticides comme tous les xénobiotiques pénètrent dans l'organisme selon trois voies : cutanée, inhalation, orale [32]. Dans le cas de l'exposition professionnel la voie d'exposition principale est la voie cutanée qui résulte des manipulations liées au stockage, préparation, nettoyage du matériel, travaux dans les champs traités. Une deuxième voie d'exposition professionnelle on a l'exposition par inhalation qui résulte des épandages alors que l'exposition orale est liée à la contamination qui va des mains et aliments souillés à la bouche. Dans le cadre de la contamination domestique c'est les deux voies orales et d'inhalation qui sont le plus rependue. La voie orale se traduit par l'ingestion d'aliments et d'eau contaminées par des résidus de pesticides [33] ou bien par une ingestion accidentelle ou volontaire d'une forte dose du produit toxique [31]. L'habitation dans des zones proches des épandages et fumigeant augmente le risque d'inhalation chez la population générale [32].

I.4.2. Types de toxicités :

En dépit de l'intérêt agricole et de santé publique des pesticides, ceux-ci présentent aussi des dangers pour l'environnement et la santé humaine. Les pesticides ne font pas la différence entre un organisme nuisible et les autres organismes et du fait de leur grande activité

biologique et toxicité ils sont potentiellement dangereux pour les humains, animaux et l'environnement [19].

Plusieurs paramètres affectent le degré de dommages causés par les pesticides ; la voie d'exposition, la dose exposée, les propriétés physicochimiques du pesticides, l'état physique de l'individu et qui inclue aussi son métabolisme [19].

La toxicité d'un pesticide s'exprime par la dose létale 50 (DL₅₀) ou bien la concentration létale 50 (CL₅₀). Elle est mesurée en administrant des doses croissantes d'un toxique puis on calcule le nombre de mort pour chaque dose unique et les résultats sont enregistrés. La dose unique qui tue 50% des individus représente la DL₅₀. Cette entité est mesurée par mg/kg de poids corporel. La CL₅₀ c'est la concentration du produit chimique dans le milieu externe (habituellement l'air ou l'eau entourant les animaux de laboratoire), ce qui entraîne une mortalité de 50 % de la population d'essai, où la population est génétiquement homogène. Elle est exprimée en parties par million (ppm) [19].

On cite les intoxications aiguës qui désignent des dommages engendrés par une exposition à une forte dose unique de la substance. Celle-ci est facile à déterminer de la façon expliquée ci-dessus. La toxicité subaiguë et chronique désignent les dommages engendrés par une exposition répétée à de faibles doses d'une substance pour une courte période (subaiguë) et une longue période (chronique). Par contre dans ce cas il est plus difficile d'établir un lien de causalité [31].

a. Intoxication aiguë : Les effets nocifs d'une exposition unique par n'importe quelle voie d'entrée sont appelés « effets aigus ». Les quatre voies d'exposition sont la peau, l'inhalation (poumons), la bouche et les yeux. La toxicité aiguë est déterminée en examinant la toxicité cutanée, la toxicité par inhalation et la toxicité orale des animaux d'essai. En outre, l'irritation des yeux et de la peau est également examinée. La maladie aiguë apparaît généralement peu de temps après le contact ou l'exposition au pesticide. Plusieurs symptômes, comme des maux de tête, des courbatures, des éruptions cutanées, une mauvaise concentration, des nausées, des étourdissements, une vision altérée, des crampes, des crises de panique et, dans les cas graves, le coma et la mort, peuvent survenir en raison d'une intoxication aux pesticides [19].

b. Toxicité chronique : Tout effet nocif découlant de petites doses répétées pendant une certaine période est appelé « effets chroniques ». Les effets chroniques présumés de

l'exposition à certains pesticides comprennent les anomalies congénitales, la toxicité pour le fœtus et la production de tumeurs bénignes ou malignes...etc. Il est plus difficile de déterminer la toxicité chronique d'un pesticide que la toxicité aiguë au moyen d'analyses en laboratoire. L'exposition continue et répétée à des quantités sublétales de pesticides cause des maladies chroniques chez les humains [19]. Récemment, plusieurs études établissent un lien entre l'exposition aux pesticides et l'incidence des maladies chroniques humaines touchant les systèmes nerveux, reproducteur, rénal, cardiovasculaire et respiratoire [34].

I.4.3. Métabolisme et mécanisme de toxicité :

Une fois les pesticides dans l'organisme, ils se lient à différents récepteurs tels que l'Aryl hydrocarbon Receptor (AhR), le Pregnane X Receptor (PXR) et le Constitutive Androstane Receptor (CAR), qui activent le processus d'adaptation de la cellule aux xénobiotiques. La transduction du signal qui en résulte, conduit à l'induction de l'expression des enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX) qui comprend les enzymes de phase I et les enzymes de phase II qui permettent l'élimination des xénobiotiques [33]. La première phase est une étape de fonctionnalisation qui fait intervenir les mono-oxygénases, le plus souvent les cytochromes P450 (CYP450) [35]. Ils ajoutent un groupe réactif, comme un radical hydroxyle (groupement OH). En conséquence de cette étape, des molécules réactives, qui peuvent être plus toxiques que la molécule mère, sont produites [36].

Les réactions de conjugaison de phase II suivent généralement l'activation de phase I, ce qui donne un xénobiotique qui a été transformé en un composé hydrosoluble qui peut être excrété par l'urine ou la bile. Il existe dans l'organisme plusieurs types de réactions de conjugaison, dont la glucuronidation, la sulfatation et la conjugaison aux acides aminés et au glutathion [36]. Les réactions de conjugaison sont généralement des réactions de désintoxication, mais peuvent aussi être des réactions d'activation [37].

Le système d'efflux (p-glycoprotéine ou multi-drug resistance) a été défini comme le système de détoxification de phase III. Le transporteur est une pompe à efflux dépendant de l'énergie, qui pompe les xénobiotiques hors d'une cellule, diminuant ainsi la concentration intracellulaire des xénobiotiques [36].

Il existe différents mécanismes de toxicité des pesticides et parfois même ils peuvent être combinés. Ils peuvent être liés au processus de détoxification lui-même avec la production de métabolites intermédiaires très toxiques pouvant réagir avec des macromolécules cellulaires

(acide désoxyribonucléique [ADN], protéines, lipides) [2, 38] et les modifier et entraîner des lésions cellulaires ou génétiques. Ils provoquent des lésions au niveau de ces molécules par l'intermédiaire de réactions chimiques telles que l'oxydation, la nitration/nitrosation et l'halogénéation. Ces réactions sont objet d'augmentation des mutations et d'entraîner des altérations dans les fonctions de certaines protéines et enzymes majeures. Les ROS peuvent également altérer le maintien du statut redox de la cellule, le métabolisme, la transduction du signal régulant l'oxydation ou la réparation de l'ADN [33].

Un autre mécanisme de toxicité spécifique des perturbateurs endocriniens et métaboliques qui se lie de façon illégitime aux récepteurs ER, AR, TR [39], ou PPAR. D'autres mécanismes sont liés à l'induction de l'expression de gènes ou à l'activation de voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la différenciation cellulaires, et dans l'homéostasie métabolique [40].

I.5. Effets des pesticides sur la santé :

I.5.1. Perturbateurs endocriniens :

Les hormones endocriniennes sont des substances chimiques sécrétées par une glande particulière et elles agissent sur des cellules, des tissus, des organes et des systèmes de l'organisme, ces hormones étant de nature très spécifique, en outre, leur concentration et le moment de la libération sur une période de croissance spécifique est d'une grande importance. Les pesticides perturbent leur activité, le moment de leur libération ou peuvent imiter ces hormones. Cela peut aboutir à la réduction de la fertilité, aux anomalies des voies génitales masculines et féminines [22, 23], aux anomalies des glandes thyroïdes [39], affaiblissement du fonctionnement du système immunitaire et divers types de cancer [25,26, 27]. La plupart des effets nocifs causés par les perturbateurs endocriniens sont attribués à leur interférence avec la signalisation hormonale médiée par les récepteurs nucléaires d'hormones [40]. Les perturbateurs endocriniens peuvent aussi agir comme antagonistes, où ils se lient aux récepteurs de l'hormone endogène dans une cellule. Ainsi, l'hormone endogène normale ne peut pas se lier aux récepteurs et aucun signal ne se produit. Les anti-estrogènes et les anti-androgènes sont des exemples de produits chimiques qui bloquent ou antagonistes les hormones. Ils peuvent aussi bloquer les hormones naturelles ou leurs récepteurs en modifiant leur métabolisme dans le foie [41].

I.5.2. Dommages génétiques :

Il est largement établi que la production de ROS est associée aux dommages de l'ADN, peroxydation lipidique [45] et changement dans le potentiel de la membrane mitochondriale [46]. Les enzymes impliquées dans la détoxification des pesticides, produisent des composés électrophiles qui sont des époxydes cancérigènes, ces événements peuvent également rendre la machine de réparation moins efficace, entraînant un vieillissement prématuré et une apoptose. Les déséquilibres des ROS peuvent également recruter des protéines aberrantes qui peuvent entraîner un déséquilibre de la voie de signalisation conduisant à processus tumorigénique [47]. L'exposition à différentes substances chimiques présentes dans notre environnement peut être une cause de l'apparition d'un cancer d'origine mutagène [38].

I.5.3. Stress oxydatif :

La génération de ROS est associée au risque de cancer. ROS peut influencer l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'inflammation, la transformation cellulaire et la mort ou la survie des cellules tumorales, la prolifération, l'invasion, l'angiogenèse et les métastases. Il a été prouvé que les ROS activent les facteurs de transcription NF- κ B, protéine activatrice-1 (AP-1), HIF-1 α , transducteur de signal et activateur de transcription 3 (STAT3)

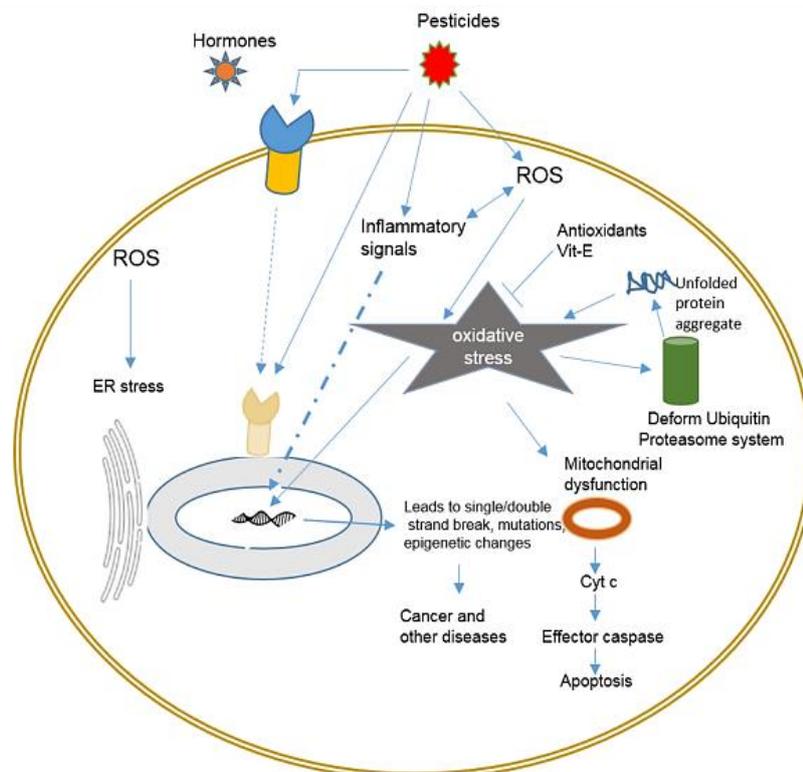


Figure 3. Mécanisme de toxicité des pesticides au niveau moléculaire [48].

[48]. L'augmentation du taux des ROS causé par les pesticides augmentent les signaux

inflammatoires, crée des dommages dans l'ADN qui abouties à la formation de cancer ou autre maladies chroniques. Le stress oxydatif conduit aussi à des dysfonctionnements mitochondriales qui à son tour libère le Cytochrome C qui active la cascade des caspases et cela induit une apoptose (Figure 3) [48].

I.5.4. Effets épigénétiques :

L'épigénétique consiste principalement en des changements dans les schémas de méthylation de l'ADN, les modifications des histones et l'expression différentielle des ARN non codants, qui provoque des variations dans l'expression des gènes. La recherche dans ce domaine a révélé de nombreuses relations importantes entre les changements épigénétiques et la pathogénicité de plusieurs maladies, dont le cancer. Les facteurs environnementaux sont associés à l'épigénétique. Les études sur les animaux confirment le rôle de l'épigénétique environnementale dans la sensibilité aux maladies [49]. Les pesticides sont des contaminants de l'environnement et on constate maintenant que ces produits chimiques sont associés à des modifications épigénétiques, ce qui a des effets sur la santé humaine [42].

I.5.5. Effets cancérigènes :

Les pesticides peuvent avoir des effets cancérigènes sur la santé humaine. Plusieurs études ont été menées pour évaluer le risque de cancer associé à l'exposition aux pesticides. D'après les études ont démontrés une association entre l'exposition aux pesticides et certains types de cancers, notamment le lymphome non hodgkinien, le cancer de la prostate, le cancer du sein, le cancer du poumon et le cancer du cerveau. Le glyphosate, un herbicide largement utilisé dans l'agriculture, a été classé comme cancérigène probable pour l'homme par l'IARC en 2015. Les effets cancérigènes peuvent également être plus prononcés chez les personnes ayant des antécédents familiaux de cancer [50].

I.5.6. Effets neurologiques :

Les pesticides peuvent avoir des effets neurologiques sur la santé humaine, notamment des troubles cognitifs, des symptômes neurologiques et des maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson. Les pesticides peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique et pénétrer dans le cerveau, où ils peuvent affecter les fonctions neurologiques. Certains pesticides, tels que les organophosphorés, agissent en inhibant l'activité de l'acétylcholinestérase, une enzyme nécessaire à la transmission des impulsions nerveuses dans le cerveau [51, 52].

Plusieurs études épidémiologiques ont montré une association entre l'exposition aux pesticides et des troubles cognitifs, notamment la diminution des fonctions cognitives, des déficits de la mémoire et des difficultés de concentration [46, 51, 53, 55]. Les effets neurologiques des pesticides peuvent être plus prononcés chez les personnes exposées à des niveaux élevés de pesticides pendant de longues périodes, ainsi que chez les personnes ayant des antécédents familiaux de troubles neurologiques [56].

I.5.7. Effet sur le système immunitaire :

Les pesticides peuvent également avoir des effets sur le système immunitaire, ce qui peut augmenter la susceptibilité à certaines maladies infectieuses et auto-immunes. Les pesticides peuvent avoir des effets immunosuppresseurs, c'est-à-dire qu'ils peuvent affaiblir la réponse immunitaire de l'organisme à une infection. Cela peut augmenter la susceptibilité à certaines maladies infectieuses, telles que la grippe, ainsi qu'à certaines infections opportunistes chez les personnes immunodéprimées [57].

Plusieurs études ont également suggéré que les pesticides peuvent être impliqués dans le développement de maladies auto-immunes, telles que le lupus érythémateux systémique et la sclérose en plaques. Les mécanismes sous-jacents à ces effets auto-immuns ne sont pas entièrement compris, mais ils peuvent impliquer des modifications de la fonction immunitaire, telles que des changements dans la production d'anticorps. Les effets des pesticides sur le système immunitaire peuvent être influencés par des facteurs tels que la dose, la durée et le type d'exposition, ainsi que l'âge et la santé générale de la personne exposée [57].

I.6. Effet du chlorpyrifos sur la santé :

Le chlorpyrifos a suscité des préoccupations quant à son impact sur la santé humaine en raison de sa toxicité potentielle. Voici quelques effets sur la santé humaine qui ont été associés à l'exposition au chlorpyrifos :

I.6.1. Effets neurotoxiques :

Le chlorpyrifos est connu pour son effet neurotoxique, notamment en perturbant le système nerveux central. Des études ont suggéré que l'exposition au chlorpyrifos peut être associée à des troubles neurocomportementaux chez les enfants, tels que des problèmes d'apprentissage, des déficits cognitifs, des troubles du développement et des troubles du comportement [39,40]. Des effets similaires ont été observés chez les adultes exposés professionnellement au chlorpyrifos [57, 58].

I.6.2. Effets sur le système endocrinien :

Des études ont également suggéré que le chlorpyrifos pourrait avoir des effets sur le système endocrinien, interférant avec la régulation hormonale normale. Certaines recherches ont montré des associations entre l'exposition au chlorpyrifos et des altérations des niveaux d'hormones thyroïdiennes, des déséquilibres hormonaux et des effets sur la reproduction [62].

I.6.3. Risques pour le développement fœtal :

L'exposition au chlorpyrifos pendant la grossesse a été associée à des effets néfastes sur le développement fœtal. Des études ont montré des associations entre l'exposition prénatale au chlorpyrifos et des retards de croissance intra-utérine, des anomalies du développement et des effets néfastes sur le système nerveux central du fœtus [58].

I.6.4. Effets sur le système respiratoire :

Chez les personnes exposées professionnellement au chlorpyrifos, des effets néfastes sur la fonction pulmonaire et l'apparition de symptômes respiratoires tels que l'asthme ont été rapportés [58].

Chapitre II

Généralités sur les érythrocytes

Le sang est composé de cellules et de plasma. Les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes forment les composants cellulaires. La fonction principale du sang est de fournir de l'oxygène aux tissus et d'éliminer le dioxyde de carbone et les déchets. Les autres rôles importants sont ceux de l'immunité et de la défense, de l'homéostasie et de l'hémostase. Dans ce chapitre on se concentre sur les globules rouges.

II.1. Structure et fonction :

Les globules rouges (érythrocytes) sont les composants cellulaires les plus nombreux dans le sang, représentant environ 94 % des cellules. Cela représente l'équivalent de $4,6-6,1 \times 10^{12}/L$ de numération cellulaire chez les hommes et de $4,2-5,4 \times 10^{12}/L$ chez les femmes. Ils ont une forme de disques biconcaves qui, au moment où ils entrent dans la circulation, ils sont dépourvus de noyau et d'organelles. Ils mesurent $6,5-8,5 \mu m$ de diamètre et $1,5-2,5 \mu m$ d'épaisseur. Cette forme unique leur donne une grande surface pour faciliter l'échange de gaz et aussi se déforme de façon réversible pour permettre le passage à travers les petits capillaires [63] plus petit que leur diamètre [64]. La durée de vie moyenne des globules rouges dans la circulation est de 120 jours [65].

La membrane des globules rouges est constituée d'une bicouche lipidique composée de 50% de protéines, 40% de lipides et 10% de glucides. Les glucides sur la surface extérieure de la membrane sont des glycoprotéines et des glycolipides responsables de l'identité antigénique des cellules et ont un rôle dans la compatibilité ABO. Un érythrocyte a besoin d'énergie pour maintenir sa forme et maintenir le fer qu'il contient à l'état réduit (ferreux). L'ATP est produite à l'intérieur de la cellule par la voie Embden-Meyerhof et le NADPH par le shunt monophosphate hexose. Les principales fonctions des érythrocytes sont de [63] :

- Transporter l'hémoglobine (Hb) qui transporte l'oxygène des poumons aux tissus [63],
- Permettre le transport du dioxyde de carbone des tissus aux poumons principalement sous forme de bicarbonate [63],
- Faciliter l'équilibre de la base acide vue que l'Hb est un excellent tampon acide-base [63].

II.2. Erythropoïèse :

Les globules rouges sont produits à partir de cellules hématopoïétiques pluripotentes. Ces cellules souches résident dans la moelle osseuse. Sous stimulation appropriée à partir d'une

variété d'hormones ou de cytokines, elles subissent une série d'événements de maturation qui à la fin va produire des érythrocytes entièrement fonctionnels [64].

L'hormone principale qui régule l'érythropoïèse est l'érythropoïétine (Epo) [65]. Les reins sont le principal site de la synthèse de l'Epo chez les adultes, car ils sont capables de détecter la tension d'O₂ dans le sang. La libération de l'Epo dans le système circulatoire par les reins entraîne une accélération de l'érythropoïèse dans la moelle osseuse. [64].

Le premier progéniteur engagé dans la lignée érythroïde est burst forming unit-erythroid (BFU-E) (figure 4). Ce globule rouge immature ne peut être identifié morphologiquement et est défini comme une cellule qui produit de grandes colonies éclatées de cellules érythroïdes en culture semi-solide. BFU-E exprime des récepteurs pour le facteur de cellules souches (SCF) et un faible niveau de récepteurs d'Epo [66].

La BFU-E se différencie en colony forming unit-erythroid (UFC-E), qui elle aussi ne peut être définie morphologiquement, mais génère de petites colonies compactes de globules rouges matures. CFU-E exprime moins de récepteurs pour le SCF et plus de récepteurs d'Epo, car la lignée devient de plus en plus dépendante de l'Epo pour sa maturation [64].

La synthèse de l'hémoglobine commence au niveau de ces cellules qui ont un rapport noyau-cytoplasme élevé (80%) avec un cytoplasme basophile en raison d'une forte concentration de ribosomes [66].

Les érythroblastes basophiles (Bs) constituent le prochain stade de la voie de maturation, ces cellules sont plus petites (16 à 18 m) et extrêmement basophiles. Le prochain stade comprend les érythroblastes polychromatiques (Pos) de 12 à 15 m, développent une teinte rosée due à l'augmentation du niveau d'hémoglobine et diluent la basophilie induite par les ribosomes. Des érythroblastes orthochromatiques (O) de 10 à 15 m apparaissent avec un cytoplasme de plus en plus rose. Le noyau excentrique, très condensé occupant 25 % du noyau de la cellule, est ensuite relargué pour former les réticulocytes (Rs) qui entrent dans la circulation et continuent leur maturation pendant encore 24-48 heures jusqu'à ce que la teneur finale en hémoglobine soit synthétisée. Après la perte de la mitochondrie et des ribosomes, les érythrocytes matures s'engagent dans l'échange gazeux. On remarque qu'au fur et à mesure de la maturation, les cellules deviennent de plus en plus petites et le rapport noyau/cytoplasme plus petit (Figure 4) [64].

L'érythropoïèse nécessite des vitamines B9 (acide folique) et B12 qui sont indispensables à la synthèse de l'ADN. Le fer est aussi nécessaire et est impliqué dans la synthèse de l'hème avec l'intervention de la vitamine B6 mais à des besoins très limités [66].

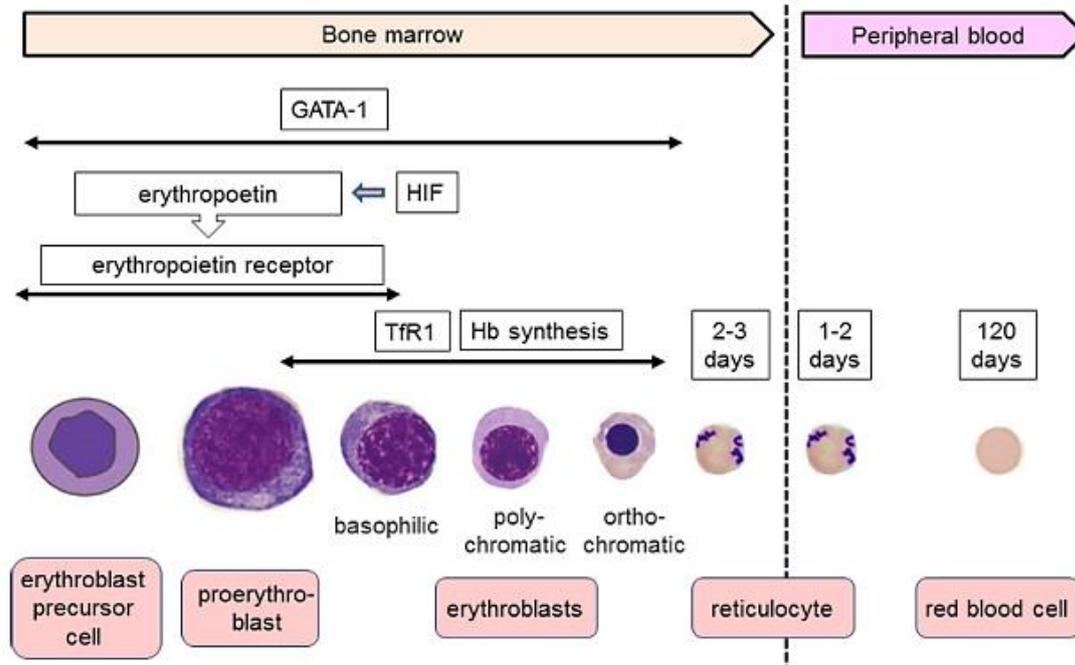


Figure 4. Maturation de la lignée érythrocytaire [64].

II.3. L'hémoglobine :

L'hémoglobine est une métalloprotéine contenue dans les érythrocytes et est responsable du transport de 99% de l'oxygène à partir des poumons vers les tissus et occupe 33% de la masse cellulaire. Il est constitué de quatre sous-unités composées de globines polypeptidiques et de porphyrines centrées d'un atome de fer, la porphyrine et le fer forment l'hème. Il existe deux paires de globines dans une molécule d'hémoglobine, chez l'adulte l'hémoglobine normale (HbA) est constituée de deux chaînes α et deux chaînes β . 2,5% de l'hémoglobine totale représente un autre variant (HbA_2) est constituée de deux chaînes α et deux chaînes δ . L'hémoglobine fœtale (HbF) contient deux chaînes α et deux chaînes γ . Cette différence de structure confère à HbF une meilleure affinité pour l'oxygène pour que l'oxygène maternel traverse vers la circulation fœtale. L'hème est synthétisé à partir de l'acide succinique et glycine et contient un atome de fer sous forme réduite, ferreux (Fe^{2+}). L'hémoglobine porte quatre atomes de fer et transporte donc quatre atomes d'oxygène [67].

II.3.1. Synthèse de l'hémoglobine :

L'hémoglobine est synthétisée lors de l'érythropoïèse à partir du stade proérythroblaste [68]. La synthèse des chaînes de globine sont régulés par la séquence régulatrice (A/T)GATA(A/G) (WGATAR $\frac{1}{4}$ GATA motif), Le facteur de transcription GATA-1 se lie à cette séquence via le doigt de zinc proche de la terminaison carboxylique [50,49].

Le fer qui provient généralement de l'alimentation est transporté dans le sang par une protéine appelé transferrine (Tf) pour entrer dans la cellule elle se lie à un récepteur de transferrine (TfR), ensuite les complexes se regroupent dans les invaginations recouvertes de clathrine et sont donc internalisé dans une vésicule endocytaire. Le fer est libéré par la transferrine dans les vésicules endocytaires par un processus dépendant de la température et de l'énergie qui implique une acidification endosomique [70]. Le fer libéré par la transferrine est ensuite transporté à travers la membrane endosomique, et un candidat convaincant remplissant cette fonction est natural resistance- associated macrophage protein 2' (Nramp2) [71]. Il semble probable que le fer ferrique libéré de la transferrine soit réduit à une forme ferreuse plus soluble, et cette conclusion est confirmée par des études récentes selon lesquelles Nramp2 (aussi appelé DCT1, divalent cation transporter 1) ne peut transporter que du fer ferreux [72]. L'apotransferrine libre, qui reste attachée au récepteur retourne à la surface cellulaire, où l'apotransferrine est libérée des cellules. Une partie du fer est stocké dans la ferritine [70].

L'hème lui est synthétisé dans la mitochondrie. Avec l'arrivé du fer, la première enzyme, 5-aminolevulinate synthase (ALAS), de la voie de cascade de synthèse de l'hème s'active et catalyse la condensation de la glycine et succinyl CoA. A la fin de la cascade de réactions la protoporphyrine IX formé est chélaté par le Fe^{2+} au centre. L'hème est exporté de la mitochondrie à travers le transporteur ATP-Binding Cassette (ABC) puis il s'associe aux chaînes de globine pour former l'hémoglobine [71].

II.3.2. Rôle de l'hémoglobine :

a. Transport de l'oxygène : L'hémoglobine fixe l'oxygène sous une réaction réversible ($O_2 + Hb \leftrightarrow HbO_2$) est forme alors l'oxyhémoglobine. La structure quaternaire de l'Hb détermine son affinité pour l'oxygène. Lorsque l'hémoglobine adulte (HbA) fixe l' O_2 , les deux chaînes β se rapprochent, et lorsque l' O_2 est abandonné, elles s'écartent davantage. Le mouvement des chaînes provoque un changement dans la position des groupes hémiques qui prennent un état détendu (R) qui favorise la liaison de l' O_2 ou un état tendu (T) qui réduit la liaison de l' O_2 . Lorsque l'oxygène se lie à l'hémoglobine, la forme R est favorisée dans les

molécules d'hémoglobine. La liaison du premier groupe hémique dans l'hémoglobine fait augmenter l'affinité du deuxième groupe qui une fois lié, il favorise l'état R du troisième groupe et ainsi de suite. Cela signifie que l'affinité du quatrième groupe pour l'oxygène est beaucoup bien meilleure que les précédents. Cette propriété, connue sous le nom d'interaction hème-hème, donne lieu à une courbe sigmoïdale lorsque la saturation est en fonction de la pression partielle d'oxygène (PO_2) dans une courbe de dissociation de l'oxygène (figure 5). Cette interaction hème-hème présente également un avantage au niveau des tissus, car l'inverse est également vrai où une légère diminution en PO_2 est nécessaire dans les tissus pour qu'une quantité d'oxygène soit libérée. En revanche, la courbe de dissociation de la myoglobine est hyperbolique, ce qui signifie que si la myoglobine a une forte affinité pour l'oxygène, elle ne renonce pas facilement à l'oxygène, ce qui constitue un avantage dans son rôle de protéine de stockage de l'oxygène dans le muscle (figure 5). L'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène est affectée par : le pH, la température et la concentration de 2,3 diphosphoglycérate (2,3 DPG). Une diminution de l'affinité de l'Hb pour l'oxygène lorsque le pH baisse, est appelée l'effet Bohr et est étroitement liée au fait que la désoxyhémoglobine lie plus activement les ions hydrogène que l'oxyhémoglobine. Le pH du sang diminue à mesure que la teneur en dioxyde de carbone (CO_2) augmente dans les tissus, de sorte que lorsque la pression partielle du dioxyde de carbone (PCO_2) augmente, la courbe de dissociation de l'oxygène se déplace vers la droite,

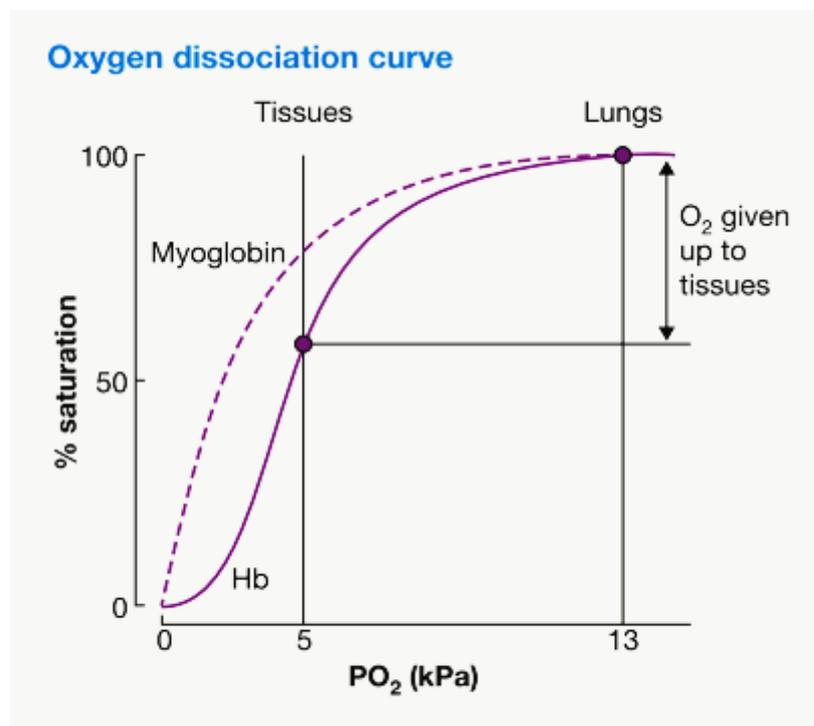
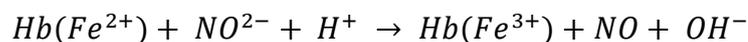


Figure 5. La courbe de dissociation de l'oxygène [42].

ce qui signifie que l'hémoglobine a une affinité inférieure pour l'oxygène, encourageant à nouveau la libération d'oxygène au niveau des tissus [42, 54].

b. Transport et tampon du dioxyde de carbone (CO₂) : L'érythrocyte joue un rôle important dans le transport du dioxyde de carbone (CO₂) des tissus vers les poumons. Bien que le CO₂ soit 20 fois plus soluble que l'O₂, seulement 7 % du CO₂ est transporté dissous dans le plasma. La grande majorité du CO₂ subit une réaction chimique au sein de l'érythrocyte, soit par une réaction d'hydratation catalysée par l'anhydrase carbonique et la conversion du CO₂ en ions bicarbonate (70 %), soit en se combinant directement à l'hémoglobine pour former un composé de carbaminohémoglobine [63].

c. Monoxyde d'azote (NO) : Une hypoxie qui se traduit par l'augmentation du taux de déoxyhémoglobine (déoxyHb) conduit les érythrocytes à libérer une petite quantité d'ATP qui active la synthèse de vasodilatateurs par les cellules endothéliales (y compris l'oxyde nitrique) qui détendent les muscles lisses vasculaires et augmentent le flux sanguin local et l'apport d'O₂ [74]. Le monoxyde d'azote synthétisé par les cellules endothéliales entre dans les érythrocytes pour le transporter. Le NO entrant dans le sang est sujet à une inactivation rapide par des réactions avec l'oxyHb pour former de la méthémoglobine (metHb) et du nitrate et par sa liaison étroite avec les groupes hémiques désoxygénés dans l'Hb pour former de la nitrosylhémoglobine (HbNO). Lorsque le sang est oxygéné au niveau des poumons l'Hb prend la forme R. Une fraction de NO qui provient du HbNO va être transférée à partir de l'hème vers la cystéine93 (Cys93) de la chaîne β de l'hémoglobine pour former S-nitrosohémoglobine (SNO-Hb). Après déoxygénation au niveau des tissus, l'Hb favorise la conformation T qui aboutit à la libération du NO à partir du SNO-Hb [75]. Ce phénomène s'explique par le fait que la conformation R favorise une orientation interne du Cys93 alors que la conformation T expose le Cys93 à l'extérieur [76]. Il faut noter que l'activité de la NO synthase (NOS) augmente le taux de nitrite dans le plasma [77], ce dernier peut être recyclé dans les érythrocytes en NO. Le nitrite réagit avec la déoxyhémoglobine selon la formule suivante :



Le mécanisme implique les événements suivants : transport du nitrite dans les RBC, réaction du nitrite avec l'Hb, fuite de l'activité de la NO des RBC et induction de la vasodilatation. Une autre possibilité est que le NO quitte les GR sous forme de trioxyde de dinitrogène (N₂O₃). Un intermédiaire nitrite-metHb et un NO₂ radicalaire se forment pendant la réaction nitrite-Hb, ce

dernier peut réagir avec le NO pour produire du N_2O_3 (Figure 6), qui peut se diffuser et se reformer en NO (et NO_2) à l'extérieur des GR [78].

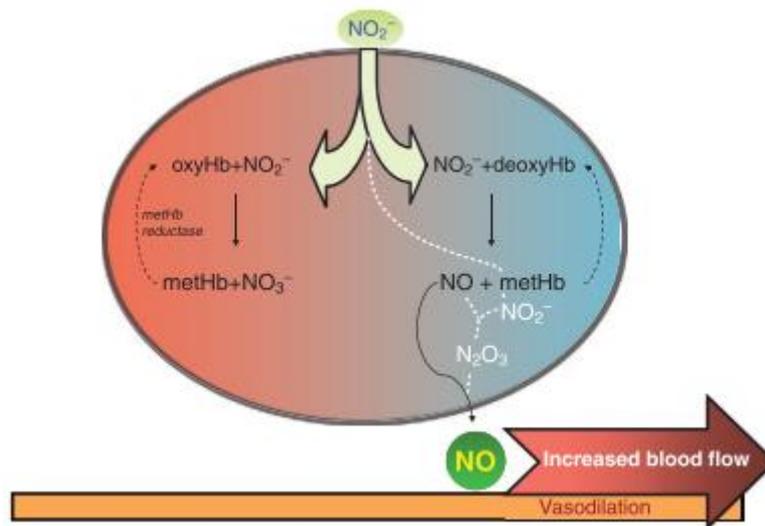


Figure 6. Recyclage du NO dans les érythrocytes [78].

II.4. La membrane plasmique :

La membrane plasmique des érythrocytes est constituée de deux domaines, la bicouche lipidique et le cytosquelette. La structure de la bicouche lipidique ne diffère pas des autres trouvés dans les cellules des mammifères. Tandis que le cytosquelette des GR n'a pas le même principe que celui trouvé dans les autres cellules parce qu'il ne contient pas de tubuline et n'est pas impliqué dans la motilité cellulaire ou la phagocytose [79].

II.4.1. La bicouche lipidique :

Le domaine lipidique est constitué approximativement de parties égales de lipides et protéines. Les lipides majoritaires sont le cholestérol et les phospholipides. Il semblerait aussi que le cholestérol est partagé de façon égale entre les deux couches membranaires alors que la distribution des phospholipides est asymétrique. Dans la face externe de la bicouche on trouve les glycoprotéines, les phosphatidylcholines et sphingomyelines. Du côté du cytoplasme on trouve les phosphatidylinositols, les phosphatidyléthanolamines et Phosphatidylsérine. Si les aminophospholipides avaient été situés sur la face extérieure de la membrane ils auraient déclenché la cascade de coagulation. La fluidité membranaire est déterminée par certains paramètres : le rapport molaire entre le cholestérol et les phospholipides, le degré d'insaturation des chaînes acyl des phospholipides et le rapport phosphatidylcholine et sphingomyeline. Les phosphatidylcholines favorisent la fluidité membranaire alors que les sphingomyelines

induisent sa rigidité. Les protéines sont généralement des glycoprotéines transmembranaires avec trois régions. Les groupes sanguins sont déterminés par les groupements glucidiques attachés à ces derniers. Les protéines qui traversent la membrane sont classées en tant que protéines intégrales et elles comprennent les protéines de la bande 3, ces derniers apparaissent sous formes de taches en bleu de Coomassie sur gel acrylamide, ainsi que diverses. Les protéines de la bande 3 sont des transporteurs d'anion et leur rôle est de transporter le Cl^- et HCO_3^- à travers la membrane ce qui permet le transport du CO_2 à partir des tissus vers les poumons [79].

II.4.2. Cytosquelette :

Le squelette de la membrane des globules rouges est un complexe multi-protéique formé par des protéines structurales comprenant α et β spectrine, ankyrine, protéine 4.1 et actine, il se trouve juste en dessous de la membrane. Les protéines du cytosquelette interagissent avec la bicouche lipidique et les protéines transmembranaires pour donner à la membrane des GR sa force et son intégrité. Ils interagissent entre eux pour former un échafaudage sur la surface interne de la bicouche lipidique. α et β spectrine interagissent côte à côte pour former des hétérodimères flexibles sous forme de tige et qui s'associent tête à tête pour former des tétramères. Les tétramères de spectrine sont liés au cytoplasme selon les mécanismes suivants [80]:

- Les tétramères sont liés par l'ankyrine au domaine cytoplasmique de la protéine de bande 3. La protéine 4.2 se lie à la bande 3 à la même position et peut améliorer l'interaction ankyrin-bande 3 [80].
- Plusieurs tétramères de spectrine interagissent du côté extrême de leur queue avec des protofilaments d'actine, tropomyosine, tropomoduline et adducine pour former des complexes de jonction. La protéine 4.1, qui se lie également à la glycophorine C, une protéine membranaire intégrale, interagit avec la β spectrine au niveau du domaine de liaison actine et augmente l'affinité de la liaison spectrine-actine (Figure 7) [80].

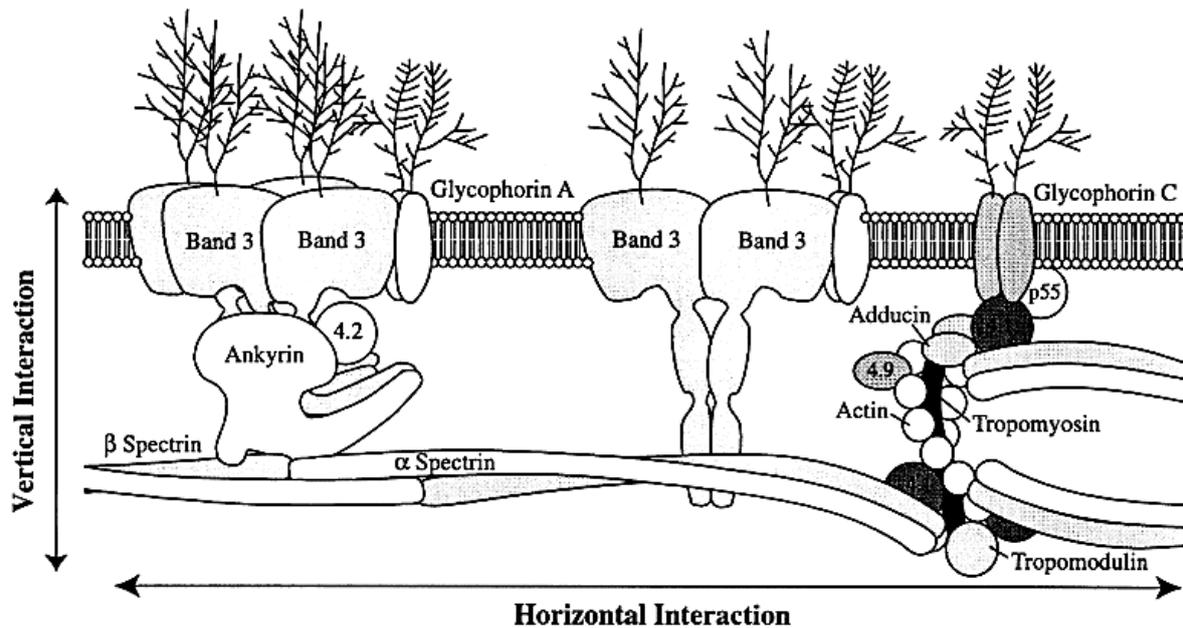


Figure 7. Model schématique des composants de la membrane des érythrocytaires [80].

II.4.3. Physiopathologie de la membrane des GRs :

Les GRs ont une forme normale de discocytes. Néanmoins cette forme peut être altérée sous l'effet de certaines conditions comme l'exposition aux xénobiotiques [81], on obtient alors soit des échinocytes ou des stomatocytes. Les échinocytes sont formés à partir de discocytes lorsque l'adénosine 5'-triphosphate (ATP) est épuisée ou le taux cytoplasmique en Ca^{++} est augmenté. À mesure que le pool cytoplasmique d'ATP diminue, les polyphosphoinositides se déphosphorylent, ce qui altère l'interaction glycophrine-protéine 4.1. Lorsque l'ATP est restaurée, les polyphosphoinositides sont rephosphorylés, et les échinocytes redeviennent des discocytes. Le Ca^{++} cytoplasmique active la phospholipase C, qui clive les polyphosphoinositides. Puisque les érythrocytes ne peuvent pas synthétiser le polyphosphatidylinositol de novo, ni l'acquérir à partir de protéines plasmatiques, l'activité phospholipase C provoque une perte permanente de phospholipide d'inositol et un changement

échinocytique irréversible. Les stomatocytes peuvent également se former lorsque la teneur en eau érythrocytaire est augmentée (Figure 8) [79].

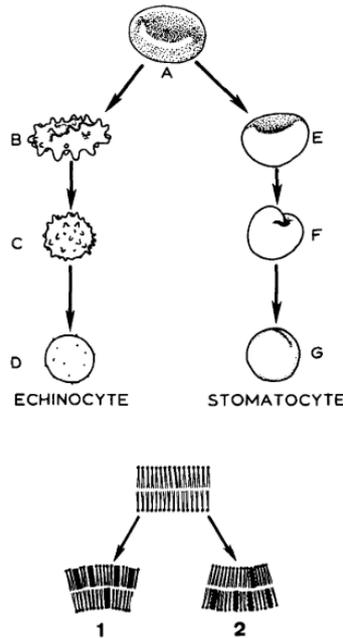


Figure 8. Les différentes formes pathologiques des érythrocytes [79].

À de faibles concentrations de xénobiotiques anioniques, les érythrocytes normaux ou les discocytes (A) sont convertis en échinocytes I (B). À mesure que la concentration augmente, des sphéro-échinocytes I (C) puis des sphéroéchinocytes II (D) se forment. Les xénobiotiques cationiques produisent des stomatocytes I (E), des spherostomatocytes I (F) et des spherostomatocytes II (G) à mesure que la concentration augmente.

II.5. Stress oxydatif et vieillissement des GRs :

Sous l'effet d'oxydant l'hémoglobine s'oxyde pour former la méthémoglobine. L'hémoglobine contient une molécule de fer à l'état ferreux (Fe^{2+}) alors que la méthémoglobine possède un fer à l'état ferrique (Fe^{3+}) [82]. Ces oxydants peuvent être liées aux conditions physiologiques vue la présence d'une forte concentration en fer et oxygène ou bien liée à une exposition aux xénobiotiques comme les pesticides par exemple. Ces substances peuvent participer aussi dans la génération des radicaux libres qui créent des lésions au niveau des molécules [67]. Pour se protéger, les érythrocytes possèdent des systèmes de défense qui neutralisent les radicaux libres et les méthémoglobines [79].

II.5.1. Système de défense contre les radicaux libres :

Avec l'intervention du glutathion peroxydase le glutathion réduit s'oxyde et donne un électron pour le radicale libre. De cette manière le radicale est neutralisé et ne présentera plus de danger sur les molécules de la cellule. Néanmoins, il faut savoir que le glutathion doit être recyclé et pour cela un système enzymatique puissant et liée au métabolisme énergétique intervient (Figure 9). Le coproduit de la glycolyse, le NADH est utilisé comme cofacteur de l'enzyme glutathion réductase pour réduire le GSSG [79].

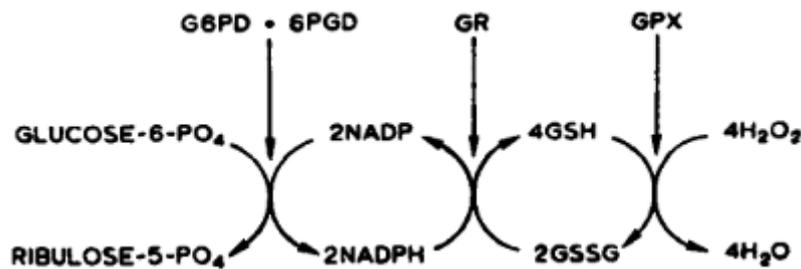


Figure 9. Système enzymatique de neutralisation des radicaux libres [79]. G6D : Glucose 6 PhosphoDéshydrogénase, 6PGD : 6 PhosphoGluconate Déshydrogénase, GR : Glutathion réductase, GSH : Glutathion réduit, GSSG : Glutathion oxydé, NADP : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, GPX : Glutathion Peroxydase

II.5.2. Systèmes de réduction de la méthémoglobine :

a. Voie anaérobie NADH -Dépendante (voie principale) : la voie NAD-dépendante ou voie d'Embden-Meyeroff c'est la voie métabolique la plus importante et est liée à la glycolyse anaérobie. Le NAD est réduit en NADH, qui est ensuite utilisé par la méthémoglobine réductase (diaphorase I, NADH-déshydrogénase, ou cytochrome b réductases [65, 48], une flavoprotéine découverte par Gibson en 1948). Il réduit le cytochrome b, une hémoprotéine soluble dans le cytoplasme des globules rouges. Une molécule de cytochrome

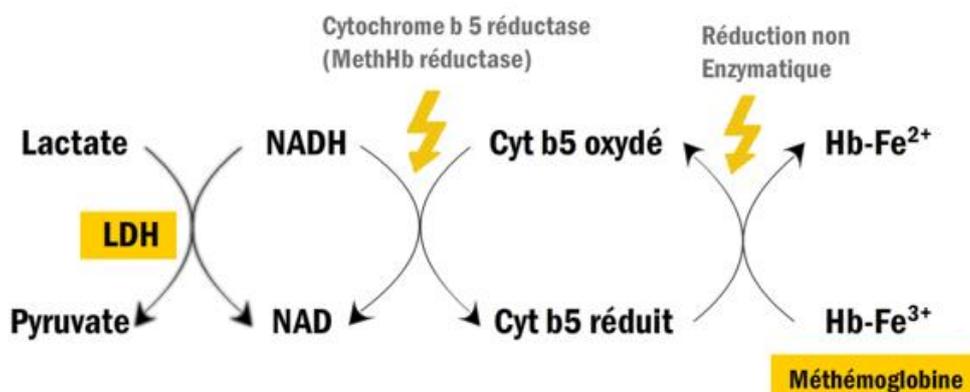


Figure 10. La voie anaérobie NADH-dépendante.

b5 peut se lier à une sous-unité de méthémoglobine, essentiellement par la lysine et/ou les résidus d'arginine, et transférer l'électron nécessaire pour réduire le fer ferrique en fer ferreux (Figure 10) [67].

b. Voie aérobie NADPH – dépendante (voie potentielle ou accessoire) : est également appelée la voie de pentose phosphate. Le NADP est réduit en NADPH, qui réduit lui-même la méthémoglobine en hémoglobine catalysée par une autre méthémoglobine-réductase, NADPH flavin-réductase, diaphorase 11, ou NADPH-déshydrogénase. Cette voie à un rendement physiologique très faible parce qu'elle a besoin d'un accepteur d'électron entre l'enzyme et la méthémoglobine qu'on ne trouve pas dans le corps. Cela doit donc être apporté de l'extérieur. Le traitement clinique utilise généralement le bleu de méthylène comme accepteur d'électrons, mais la riboflavine peut également être utilisée (Figure 11) [67].

c. Les voies non-enzymatiques : cette voie comprend le pouvoir antioxydant des vitamines et du glutathion. L'acide ascorbique peut traverser la membrane érythrocytaire. Il réduit la méthémoglobine en transférant un électron. L'acide ascorbique est ensuite oxydé en acide déshydroascorbique qui à son tour est réduit soit par le glutathion ou bien directement par l'acide déshydroascorbique réductase. Le glutathion réduit a le même mécanisme que l'acide ascorbique. Le glutathion oxydé est ensuite réduit par le glutathion

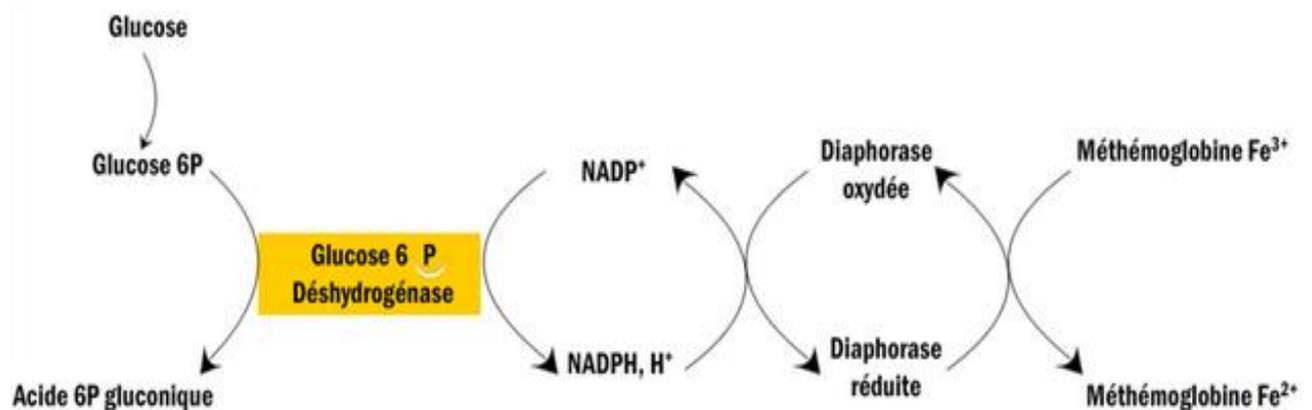


Figure 11. La Voie aérobie NADPH – dépendante.

réductase, NADH dépendant, dans les érythrocytes. C'est un mécanisme dépendant de la voie glycolytique anaérobie (Figure 12) [67].

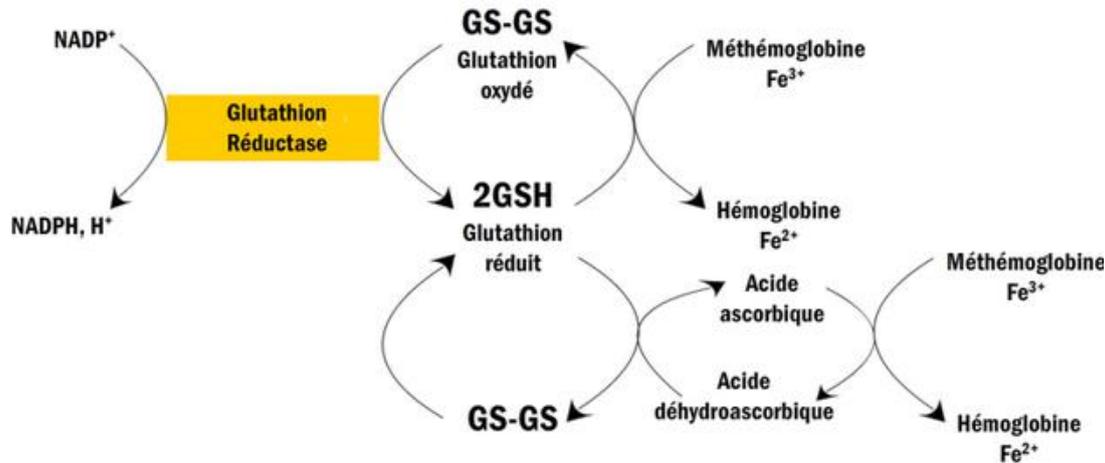


Figure 12. Les voies non enzymatiques.

II.5.3. Vieillessement des GRs :

Lorsque le stress oxydant dépasse la capacité réductrice de l'érythrocyte, plusieurs choses peuvent se produire. Le dommage oxydatif le plus évident est la formation des corps de Heinz. Les corps de Heinz sont composés d'hémoglobine dénaturée et de certaines protéines de la membrane érythrocytaire. Bien que les corps de Heinz puissent se former par oxydation des groupes sulfhydryles internes de l'hémoglobine, la formation d'hémichromes semble plus importante. Les hémichromes réversibles, telles que l'hydroxyde d'hémoglobine et le fémhémochrome dihistidine, sont formées à partir de la méthémoglobine. Comme son nom l'indique, l'hémichrome réversible peut être converti en méthémoglobine, et, finalement, en hémoglobine réduite. Si des hémichromes irréversibles se forment, la dénaturation de l'hémoglobine ne peut être arrêtée et les agrégats d'hémoglobine forment des corps de Heinz. Les hémichromes ont une affinité accrue pour la partie cytoplasmique de la protéine membranaire de bande 3. Le complexe de « protéine membranaire 3-hémichrome » résultant favorise la polymérisation de molécules supplémentaires pour former un complexe macromoléculaire qui peut être reconnu sous microscope comme des corps de Heinz [79].

La copolymérisation de la protéine membranaire 3 et des hémichromes entraîne la formation de clusters de protéines membranaires 3. Parce que la protéine de bande 3 est une protéine intégrale et traverse la bicouche lipidique les clusters à l'intérieur aboutissent à la formation de clusters à l'extérieur de la membrane érythrocytaire. Le regroupement externe de

la protéine de bande 3 crée un site de reconnaissance pour les auto-anticorps. Les érythrocytes attachés avec les auto-anticorps sont piégés et dégradés par les macrophages dans la rate et le foie. Sinon, les corps de Heinz peuvent être enlevés par la rate et la partie restante peut circuler. Ce phénomène a été qualifié d'« attaque » splénique [79].

Chapitre III

Mécanismes de toxicité des pesticides

III.6. Induction d'un stress oxydatif :

Les espèces réactives d'oxygène représentent des composés chimiques qui ont une grande tendance à donner un oxygène aux autres substances [84]. Les espèces réactives comprennent des composés radicalaires et non radicalaires. Les composés radicalaires sont ceux qui possèdent un ou deux électrons célibataires sur leur orbitale externe (Tableau II). Les composés non radicalaires ne possèdent pas d'électrons célibataires mais sont hautement réactifs et peuvent être convertis en composés radicalaires (Tableau II) [48].

Tableau II. Les différents ROS et leurs systèmes antioxydants [48].

ROS	Symbole	Système antioxydant	Symbole
ROS radicalaires		Enzymatique	
Superoxyde	$O_2^{\cdot -}$	Superoxyde dismutase	SOD
Radical hydroxyle	$\cdot OH$	Catalase	CAT
Oxyde nitrique	NO^{\cdot}	Glutathion peroxydase	GPx
Radicale organique	R^{\cdot}	Glutathion réductase	GR
Radicale peroxyde	ROO^{\cdot}	Glutathion S-transférase	GST
Radicale Alkoxyde	RO^{\cdot}	Thioredoxine superoxydase	TrxPx
Radicale thyle	RS^{\cdot}	Thioredoxine réductase	TrxR
Radicale sulfonyle	ROS^{\cdot}		
Radicale peroxyde thyle	$RSOO^{\cdot}$		
ROS/RNS nonradicalaires		Non-enzymatiques	
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2	Glutathion	GSH
Oxygène singulet	1O_2	Glutathioredoxine	Grx
Ozone (trioxygène)	O_3	Thioredoxine	Trx
Hydroperoxyde organique	ROOH	Peroxyredoxine	Prx
Acide hypochloreux	HOCl	Sulfiredoxine	Srx
	$ONOO^{\cdot -}$	Composés phytochimiques	
Peroxynitrite		Vitamines A, C, E	

Heureusement que l'organisme développe un moyen de lutter contre les espèces réactives d'oxygène, le système de lutte le plus commun et le système enzymatique (GSH dans les érythrocytes, superoxyde dismutase et catalase). Ces enzymes interviennent en premier lieu et décompose les espèces réactives d'oxygène. Dans le cas où le stress oxydatif dépasse la capacité de ce système, la seconde ligne de défense intervient. Le corps maintient des pools de vitamines anti-oxydantes (vitamine E, C et β -carotène ; le précurseur de la vitamine A), ces vitamines piègent et atténuent les radicaux libres mais à leurs tours ils s'oxydent et perd leur propriété antioxydante. Les vitamines ont une activité spécifique et travail avec synergie pour améliorer les capacités antioxydantes de l'organisme [84].

- a. **La vitamine C :** La vitamine C est l'antioxydant plasmatique soluble le plus puissant. Appelé aussi acide ascorbique ou acrobate possède deux pouvoirs qui participent à la lutte contre les radicaux libres. Le premier pouvoir consiste à céder un électron pour quasiment tous les radicaux libres [85], le deuxième pouvoir repose sur sa grande participation dans la régénération de la vitamine E et donc prévenir la peroxydation lipidique des membranes biologiques [86].
- b. **La vitamine E :** Ce terme regroupe deux familles d'isomères, les tocotriénols et les tocophérols. La différence entre ses deux familles se joue sur le degré d'insaturation sur la chaîne latérale. La vitamine E, grâce à sa propriété liposoluble, est capable de réduire les radicaux peroxydes et interagit avec $2O_2^{\cdot -}$, HOCl, ONOO⁻ [87].

Le stress oxydatif peut être défini comme la perte de balance entre la production des radicaux libres et la défense antioxydante de l'organisme. Le stress oxydatif ne passe pas inaperçu puis qu'ils provoquent des dommages importants dans l'organisme : s'il y'a beaucoup trop de radicaux libres ou peut d'antioxydant pour la protection, des conditions de stress oxydatif se développent ce qui peut causer des dommages chroniques ou permanents. Ce phénomène est inclus dans beaucoup de patho-mécanismes suivi de peroxydation de lipides dans les fluides du corps. Par exemple, le stress oxydatif est un important mécanisme de neurodégénérescence dans la maladie d'Alzheimer. Parmi les autres maladies figurent la maladie de Parkinson, les cataractes, l'athérosclérose, les maladies néoplasiques, le diabète, les maladies chroniques du tractus gastro-intestinal, le vieillissement de la peau, l'asthme et bien d'autres. Dans le cas des hémopathies induites par le stress oxydatif on parle de drépanocytose (anémie falciforme), anémie, vieillissement, activité du glucose-6-phosphate déshydrogénase, hypoxie fœtale ou néonatale, thalassémie [84].

Les pesticides font parties des facteurs qui peuvent provoquer un stress oxydant conduisant à la génération de radicaux libres et des altérations dans le système antioxydant, le système enzymatique de piégeage et peroxydation des lipides [84].

Les ROS sont produits par une réaction catalysée par une chaîne de transporteurs d'électrons, la NADPH oxydase [88]. Le pesticide s'oxyde pour former un radical libre avec un électron célibataire et le cofacteur NADPH perd un proton [84] :



Le pesticide radicalaire réagit avec une molécule d'oxygène pour se stabiliser et donne un superoxyde anionique ($\text{O}_2^{\bullet -}$) [89]:



Le superoxyde anionique est réduit par le superoxydismutase (SOD) et formation de superoxyde d'hydrogène [84] :



Ensuite, le H_2O_2 s'attaque au Fe^{2+} pour former le radical hydroxyle OH^{\bullet} et un HO^- via la réaction de Fenton [90] [84]:



Le radical hydroxyle est très toxique et induit la peroxydation lipidique [84]. Un nombre variable d'études ont montrées que l'hémolyse est le résultat de la peroxydation des lipides par les radicaux libres [91]. D'autres études au contraire ont montré que l'hémolyse et un phénomène indépendant de la peroxydation des lipides [92]. Cependant, Bonzena Sosnowska et al., ont montré que le CFVF abouti à la peroxydation des lipides et à l'hémolyse de façon similaire et cela à une concentration de 250 μM [84].

Néanmoins, le mécanisme de génération de stress oxydatif décrit ci-dessus s'applique sur des cellules contenant une mitochondrie où se trouve la NADPH oxydase comme les cellules pulmonaires. Mais des études récentes ont montré que les érythrocytes contiennent 4 isoformes de sous-unités du NADPH oxydase ; NOX1, NOX2, NOX4 et NOX5 [90]. Le SOD et catalase ont pu être isolés à partir d'érythrocytes ce qui nous permet de dire que ce mécanisme peut être appliqué dans les érythrocytes [90].

Des études ont montrées que l'exposition des érythrocytes de rats aux deux pesticides chlorpyrifos et endosulfan diminue l'activité des enzymes antioxydantes ; le supeoxyde dismutase (SOD) et catalase (CAT) [8]. L'altération des enzymes antioxydantes fait partie des mécanismes de génération d'un stress oxydatif par les pesticides [93].

III.6.1. Oxydation physiologique et pathologique de l'hémoglobine :

Le transport d'oxygène nécessite de l'oxygène lié de façon réversible à l'hémoglobine ferreuse, HbFe(II). L'hémoglobine oxygénée Hb(Fe(II)O₂) est une molécule très stable mais s'auto-oxyde lentement à un taux d'environ 3%/jour. Ce taux est accéléré à des tensions d'oxygène plus faibles quand l'hémoglobine est partiellement oxygénée [94].

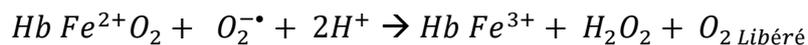
L'oxyhémoglobine s'auto-oxyde pour former une oxy-méthémoglobine :



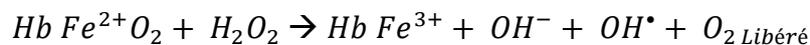
La réaction d'auto-oxydation principale est la disssociation de $Hb Fe^{3+}O_2^-$ en $Hb Fe^{2+}$ et $2O_2^-$ néanmoins cette forme d'oxydation peut être empêché par la catalase, peroxyde dismutase ou les deux en même temps.



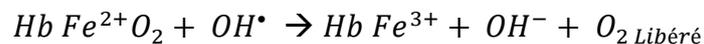
A un pH bas où y'a une forte concentration en H⁺ le superoxyde anionique attaque d'autre molécules d'oxyhémoglobine :



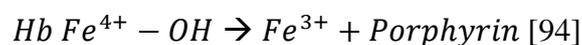
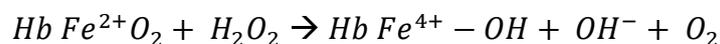
Le H₂O₂ attaque une nouvelle molécule d'oxyhémoglobine selon la réaction de Fenton :



Le radicale hydroxyle s'attaque à son tour à une autre molécule d'oxyhémoglobine [67] :



La forme hémoglobine lié au fer n'a pas la capacité de catalyser la réaction Fenton et donc une grande partie de peroxydes d'hydrogène décompose l'hémoglobine pour liberer le fer qui catalyse la réaction de fenton [67] :



Une petite partie du peroxyde d'hydrogène réagit avec l'oxyhémoglobine pour donner les espèces ferryls ($Hb Fe^{4+}$) qui sont hautement réactives et attaquent de nouvelles oxyhémoglobines [67].

Dans des conditions physiologiques normales chez les personnes en bonne santé, environ 1 % de l'hémoglobine totale existe sous forme de méthémoglobine oxygénée, si le pourcentage dépasse le 1% on parle de méthémoglobinémie [82].

Il a été démontré que l'exposition à divers pesticides conduisait à l'augmentation du taux de la méthémoglobine dans les érythrocytes [95].

III.6.2. Peroxydation lipidique :

Les radicaux libres formés dans les érythrocytes réagissent avec les acides gras polyinsaturés des membranes et cela dans une réaction qu'on appelle peroxydation lipidique. Les érythrocytes sont particulièrement fragiles envers ce phénomène car leur membrane est riche en acides gras polyinsaturés. Cette réaction induit la formation des aldéhydes qui sont considérés comme des messagers toxiques du stress oxydatif, capables de propager et d'amplifier les lésions oxydatives. Parmi les aldéhydes produits il y'a le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonanal (HNE) et puisque le MDA est produit à des taux élevés pendant la peroxydation lipidique donc il est souvent utilisé comme une méthode de mesure du stress oxydatif. La peroxydation lipidique peut être décrite comme un processus sous lequel des espèces chimiques oxydantes non radicalaires ou des radicaux libres attaquent les lipides

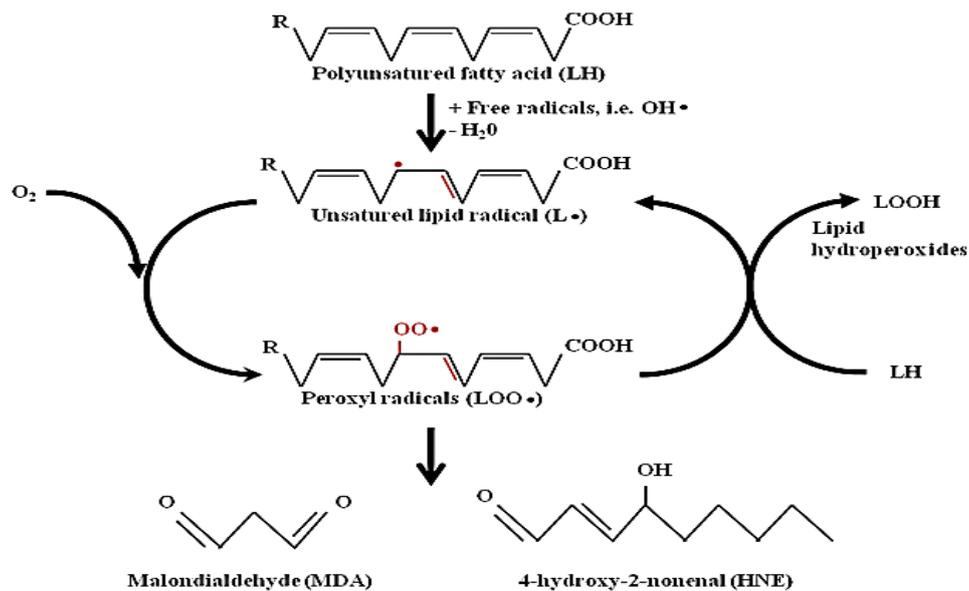


Figure 12. La formation des MDA et HNE à partir d'acides gras polyinsaturés.

contenant une ou plusieurs liaisons carbone-carbone doubles. Ce processus implique l'extraction d'hydrogène à partir d'un atome de carbone et l'insertion d'oxygène, ce qui entraîne la formation de radicaux peroxy et d'hydroperoxydes lipidiques, comme l'illustre la figure 13 [96]. Ces aldéhydes sont hautement réactifs et sont capables d'affecter divers processus de signalisations. Ces effets dépendent de leur capacité à créer des liaisons covalentes avec les protéines et l'ADN [97].

Les aldéhydes formés à partir de la peroxydation lipidique réagissent facilement avec les protéines, générant une grande variété d'adduits covalents intra et intermoléculaires. En fonction de leurs caractéristiques structurelles, ils peuvent former des bases de Schiff et/ou des adduits de Michael en interagissant avec le groupe amine libre de la lysine, le groupe imidazole de l'histidine, les groupes guanidine d'arginine et le groupe thiol de la cystéine [97]. HNE peut affecter les fonctions cellulaires, grâce à sa capacité à former des adduits avec des protéines impliquées dans la transduction des signaux et l'expression des gènes, y compris les récepteurs, les kinases, les phosphatases et les facteurs de transcription [97]. Les MDA peuvent former des adduits de protéines en modifiant spécifiquement les résidus de lysyle des protéines [98], et les biomolécules autologues modifiées peuvent générer des néoépitopes à partir d'épitopes, eux-mêmes, capables d'induire des réponses immunitaires innées et adaptatives indésirables, y compris l'athérosclérose [99].

Les adduits de HNE peuvent s'accumuler progressivement dans le système vasculaire, entraînant des dysfonctionnements cellulaires et des effets nuisibles aux tissus, qui sont impliqués dans la progression de l'athérosclérose. En outre, le HNE, en formant des adduits HNE-apoB, contribue à l'athérogénicité des lipoprotéines oxydées à faible densité (LDL), conduisant à la formation de cellules spumeuses [96]. La présence d'adduits de protéines HNE a été détectée dans les maladies liées à l'inflammation, telles que les troubles du foie alcooliques et la pancréatite alcoolique chronique, dans lesquelles la formation accrue d'adduits de protéines de HNE s'est avérée dans des cellules acinaires adjacentes au tissu conjonctif interlobulaire [100]. En outre, des adduits de protéines HNE ont été détectés dans les tissus cérébraux et les fluides corporels dans plusieurs maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Huntington, la maladie de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique et le syndrome de Down [101].

III.6.3. Éryptose :

L'augmentation des ROS induite par les pesticides peut aboutir à l'activation d'une cascade de mort des érythrocytes programmée ou éryptose [102]. Le stress oxydatif active les canaux cationiques par où entre le Ca^{2+} . L'augmentation du taux de Ca^{2+} dans le cytoplasme induit l'ouverture des canaux K^+ qui sortent de la cellule. Le K^+ à l'extérieur de la cellule induit une hyperpolarisation qui aboutit à la sortie massive du Cl^- qui va apporter avec lui de l'eau et cela va provoquer une plasmolyse et mort de la cellule [103].

Un deuxième mécanisme d'éryptose dont l'entrée du Ca^{2+} induit l'activation de l'enzyme sphingomyélinase qui dégrade les lipides membranaires pour produire des molécules de céramide qui à leur tour, activent les scramblases et qui vont induire l'exposition des phosphatidylsérines et cela va provoquer un brouillage membranaire. L'exposition des phosphatidylsérines à l'extérieur de la membrane plasmique, envoient un signal d'activation pour les plaquettes et les macrophages qui vont amorcer la phagocytose des érythrocytes [104].

III.6.4. Rôle du stress oxydant dans la cytotoxicité des pesticides :

Les pesticides peuvent induire des effets cytotoxiques tels que le stress oxydant. Le tableau III regroupe des études sur certains pesticides et l'effet du stress oxydant induit par ces derniers sur quelques modèles d'étude.

Tableau III. L'effet du stress oxydatif induit par les pesticides sur différents tissus.

Pesticide	Model d'étude	Concentration	Marqueurs du stress oxydatif	Référence
Chlorpyrifos	Erythrocytes humains	0, 100, 500, 1000, 2000 ppm	CAT et SOD ↓, TPC ↑	[11]
	Rats Wistars	10.6 mg/kg	OF ↑ et MDA ↑	[12]
	UCBE	40 et 400 nM	ROS ↑, CAT ↓, SOD ↑↓, OF ↑↓	[15]
	Erythrocytes de chèvre	10 ppm	SOD et CAT ↓, GST et LP ↑	[13]
Cyperméthrine	Rats Wistars	25 mg/kg	PO et LP ↑, IL-6 et TNF-α ↑ dans le plasma	[105]
	Rats Wistars	1.5-15 mg/kg	LP ↑	[106]

	Erythrocytes de rats	25-800 μ M	SOD et CAT et GPx↓, GSH et LP et GST et GR↑	[107]
Deltaméthrine	Rats Sprague–Dawley	3.125 mg/kg et 12.50 mg/kg	ROS dans le cerveau ↑, Expression Nrf 2 ↑	[108]
	PC12	10 et 100 μ M	ROS ↑	[108]
	Gr de truites arc-en-ciel	0,25 g/L	Inhibition de l'activité de G6PD	[109]
Imidaclopride	Erythrocytes de rats	450 mg/kg	OF ↑	[110]
	Ligné cellulaire fibroblaste L-929	250 μ g/mL et 500 μ g/mL	LDH ↑, GSH ↓, AChE ↑↓	[111]
	Souris femelle	37.5, 75.0 et 112.5 mg/kg	IM ↑, AC ↑, formation de MN	[112]
Acétamipride	Lymphocytes du sang périphérique humain	25 – 40 μ g/mL	IxM↓, NDI↓	[113]
	Erythrocytes de souris	20 mg/kg	GR↓, Hct↓, Hb↓, bilirubine ↑, LDH↑, OF↑	[114]
	Erythrocytes de rats Wistar	40 et 80 mg/kg	MDA↑, GSH↓, Enzymes anti-oxydantes↓	[115]
Metalaxyl	Lymphocytes humains	50 μ g/mL	MN↑, SCE↑	[116]
	Erythrocytes polychromatique de rats	5-10-100 μ g/mL	MN↑, SCE↑	[116]
Deltaméthrine		5,2 μ M 62 μ M 0,7 μ M	50% CAT↓ 50% SOD↓ 50% GPx↓	[117]
Malathion		158 μ M 240 μ M 1198 μ M	50% CAT↓ 50% SOD↓ 50% GPx↓	
Diclorvos	Contact direct avec les enzymes antioxydantes	133 μ M 328 μ M	50% CAT↓ 50% SOD↓	

		1638µM	50% GPx↓	
λ-Cyaloethrine		320µM	50% CAT↓	
		2320µM	50% SOD↓	
		98µM	50% GPx↓	
Malathion	Erythrocytes humains	25, 75, 200 µM	MDA↑, SOD et CAT et GPx↓	[118]

CAT : Catalase ; **SOD** : Superoxide dismutase ; **TPC** : Conteneur protéique totale ; **OF** : Fragilité osmotique ; **MDA** : Malondialdéhyde ; **UCBE** : Erythrocytes du sang du cordon ombilical humain ; **LP** : Peroxydation lipidique ; **PO** : Oxydation protéique ; **IL-6** : Interleukine 6 ; **TNF-α** : Tumor Necrosis Factor α ; **PC12** : Cellules pheochromocytoma adrénales de rats ; **G6PD** : Glucose 6-Phosphate Déshydrogénase ; **LDH** : Lactate déshydrogénase ; **GSH** : Glutathion réduit ; **AChE** : Acétylcholinestérase ; **IM** : Inhibition mitotique ; **AC** : Aberrations chromosomiques ; **MN** : Micronucléus ; **IxM** : Index mitotique ; **NDI** : Index de division nucléaire ; **Hct** : Hématocrite ; **Hb** : Hémoglobine ; **GPx** : Glutathion peroxydase ; **GST** : Glutathion S-transférase ; **GR** : Glutathion réductase ; **SCE** : Echange entre chromatides sœurs ; ↑ : **Augmentation** ; ↓ : **Diminution** ; ↑↓ : **Inchangé**.

Chapitre IV

Matériel et méthodes

Ce travail ayant pour but d'évaluer l'effet cytoprotecteur de molécules antioxydantes vis-à-vis de la toxicité induite par les pesticides. Il a été réalisé au niveau des laboratoires Associé en Ecosystèmes Marins et Aquacoles et le laboratoire Biotechnologie Végétales et Ethnobotanique de la faculté SNV de l'université A/Mira de Béjaia.

IV.1. Matériel :

IV.1.1. Matériel biologique :

Tous les tests ont été effectués sur des globules rouges provenant du sang frais humain. Le sang a été récupéré auprès des volontaires en santé par ponction veineuse dans des poches, au sein du centre de transfusions sanguines de Sidi Ali Lebhar de Bejaia. Puis il a été conservé au frais à 4°C.

IV.1.2. Produits chimiques :

- Chlorure de sodium (*NaCl*) (Sigma-Zentrifugen).
- Hydroxyde de sodium (*NaOH*) (Biochem).
- Acide thiobarbiturique (*TBA*) (Biochem).
- Acide trichloracétique (*TCA*) (Biochem).
- Acide éthylène-diamine tétra acétique (*EDTA*) (Sigma-Aldrich).
- Peroxyde d'hydrogène 30% (H_2O_2) (Sigma-Aldrich).

IV.1.3. Pesticide utilisé :

Le chlorpyrifos utilisé est de marque PYRICAL 480 sous formule liquide soluble dans l'eau.

IV.1.4. Anti-oxydants utilisés :

- Vitamine C (Sigma-Aldrich).
- Vitamine E (Sigma-Aldrich).

IV.1.5. Appareillage :

Le tableau 08 illustre les différents appareils utilisés pour la réalisation du travail pratique ainsi que leur firme.

Tableau IV. Liste des appareils utilisés lors de l'expérimentation.

Appareil	Firme
Balance analytique	Kern PNJ
Balance de précision	Kern
Centrifugeuse réfrigérée	Eppendorf (centrifuge 5702 R)
Bain marie	Memmert
Haute	HSBP- 180
Vortex	VELP scientifica
Agitateur électromagnétique	VELP scientifica
Spectrophotomètre	Jenway 7305 spectrophotometer
Réfrigérateur	Condor

IV.2. Méthode :

Afin d'étudier la cytotoxicité membranaire des pesticides nous avons utilisé le GR comme modèle, aussi dans le but d'évaluer l'effet protecteur des antioxydants à l'égard de cette cytotoxicité. Pour cela, nous avons opté pour une optimisation d'un protocole pour induire un effet toxique du chlorpyrifos sur les érythrocytes, l'effet toxique dans notre cas se traduit par une hémolyse.

IV.2.1. Effet cytotoxique du Chlorpyrifos :

La poche de sang a été récupérée au sein du centre de transfusion de Bejaia, prélevé à partir de sujets sains.

Une série de trois lavages a été effectuée sur les érythrocytes avec du NaCl à 0,9% pour avoir un sang isotonique. Le tube a d'abord été centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min à 4°C, puis le sérum et la couche blanchâtre ont été jetés. Le sérum jeté a été remplacé par de l'eau physiologique avec des quantités égales afin de garder l'état hydrique des cellules, puis mélangé délicatement avant d'être centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min à 4°C. L'opération a été répétée trois fois jusqu'à ce que le surnageant soit très clair.

Un hématocrite de 20% a été préparé. D'abord, 3200 µL d'eau physiologique ont été rajoutés à 800 µL de suspension érythrocytaire pour obtenir un volume finale 4 mL.

IV.2.1.1. Préparation des solutions du chlorpyrifos

La solution du chlorpyrifos a une concentration de 480 g/L. Pour la préparation d'une solution aux concentrations de 200, 100, 50, 25 µg/mL, le passage par une solution intermédiaire de 0,5 g/L est nécessaire.

D'abord, un volume (µL) de la solution du chlorpyrifos a été prélevé puis elle a été complétée jusqu'au trait de jauge avec du NaCl (0,9 %). Après 30 minutes d'agitation, un volume adéquat de la solution intermédiaire a été prélevé dans un tube à essai avant d'ajouter le NaCl (0,9 %) pour enfin obtenir des solutions aux concentrations à testées.

IV.2.1.2. Pourcentage d'hémolyse :

Dans le but de calculer le taux d'hémolyse, nous avons procédé comme suit : un volume (µL) du sang isotonique a été déposé au fond d'un tube à essai pour leur rajouter un autre volume (µL) d'eau physiologique à 0,9 %. Après une incubation de 30 minutes à 37°C, un volume (µL) d'eau physiologique (0,9 %) a été ajouté puis les tubes ont été réincubé à 37°C pendant 15 minutes. Après incubation, un volume (µL) a été prélevé et 4 mL d'eau distillée ont été ajoutés pour fragiliser les GR puis mélanger fortement les tubes pour bien hémolyser les cellules. Une lecture de l'absorbance a été réalisée à 540 nm. La valeur d'absorbance donnée a été utilisée pour déterminer le pourcentage d'hémolyse en utilisant la formule suivante [12]:

$$\text{Pourcentage d'hémolyse \%} = \frac{\text{A540nm d'échantillon}}{\text{A540nm test d'hémolyse totale}} \times 100$$

IV.2.1.3. Test de toxicité du pesticide :

Les concentrations 25, 50, 100 et 200 µg/mL du chlorpyrifos ont été testées sur l'hématocrite à 20%. D'abord, un volume (µL) d'eau physiologique a été ajouté à un volume (µL) de suspension érythrocytaire puis une incubation à 37°C pendant 30 minutes a été réalisée. Ensuite, un volume (µL) du pesticide a été ajouté et les tubes ont été incubés à 37°C pendant 15 minutes. Après incubation, un volume (µL) a été prélevé et un volume de NaCl a été ajouté, puis l'absorbance à 620 nm a été effectuée pour déterminer la concentration cellulaire. Après la mesure, les tubes ont été centrifugé à 3000 rpm pendant 10 minutes à 4°C et les surnageant

ont été récupérés pour mesurer le taux d'hémoglobine et méthémoglobine libéré. Le culot quant à lui a été hémolysé avec 4 mL d'eau distillé pour ensuite mesurer l'hémoglobine et méthémoglobine internes [6] (figure 14).

IV.2.2. Effet protecteur des vitamines :

IV.2.2.1. Préparation des vitamines :

Les solutions des vitamines ont été préparées aux concentrations primaires de 0,4 mg/mL pour la vitamine C et 1 mg/mL pour la vitamine E. La concentration finale des vitamines dans le milieu réactionnel est de 0,1 mg/mL de la vitamine C et 0,25 mg/mL de la vitamine E [95].

IV.2.2.2. Prétraitement avec les vitamines :

Trois essais ont été réalisés pour chaque test, le premier pour la protection avec la vitamine C, le deuxième pour la protection avec la vitamine E et enfin un test de protection avec les deux vitamines combinées. Pour les tests de protection, un volume (μL) de la suspension érythrocytaire à 20% a été prélevé et un volume (μL) de NaCl (0,9%) a été ajouté avant d'ajouter un volume (μL) de la vitamine [95].

Une incubation de 30 minutes a été lancée pour toutes les conditions traitées et non traitées (témoin) [95].

Après l'incubation, un volume (μL) du pesticide a été ajouté aux conditions de protection et de toxicité, tandis que le reste des tubes le même volume a été remplacé par le NaCl (0.9%) [95].

Après une incubation de 15 minutes à 37 °C, un volume (μL) a été prélevé et 4 mL de NaCl (0.9%) ont été ajoutés dans tous les tubes à l'exception des tubes de 100 % hémolyse où 4 mL d'eau distillée ont été ajoutées. Une lecture à 620 nm a été réalisée au spectrophotomètre à fin de mesurer la concentration cellulaire. Après la mesure, les tubes ont été centrifugés à 3000 rpm pendant 10 minutes à 4°C et les surnageants ont été récupérés pour déterminer le taux de l'Hb et de la metHb libérée (extracellulaire) à 412 nm et 540 nm, respectivement. Le culot cellulaire restant a été hémolysé après l'ajout de 4 mL d'eau distillée pour ensuite mesurer l'Hb et la metHb intracellulaire à 412 nm et 540 nm, respectivement. Le détail du protocole est illustré dans la figure 14 [95].

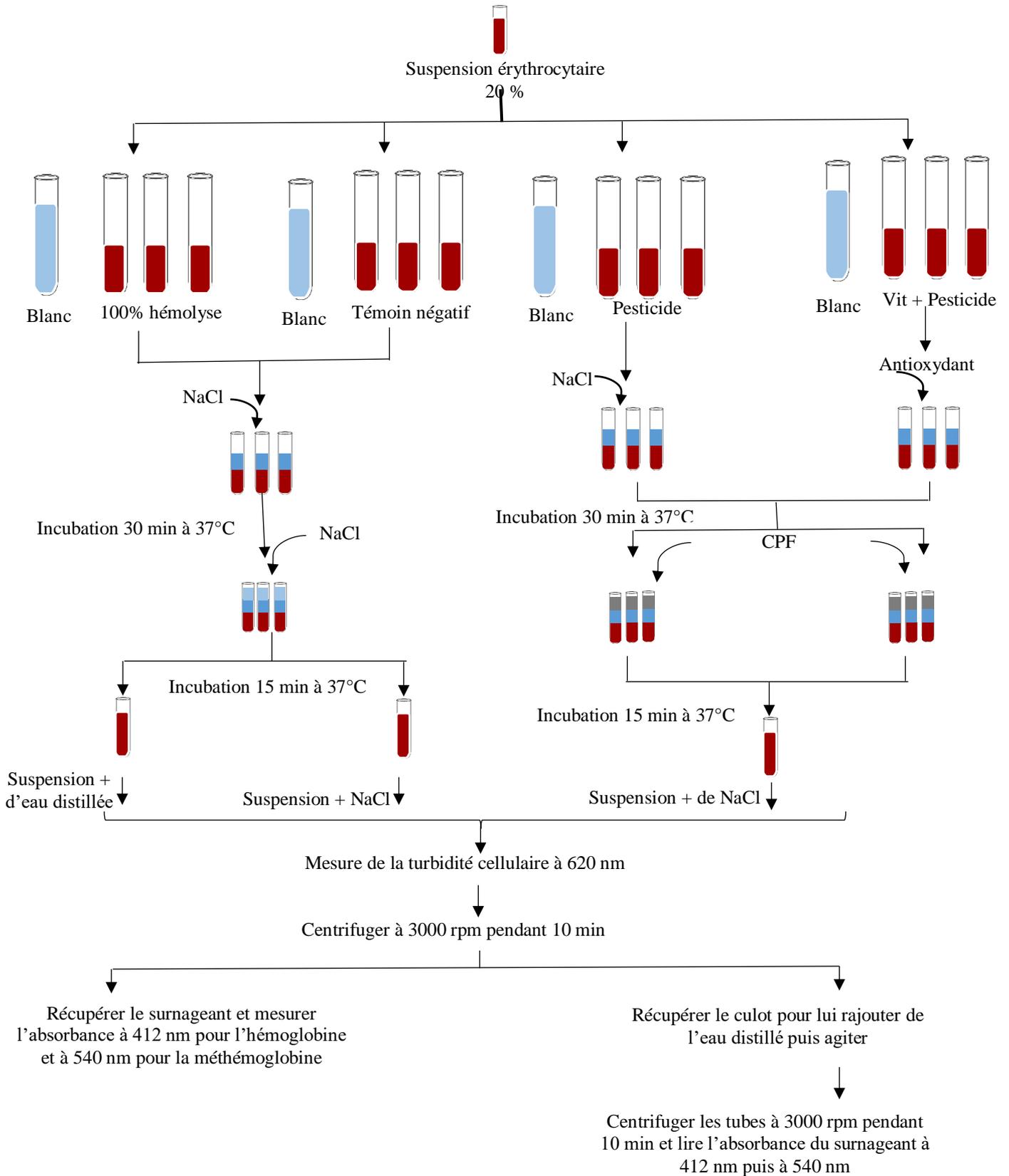


Figure 14. Protocole de l'effet cytoprotecteur des vitamines à l'égard de la cytotoxicité induites par le chlorpyrifos.

IV.2.3. Test TBARS :

Dans le but de mesurer le taux de la peroxydation des lipides membranaire, le test du dosage des substances réagissant à l'acide Thiobarbiturique (TBARS) a été mis en place. Ce test permet d'estimer les dommages que représente le chlorpyrifos sur la membrane érythrocytaire en mesurant le taux des mlondialdéhydes (MDA) qui est un des produits finaux de la peroxydation lipidique.

IV.2.3.1. Protocole du test TBARS :

Un volume (μL) de la suspension érythrocytaire à 20 % a été incubé à 37 °C pendant 30 minutes avec un volume (μL) de l'antioxydant à des concentrations de 0,1 mg/mL de vitamine C et de 0,25 mg/mL de vitamine E. Ensuite, un volume (μL) du pesticide a été ajouté dans chaque tube, le même volume du NaCl a été ajouté au témoin négatif à la place du pesticide [6].

Après une incubation de 15 minutes à 37°C, un volume de (μL) de TCA a été ajouté dans chaque tube puis incubé pendant 2 heures à 0°C [6].

Une centrifugation des tubes à 3000 rpm pendant 10 minutes a été effectuée, puis un volume (ml) du surnageant a été prélevé dans des tubes en verre [6].

Un volume (μL) de TBA et un volume (μL) d'EDTA ont été ajoutés aux tubes puis une incubation de 15 minutes à 95°C a été réalisée. A la fin de l'incubation les tubes ont été mis directement dans un bain de glace [6].

La mesure des taux de MDA a été réalisée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 535 nm [6].

IV.2.4. Test de stabilité de l'hémoglobine :

Ce test vise à déterminer le mécanisme de l'oxydation de l'hémoglobine induite par le pesticide.

IV.2.4.1. Préparation de la solution de l'hémoglobine :

Le sang a été lysé par l'ajout de l'eau distillée. Les érythrocytes ont été lysés en agitant le tube. Ensuite, une centrifugation à 3000 rpm pendant 10 minutes a été réalisé puis le surnageant a été récupéré.

IV.2.5. Protocole de la stabilité de l'hémoglobine :

Un volume (μL) de l'antioxydant aux concentrations précédentes a été ajouté à un volume (μL) de l'hémoglobine. Le même volume a été remplacé par du NaCl dans la condition témoin négatif, pesticide ainsi que le contrôle positif (H_2O_2). Après une incubation de 30 minutes à 37°C , un volume (μL) de Chlorpyrifos a été ajouté pour les conditions pesticide et vitamine et le H_2O_2 pour le contrôle positif à l'exception des tubes du témoin négatif où un volume (μL) de NaCl a été ajouté. Après une incubation de 30 minutes à 37°C , une lecture des absorbances a été réalisée aux longueurs d'ondes de 412 nm pour la mesure de l'Hb et 540 nm pour la mesure de la metHb [5, 96].

IV.2.6. Analyses statistiques :

L'analyse statistique a été effectuée avec le logiciel Graph Pad Prism 5, les résultats sont présentés comme moyenne \pm écart type ($n = 3$). Les valeurs sont données en ns $p > 0,05$ * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Le test ANOVA One-Way a été utilisé pour comparer la différence entre chaque groupe traité avec le chlorpyrifos et le témoin négatif. Les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives.

Chapitre V

Résultats

V.1. Effet cytotoxique du chlorpyrifos :

Afin d'évaluer l'effet cytoprotecteur des antioxydants (vitamine C et vitamine E), les érythrocytes ont été traités avec le chlorpyrifos à différentes concentrations.

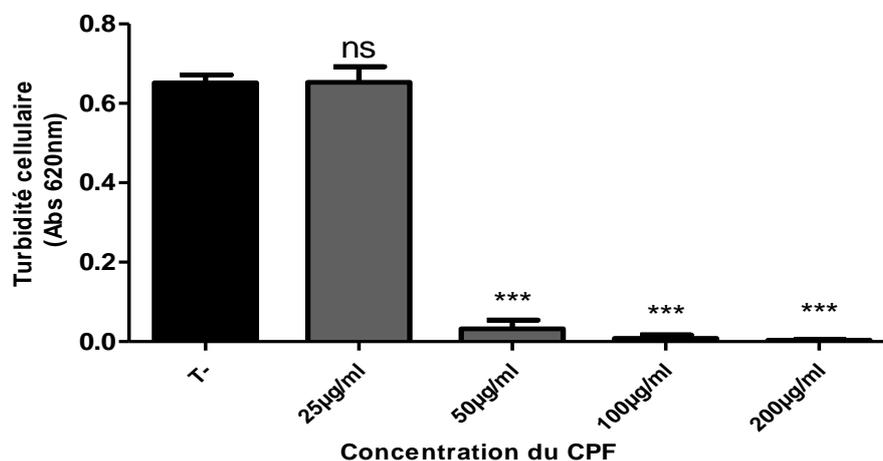


Figure 15. Turbidité cellulaire obtenue après traitement des globules rouges avec différentes concentrations du CPF. T - : témoin négatif (sans traitement) ; CPF : Chlorpyrifos ; * : comparaison des tubes traités avec le CPF avec le témoin négatif. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD des différentes expérimentations (ns : non significatif $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

La figure 15 représente les variations de concentrations cellulaires des érythrocytes qui suite à leur exposition à différentes concentrations du chlorpyrifos. Les résultats montrent qu'à partir de la concentration de 50 $\mu\text{g/mL}$, la turbidité cellulaire diminue d'une manière très significative ($0,032 \pm 0,02$) en comparaison avec le témoin négatif ($0,651 \pm 0,01$).

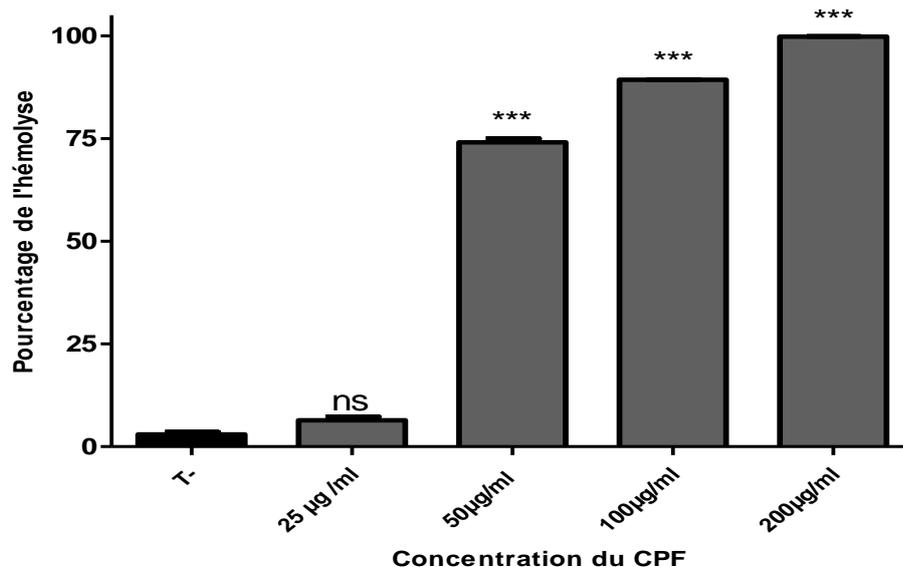


Figure 16. Le pourcentage de l'hémolyse en testant différentes concentrations du CPF. T⁻ : témoin négatif (sans traitement) ; CPF : Chlorpyrifos ; * : comparaison des tubes traités avec le CPF avec le témoin négatif. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD des différentes expérimentations (ns : non significatif $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

La figure 16 représente les variations des pourcentages de l'hémolyse en fonction de concentrations du chlorpyrifos.

Nous avons d'abord testé la concentration de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour vérifier l'effet que représente ce pesticide [11]. Cette concentration a donné une hémolyse totale avec un pourcentage d'hémolyse de 99,8%. Une optimisation de la concentration du CPF à tester a été réalisée.

Le CPF à 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ n'a exercé aucun effet toxique sur les érythrocytes ($6,567 \pm 0,6$) par rapport au témoin ($0,651 \pm 0,01$). Tandis que les autres concentrations 50, 100 et 200 ont engendré une diminution très significative de la turbidité cellulaire.

Le pourcentage de l'hémolyse confirme les résultats de la turbidité cellulaire. En effet, à 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ du CPF le taux d'hémolyse est proche du témoin négatif (T⁻). Ce pourcentage augmente en augmentant la concentration du CPF ; à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($74,167 \pm 0,802$ %), à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($87,733 \pm 2,801$ %) et à 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($99,567 \pm 0,483$ %).

En parallèle, les résultats du taux de l'Hb libérée (figure 17) confirment le degré de toxicité du pesticide à l'égard des erythrocytes où nous avons enregistré des taux de l'Hb libérées significativement élevés après traitement avec le CPF à 50,100 et 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ qui est en moyenne de ($0,979 \pm 0,002$) en comparaison au témoin négatif ($0,104 \pm 0,01$).

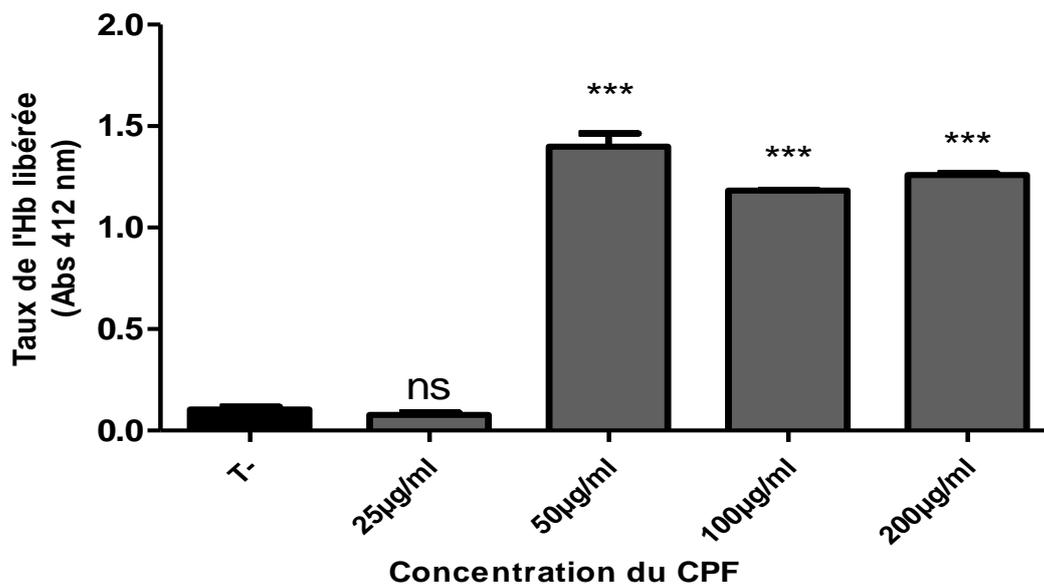


Figure 17. Le taux de l'hémoglobine libérée après traitement avec différentes concentrations du CPF. T - : témoin négatif (sans traitement) ; CPF : Chlorpyrifos ; * : comparaison des tubes traités avec le CPF avec le témoin négatif. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD des différentes expérimentations (ns : non significatif $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

La figure 18 représente le taux de l'hémoglobine intracellulaire des érythrocytes traités avec différentes concentrations du CPF. Les résultats montrent une relation inverse entre le pourcentage de l'hémolyse et le taux de l'hémoglobine intracellulaire et une relation similaire entre le taux de l'hémoglobine externe et le taux de l'hémolyse.

La figure 19 représente le taux de méthémoglobine intracellulaire après traitement avec plusieurs concentrations de CPF. Les résultats montrent que le taux de metHb diminue à chaque fois qu'on augmente la concentration de CPF.

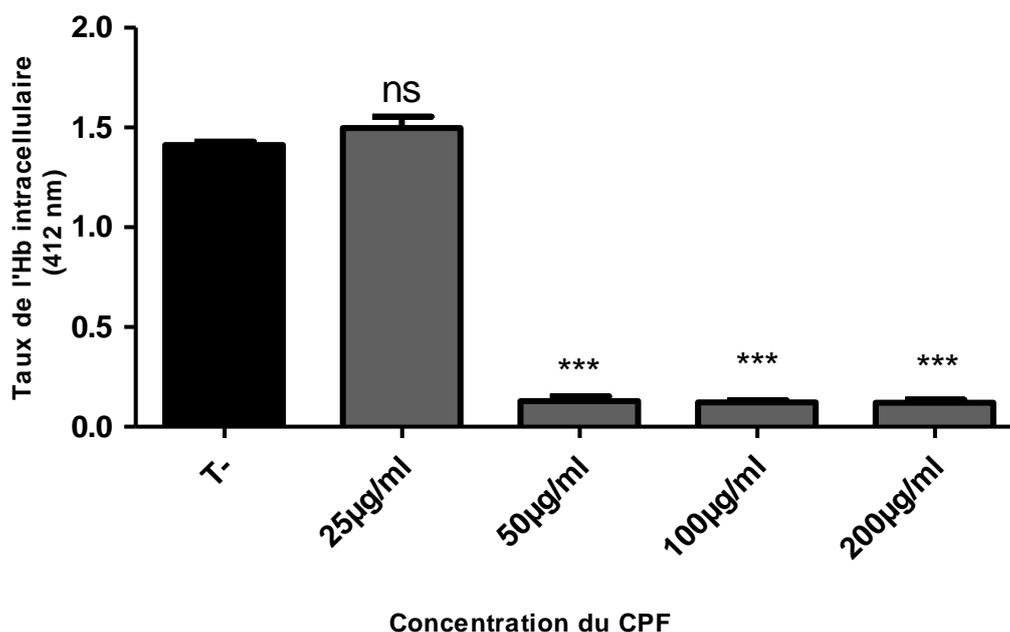


Figure 18. Taux de l'hémoglobine intracellulaire après traitement avec différentes concentrations du CPF. T⁻ : témoin négatif (sans traitement) ; CPF : Chlorpyrifos ; * : comparaison des tubes traités avec le CPF avec le témoin négatif. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD des différentes expérimentations (ns : non significatif $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

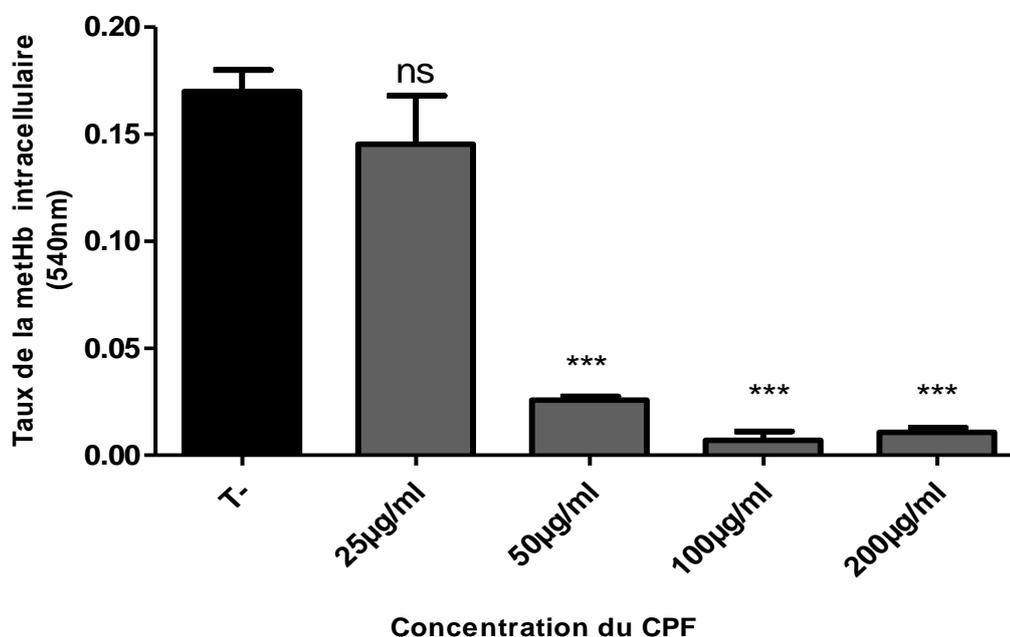


Figure 19. Taux de la méthémoglobine intracellulaire après traitement avec différentes concentrations de CPF. T⁻ : témoin négatif (sans traitement) ; CPF : Chlorpyrifos ; * : comparaison des tubes traités avec le CPF avec le témoin négatif. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD des différentes expérimentations (ns : non significatif $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

V.2. Etude de l'effet cytoprotecteur des antioxydants sur les globules rouges :

Le but de cette étude est de déterminer l'effet protecteur des deux vitamines C et E seules ou combinées, connues pour leur pouvoir antioxydant. Une augmentation accrue des ROS dans l'organisme ou dans une cellule donnée génère un déséquilibre et provoque un stress oxydant. Afin de minimiser ce SO l'organisme peut être renforcé avec des antioxydants exogènes tels que les vitamines. La vitamine E, molécule liposoluble, qui neutralise les ROS en cédant un électron et se retrouve ainsi sous forme oxydée. La vitamine C est une molécule antioxydante hydrosoluble qui présente aussi une propriété dans la régénération de la vitamine E.

La figure 20 représente les variations de la turbidité cellulaire des GRs suite à leur exposition au CPF ainsi qu'aux différents antioxydants (vit C ; vit E et la combinaison entre vit C+E).

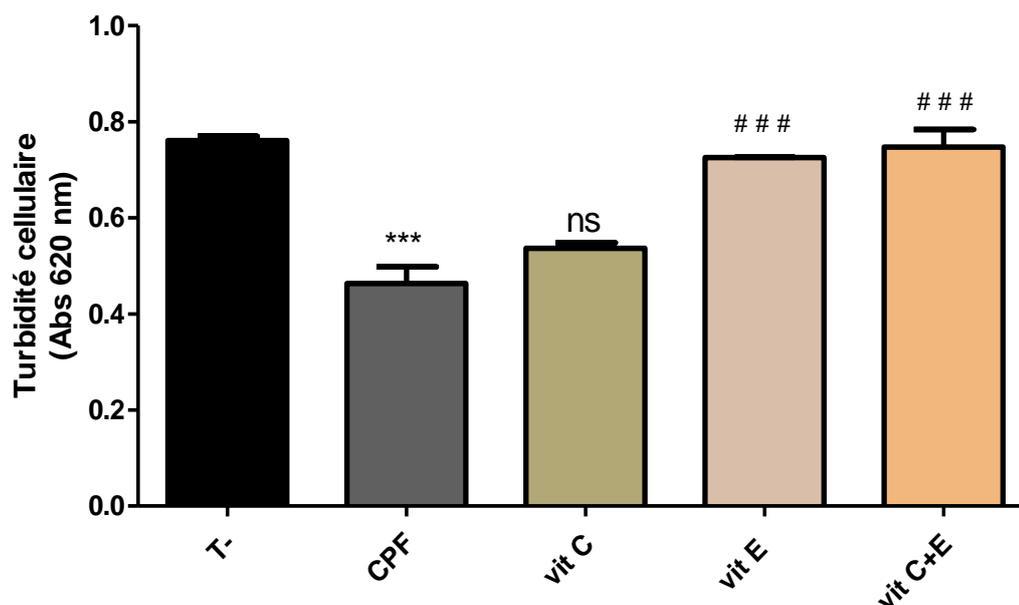


Figure 20. Turbidité cellulaire après traitement avec le CPF et différents antioxydants. T⁻ : témoin négatif (sans traitement) ; CPF : Chlorpyrifos ; Vit C : vitamine C ; Vit E : Vitamine E ; Vit C+E : combinaison entre les deux vitamines. # : Comparaison avec le CPF. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD des différentes expérimentations (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$). * : comparaison de CPF avec T⁻ respectifs. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD des différentes expérimentations (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Les résultats montrent que la turbidité cellulaire diminue significativement après l'ajout du CPF. Les résultats montrent aussi qu'après prétraitement par les vitamines la turbidité cellulaire augmente ($0,761 \pm 0,01$) par rapport au pesticide seul ($0,463 \pm 0,05$). La combinaison

(vitamine C et E) a protégé les cellules de la lyse provoquée par le CPF de façon très significative ($0,747 \pm 0,06$).

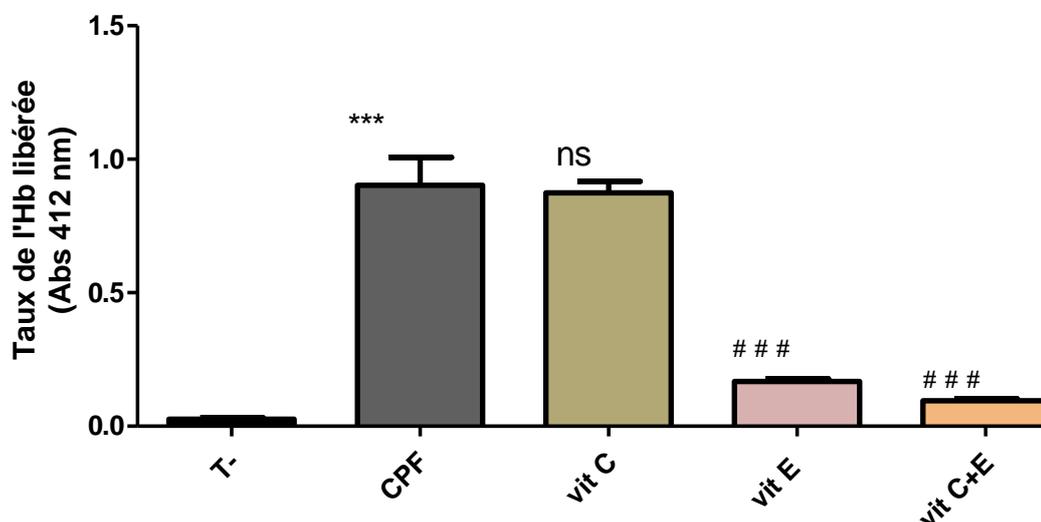


Figure 21. Taux de l'hémoglobine libérée après traitement avec le CPF et différents antioxydants. T - : témoin négatif (sans traitement) ; CPF : Chlorpyrifos ; Vit C : vitamine C ; Vit E : Vitamine E ; Vit C+E : combinaison entre les deux vitamines. # : Comparaison avec le CPF. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD des différentes expérimentations (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$). * : comparaison de CPF avec T- respectifs. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD des différentes expérimentations (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

L'hémoglobine est la protéine responsable du transport de l'oxygène dans le sang. La méthémoglobine est une forme modifiée de l'hémoglobine dans laquelle le fer ferreux (Fe^{2+}) présent normalement est converti en fer ferrique (Fe^{3+}). La méthémoglobine est incapable de lier l'oxygène de manière efficace et peut donc entraîner une réduction de la capacité de transport de l'oxygène.

La figure 21 représente le taux de l'hémoglobine libérée après traitement avec le CPF, le CPF et vitamine C, le CPF et vitamine E ainsi que le CPF avec vitamine C et vitamine E. Le taux de l'hémoglobine libérée a augmenté de manière significative après traitement avec le pesticide ($0,9 \pm 0,1$). Les GRs qui ont d'abord été prétraités avec la vitamine C puis avec le pesticide ont donné un taux d'hémoglobine plus petit par rapport au pesticide seule mais de manière non significative ($0,8 \pm 0,07$). La vitamine E quant à elle a diminué le taux de

l'hémoglobine libérée de façon significative ($0,19 \pm 0,01$). Le taux d'hémoglobine le plus petit a été donné après traitement avec les deux vitamines ($0,09 \pm 0,01$).

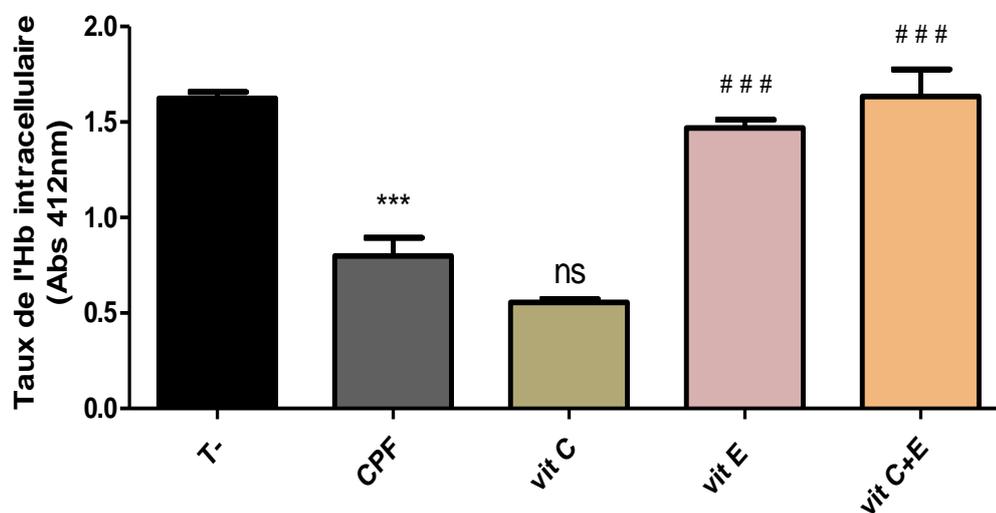


Figure 22. Taux de l'hémoglobine intracellulaire des globules rouges traités par le CPF et différents antioxydants. T : témoin négatif (sans traitement) ; CPF : Chlorpyrifos ; Vit C : vitamine C ; Vit E : Vitamine E ; Vit C+E : combinaison entre les deux vitamines. # : Comparaison avec le CPF. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD des différentes expérimentations (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$). * : comparaison de CPF avec T- respectifs. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD des différentes expérimentations (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

La figure 22 représente le taux de l'hémoglobine intracellulaire lors du traitement des érythrocytes avec du CPF et des antioxydants (vitamine C, E et la combinaison des deux vitamines). Les résultats montrent que le taux de l'Hb intracellulaire oppose les résultats de l'Hb libérée. Les valeurs de l'Hb intracellulaire vont dans le même sens que celles des concentrations cellulaires où les conditions à faible turbidité cellulaire ont une faible concentration en Hb intracellulaire.

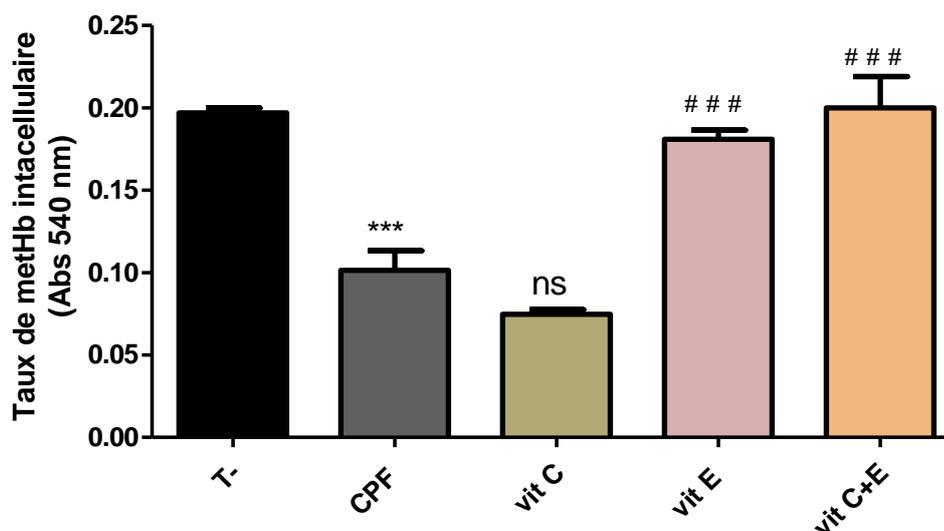


Figure 23. Taux de la méthémoglobine intracellulaire des globules rouges traités par le CPF et différents antioxydants. T⁻ : témoin négatif (sans traitement) ; CPF : Chlorpyrifos ; Vit C : vitamine C ; Vit E : Vitamine E ; Vit C+E : combinaison entre les deux vitamines. # : Comparaison avec le CPF. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD des différentes expérimentations (# p < 0,05 ; ## p < 0,01 ; ### p < 0,001). * : comparaison de CPF avec T⁻ respectifs. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD des différentes expérimentations (* p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001).

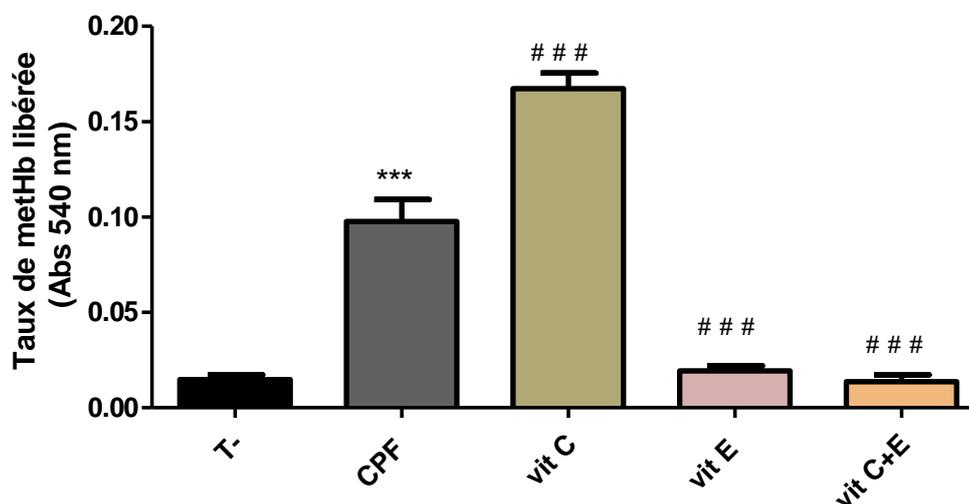


Figure 24. Le taux de méthémoglobine libéré après traitement avec le CPF et différents antioxydants. T⁻ : témoin négatif (sans traitement) ; CPF : Chlorpyrifos ; Vit C : vitamine C ; Vit E : Vitamine E ; Vit C+E : combinaison entre les deux vitamines. # : Comparaison avec le CPF. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD des différentes expérimentations (# p < 0,05 ; ## p < 0,01 ; ### p < 0,001). * : comparaison de CPF avec T⁻ respectifs. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD des différentes expérimentations (* p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001).

Les figures 23 et 24 représentent les taux de la méthémoglobine intracellulaire et libérée respectivement. On remarque qu'après traitement avec le pesticide seul, le taux de la méthémoglobine intracellulaire a diminué ($0,10 \pm 0,02$) alors que le taux de la méthémoglobine extracellulaire a augmenté. Le traitement avec la vitamine C a diminué encore plus la méthémoglobine intracellulaire et augmenté dans l'extracellulaire ($0,16 \pm 0,01$). La vitamine E et la combinaison ont donné un effet contraire à celui de la vitamine C.

V.3. Test TBARS :

Nous avons mis un lien entre l'hémolyse et la peroxydation lipidique et pour mettre en évidence un lien de causalité on a utilisé un test simple à réaliser : le test TBARS. Ce test vise à mesurer le taux des produits de peroxydation lipidique, le malondialdéhyde (MDA).

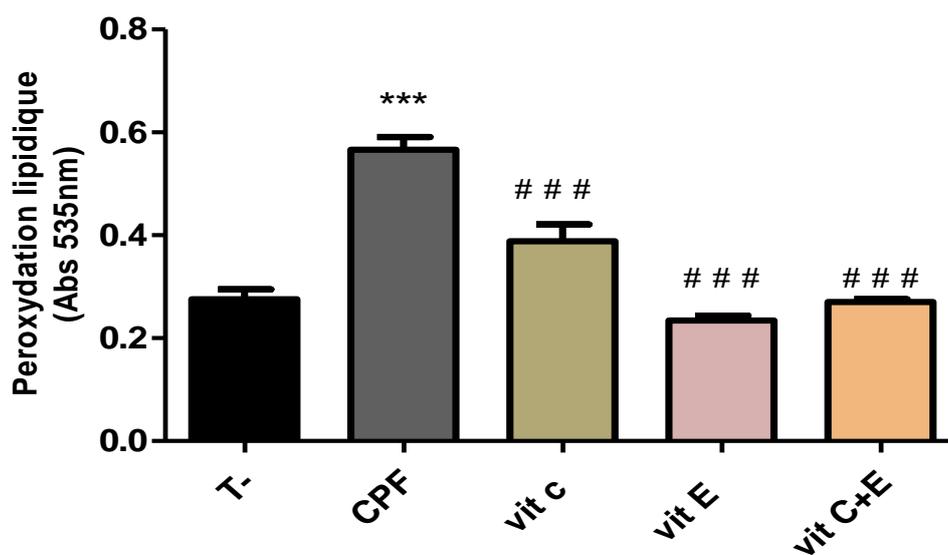


Figure 25. Le taux des MDA formés après peroxydation lipidique suite à un traitement avec le CPF et différents antioxydants. T⁻ : témoin négatif (sans traitement) ; CPF : Chlorpyrifos ; Vit C : vitamine C ; Vit E : Vitamine E ; Vit C+E : combinaison entre les deux vitamines. # : Comparaison avec le CPF. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD des différentes expérimentations (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$). * : comparaison de CPF avec T⁻ respectifs. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD des différentes expérimentations (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

La figure 25 représente le taux des MDA formés en fonction des traitements utilisés. Ce test a révélé que le CPF induit en majeure partie la dégradation des acides gras insaturés des membranes biologiques en MDA. Lors du traitement avec la vitamine C et CPF le taux des MDA a augmenté de façon significative ($0,38 \pm 0,05$) ($0,56 \pm 0,04$) respectivement, par rapport au témoin négatif ($p < 0,05$) tandis que le traitement avec la vitamine E et la combinaison ne représentent pas de différence significative par rapport au T⁻.

V.4. Test de stabilité d'hémoglobine :

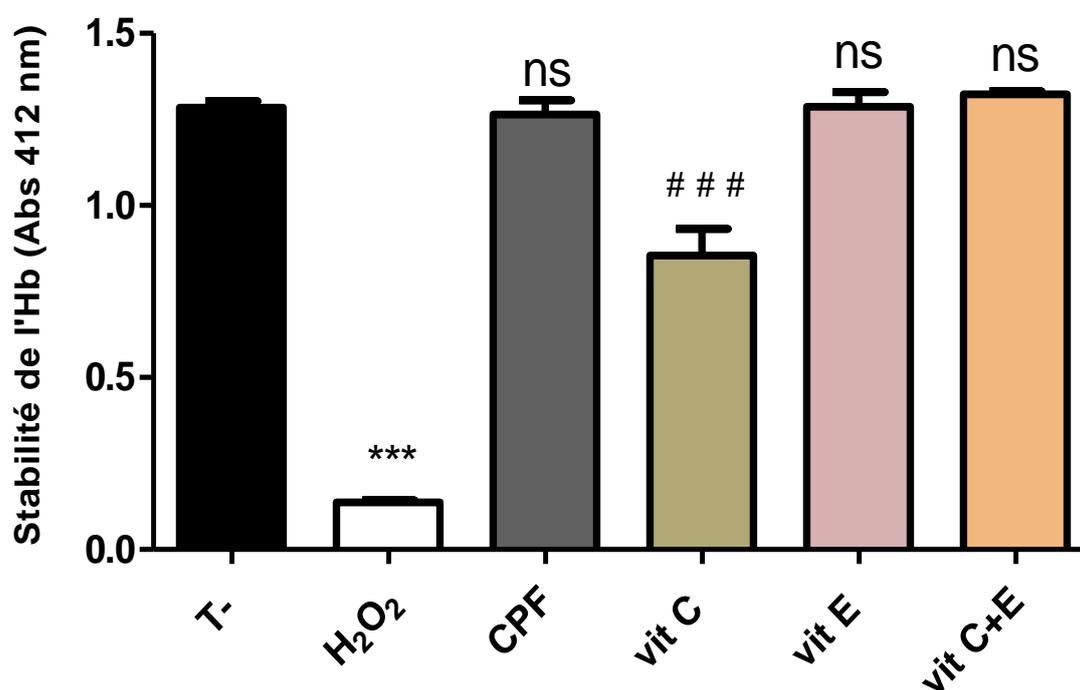


Figure 26. Taux de l'hémoglobine après contacte directe avec le CPF et les antioxydants.

T⁻ : témoin négatif (sans traitement) ; CPF : Chlorpyrifos ; Vit C : vitamine C ; Vit E : Vitamine E ; Vit C+E : combinaison entre les deux vitamines. # : Comparaison avec le CPF. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD des différentes expérimentations (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$). * :

comparaison de CPF avec T- respectifs. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD des différentes expérimentations (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).comparaison de CPF avec T- respectifs.

La figure 26 représente le taux d'hémoglobine après traitement de la solution d'hémoglobine avec le CPF, le H_2O_2 qui représente le contrôle positif avec une forte oxydation d'hémoglobine, ainsi que le traitement avec les antioxydants et le CPF.

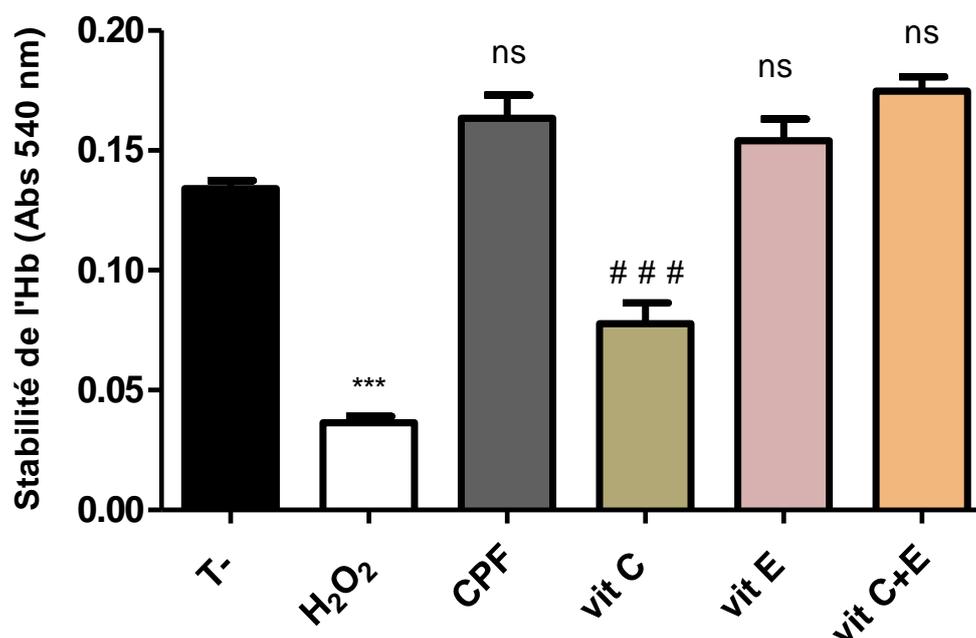


Figure 27. Taux de la méthémoglobine après contacte directe entre le CPF et l'hémoglobine avec test de protection aux antioxydants. T - : témoin négatif (sans traitement) ; CPF : Chlorpyrifos ; Vit C : vitamine C ; Vit E : Vitamine E ; Vit C+E : combinaison entre les deux vitamines. # : Comparaison avec le CPF. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD des différentes expérimentations (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$). * : comparaison de CPF avec T- respectifs. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD des différentes expérimentations (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

La figure 27 représente les taux de méthémoglobine. Le H_2O_2 a fait diminuer les taux d'hémoglobine et méthémoglobine. Le CPF quant à lui n'a pas donné de différence significative dans les taux d'hémoglobine et méthémoglobine en comparaison avec le T- ($0,16 \pm 0,01$) (. La vitamine C quant à elle, a diminué le taux d'hémoglobine et méthémoglobine de façon significative (** $p < 0,01$). La vitamine E et la combinaison ne représentent pas de différence significative par rapport au T- ($0,17 \pm 0,01$) ($0,016 \pm 0,01$) respectivement.

Chapitre VI

Discussion

VI.1. Discussion :

Le but de cette étude est de déterminer l'effet cytoprotecteur des antioxydants à l'égard de la toxicité induite par le CPF, un pesticide largement utilisé dans l'agriculture en tant qu'insecticide. Pour ce faire, une optimisation d'un protocole a d'abord été réalisée avant l'application des antioxydants (Vitamine E, vitamine C et la combinaison des deux vitamines).

Les résultats de l'optimisation montrent que le CPF affecte d'une manière dose dépendante la concentration cellulaire. Deeba et ses collaborateurs (2016), ont constaté un pourcentage de l'hémolyse plus petit (8,4%) après traitement des érythrocytes humains avec le CPF à 100 µg/mL pendant 1 h [11], ce qui est différent de nos résultats. Cette différence est due au fait qu'ils ont utilisé le sang isotonique total alors que nous avons utilisé un hémocrite de 20%. Nous avons remarqué qu'avec une concentration de 25 µg/mL la turbidité cellulaire a diminué de façon non significative avec un pourcentage d'hémolyse de 6,0%. Cette concentration ne représente donc pas d'effet cytotoxique après un temps d'incubation de 15 min. Tandis qu'à 35 µg/mL, la concentration cellulaire diminue de façon significative, après un temps d'incubation de 15 min.

Les résultats de l'Hb libérée et intracellulaire appuient ceux de concentrations cellulaires, ce qui signifie que lorsqu'une hémolyse survient, l'Hb sera libérée dans le milieu extracellulaire et dans le cas contraire, l'Hb intracellulaire sera élevée.

En effet, les résultats obtenus peuvent être expliqués par le fait que le CPF est une molécule qui est plus soluble dans les lipides que dans les milieux aqueux et donc interagit plus dans un milieu réactionnel lipidique. Le CPF peut donc provoquer une hémolyse suite à son interaction avec les lipides membranaires alors que dans le milieu intracellulaire le pesticide n'a pas pu interagir avec l'Hb vu que le milieu réactionnel dont il se trouve est défavorable. Nous avons remarqué que le taux de la methHb extracellulaire augmente en augmentant la concentration du CPF, cela peut être expliqué par le fait qu'une libération accrue en Hb aboutit à son oxydation dans le milieu extracellulaire. Dans le globule rouge, l'oxydation de l'Hb est compensée par un mécanisme de réduction visant à rétablir la fonctionnalité de la protéine. Ceci s'effectue par voie enzymatique grâce à la NADH-méthémoglobine réductase. La perte de ce système enzymatique lors de l'hémolyse induite par le CPF entraîne une oxydation importante de la protéine en solution qui s'accompagne d'une production de radicaux libres oxygénés toxiques qui pourrait agir sur le reste des cellules [121].

Afin de minimiser les dégâts oxydatifs engendrés par le CPF, les vitamines C et E ont été utilisées seules ou en association. Les résultats obtenus avec ces molécules antioxydantes ont démontré une protection importante des érythrocytes. La plus grande concentration cellulaire est obtenue après prétraitement avec la vitamine E et avec les deux vitamines associées (C+E), cela s'explique par la cytoprotection des érythrocytes par les vitamines contre l'oxydation induite par le CPF.

Le CPF a été associé à des effets oxydatifs, il a été démontré qu'il est associé à la production excessive de radicaux libres et aux dommages cellulaires [87, 99, 100].

Un contact direct entre le CPF et les globules rouge peut entraîner une augmentation du stress oxydatif. En effet, en raison de leur rôle dans le transport de l'oxygène, ces cellules sont particulièrement plus vulnérables aux dommages oxydatifs. Ainsi, l'oxydation des globules rouges peut être utilisée comme un marqueur pour évaluer les effets néfastes du CPF sur les cellules sanguines.

La vitamine C (acide ascorbique) et la vitamine E (α -tocophérol) sont des antioxydants qui jouent un rôle important dans la protection des cellules contre les dommages oxydatifs. La vitamine C est hydrosoluble et agit dans les compartiments aqueux des cellules, tandis que la vitamine E est liposoluble et agit dans les membranes cellulaires. Lorsque les globules rouges sont exposés au CPF, ces vitamines peuvent potentiellement réduire les effets néfastes en neutralisant les radicaux libres produits par le CPF. Cela peut aider à prévenir ou à atténuer les dommages oxydatifs et de protéger ainsi les globules rouges contre les effets délétères du CPF [6].

Les résultats du taux de l'Hb intracellulaire et extracellulaire appuient les résultats de la turbidité cellulaire où les valeurs faibles en Hb intracellulaire indiquent une cytotoxicité membranaire élevée qui s'accompagne de taux de l'Hb libérée élevée. Tandis que l'augmentation des taux de l'Hb intracellulaire après traitement préalable avec les vitamines indique une présence de cytoprotection contre le CPF.

Dans le cas des résultats des taux des MDA nous avons remarqué qu'après l'ajout du CPF une formation des MDA a été constatée et cela est expliqué par la peroxydation lipidique de la membrane des globules rouge. Des résultats similaires ont été approuvés par Gultekin et ses collaborateurs (2000), qui ont démontré qu'une administration *in vitro* du CPF induit une peroxydation des lipides des érythrocytes [10]. Les vitamines C et E sont des antioxydants qui agissent par le biais de protection de l'oxydation des lipides membranaire ce qui réduit la

formation des MDA. Nous avons remarqué qu'après l'ajout de la vitamine C et E seules ou combinées une diminution du taux des MDA ce qui indique que les vitamines C et E protègent contre la peroxydation lipidique. Néanmoins, nous avons constaté aussi que la vitamine E protège mieux que la vitamine C ce qui paraît évident puisque la vitamine E est la plus connue pour son pouvoir protecteur contre la peroxydation lipidiques des membranes (molécule liposoluble). Des études antérieures confirment nos résultats [102,88,86,103]. Deux études réalisées *in vivo* sur des rats exposés au CPF, ont rapporté que la vitamine E protège les érythrocyte de la peroxydation lipidique [12] ainsi que la combinaison entre les deux vitamines E et C [7]. Une autre étude *in vitro* mené sur des érythrocytes de chèvre a montré des résultats similaires où la vitamine E protège contre la peroxydation lipidique [13]. Cependant le CPF induit une peroxydation des lipides et oxyde les groupements sulfhydriles et provoque ainsi des dommages au niveau des membranes biologiques ce qui provoque une hémolyse [104,105]. En revanche, la vitamine E diminue l'oxydation des lipides membranaires et protège donc les cellules contre l'hémolyse induite par le CPF.

La diminution du taux de l'Hb dans le test de stabilité, dans le cas du contrôle positif prouve que le H₂O₂ est un fort oxydant de l'Hb vue que son taux diminue fortement par rapport au témoin négatif. Le CPF ne semble pas avoir un effet sur l'Hb puisque les valeurs de cette Hb restent élevées. Cela est peut être expliqué par la solubilité élevée du milieu réactionnel qui est inadéquat pour le CPF. Cependant, après traitement avec le CPF et les vitamines C et E nous avons constaté que la vitamine C oxyde l'Hb et que cette oxydation peut être protégée par la vitamine E où nous avons constaté une élévation du taux de l'Hb après traitement avec les deux vitamines combinées par rapport au traitement avec la vitamine C seule. Dans une étude réalisée par Claro et ces collaborateurs (2006), il a été démontré un effet similaire de la protection de la vitamine E contre l'oxydation de l'Hb. En effet, le phenylhydrazine hydrochloride (PH) provoque une cytotoxicité à l'égard des globules rouges et la vitamine C perd son activité antioxydante mais au contraire elle augmente la formation des corps de Heinz. Aussi, la vitamine E exerce un effet protecteur à l'égard de ce pesticide[123].

Il a été rapporté dans la littérature que les deux vitamines C et E représentent un effet protecteur à l'égard d'un stress oxydatif en induisant la formation de la metHb. Il a été constaté que la vitamine C protège à une concentration de 5 mM et provoque un stress oxydatif en dépassant cette concentration alors que la vitamine E protège contre la formation de metHb d'une manière dose-dépendante [125]. Il a été aussi révélé que la vitamine C présente un effet pro-oxydant à l'égard de la solution de l'Hb à une concentration de 0,1 mg/mL et augmente

ainsi le taux de la metHb ce qui peut provoquer une méthémoglobinémie où les patients souffrent d'hypoxie sévère ; qui à son tour provoque des instabilités cardiovasculaires et des dommages neurologiques irréversibles [107,108]. Le CPF ne semble pas avoir d'effet sur l'Hb mais représente une cytotoxicité cellulaire élevée, qui peut être expliquée par un autre mécanisme tel que la peroxydation des lipides membranaires.

Conclusion

Notre étude consiste à étudier l'effet protecteur des antioxydants à savoir la vit C et vit E (seules ou combinées) sur les globules rouges humains à l'égard du stress oxydant induit par le chlorpyrifos.

Notre approche expérimentale a d'abord consisté à évaluer la cytotoxicité du chlorpyrifos sur les érythrocytes et ensuite d'étudier l'effet protecteur des antioxydants (C et E) contre la toxicité induite par ce pesticide. Pour explorer le mécanisme d'action des vitamines E et C sur l'oxydation de l'hémoglobine, nous avons mesuré le taux de la metHb générée, qui présente un marqueur important du stress oxydant.

Au terme de notre travail, nous pouvons conclure que le CPF induit un stress oxydatif au niveau de la membrane des érythrocytes et qui a été constaté par des taux de MDA élevés. Les vitamines E et C protègent contre l'hémolyse et la formation des MDA et que la vitamine E protège mieux que la vitamine C et qu'une meilleure protection a été obtenue avec la combinaison des deux vitamines.

La peroxydation lipidique est à l'origine de l'hémolyse induite par le CPF, cette hémolyse est peut être observée chez les sujets au contact avec le pesticide et de provoquer ainsi une anémie hémolytique, surtout chez les agriculteurs. Pour cela, les vitamines E et C peuvent être utilisées à titre préventif pour diminuer les risques et les dommages oxydatifs induits par le CPF.

Il serait donc intéressant d'élargir cette étude en utilisant différents pesticides pour déterminer leurs effets toxiques, d'élucider les mécanismes moléculaires impliqués et d'utiliser une large gamme d'antioxydants afin de contrecarrer les effets néfastes de ces pesticides.

-
- [1] B. Dorothée, “L’impact des pesticides sur la santé humaine,” 2018.
- [2] S. Mostafalou and M. Abdollahi, “Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives,” *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 268, no. 2, pp. 157–177, Apr. 2013, doi: 10.1016/j.taap.2013.01.025.
- [3] D. Pimentel, “Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States,” *Environ. Dev. Sustain.*, vol. 7, no. 2, pp. 229–252, 2005, doi: 10.1007/s10668-005-7314-2.
- [4] R. L. Jirtle and M. K. Skinner, “Environmental epigenomics and disease susceptibility,” *Nature Reviews Genetics*, vol. 8, no. 4, pp. 253–262, Apr. 2007. doi: 10.1038/nrg2045.
- [5] S. Maître and B. Laubscher, “Pesticides et santé humaine,” *Rev. Med. Suisse*, vol. 18, no. 782, pp. 1017–1021, 2022, doi: 10.53738/REVMED.2022.18.782.1017.
- [6] Y. Bellik and M. Iguer-ouada, “Concurrent measurement of cellular turbidity and hemoglobin to evaluate the antioxidant activity of plants,” *Food Chem.*, vol. 190, pp. 468–473, 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.05.126.
- [7] M. Toxicology, F. Gultekin, N. Delibas, S. Yasar, and I. Kilinc, “In vivo changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of vitamin C and vitamin E on oxidative damage in erythrocytes induced by chlorpyrifos-ethyl in rats,” pp. 88–96, 2001, doi: 10.1007/s002040100219.
- [8] R. Saxena, P. Garg, and D. K. Jain, “In Vitro anti-oxidant effect of vitamin e on oxidative stress induced due to pesticides in rat erythrocytes,” *Toxicol. Int.*, vol. 18, no. 1, pp. 73–76, 2011, doi: 10.4103/0971-6580.75871.
- [9] I. Altuntas, N. Delibas, D. K. Doguc, S. Ozmen, and F. Gultekin, “Role of reactive oxygen species in organophosphate insecticide phosalone toxicity in erythrocytes in vitro,” vol. 17, pp. 153–157, 2003, doi: 10.1016/S0887-2333(02)00133-9.
- [10] F. Gultekin and M. Ozturk, “The effect of organophosphate insecticide chlorpyrifos-ethyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes (in vitro),” pp. 533–538, 2000, doi: 10.1007/s002040000167.
- [11] F. Deeba *et al.*, “Chlorpyrifos and lambda cyhalothrin-induced oxidative stress in human erythrocytes: In vitro studies,” *Toxicol. Ind. Health*, vol. 33, no. 4, pp. 297–307, 2017,

- doi: 10.1177/0748233716635003.
- [12] S. Folorunsho, J. Olusegun, S. Adeniyi, and K. A. Nelson, “Vitamin E protects Wistar rats from chlorpyrifos-induced increase in erythrocyte osmotic fragility,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 48, no. 12, pp. 3477–3480, 2010, doi: 10.1016/j.fct.2010.09.026.
- [13] R. Saxena and P. Garg, “Vitamin E provides protection against in vitro oxidative stress due to pesticide (Chlorpyrifos and Endosulfan) in goat RBC,” vol. 1, no. December, pp. 1–6, 2010.
- [14] F. Demir, F. Gökce, D. Durak, and Y. Kalender, “Subacute chlorpyrifos-induced oxidative stress in rat erythrocytes and the protective effects of catechin and quercetin,” *Pestic. Biochem. Physiol.*, vol. 99, no. 1, pp. 77–81, 2011, doi: 10.1016/j.pestbp.2010.11.002.
- [15] M. M. Quintana, V. Rivero Osimani, G. Magnarelli, M. G. Rovedatti, and N. Guiñazú, “The insecticides chlorpyrifos and acetamiprid induce redox imbalance in umbilical cord blood erythrocytes in vitro,” *Pestic. Biochem. Physiol.*, vol. 148, pp. 87–92, 2018, doi: 10.1016/j.pestbp.2018.04.001.
- [16] A. Barathinivas *et al.*, “Ecotoxicological Effects of Pesticides on Hematological Parameters and Oxidative Enzymes in Freshwater Catfish, *Mystus keletius*,” *Sustain.*, vol. 14, no. 15, Aug. 2022, doi: 10.3390/su14159529.
- [17] R. C. Gupta and J. W. Crissman, *Agricultural Chemicals*, Third Edit. Elsevier, 2013. doi: 10.1016/B978-0-12-415759-0.00042-X.
- [18] Organisation mondiale de la santé, *Classification OMS recommandée des pesticides en fonction des dangers qu'ils présentent*. 2019.
- [19] Y. Ishwar Chandra and D. Ningombam Linthoingambi, “Pesticides classification and its impact on human and environment. Environmental science and engineering,” vol. 6, pp. 140–158, 2017.
- [20] H. De Barjac and J. Coz, “Seisibilité comparée de six espèces différents de moustiques à bacillus thuringiensis var. israelensis,” *Bull. l'organisation Mond. la santé*, vol. 57, no. 1, pp. 139–141, 1979.
- [21] G. E. McDonnell, “Mechanisms of Action,” *Antisepsis, Disinfect. Steriliz.*, pp. 217–251,

- 2007, doi: 10.1128/9781555816445.ch7.
- [22] D. E. Moreland, “Mechanisms of Action of Herbicides,” *Annu. Rev. Plant Physiol.*, vol. 31, no. 1, pp. 597–638, Jun. 1980, [Online]. Available: www.kaowarsom.be
- [23] S. Serghat, A. Mouria, A. Ouazzani Touhami, A. Badoc, and A. Douira, “Effet De Quelques Fongicides Sur Le Développement in Vitro De *Pyricularia Grisea* Et *Helminthosporium Oryzae* (*),” *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, vol. 143, no. February, pp. 7–18, 2004.
- [24] W. M. Hoskins and R. Craig, “Organic insecticides.,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 15, pp. 539–572, 1946, doi: 10.1146/annurev.bi.15.070146.002543.
- [25] M. Stoytcheva, *Pesticides in the Modern World - Trends In Pesticides In The Modern World – Trends In Pesticides*. InTech, 2011.
- [26] E. M. John and J. M. Shaik, “Chlorpyrifos: pollution and remediation,” *Environ. Chem. Lett.*, vol. 13, no. 3, pp. 269–291, 2015, doi: 10.1007/s10311-015-0513-7.
- [27] M. F. Bouchard *et al.*, “Prenatal exposure to organophosphate pesticides and IQ in 7-year-old children,” *Environ. Health Perspect.*, vol. 119, no. 8, pp. 1189–1195, Aug. 2011, doi: 10.1289/ehp.1003185.
- [28] L. G. Costa, “Current issues in organophosphate toxicology,” *Clinica Chimica Acta*, vol. 366, no. 1–2, pp. 1–13, Apr. 2006. doi: 10.1016/j.cca.2005.10.008.
- [29] P. K. Sinha and A. Sharma, “Organophosphate poisoning: A review,” *Med. J. Indones.*, vol. 12, no. 2, pp. 120–126, 2003, doi: 10.13181/mji.v12i2.100.
- [30] M. A. Hassaan and A. El Nemr, “Pesticides pollution : Classifications , human health impact , extraction and treatment techniques,” *Egypt. J. Aquat. Res.*, vol. 46, no. 3, pp. 207–220, 2020, doi: 10.1016/j.ejar.2020.08.007.
- [31] S. Maître and B. Laubscher, “Pesticides et santé humaine,” *Rev. Med. Suisse*, vol. 18, no. 782, pp. 1017–1021, 2022, doi: 10.53738/REVMED.2022.18.782.1017.
- [32] E. Collective, D. E. S. Territoires, and T. En, “Expertise Collective,” 2007.
- [33] S. Bortoli and X. Coumoul, “Impact des pesticides sur la santé humaine,” *Prat. en Nutr.*, vol. 14, no. 53, pp. 18–24, 2018, doi: 10.1016/j.pranut.2017.12.005.

-
- [34] S. Mostafalou, “Concerns of Environmental Persistence of Pesticides and Human Chronic Diseases,” *Clin. Exp. Pharmacol.*, vol. 01, no. S5, pp. 10–11, 2012, doi: 10.4172/2161-1459.S5-e002.
- [35] D. Mansuy, “Le métabolisme des xenobiotiques : effets bénéfiques , effets néfastes,” vol. 207, no. 1, pp. 33–37, 2013, doi: 10.1051/jbio/2013003.
- [36] D. J. Liska, “The detoxification enzyme systems.,” *Altern. Med. Rev.*, vol. 3, no. 3, pp. 187–98, Jun. 1998, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9630736>
- [37] E. Croom, *Metabolism of Xenobiotics of Human Environments*, 1st ed., vol. 112. Elsevier Inc., 1877. doi: 10.1016/B978-0-12-415813-9.00003-9.
- [38] L. Claxton and G. Woodalljr, “A review of the mutagenicity and rodent carcinogenicity of ambient air,” *Mutat. Res. Mutat. Res.*, vol. 636, no. 1–3, pp. 36–94, Nov. 2007, doi: 10.1016/j.mrrev.2007.01.001.
- [39] N. Akhtar, S. A. Kayani, M. M. Ahmad, and M. Shahab, “Insecticide-induced Changes in Secretory Activity of the Thyroid Gland in Rats,” *J. Appl. Toxicol.*, vol. 16, no. 5, pp. 397–400, Sep. 1996, doi: 10.1002/(SICI)1099-1263(199609)16:5<397::AID-JAT362>3.0.CO;2-Y.
- [40] E. Swedenborg, J. Rüegg, S. Mäkelä, and I. Pongratz, “Endocrine disruptive chemicals: mechanisms of action and involvement in metabolic disorders,” *J. Mol. Endocrinol.*, vol. 43, no. 1, pp. 1–10, Jul. 2009, doi: 10.1677/JME-08-0132.
- [41] E. R. Kabir, M. S. Rahman, and I. Rahman, “A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health,” *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 40, no. 1, pp. 241–258, 2015, doi: 10.1016/j.etap.2015.06.009.
- [42] A. Sabarwal, K. Kumar, and R. P. Singh, “Hazardous effects of chemical pesticides on human health – Cancer and other associated disorders,” *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 63, no. September, pp. 103–114, 2018, doi: 10.1016/j.etap.2018.08.018.
- [43] V. F. Garry, “Pesticides and children,” *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 198, no. 2, pp. 152–163, Jul. 2004, doi: 10.1016/j.taap.2003.11.027.
- [44] V. Mathur, P. Bhatnagar, R. G. Sharma, V. Acharya, and R. Sexana, “Breast cancer incidence and exposure to pesticides among women originating from Jaipur,” *Environ.*

- Int.*, vol. 28, no. 5, pp. 331–336, Nov. 2002, doi: 10.1016/S0160-4120(02)00031-4.
- [45] B. D. Banerjee, V. Seth, A. Bhattacharya, S. T. Pasha, and A. K. Chakraborty, “Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers,” *Toxicol. Lett.*, vol. 107, no. 1–3, pp. 33–47, Jun. 1999, doi: 10.1016/S0378-4274(99)00029-6.
- [46] P. Bonsi *et al.*, “Early ionic and membrane potential changes caused by the pesticide rotenone in striatal cholinergic interneurons,” *Exp. Neurol.*, vol. 185, no. 1, pp. 169–181, Jan. 2004, doi: 10.1016/j.expneurol.2003.09.016.
- [47] Y. Wang, “Bulky DNA Lesions Induced by Reactive Oxygen Species,” *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 21, no. 2, pp. 276–281, Feb. 2008, doi: 10.1021/tx700411g.
- [48] S. C. Gupta, D. Hevia, S. Patchva, B. Park, W. Koh, and B. B. Aggarwal, “Upsides and Downsides of Reactive Oxygen Species for Cancer: The Roles of Reactive Oxygen Species in Tumorigenesis, Prevention, and Therapy,” *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 16, no. 11, pp. 1295–1322, Jun. 2012, doi: 10.1089/ars.2011.4414.
- [49] R. L. Jirtle and M. K. Skinner, “Environmental epigenomics and disease susceptibility,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 8, no. 4, pp. 253–262, Apr. 2007, doi: 10.1038/nrg2045.
- [50] M. C. R. Alavanja, M. K. Ross, and M. R. Bonner, “Increased cancer burden among pesticide applicators and others due to pesticide exposure,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 63, no. 2, pp. 120–142, 2013, doi: 10.3322/caac.21170.
- [51] Y. Li *et al.*, “Neurological effects of pesticide use among farmers in China,” *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 11, no. 4, pp. 3995–4006, 2014, doi: 10.3390/ijerph110403995.
- [52] A. Moretto and C. Colosio, “Biochemical and toxicological evidence of neurological effects of pesticides: The example of Parkinson’s disease,” *Neurotoxicology*, vol. 32, no. 4, pp. 383–391, 2011, doi: 10.1016/j.neuro.2011.03.004.
- [53] F. Kamel and J. A. Hoppin, “Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease,” *Environ. Health Perspect.*, vol. 112, no. 9, pp. 950–958, 2004, doi: 10.1289/ehp.7135.
- [54] C. Colosio, M. Tiramani, and M. Maroni, “Neurobehavioral effects of pesticides: State

- of the art,” *Neurotoxicology*, vol. 24, no. 4–5, pp. 577–591, 2003, doi: 10.1016/S0161-813X(03)00055-X.
- [55] S. K. Rastogi, S. Tripathi, and D. Ravishanker, “A study of neurologic symptoms on exposure to organophosphate pesticides in the children of agricultural workers,” *Indian J. Occup. Environ. Med.*, vol. 14, no. 2, pp. 54–57, 2010, doi: 10.4103/0019-5278.72242.
- [56] S. H. Thany, P. Reynier, and G. Lenaers, “Neurotoxicité des pesticides Quel impact sur les maladies neurodégénératives ?,” *Medecine/Sciences*, vol. 29, no. 3, pp. 273–278, Mar. 2013, doi: 10.1051/medsci/2013293013.
- [57] E. Corsini, J. Liesivuori, T. Vergieva, H. Van Loveren, and C. Colosio, “Effects of pesticide exposure on the human immune system,” *Hum. Exp. Toxicol.*, vol. 27, no. 9, pp. 671–680, 2008, doi: 10.1177/0960327108094509.
- [58] V. Rauh *et al.*, “Seven-year neurodevelopmental scores and prenatal exposure to chlorpyrifos, a common agricultural pesticide,” *Environ. Health Perspect.*, vol. 119, no. 8, pp. 1196–1201, Aug. 2011, doi: 10.1289/ehp.1003160.
- [59] S. M. Engel *et al.*, “Prenatal exposure to organophosphates, paraoxonase 1, and cognitive development in childhood,” *Environ. Health Perspect.*, vol. 119, no. 8, pp. 1182–1188, Aug. 2011, doi: 10.1289/ehp.1003183.
- [60] J. W. Albers *et al.*, “The Effects of Occupational Exposure to Chlorpyrifos on the Neurologic Examination of Central Nervous System Function: A Prospective Cohort Study,” *J. Occup. Environ. Med.*, vol. 46, no. 4, pp. 367–378, 2004, doi: 10.1097/01.jom.0000121127.29733.5c.
- [61] K. Khan *et al.*, “Longitudinal assessment of chlorpyrifos exposure and self-reported neurological symptoms in adolescent pesticide applicators,” *BMJ Open*, vol. 4, no. 3, 2014, doi: 10.1136/bmjopen-2013-004177.
- [62] B. Eskenazi *et al.*, “Association of in utero organophosphate pesticide exposure and fetal growth and length of gestation in an agricultural population,” *Environ. Health Perspect.*, vol. 112, no. 10, pp. 1116–1124, 2004, doi: 10.1289/ehp.6789.
- [63] A. Glenn and C. E. Armstrong, “Physiology of red and white blood cells,” *Anaesth.*

- Intensive Care Med.*, vol. 20, no. 3, pp. 170–174, doi: 10.1016/j.mpaic.2019.01.001.
- [64] S. Peter Klinken, “Red blood cells,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 34, no. 12, pp. 1513–1518, Dec. 2002, doi: 10.1016/S1357-2725(02)00087-0.
- [65] R. G. Kendall, “Erythropoietin,” *Clin. Lab. Haematol.*, vol. 23, no. 2, pp. 71–80, Apr. 2001, doi: 10.1046/j.1365-2257.2001.00351.x.
- [66] A. Delmer *et al.*, *Référentiels des collèges hématologie*, vol. 2. Elsevier Mason, 2015.
- [67] B. Faivre, P. Menu, P. Labrude, and C. Vigneron, “Hemoglobin Autooxidation/Oxidation Mechanisms and Methemoglobin Prevention or Reduction Processes in the Bloodstream Literature review and outline of autooxidation reaction,” *Artif. Cells, Blood Substitutes, Biotechnol.*, vol. 26, no. 1, pp. 17–26, Jan. 1998, doi: 10.3109/10731199809118943.
- [68] C. Ogawa, K. Tsuchiya, and K. Maeda, “Clinica Chimica Acta Reticulocyte hemoglobin content,” *Clin. Chim. Acta*, vol. 504, no. January, pp. 138–145, 2020, doi: 10.1016/j.cca.2020.01.032.
- [69] K. R. Katsumura, A. W. DeVilbiss, N. J. Pope, K. D. Johnson, and E. H. Bresnick, “Transcriptional Mechanisms Underlying Hemoglobin Synthesis,” *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 3, no. 9, pp. a015412–a015412, Sep. 2013, doi: 10.1101/cshperspect.a015412.
- [70] P. Ponka and C. N. Lok, “The transferrin receptor: role in health and disease,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 31, no. 10, pp. 1111–1137, Oct. 1999, doi: 10.1016/S1357-2725(99)00070-9.
- [71] A. Iolascon, L. De Falco, and C. Beaumont, “Molecular basis of inherited microcytic anemia due to defects in iron acquisition or heme synthesis,” *Haematologica*, vol. 94, no. 3, pp. 395–408, Mar. 2009, doi: 10.3324/haematol.13619.
- [72] H. Gunshin *et al.*, “Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter,” *Nature*, vol. 388, no. 6641, pp. 482–488, Jul. 1997, doi: 10.1038/41343.
- [73] B. Giardina, I. Messana, R. Scatena, and M. Castagnola, “The Multiple Functions of Hemoglobin,” *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 30, no. 3, pp. 165–196, Jan. 1995, doi: 10.3109/10409239509085142.

-
- [74] M. L. Ellsworth, T. Forrester, C. G. Ellis, and H. H. Dietrich, "The erythrocyte as a regulator of vascular tone," *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.*, vol. 269, no. 6, pp. H2155–H2161, Dec. 1995, doi: 10.1152/ajpheart.1995.269.6.H2155.
- [75] L. Jia, C. Bonaventura, J. Bonaventura, and J. S. Stamler, "S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control," *Nature*, vol. 380, no. 6571, pp. 221–226, Mar. 1996, doi: 10.1038/380221a0.
- [76] J. S. Stamler, E. J. Toone, S. A. Lipton, N. J. Sucher, and N. Carolina, "(S) NO Signals : Translocation , Regulation , and a Consensus Motif," *Neuron*, vol. 18, no. 5, pp. 691–696, 1997.
- [77] P. Kleinbongard *et al.*, "Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 35, no. 7, pp. 790–796, Oct. 2003, doi: 10.1016/S0891-5849(03)00406-4.
- [78] P. C. Minneci *et al.*, "Nitrite reductase activity of hemoglobin as a systemic nitric oxide generator mechanism to detoxify plasma hemoglobin produced during hemolysis," *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.*, vol. 295, no. 2, pp. H743–H754, Aug. 2008, doi: 10.1152/ajpheart.00151.2008.
- [79] J. E. Smith, "Erythrocyte Membrane : Structure , Function , and Pathophysiology," vol. 24, no. 6, pp. 471–476, 1987.
- [80] W. T. Tse and S. E. Lux, "Red blood cell membrane disorders," *Br. J. Haematol.*, vol. 104, no. 1, pp. 2–13, Jan. 1999, doi: 10.1111/j.1365-2141.1999.01130.x.
- [81] M. P. Sheetz and S. J. Singer, "Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug erythrocyte interactions," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 71, no. 11, pp. 4457–4461, 1974, doi: 10.1073/pnas.71.11.4457.
- [82] J. N. Cefalu *et al.*, "Methemoglobinemia in the Operating Room and Intensive Care Unit: Early Recognition, Pathophysiology, and Management," *Adv. Ther.*, vol. 37, no. 5, pp. 1714–1723, May 2020, doi: 10.1007/s12325-020-01282-5.
- [83] A. Mansouri, "Methemoglobin reduction under near physiological conditions," *Biochem. Med. Metab. Biol.*, vol. 42, no. 1, pp. 43–51, 1989, doi: 10.1016/0885-4505(89)90039-X.

- [84] M. Abdollahi, A. Ranjbar, S. Shadnia, S. Nikfar, and A. Rezaie, "Pesticides and oxidative stress: A review," *Med. Sci. Monit.*, vol. 10, no. 6, 2004.
- [85] D. M. Miller and S. D. Aust, "Studies of ascorbate-dependent, iron-catalyzed lipid peroxidation," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 271, no. 1, pp. 113–119, 1989, doi: 10.1016/0003-9861(89)90261-0.
- [86] H. Y. Huang, L. J. Appel, K. D. Croft, E. R. Miller, T. A. Mori, and I. B. Puddey, "Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation: Results of a randomized controlled trial," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 76, no. 3, pp. 549–555, 2002, doi: 10.1093/ajcn/76.3.549.
- [87] M. G. Traber and J. Atkinson, "Vitamin E, antioxidant and nothing more," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 43, no. 1, pp. 4–15, 2007, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.024.
- [88] R. O. Sule, L. Condon, and A. V. Gomes, "A Common Feature of Pesticides: Oxidative Stress - The Role of Oxidative Stress in Pesticide-Induced Toxicity," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2022, 2022, doi: 10.1155/2022/5563759.
- [89] L. L. Smith, "Mechanism of Paraquat Toxicity in Lung and its Relevance to Treatment," *Hum. Exp. Toxicol.*, vol. 6, no. 1, pp. 31–36, 1987, doi: 10.1177/096032718700600105.
- [90] A. George *et al.*, "Erythrocyte NADPH oxidase activity modulated by Rac GTPases, PKC, and plasma cytokines contributes to oxidative stress in sickle cell disease," *Blood*, vol. 121, no. 11, pp. 2099–2107, 2013, doi: 10.1182/blood-2012-07-441188.
- [91] B. Tavazzi *et al.*, "Energy metabolism and lipid peroxidation of human erythrocytes as a function of increased oxidative stress," *Eur. J. Biochem.*, vol. 267, no. 3, pp. 684–689, 2000, doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01042.x.
- [92] M. M. Cruz Silva, V. M. C. Madeira, L. M. Almeida, and J. B. A. Custódio, "Hemolysis of human erythrocytes induced by tamoxifen is related to disruption of membrane structure," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1464, no. 1, pp. 49–61, 2000, doi: 10.1016/S0005-2736(99)00237-0.
- [93] J. Zomer Sandrini *et al.*, "Short-term responses to cadmium exposure in the estuarine polychaete *Laonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae): Subcellular distribution and oxidative stress generation," *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 25, no. 5, pp. 1337–1344,

- 2006, doi: 10.1897/05-275R.1.
- [94] J. Umbreit, “Methemoglobin-It’s not just blue: A concise review,” *Am. J. Hematol.*, vol. 82, no. 2, pp. 134–144, Feb. 2007, doi: 10.1002/ajh.20738.
- [95] B. Sosnowska, B. Huras, H. Nowacka-Krukowska, and B. Bukowska, “Oxidative damage to human red blood cells treated with chlorfenvinphos, an organophosphate insecticide (in vitro),” *Biol.*, vol. 68, no. 4, pp. 773–778, 2013, doi: 10.2478/s11756-013-0200-8.
- [96] G. Barrera *et al.*, “Lipid peroxidation-derived aldehydes, 4-hydroxynonenal and malondialdehyde in aging-related disorders,” *Antioxidants*, vol. 7, no. 8, 2018, doi: 10.3390/antiox7080102.
- [97] R. M. Domingues, P. Domingues, T. Melo, D. Pérez-Sala, A. Reis, and C. M. Spickett, “Lipoxidation adducts with peptides and proteins: Deleterious modifications or signaling mechanisms?,” *J. Proteomics*, vol. 92, pp. 110–131, 2013, doi: 10.1016/j.jprot.2013.06.004.
- [98] H. Esterbauer and H. Zollern, “Methods for determination of aldehydic lipid peroxidation products,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 7, no. 2, pp. 197–203, 1989, doi: 10.1016/0891-5849(89)90015-4.
- [99] N. Papac-Milicevic, C. J. L. Busch, and C. J. Binder, *Malondialdehyde Epitopes as Targets of Immunity and the Implications for Atherosclerosis*, 1st ed., vol. 131. Elsevier Inc., 2016. doi: 10.1016/bs.ai.2016.02.001.
- [100] A. Casini *et al.*, “Collagen type I synthesized by pancreatic periacinar stellate cells (PSC) co-localizes with lipid peroxidation-derived aldehydes in chronic alcoholic pancreatitis,” *J. Pathol.*, vol. 192, no. 1, pp. 81–89, 2000, doi: 10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<::aid-path675>3.3.co;2-e.
- [101] G. Barrera *et al.*, “Role of 4-Hydroxynonenal-Protein Adducts in Human Diseases,” *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 22, no. 18, pp. 1681–1702, Jun. 2015, doi: 10.1089/ars.2014.6166.
- [102] M. Podsiedlik, M. Markowicz-Piasecka, and J. Sikora, “Erythrocytes as model cells for biocompatibility assessment, cytotoxicity screening of xenobiotics and drug delivery,”

- Chem. Biol. Interact.*, vol. 332, p. 109305, 2020, doi: 10.1016/j.cbi.2020.109305.
- [103] E. Lang and F. Lang, “Mechanisms and pathophysiological significance of eryptosis, the suicidal erythrocyte death,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 39, pp. 35–42, 2015, doi: 10.1016/j.semcd.2015.01.009.
- [104] S. A. Alghareeb, M. A. Alfihli, and S. Fatima, “Molecular Mechanisms and Pathophysiological Significance of Eryptosis,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, no. 6, p. 5079, 2023, doi: 10.3390/ijms24065079.
- [105] O. K. Afolabi, F. A. Aderibigbe, D. T. Folarin, A. Arinola, and A. D. Wusu, “Oxidative stress and inflammation following sub-lethal oral exposure of cypermethrin in rats: mitigating potential of epicatechin,” *Heliyon*, vol. 5, no. 8, p. e02274, 2019, doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02274.
- [106] M. N. Tiwari *et al.*, “Effects of cypermethrin on monoamine transporters, xenobiotic metabolizing enzymes and lipid peroxidation in the rat nigrostriatal system,” *Free Radic. Res.*, vol. 44, no. 12, pp. 1416–1424, 2010, doi: 10.3109/10715762.2010.512041.
- [107] N. Hamed, E. Mosallam, and R. Abdel-Razik, “In Vitro Effect of Cypermethrin on the Perturbations of Rat Erythrocytes: The Ameliorative Role of Carvone,” *Alexandria Sci. Exch. J.*, vol. 43, no. 4, pp. 417–429, 2022, doi: 10.21608/asejaiqjsae.2022.253659.
- [108] M. Rashighi and J. E. Harris, “The pesticide deltamethrin increases free radical production and promotes nuclear translocation of the stress response transcription factor Nrf2 in rat brain,” *Physiol. Behav.*, vol. 176, no. 3, pp. 139–148, 2017, doi: 10.1053/j.gastro.2016.08.014.CagY.
- [109] M. Şentürk, S. B. Ceyhun, O. Erdoğan, and Ö. I. Küfrevioğlu, “In vitro and in vivo effects of some pesticides on glucose-6-phosphate dehydrogenase enzyme activity from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocytes,” *Pestic. Biochem. Physiol.*, vol. 95, no. 2, pp. 95–99, 2009, doi: 10.1016/j.pestbp.2009.07.005.
- [110] S. Singh, A. Pandey, B. Sharma, K. Lawrence, and S. Pandit, “Imidacloprid induced osmotic fragility in erythrocytes of rats : Protective role of vit . C and tea,” vol. 5, no. 5, pp. 103–105, 2013.
- [111] L. Fibroblast *et al.*, “In Vitro Investigation of the Effects of Imidacloprid on AChE ,

- LDH , and GSH Levels in the L-929 Fibroblast Cell Line,” vol. 17, no. 5, pp. 506–510, 2020, doi: 10.4274/tjps.galenos.2019.15807.
- [112] S. K. Kataria, A. K. Chhillar, A. Kumar, M. Tomar, and V. Malik, “Cytogenetic and hematological alterations induced by acute oral exposure of imidacloprid in female mice,” *Drug Chem. Toxicol.*, vol. 00, no. 00, pp. 1–7, 2015, doi: 10.3109/01480545.2015.1026972.
- [113] A. Azzarà *et al.*, “Increased Level of DNA Damage in Some Organs of Obese Zucker Rats by c-H2AX Analysis Alessia,” *Environ. Mol. Mutagen.*, vol. 405, no. April, pp. 391–405, 2010, doi: 10.1002/em.
- [114] S. Chelly *et al.*, “HPLC-DAD Analysis, Antioxidant and Protective Effects of Tunisian *Rhanterium suaveolens* against Acetamiprid Induced Oxidative Stress on Mice Erythrocytes,” *Chem. Biodivers.*, vol. 16, no. 12, 2019, doi: 10.1002/cbdv.201900428.
- [115] T. Das, A. Pradhan, A. Paramanik, and S. M. Choudhury, “Ameliorative role of zinc on cypermethrin-induced changes in haematological parameters and oxidative stress biomarkers in rat erythrocytes,” *Toxicol. Environ. Health Sci.*, vol. 8, no. 3, pp. 234–246, 2016, doi: 10.1007/s13530-016-0280-2.
- [116] G. Demisia, D. Vlastos, M. Goumenou, and D. P. Matthopoulos, “Assessment of the genotoxicity of imidacloprid and metalaxyl in cultured human lymphocytes and rat bone-marrow,” vol. 634, pp. 32–39, 2007, doi: 10.1016/j.mrgentox.2007.05.018.
- [117] H. Paluzar and A. Sagiroglu, “Effects of Organophosphorus and Pyrethroid pesticides on antioxidant enzymes and reactivation effects of Pralidoxime: In vitro studies,” *Kuwait J. Sci.*, vol. 49, no. 3, pp. 1–21, 2022, doi: 10.48129/kjs.11847.
- [118] D. Durak, F. G. Uzun, S. Kalender, A. Ogutcu, M. Uzunhisarcikli, and Y. Kalender, “Malathion-induced oxidative stress in human erythrocytes and the protective effect of vitamins C and E in vitro,” *Environ. Toxicol.*, vol. 24, no. 3, pp. 235–242, Jun. 2009, doi: 10.1002/tox.20423.
- [119] L. Zheng, H. Dong, G. Su, Q. Zhao, and M. Zhao, “Radical scavenging activities of Tyr-, Trp-, Cys- and Met-Gly and their protective effects against AAPH-induced oxidative damage in human erythrocytes,” vol. 197, pp. 807–813, 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.11.012.

- [120] T. Verpoort *et al.*, “Novel criteria for assessing red blood cell viability in blood banks,” vol. 14, pp. 393–401, 2007, doi: 10.1016/j.tracli.2007.05.003.
- [121] C. Alexis, “Mise en evidence par Ultrasonographie doppler pulse et analyse de l’effet vasoconstricteur de trois solutions d’emoglobine humaine modifiée chimiquement,” Lorraine, 1999. doi: http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php.
- [122] S. Eroğlu, D. Pandir, F. G. Uzun, and H. Bas, “Protective role of vitamins C and E in diclorvos-induced oxidative stress in human erythrocytes in vitro,” *Biol. Res.*, vol. 46, no. 1, pp. 33–38, 2013, doi: 10.4067/S0716-97602013000100005.
- [123] L. M. Claro, M. S. Soares Leonart, S. R. Comar, and A. J. Do Nascimento, “Effect of vitamins C and E on oxidative processes in human erythrocytes,” *Cell Biochem. Funct.*, vol. 24, no. 6, pp. 531–535, 2006, doi: 10.1002/cbf.1255.
- [124] N. R. Brownlee, J. J. Huttner, R. V. Panganamala, and D. G. Cornwell, “Role of vitamin E in glutathione-induced oxidant stress: methemoglobin, lipid peroxidation, and hemolysis,” *J. Lipid Res.*, vol. 18, no. 5, pp. 635–644, 1977, doi: 10.1016/s0022-2275(20)41605-0.
- [125] N. Atyabi, S. P. Yasini, S. M. Jalali, and H. Shaygan, “Antioxidant effect of different vitamins on methemoglobin production: An in vitro study,” *Vet. Res. forum an Int. Q. J.*, vol. 3, no. 2, pp. 97–101, 2012, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25653754><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4312803>
- [126] T. George, A. Shaikh, L. Thomas, and A. Kundavaram, “Severe methemoglobinemia due to insecticide poisoning,” *Indian J. Crit. Care Med.*, vol. 18, no. 2, pp. 113–114, 2014, doi: 10.4103/0972-5229.126087.
- [127] K. Arva and A. Sharma, “A rare combination of methemoglobinemia and carboxyhemoglobinemia in pesticide poisoning,” *Am. J. Emerg. Med.*, vol. 62, pp. 148.e5–148.e7, 2022, doi: 10.1016/j.ajem.2022.09.010.

Résumé :

Le stress oxydatif (SO) représente l'un des mécanismes de toxicité impliqués par les pesticides suscite beaucoup d'intérêt par les chercheurs. Les érythrocytes semblent une cible principale pour le SO vu la présence de l'hémoglobine (Hb) dans ces derniers, ce qui les rends un modèle idéal pour l'étude. Notre étude porte sur l'effet cytotoxique du chlorpyrifos (CPF) sur les érythrocytes humains et sur l'effet protecteur des vitamines E et C contre le stress oxydant engendré par le CPF. Une gamme de concentrations de CPF ont été testées sur les érythrocytes et la turbidité cellulaire ainsi que le taux de l'Hb intra et extracellulaire ont été déterminés. Le mécanisme moléculaire impliqué a été déterminé en évaluant les paramètres du SO à savoir le taux de la méthémoglobine (MetHb) et le taux des malonydialdéhydes (MDA). Les résultats ont démontré que le CPF induit une diminution très significative de la concentration cellulaire ($0,463 \pm 0,05$) à une concentration de $35 \mu\text{g/mL}$ par rapport au témoin négatif ($0,7 \pm 0,015$). Les vitamines C et E exercent un effet cytoprotecteur contre le CPF avec une concentration cellulaire qui est de ($0,747 \pm 0,06$). Le taux de l'Hb et de la MetHb libérée, après traitement avec le CPF, a augmenté d'une manière très significative qui sont respectivement de ($0,902 \pm 0,01$) et de ($0,097 \pm 0,02$) en comparaison au témoin négatif ($0,014 \pm 0,004$). Les résultats de l'Hb et de la MetHb libérée confirment l'effet protecteur de ces antioxydants qui ont réduit significativement le taux de ces deux paramètres à ($0,095 \pm 0,01$) et ($0,013 \pm 0,006$); respectivement en comparaison avec le CPF ($0,4 \pm 0,02$). Les résultats indiquent que le pesticide augmente le taux des MDA ($0,566 \pm 0,04$) et que le prétraitement avec les vitamines protègent contre la peroxydation lipidique avec un taux de MDA qui est de ($0,270 \pm 0,009$). A partir de ces résultats prometteurs, il serait intéressant d'élargir cette étude afin de démontrer davantage les mécanismes moléculaires impliqués dans la cytotoxicité des pesticides et l'effet protecteur exercé par les vitamines.

Mots clés : Chlorpyrifos, Erythrocytes, Stress oxydatif, Hémoglobine, Méthémoglobine, Vitamine.

Abstract:

Oxidative stress (OS) is one of the toxicity mechanisms involved in pesticides that is attracting a lot of interest from researchers. Erythrocytes seem to be a main target for SO given the presence of hemoglobin (Hb) in them, which makes them an ideal model for study. Our study focuses on the cytotoxic effect of chlorpyrifos (CPF) on human erythrocytes and on the protective effect of vitamins E and C against the oxidative stress caused by CPF. A range of CPF concentrations were tested on erythrocytes and cellular turbidity as well as intra and extracellular Hb levels were determined. The molecular mechanism involved was determined by evaluating the OS parameters, namely the rate of methemoglobin (MetHb) and malonydialdehydes (MDA) level. The results demonstrated that CPF induces a very significant decrease in cell concentration (0.463 ± 0.05) at a concentration of $35 \mu\text{g/mL}$ compared to the negative control (0.7 ± 0.015). Vitamins C and E exert a cytoprotective effect against CPF with a cellular concentration which is (0.747 ± 0.06). The rate of released Hb and MetHb, after treatment with CPF, increased very significantly which are respectively (0.902 ± 0.01) and (0.097 ± 0.02) in comparison to the negative control (0.014 ± 0.004). The results of released Hb and MetHb confirm the protective effect of these antioxidants which significantly reduced the level of these two parameters to (0.095 ± 0.01) and (0.013 ± 0.006); respectively in comparison with CPF (0.4 ± 0.02). The results indicate that the pesticide increases the rate of MDA (0.566 ± 0.04) and that the pretreatment with vitamins protects against lipid peroxidation with a rate of MDA which is (0.270 ± 0.009). Based on these promising results, it would be interesting to expand this study to further demonstrate the molecular mechanisms involved in the cytotoxicity of pesticides and the protective effect exerted by vitamins.

Key words: Chlorpyrifos, Erythrocytes, oxidative stress, Hemoglobin, Methemoglobin, Vitamin.

ملخص

الإجهاد التأكسدي (OS) هو أحد آليات السمية المتضمنة في مبيدات الآفات التي تجذب الكثير من اهتمام الباحثين. يبدو أن كريات الدم الحمراء هدف رئيسي لـ SO نظرًا لوجود الهيموجلوبين فيها ، مما يجعلها نموذجًا مثاليًا للدراسة. تركز دراستنا على التأثير السام للخلايا للكلوربيريفوس (CPF) على كريات الدم الحمراء البشرية وعلى التأثير الوقائي للفيتامينات E و C ضد الإجهاد التأكسدي الناتج عن CPF. تم اختبار مجموعة من تركيزات CPF على كريات الدم الحمراء والعاكسة الخلوية وكذلك تم تحديد مستويات الهيموجلوبين داخل وخارج الخلية (Hb). تم تحديد الآلية الجزيئية المعنية

من خلال تقييم معلمات SO ، وهي معدل الميثيموغلوبين (MetHb) ومعدل (malonydialdehydes (MDA). أظهرت النتائج أن CFP يؤدي إلى انخفاض كبير جدًا في تركيز الخلية (0.05 ± 0.463) بتركيز 35 ميكروغرام / مل مقارنة بالتحكم السلبي (0.015 ± 0.7). تمارس الفيتامينات C و E تأثيرًا واقياً للخلايا ضد CPF بتركيز خلوي يبلغ (0.06 ± 0.747) معدل Hb و MetHb المنطلق ، بعد العلاج باستخدام CPF ، زاد بشكل كبير جدًا وهو على التوالي (0.01 ± 0.902) و (0.02 ± 0.097) مقارنة بالسيطرة السالبة (0.004 ± 0.014). تؤكد نتائج Hb و MetHb المنبثقة التأثير الوقائي لمضادات الأكسدة هذه مما أدى إلى انخفاض كبير في مستوى هاتين المعلمتين إلى (0.01 ± 0.095) و (0.006 ± 0.013) ؛ على التوالي مقارنة مع (0.4 ± 0.02) CPF). أشارت النتائج إلى أن المبيد يزيد من معدل (MDA (0.566 ± 0.04) وأن المعالجة بالفيتامينات تحمي من بيروكسيد الدهون بمعدل MDA وهو (0 ± 0.2703 ؛ 009) . بناءً على هذه النتائج الواحدة ، سيكون من المثير للاهتمام توسيع هذه الدراسة لتوضيح الآليات الجزيئية المشاركة في السمية الخلوية لمبيدات الآفات والتأثير الوقائي الذي تمارسه الفيتامينات.

الكلمات الرئيسية: الكوربيريفوس، كريات الدم الحمراء، الإجهاد التأكسدي، الهيموجلوبين، ميثيموجلوبين، فيتامين.