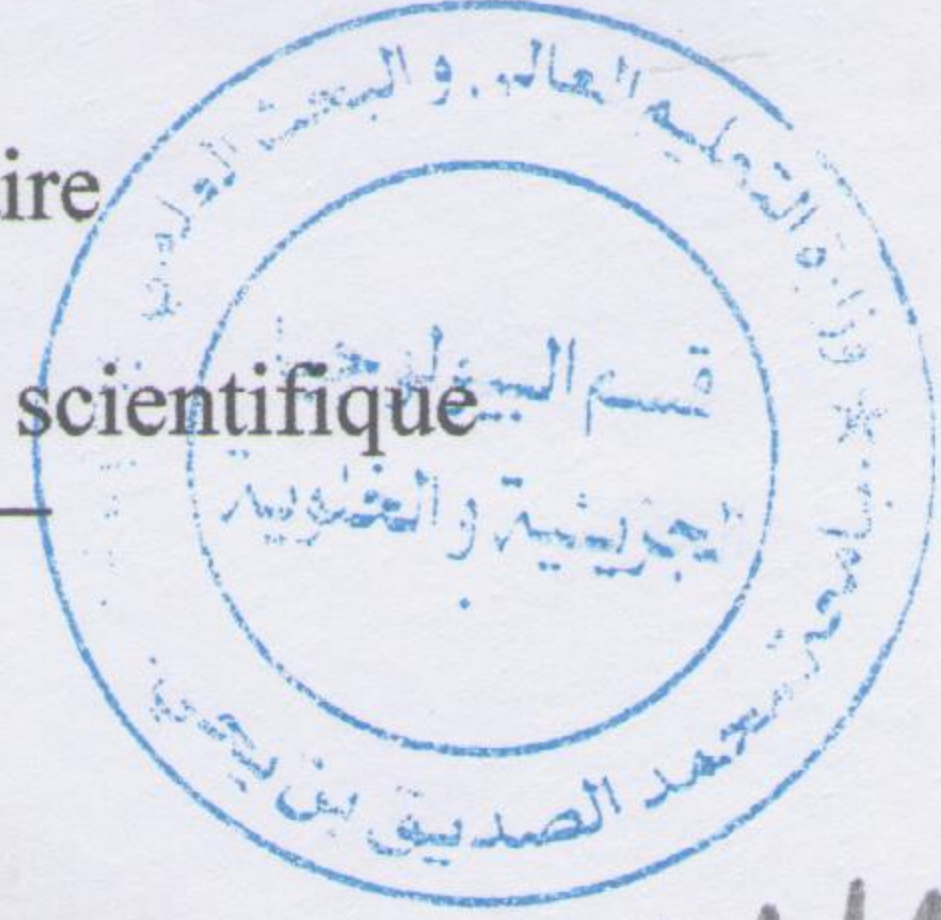


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne démocratique et populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



Université de Jijel
Faculté des Sciences de la Vie et de la Nature

B. B. n. 01/15
جامعة جيجل
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département de Biologie Moléculaire et
Cellelaire

قسم البيولوجيا الجزيئة والخلوية

01
01

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du Diplôme de **Master Académique en Biologie**

Option : Biochimie et Biologie Moléculaire

Thème

**Etude de l'hépatotoxicité induite par
chlorpyrifos: Evaluation biochimique de
l'état du stress oxydatif et de l'intégrité du
foie.**



Membres de jury :

Présidente: Mme BAHA Sarra

Examinatrice: Mme BENSEGHIER Salima

Encadreur : Dr RECHRECHE Hocine

Présenté par :

BOUBIDI Assia

ZITARI Sonia

Année universitaire 2014/2015

Sommaire

Sommaire	i
Liste des abréviations	iii
Introduction	1
I : Revue bibliographique	
I.1 : Organophosphorés	2
I.1.1. Généralités	2
I.1.2 Métabolisme des OPs	4
I.1.3 Mécanisme de toxicité des OPs	5
I.1.3.1. Neurotoxicité	5
I.1.3.2. Cibles moléculaires non neuronales des OPs	7
I.1.3.3. Immunotoxicité	8
I.1.3.4. Génotoxicité et carcinogenicité	8
I.2. Chlorpyrifos	9
I.2.1. Métabolisme du CPF	10
I.2.2. Toxicité du CPF	11
I.2.2.1. Induction du stress oxydatif	12
I.2.2.2. Hépatotoxicité	13
II. Matériel et méthodes	
II.1. Entretien des animaux	14
II. 2. Préparation du modèle expérimental	14
II.3. Dosage du MDA hépatique	14
II.4. Dosage du GSH dans le foie	15
II.5. Mesure de l'activité de CAT hépatique	15
II.6. Mesure de l'activité de GST hépatique	16
II.7. Mesure de l'activité de PAL sérique	16
II.8. Mesure de l'activité de TGO sérique	17
II.9. Mesure de l'activité de TGP sérique	17
II.10. Evaluation statistique	17

III: Résultats et Discussion

III.1. Détermination du seuil toxique et non létal de la dose du CPF	18
III.2. Mise en évidence de la cinétique des paramètres du stress oxydatif hépatique induit par CPF	19
III.2.1. Variation du MDA hépatique.....	19
III.2.2. Variation du taux du GSH hépatique.....	20
III.2.3. Mesure de l'activité de CAT hépatique.....	21
III.2.4. Mesure de l'activité de GST hépatique.....	22
III.3. Mise en évidence biochimique de l'effet du CPF sur l'activité physiologique du foie..	24
Conclusion et perspectives.....	27
Références bibliographiques	28
Annexes	36

Liste des abréviations

- ALT : Alanine aminotransférase
AST : Aspartate aminotransférase
BSA : Bovin serum albumin
CAT : Catalase
CDNB : Chlorodinitrobenzène
CPF : Chlorpyrifos
CYP : Cytochrome p
DTNB : Acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque
EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid
GR : Glutathion réductase
GSH : Glutathion réduit.
GST : Glutathion-S-transférase
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.
HO° : Radical hydroxylé
HO₂° : Perhydroxyle.
LDH : Lactate déshydrogénase
LDL: Low density lipoprotein
MAPK : Mitogen-activated protein kinase
MDA: Malonyldialdéhyde
MDH : Malate déshydrogénase
NaCN : Cyanide de sodium
NAD⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé
NADPH,H⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit.
NBT: Nitroblue tetrazolium
O₂^{°-} : Anion superoxyde
OP : Organophosphorés
PAI : Phosphatase alcaline
PKC : Protéine kinase Ca²⁺ dépendante
ROS : Reactive oxygen species
TBA : Thiobarbituric acid
TCA : Trichloroacetic acid
TGO : Transaminase glutamique oxaloacétique
TGP : Transaminase glutamique pyruvique

I.1. Organophosphorés

I.1.1. Généralités

Les insecticides organophosphorés (OP) sont des produits chimiques synthétiques qui composent une classe importante de pesticides utilisés dans les applications agricoles, industriels et domestiques dans le monde entier (Kiely et al., 2004). Ils ont la même structure de base, il s'agit d'ester d'alcools avec l'acide orthophosphorique ou avec l'acide thiophosphorique. On peut schématiser leur structure chimique comme ci-dessous.

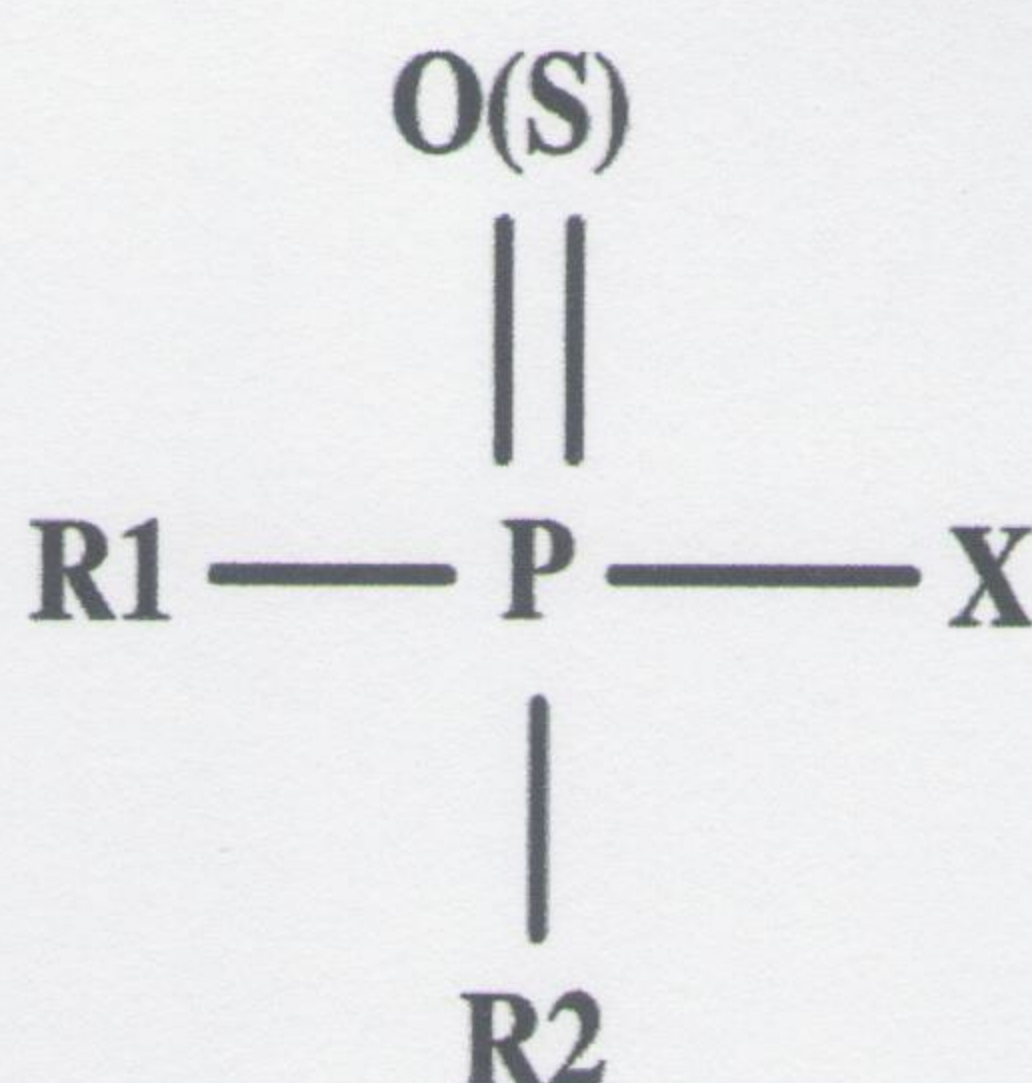


Figure 1. Structure commune aux esters organophosphorés

Les OP ont une structure chimique et un mode d'action commun. Leur formule générale a été définie par Schrader (Fig. 1) (Biljana et Milos, 2007). Le substituant X est celui qui sera soumis à l'hydrolyse; selon sa valeur, quatre classes principales d'importance variable peuvent être définies : la classe I où X contient un ammonium quaternaire, les OP de cette classe possèdent un puissant pouvoir toxique et ne sont pas utilisés en agriculture ; la classe II : X = F ; les OP de la classe II sont aussi toxiques que ceux de la classe I, ils possèdent, en outre, une forte tension de vapeur. Ces deux propriétés expliquent leur utilisation prédominante comme gaz de combat (tabun) ; la classe III : X = CN, OCN, SCN où un halogène autre que F ; les OP de la classe III ont une toxicité intermédiaire entre les classes II et IV. Certains, comme le sarin, ont été également utilisés comme gaz de combat et enfin la classe IV : X = autre substituant ; les OP de la classe IV regroupent la plupart des produits en agriculture.

Dans la plupart des cas, le substituant X est fixé par une liaison P-O ou P-S, plus rarement P-N ou P-C. Les produits de cette classe possèdent des composés R-diéthyl(2 C₂H₅), diméthyl (2 CH₃) ou isopropyl (S-C₃H₇)

L'exposition de l'homme aux pesticides implique trois types de voies : orale (alimentation), respiratoire (air) et cutanée. Les chiffres de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) indiquent que la contamination des aliments par les pesticides est la voie d'exposition la plus importante. Les

évaluations de risque attribuent, l'exposition à l'alimentation le plus grand pourcentage, puis à l'eau et à une part moindre à l'air (Gérin et al., 2003).

Le principal effet de l'intoxication aiguë par ces insecticides implique l'inhibition irréversible de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) dans le sang et le système nerveux, entraînant l'accumulation de l'acétylcholine (ACh) et l'activation des récepteurs muscariniques et nicotiques, ce qui peut conduire à la mort (Savolainen et al., 2001 ; Sharma et al., 2005 ; Aygun et al., 2007) (Figure 02).

La rapidité d'accumulation de l'ACh dépend de la dose de l'insecticide où la toxicité aiguë se manifeste par une crise cholinergique avec des sécrétions glandulaires excessives, une faiblesse, un myosis et une fasciculation musculaire (Rahimi et al., 2006). Bien que, la cible principale des OP est le système nerveux central et périphérique, de nombreux auteurs suggèrent que ces composés, à la fois dans l'intoxication aiguë et chronique, perturbent le processus d'oxydo-réduction, en modifiant l'activité des enzymes responsables et provoquant la mise en valeur de la peroxydation des lipides dans de nombreux organes (Poovala et al., 1999; Zhang et al., 2004; Sharma et al., 2005; Fortunato et al., 2006; Buyukokuroglu et al., 2008; Soltatinejad et al., 2009). D'autres systèmes et organes peuvent être affectés par ces composés, notamment le foie, les reins, les poumons, les muscles, le système immunitaire, le système hématologique (Abdollahi et al., 2004; Teimouri et al., 2006; Possamai et al., 2007). Comme il a été démontré par des études épidémiologiques, il ya une relation de certaines maladies humaines avec l'exposition aux pesticides et avec des changements dans les activités enzymatiques anti-oxydantes (Chan et al., 1998; Checkoway et al., 1998; Petrovitch et al., 2002; Abdollahi et al., 2004).

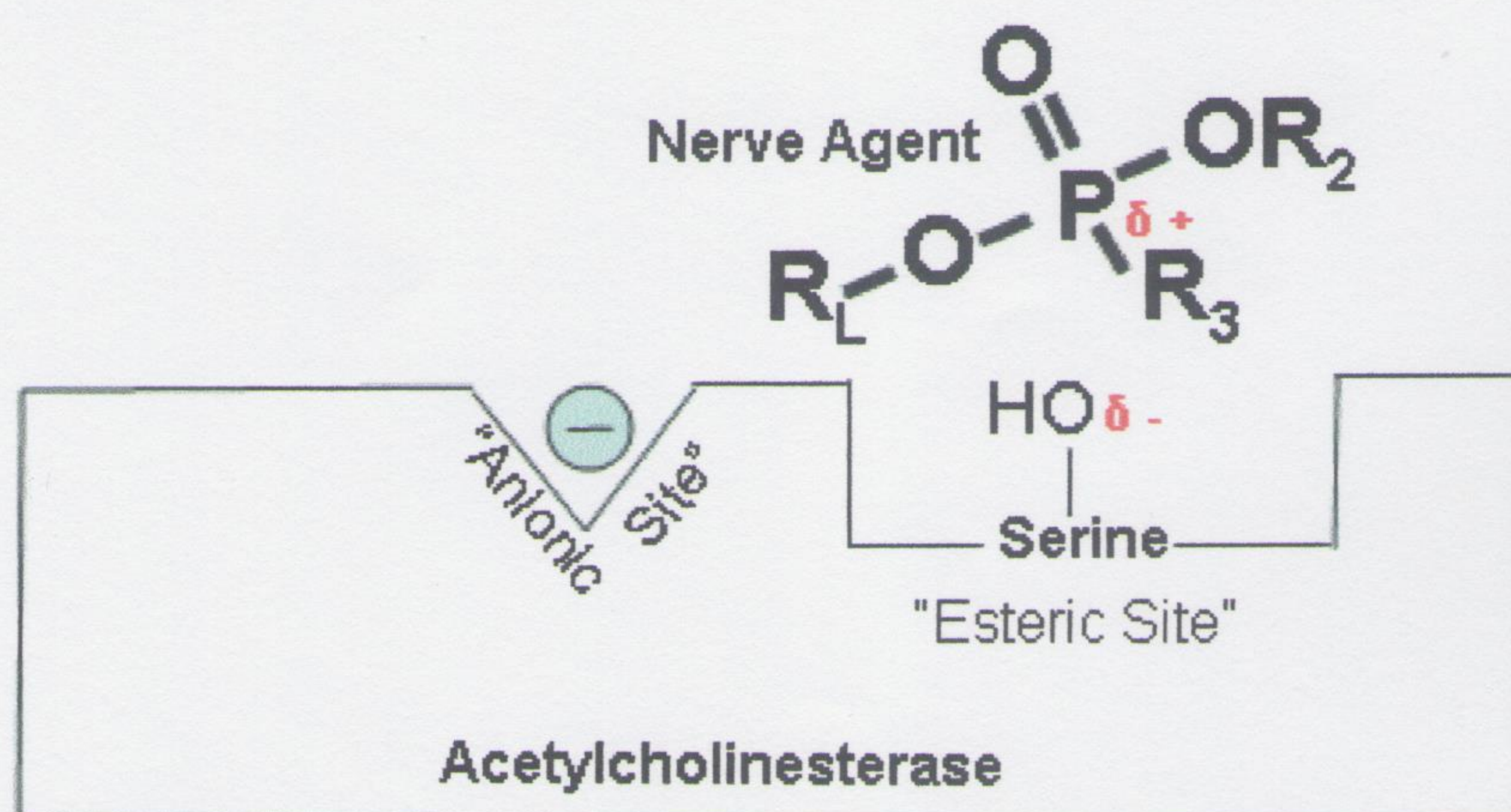


Figure 2. Mode d'inhibition de l'acétylcholinestérase par les pesticides organophosphorés.

I.1.2. Métabolisme des organophosphorés

Le métabolisme des xénobiotiques a lieu principalement dans le foie et dans une moindre mesure, également dans les poumons et l'intestin. Il comprend deux phases (I et II) : les enzymes métaboliques dans la phase I activent le produit chimique avec l'introduction de groupes fonctionnels, sur lesquels les réactions de phase II peuvent avoir lieu. Les enzymes de phase II attachent divers groupes hydrophiles, par exemple, l'acide glucuronique, le sulfate, la glycine, l'acide glutamique, ce qui permet l'excrétion du métabolite à partir de l'organisme (Josephy et Mannervik, 2006). D'une manière similaire à celle de la majorité des xénobiotiques, les OP sont métabolisés par les enzymes de phase I et II, après leur absorption par l'organisme.

La phase I du métabolisme des OP implique une oxydation et l'hydrolyse. L'oxydation est la réaction la plus importante dans l'activation d'OP sous forme thion pour former des inhibiteurs actifs d'Ache esterase. A l'aide d'enzymes CYP, l'atome de soufre dans la forme Thion lie un atome d'oxygène, conduisant à un intermédiaire instable qui se désintègre à l'OP oxon métabolite et un atome de soufre actif (de désulfuration oxydante). Les métabolites des OP sont de puissants inhibiteurs d'AChE, cet est donc la réaction clé pour la majorité des effets neurotoxiques causés par OP. L'influence de l'atome de soufre actif, en tant que produit secondaire de la réaction, est encore inconnue. Il peut interagir avec des protéines voisines et, par exemple, inactiver les enzymes CYP pour ne pas se lier à leurs sites actifs.

De nombreuses études sur le métabolisme des OP ont montré que les enzymes les plus importantes sont les cytochromes CYP1A1, CYP3A4, CYP2B6 et CYP2C19. Les trois premiers ont la plus forte affinité pour la désulfuration et l'activation d'oxon, mais pour le clivage oxydatif du groupe et de désintoxication CYP2C19 est le plus efficace (Mutch et Williams, 2006). Le haut degré de polymorphisme dans les différents CYP humains signifie que la sensibilité des individus aux effets toxiques d'un OP dépend du niveau de l'expression spécifique des isoformes du CYP (Buratti et al., 2007).

L'hydrolyse des OP a lieu après l'oxydation, à l'aide de l'enzyme estérase A, également appelé para-oxonase. Cette réaction est importante pour les processus de désintoxication des OP. La désintoxication OP se produit lorsque la para-oxonase clive les OP à dialkyl-phosphate et le groupe partant OP sont également hydrolysés par le carboxyle esterase, qui diffère de la para-oxonase à auto-inactivation par hydrolyse.

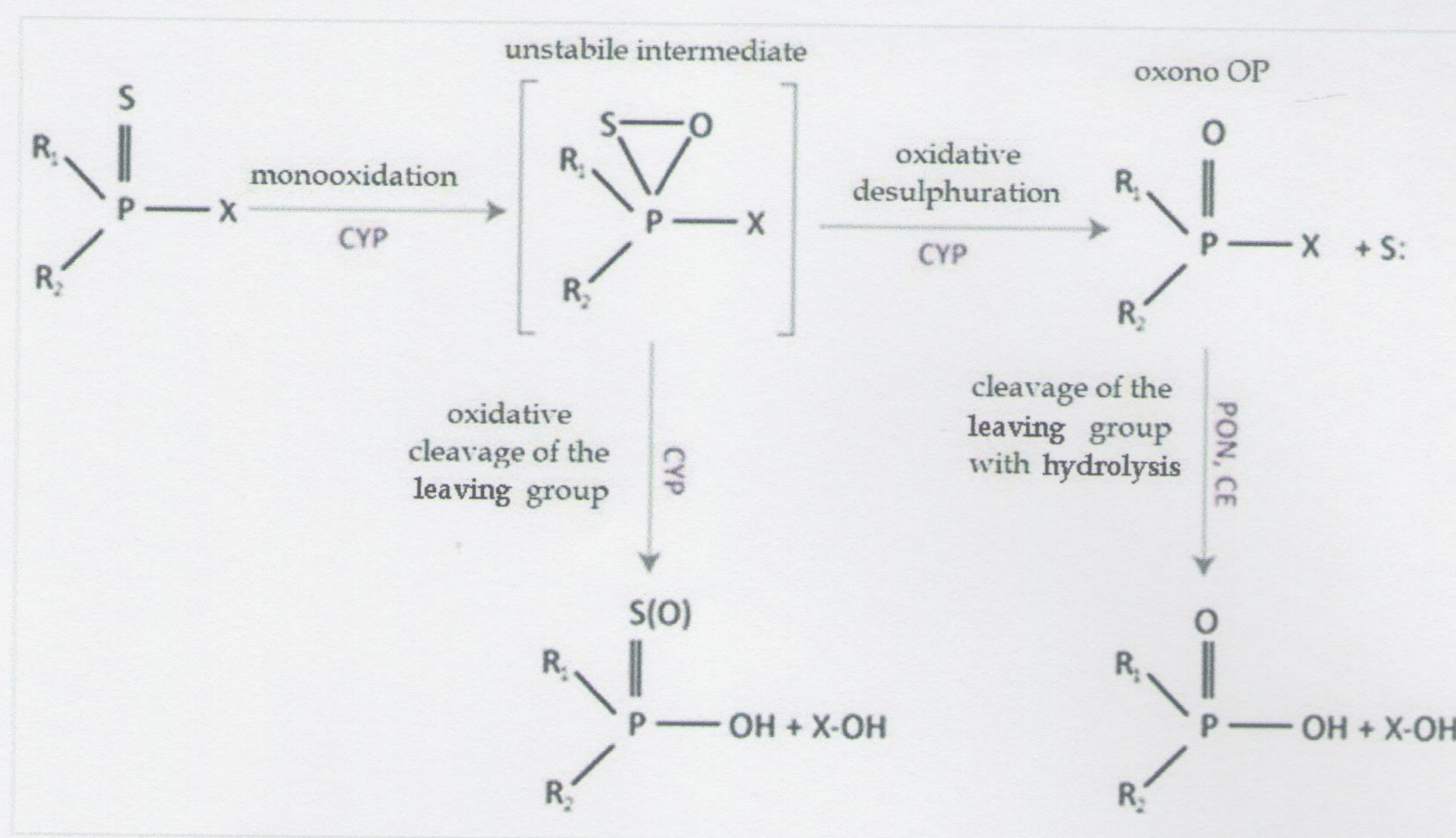


Figure 3. Réactions principales de la phase I et II de métabolisme des OP

Tandis que le clivage oxydatif du groupe partant les purifier des OP, l'équilibre entre ces deux réactions est très important pour le résultat définitif de la toxicité des OP. Le résultat de l'oxydation est souvent un composé plus hydrophile, qui peut être plus facilement conjugué dans le métabolisme de phase II, permettant ainsi à l'excrétion rapide de l'organisme (Gupta, 2006).

Les métabolites des OP résultants du métabolisme de la phase I sont conjugués avec des groupes hydrophiles catalysés par les enzymes de la phase II, et excrétés dans l'urine. Les réactions de désintoxication ont lieu exclusivement dans le métabolisme de phase II.

I.1.3. Mécanismes de toxicité des OP

Après absorption, de nombreux OP sont activés par des oxydases, des hydrolases et des transférases au niveau hépatique avant d'être toxiques pour l'homme (Hayes, 1982). La connaissance de ces mécanismes permettant de déterminer le délai d'apparition des manifestations toxiques.

I.1.3.1. Neurotoxicité des OP

L'acétylcholinestérase (AChE) se trouve dans les membranes synaptiques, où il se dégrade, à travers son activité d'hydrolyse, l'acétylcholine, un neurotransmetteur. La production de la choline et de l'acétate, une réaction importante pour la régulation de l'activité synaptique dans le système nerveux central et périphérique. Cette dernière constitue le système nerveux somatique et autonome (végétatif). Le CPF est un inhibiteur du cholinestérase responsable du blocage de la fonction de l'AChE, ce qui provoque l'accumulation excessive d'acétylcholine dans la fente synaptique. Cela

provoque des effets neurotoxiques tels que la paralysie neuromusculaire (par exemple la contraction musculaire) en continu à travers l'ensemble du corps (Gupta, 2006). Le CPF inhibe l'AChE en formant une liaison covalente avec le site actif de l'acétylcholinestérase préférentiellement au niveau de la serine (Figure 3). Il hydrolyse spontanément et très lentement l'OP à partir du site actif, parfois de manière irréversible, entraînant ainsi des effets toxiques à long terme.

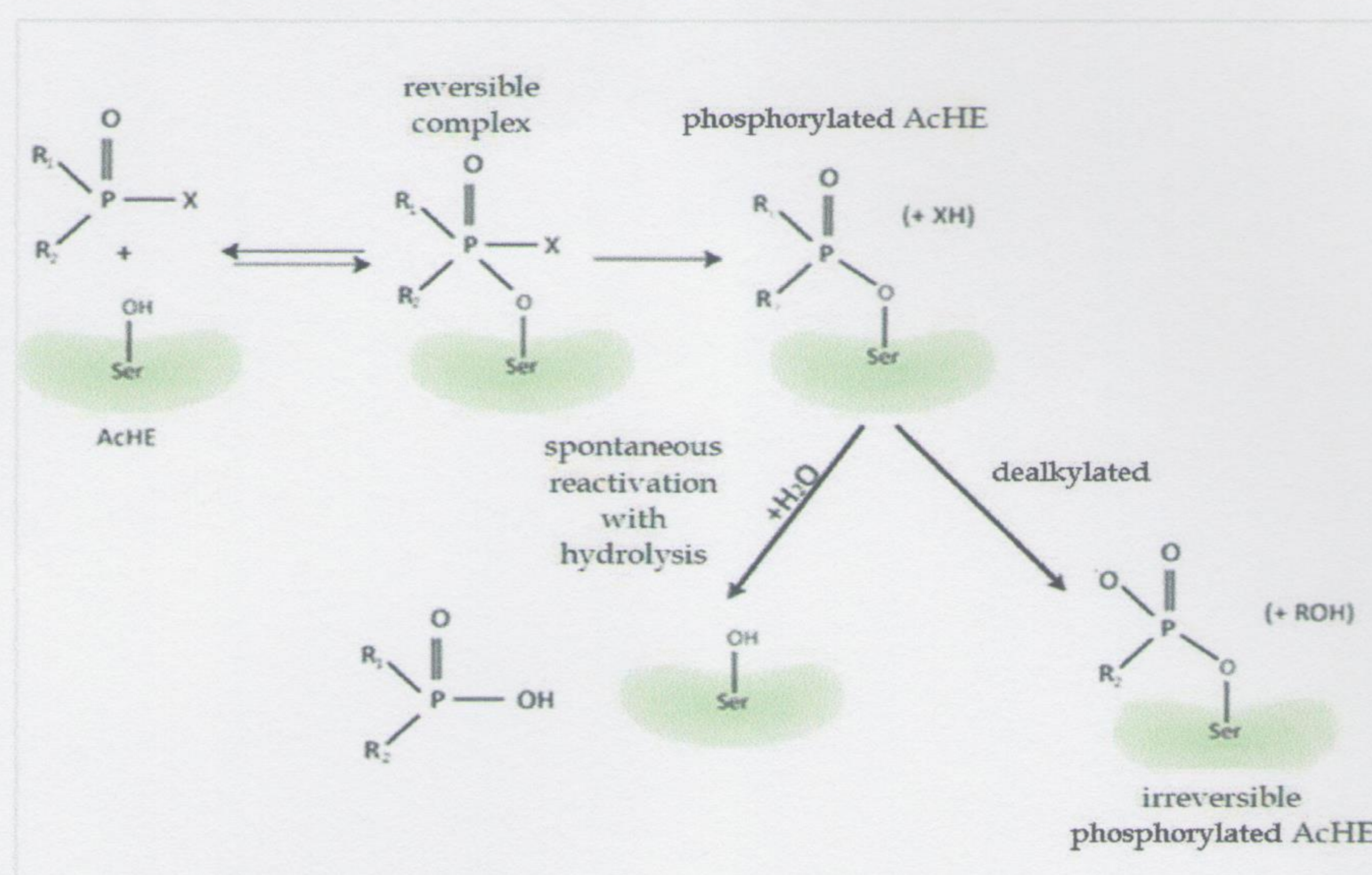


Figure 4. La liaison d'OP avec l'AChE (Hreljac, 2009)

Les neurotransmetteurs du système nerveux autonome agissent sur les organes cibles en se liant à des récepteurs spécifiques. Les récepteurs cholinergiques (nicotine, muscarine) sont affectés par différents types de neurotransmetteur. L'excès de l'acétylcholine dans la synapse périphérique du nerf cause l'activation des récepteurs muscariniques et nicotiques ainsi que l'activation des régions sympathiques et parasympathiques. Du fait que les synapses dans le système nerveux central (SNC) sont inaccessibles pour des buts expérimentaux en comparaison avec les jonctions neuromusculaire du système nerveux périphérique (SNP), le mécanisme d'intoxication par les OP dans le SNC a été moins étudié. La cause des symptômes provoqués par les OP est l'inhibition de la neuropathy target esterase (NTE), située dans le système neuronal, plutôt que l'inhibition d'AChE. La NTE appartient au même groupe d'estérase de sérine qu'à l'AChE, toutefois son rôle primaire dans l'organisme n'est pas bien connu (Kamanyire et Karalliedde, 2004). Autres symptômes neurotoxiques qui ne peuvent pas être attribués à l'inhibition d'AChE, mais à différentes cibles secondaires à l'intérieur du système neural ont été proposés.

I.1.3.2. Cibles moléculaires non neuronales des OP

Bien que la neurotoxicité des OP soit bien décrite, on sait peu sur leurs mécanismes d'activité et les conséquences de l'exposition aux OP sur les tissus et les organes non-neuronaux chez les humains. Des études récentes ont révélé plusieurs cibles secondaires pour les OP qui perturbent éventuellement une variété de processus biologiques. Parmi les enzymes qui sont inhibées par les OP sont les carboxylases, qui participent au métabolisme des xénobiotiques. Leur inhibition par OP peut bloquer la transformation métabolique de diverses substances (Hodgson et Rose, 2005). OP peut également influencer le métabolisme xénobiotique via l'atome de soufre actif qui résulte de désulfuration dans la phase I du métabolisme et inhibe fortement l'enzyme CYP (Hodgson et Rose, 2006). Les OP inhibent également les lipases, qui jouent un rôle important dans la signalisation cellulaire. Il a été montré que le chlorpyrifos-oxon, inhibait la Diacylglycerol lipase (DAG-lipase) indirectement et ainsi activait les extracellular signal-regulated kinases (ERK) qui sont des membres du groupe de mitogène-activated protein kinases (MAPK) qui régulent la prolifération et la différenciation cellulaire (Bomser et al., 2002 ; Quistad et al., 2006). Les OP peuvent également affecter les voies de signalisation par l'activation de la protéine kinase (PKC). Toutefois, cette activation est probablement indirecte (Bagchi et al., 1997).

Les OP induisent également la formation de ROS et le stress oxydatif et ils se sont avérés être associés à l'apoptose dans différents tissus (orale et al., 2006; Yu et al., 2008). Lors du métabolisme des OP par cytochrome P450, les ROS sont générés. Le changement de l'homéostasie du système antioxydant par les OP résulte une carence en paramètres antioxydants, si l'exigence de ces derniers n'est pas maintenue (Banerjee et al., 1999 ; Vidyasagar et al., 2004 ; Possamai et al., 2007). L'autre moyen de production d'ROS dans la toxicité des OP est la consommation d'énergie élevée associée à l'inhibition de la phosphorylation oxydative, qui a été décrit par Milatovic et al. (2007) et une libération accrue de glucose par induction de la glycogénolyse dans le foie et la libération subséquente de l'ATP pour répondre aux besoins en énergie de l'organisme (Rahimi et al., 2007). La consommation d'énergie élevée entraîne une diminution de la capacité des cellules à l'entretien de ses niveaux d'énergie. Pour cette raison, les quantités excessives des ROS peuvent être générées dans différents organes (Milatovic et al., 2007). Ainsi la perturbation dans le système d'oxydo-réduction de la cellule est un autre mécanisme impliqué dans la génération d'espèces réactives de l'oxygène lors de l'exposition aux OP. De plus, Kojima et al. (2004) ont montré que les OP pouvaient inhiber le stéroïde androgène (AR) du récepteur, ce qui peut provoquer des perturbations des hormones stéroïdiennes dans l'organisme.

I.1.3.2. Cibles moléculaires non neuronales des OP

Bien que la neurotoxicité des OP soit bien décrite, on sait peu sur leurs mécanismes d'activité et les conséquences de l'exposition aux OP sur les tissus et les organes non-neuronaux chez les humains. Des études récentes ont révélé plusieurs cibles secondaires pour les OP qui perturbent éventuellement une variété de processus biologiques. Parmi les enzymes qui sont inhibées par les OP sont les carboxylases, qui participent au métabolisme des xénobiotiques. Leur inhibition par OP peut bloquer la transformation métabolique de diverses substances (Hodgson et Rose, 2005). OP peut également influencer le métabolisme xénobiotique via l'atome de soufre actif qui résulte de désulfuration dans la phase I du métabolisme et inhibe fortement l'enzyme CYP (Hodgson et Rose, 2006). Les OP inhibent également les lipases, qui jouent un rôle important dans la signalisation cellulaire. Il a été montré que le chlorpyrifos-oxon, inhibait la Diacylglycerol lipase (DAG-lipase) indirectement et ainsi activait les extracellular signal-regulated kinases (ERK) qui sont des membres du groupe de mitogène-activated protein kinases (MAPK) qui régulent la prolifération et la différenciation cellulaire (Bomser et al., 2002 ; Quistad et al., 2006). Les OP peuvent également affecter les voies de signalisation par l'activation de la protéine kinase (PKC). Toutefois, cette activation est probablement indirecte (Bagchi et al., 1997).

Les OP induisent également la formation de ROS et le stress oxydatif et ils se sont avérés être associés à l'apoptose dans différents tissus (orale et al., 2006; Yu et al., 2008). Lors du métabolisme des OP par cytochrome P450, les ROS sont générés. Le changement de l'homéostasie du système antioxydant par les OP résulte une carence en paramètres antioxydants, si l'exigence de ces derniers n'est pas maintenue (Banerjee et al., 1999 ; Vidyasagar et al., 2004 ; Possamai et al., 2007). L'autre moyen de production d'ROS dans la toxicité des OP est la consommation d'énergie élevée associée à l'inhibition de la phosphorylation oxydative, qui a été décrit par Milatovic et al. (2007) et une libération accrue de glucose par induction de la glycogénolyse dans le foie et la libération subséquente de l'ATP pour répondre aux besoins en énergie de l'organisme (Rahimi et al., 2007). La consommation d'énergie élevée entraîne une diminution de la capacité des cellules à l'entretien de ses niveaux d'énergie. Pour cette raison, les quantités excessives des ROS peuvent être générées dans différents organes (Milatovic et al., 2007). Ainsi la perturbation dans le système d'oxydo-réduction de la cellule est un autre mécanisme impliqué dans la génération d'espèces réactives de l'oxygène lors de l'exposition aux OP. De plus, Kojima et al. (2004) ont montré que les OP pouvaient inhiber le stéroïde androgène (AR) du récepteur, ce qui peut provoquer des perturbations des hormones stéroïdiennes dans l'organisme.

D'autres cibles des OP ont été révélées, par *in vitro* et *in vivo*, dont cinq étaient particulièrement sensibles (Casida et Quistad, 2004): le chlorpyrifos et le chlorpyrifos-oxon (au-dessous de 1 nM) sont signalés pour activer les protéines de liaison à l'élément de réponse Ca²⁺ / cAMP dans les neurones de rat en culture, en tant que possible (Schuh et al., 2003); le para-oxon (1-10 nM) provoque la mort cellulaire par apoptose dans une lignée cellulaire de leucémie par une perturbation des mitochondries, ce qui conduit à l'activation de la caspase-9 (Saleh et al., 2003); le fluorophosphate arachidonique d'éthyle (<1 uM) et diisopropylfluorophosphate (100 uM) inhiber le facteur d'activation plaquettaire acétylhydrolase (Kell et al., 2003); le fénitrothion (à 22 nM) agit comme un antagoniste de récepteur d'androgène *in vitro* (Tamura et al., 2003) et inhibe le développement des tissus dépendant des androgènes *in vivo* (Tamura et al., 2001).

I.1.3.3. Immunotoxicité des OP

Les effets toxiques des OP sur le système immunitaire peuvent être directs ou indirects et sont reflétés par différentes pathologies d'organes immunitaires qui réduisent l'immunité humorale et/ou cellulaire. Les effets immunotoxiques directs des OP peuvent être dus à : l'inhibition de sérine hydrolases (système du complément) ou des estérases (membranes de lymphocytes et monocytes) dans le système immunitaire; les dommages oxydatifs des organes du système immunitaire; les changements dans les voies de transduction du signal qui contrôlent la prolifération et la différenciation des cellules immunitaires. L'immuno-toxicité indirecte des OP est exprimée comme des changements dans le système nerveux ou des effets chroniques du métabolisme modifié sur le système immunitaire. La sélection des biomarqueurs appropriés et des méthodes biologiques est très difficile car la diversité physiologique des systèmes immunitaires des organismes est très élevée (Galloway et Handy, 2003).

I.1.3.4. Génotoxicité et carcinogénicité des OP

Un certain nombre de pesticides ont été associés à divers cancers, suite à des enquêtes épidémiologiques sur des agriculteurs et des travailleurs de la fabrication de pesticides (Alavanja et Bonner, 2005; Alavanja et al., 2007; Bassil et al., 2007; Koutros et al., 2010). Le risque élevé de cancer suite à une exposition aux pesticides indique une lacune dans la connaissance actuelle de la cancérogénicité des pesticides, et fournit la preuve que les pesticides peuvent causer le cancer grâce à des mécanismes alternatifs, tels que les changements épigénétiques (Skinner et Anway 2007; Alavanja 2009).

Le développement du cancer est un processus multi-étapes qui comprend l'initiation, la promotion et la progression. De nombreux agents cancérigènes sont génotoxiques capables d'initier

le développement du cancer en causant des dommages à l'ADN et des mutations, alors que les cancérigènes non génotoxiques induisent principalement la transformation de cellules néoplasiques et favorisent la prolifération cellulaire par des mécanismes différents qui consistent à éviter l'apoptose, stimuler des facteurs de croissance et à supprimer les signaux anti-croissance.

Des études expérimentales *in vitro* et *in vivo* ont montré que plusieurs OP exerçaient des activités génotoxiques (Bolognesi, 2003). De plus, d'autres rapports ont démontré que les OP pouvaient induire une transformation néoplasique des cellules (Cabello et al., 2001). Il a été rapporté que les OP étaient capables de : - provoquer des aberrations chromosomiques et des échanges de chromatides sœurs (Galloway et al., 1987);- provoquer des anomalies du sperme chez les souris exposées aux OP (Mathew et al., 1992). Hreljac et al. (2008) ont étudié les mécanismes de la génotoxicité et de la cancérigénicité potentielle des modèles des OP sélectionnés (parathion, para-oxon et dimefox) dans le modèle expérimental *in vitro* avec des cellules d'hépatomes humains (HepG2). Ils ont démontré que les OP agissaient sur plusieurs cibles, de faibles concentrations de parathion et para-oxon étaient génotoxiques, tandis que dimefox agit comme un mitogène.

Les méthodes utilisées dans ces études ont impliqué une série de différents tests de génotoxicité (*Salmonella typhimurium* essai de mutation inverse, et la comète et test du micronoyau dans les cellules HepG2) et les méthodes pour mesurer la prolifération cellulaire (test MTT, l'analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux et Ki- immunocoloration 67), comme étant associés à des méthodes moléculaires pour l'analyse de l'expression des gènes (de PCR quantitative en temps réel) et des procédés biochimiques pour les mesures d'activité enzymatique.

I.2. Chlorpyrifos

Le [O, O-diéthyl-O- (3, 5,6-trichloro-2-pyridyl) phosphorothioate] connu sous le nom de chlorpyrifos (CPF), a d'abord été lancé sur le marché en 1965 comme un large spectre classique pour contrôler l'agriculture et les insectes ravageurs (Cox, 1994). C'est un inhibiteur de l'acétylcholinestérase bien connu tout comme les autres OP. Il est bien utilisé aussi pour tuer des moustiques que des cancrelats, des larves de scarabées, des puces, des mouches, des poux... Il est utilisé comme insecticide sur les graines, le coton, les fruits, les noix dans les champs et vergers, mais aussi sur des pelouses et des plantes ornementales. De plus, il est aussi répertorié comme antiparasitaire en usage directe sur le mouton et la dinde, mais aussi en utilisation indirecte, pour le traitement de site de cheval, des niches de chien, des logements domestiques, des bâtiments agricoles, des poubelles de stockage et des établissements commerciaux.

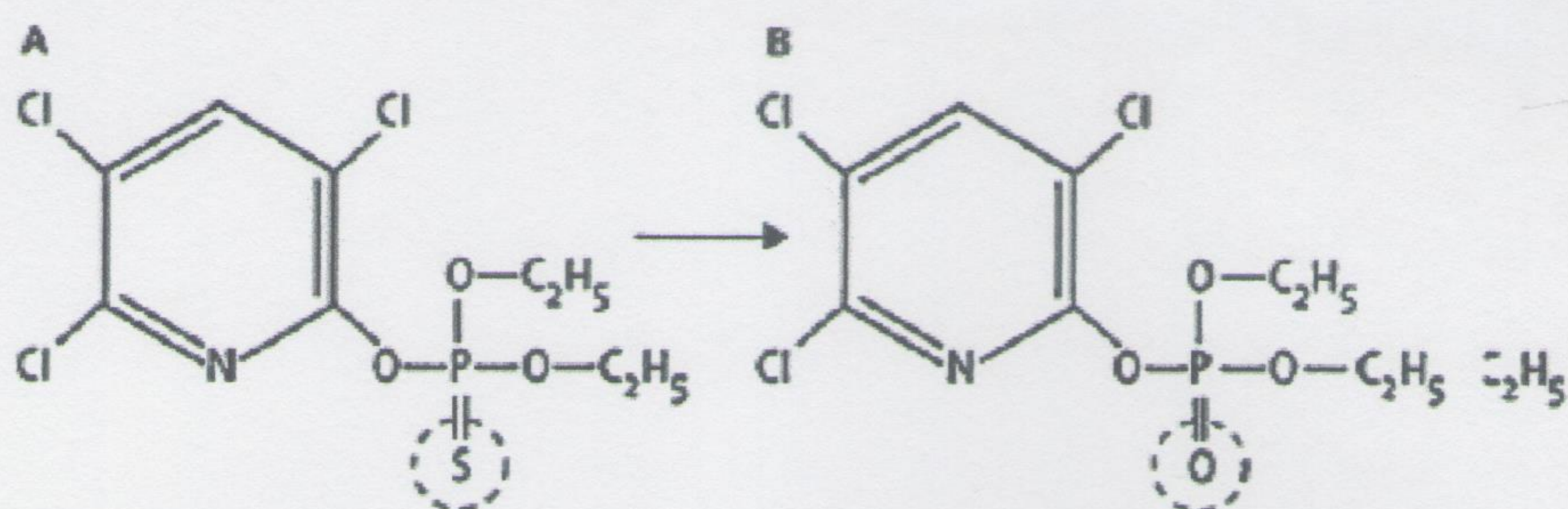


Figure 5. Structure de : A. Chlorpyrifos. B. Chlorpyrifos oxon

I.2.1. Métabolisme du CPF

Le CPF est lui-même un faible inhibiteur de l'acétylcholinestérase et doit être activé en métabolite plus puissant, le chlorpyrifos oxon (CPF-O). Le CPF peut également être détoxifié au métabolite non toxique, 3, 5,6- trichloro-2-pyridinol (TCPy). Le CYP2B6 est le plus rapporté pour la bioactivation du CPF en CPF-O, environ cinq fois plus élevée que CYP1A2, le second CYP actif dans cette réaction (Foxenberg et al., 2007). Pour la détoxification de CPF en TCPy, la CYP2C19 possède la cote intrinsèque la plus élevée, environ six fois plus élevé que la prochaine CYP la plus active (Foxenberg et al., 2007). Toutefois, il convient de noter que toutes les enzymes CYP qui catalysent la biotransformation de CPF sont capables à la fois de catalyser la bioactivation et la détoxification à un certain niveau, mais la CYP2B6 favorise fortement la voie de bioactivation tandis que CYP2C19 favorise la détoxification. Le rôle prédominant de ces enzymes CYP dans le métabolisme du CPF a été constamment démontré à la fois par le métabolisme et des études sur les inhibiteurs (Tang et al., 2001; Buratti et al., 2003; Foxenberg et al., 2007; Croom et al., 2010). Ces deux enzymes ont été également détectés dans les tissus du cerveau humain, l'organe cible de la toxicité par le CPF (Miksys et al., 2003). L'autre CYP principale impliquée dans le métabolisme du CPF est la CYP3A4 qui est très abondante dans le foie, a une faible affinité pour la biotransformation du CPF et considéré comme l'enzyme prédominant de la composante de faible affinité au métabolisme du CPF (Foxenberg et al., 2007; Croom et al., 2010).

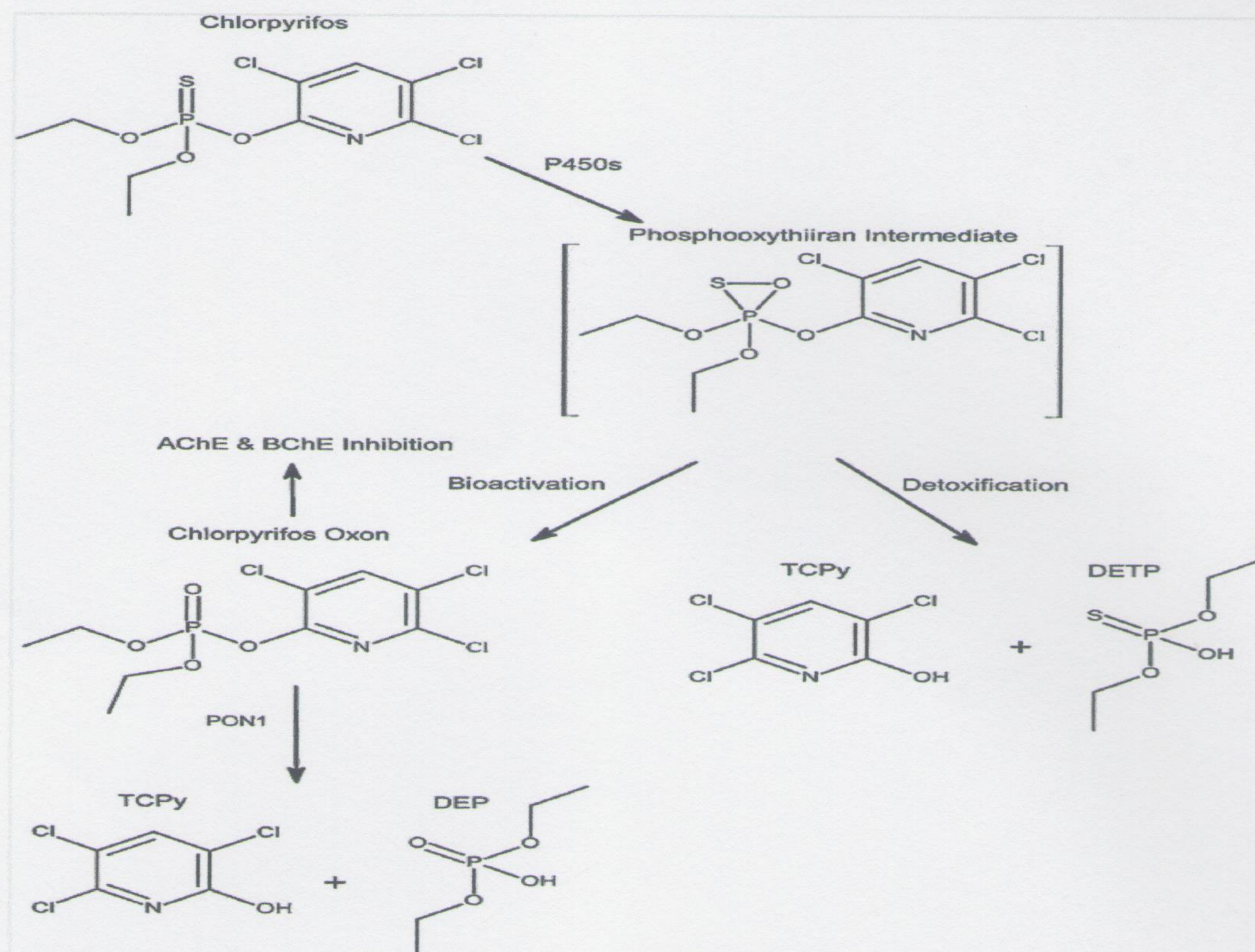


Figure 6. Principales voies du métabolisme du CPF

I.2.2. Toxicité du CPF

L'utilisation générale et l'étendue du CPF dans les pays en développement augmente la probabilité d'une exposition accidentelle aux pesticides dans les segments de la population soit de l'exposition de court terme de haut niveau ou l'exposition de bas niveau à long terme avec des effets toxiques qui en découlent (Cohn et Macphail, 1997; Tang et al., 2001). Dans la plupart de ces pays, les équipements de sécurité sont rarement utilisés, les méthodes de stockage ne sont pas sécurisées, les instructions d'utilisation de pesticides ne sont pas toujours appliquées, les délais d'attente ne sont pas respectés et l'ampleur de résidus de pesticides dans les ressources alimentaires d'origine tant végétale et animale est largement inconnu, par conséquent, le risque d'exposition se trouvait augmenté (Konradsen et al., 2003; Ambali et al., 2009).

Différents types d'exposition au CPF peuvent provoquer une toxicité aiguë. Les symptômes d'intoxication aiguë par les OP se développent pendant ou après l'exposition, quelques minutes à quelques heures, en fonction de la méthode d'application. L'exposition en fonction d'apparition des symptômes : par inhalation rapide puis la voie gastro-intestinal et en fin la voie cutanée. Certains des premiers symptômes les plus fréquemment rapportés sont ordonnés comme suit : maux de tête, des nausées, étourdissements, hyper sécrétion (de prestation de serment et la salivation),

contractions musculaires, faiblesse et tremblements, coordination, paralysie et famine (Petras, 1981; Rickett et al., 1986).

Le CPF est métaboliquement actif correspondant à son analogue, le chlorpyrifos-oxon, qui est principalement responsable de la toxicité chez les mammifères par l'inhibition de l'acétylcholinestérase dans le système nerveux central et périphérique (Sultatos et Murphy, 1983; Chambers et Chambers, 1989; Kousba et al., 2004), l'induction du stress oxydatif (Goel et al., 2005) et dysfonctionnement hépatique (Goel et al., 2006). C'est un agent neurotoxique puissant. Il interfère avec l'acétylcholinestérase (AChE), qui est nécessaire pour la transmission normale des nerfs. L'accumulation résultante de l'acétylcholine dans la fente synaptique induit une hyperactivité des voies cholinergiques, ce qui conduit à la neurotoxicité et la mort éventuelle (Qiao et al., 2002; Meyer et al., 2004).

Avec des expositions répétées intermittentes (soit 40 mg/kg de CPF une fois tous les 4 jours), des rats adultes étaient plus sensibles aux changements neurochimiques, y compris l'inhibition de l'AChE au niveau du cerveau (Chakraborti et al., 1993). En outre, il a été rapporté que le chlorpyrifos peut provoquer des anomalies immunologiques (Trasher et al., 2002), des lésions tissulaires (Jett et Navoa., 2000), la toxicité testiculaire (Kalender et al., 2012), la toxicité reproductive (Farag et al., 2010), l'hématotoxicité (Demir et al., 2011), la toxicité dans le développement (Breslin et al., 1996) et la cardiotoxicité (Bas et Kalender, 2011). En plus de l'évaluation de la sensibilité liée à l'âge et l'inhibition de l'AChE induite par le CPF, il y avait également des préoccupations pour l'inhibition potentielle d'AChE en raison de l'exposition au CPF-O. Après la désulfuration du chlorpyrifos en chlorpyrifos-oxon, celui-ci phosphoryle et inhibe l'acétylcholine estérase (AChE). L'acétylcholine phosphorylée ne peut pas hydrolyser le neurotransmetteur acétylcholine.

1.2.2.1. Induction du stress oxydatif

Bien que l'inhibition du ChE soit le principal mécanisme de la toxicité du CPF, des preuves récentes impliquent d'autres mécanismes (Slotkin et al., 2006). Un de ces mécanismes associé à la fois à une intoxication aiguë et chronique de CPF c'est le stress oxydatif. Plusieurs études ont montré le rôle du stress oxydatif dans l'empoisonnement induit par le CPF (Gultekin et al., 2001 ;Durak et al., 2008 ;Ambali et al., 2010 ;Kammon et al., 2011). Les enzymes antioxydantes, SOD, CAT et GSH-Px ont été montrés pour être touchés de façon importante par les pesticides y compris CPF (Verma et al., 2007; Mansour et Mossa, 2010). Le CPF a été postulé pour avoir de multiples effets sur les cellules cibles, notamment la production des ROS et l'induction de stress oxydatif

intracellulaire (Bebe et Panemangalore, 2003). Le CPF a été rapporté pour induire le stress oxydatif dans le foie par des niveaux accrus de ROS, peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), nitrate (NO_3^-) et de nitrite (NO_2^-) (Mehta et al., 2009). Il s'agit notamment des radicaux peroxydes hydroxyles, et le peroxyde d'hydrogène qui ciblent et inactivent les macromolécules biologiques éventuellement endommagent les membranes et d'autres tissus (Meister, 1998).

Les dommages induits par le stress oxydatif se produit principalement par la production des ROS. Il comprend des modifications de macromolécules cellulaires tels que les lipides, les protéines et l'ADN, (Vandana et al., 2006; Verma et al., 2007; Aly et al., 2010). L'un des principaux mécanismes de lésion est la peroxydation lipidique (l'oxydation de la couche lipidique de la membrane cellulaire) (Schneider et de Oliveira, 2004) qui est la destruction par oxydation des lipides, c'est une réaction en chaîne auto-entre tenue destructrice, libérant MDA comme produit final (Vidyasagar et al., 2009).

Le mécanisme antioxydant est composé d'un système de défense antioxydant enzymatique constitué de piègeurs des radicaux libres comme la superoxydedismutase (SOD) et catalase (CAT) ainsi que la glutathion peroxydase (GPx), la glutathion réductase (GR) et de glutathion-S-transférase (GST) (Aly et al., 2010). La composition non enzymatique est principalement constituée de thiols, glutathion (GSH), la vitamine C et E (Costantini et Verhulst, 2009).

I.2.2.2. Hépatotoxicité

Le CPF provoque le dysfonctionnement hépatique (Goel et al., 2006). Sa biotransformation s'effectue dans le foie et sa désintoxication a lieu dans le foie et le plasma. Cette biotransformation est catalysée par CYP450 et des enzymes qui y sont associées dans les membranes des microsomes du foie (Jokanovic, 2001).

Il est démontré que le CPF provoque l'hépatotoxicité par des changements du profil des enzymes hépatiques comme PAI, AST, LDH et des changements histopathologiques (Gokcimen et al., 2007; Elhalwagy et al., 2008; Mansour et Mossa, 2010), ainsi des altérations des macromolécules (Chen et al., 2013). Ces altérations probablement transforment la fonction des cellules par des changements dans le calcium ou le pH intracellulaire, et finalement conduisent à la mort cellulaire et à des lésions tissulaires (Majhi et al., 2011).

Des rapports antérieurs ont aussi démontré les actions hépatotoxiques du CPF, dans lesquelles, le profil des enzymes du foie, des enzymes antioxydants et des éléments essentiels ont été trouvés affectés (Goel et al., 2000, 2005, 2006; Goel et Dhawan, 2001). La biotransformation hépatique du CPF entraîne une modulation de sa toxicité aiguë chez les mammifères.

intracellulaire (Bebe et Panemangalore, 2003). Le CPF a été rapporté pour induire le stress oxydatif dans le foie par des niveaux accrus de ROS, peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), nitrate (NO_3^-) et de nitrite (NO_2^-) (Mehta et al., 2009). Il s'agit notamment des radicaux peroxydes hydroxyles, et le peroxyde d'hydrogène qui ciblent et inactivent les macromolécules biologiques éventuellement endommagent les membranes et d'autres tissus (Meister, 1998).

Les dommages induits par le stress oxydatif se produit principalement par la production des ROS. Il comprend des modifications de macromolécules cellulaires tels que les lipides, les protéines et l'ADN, (Vandana et al., 2006; Verma et al., 2007; Aly et al., 2010). L'un des principaux mécanismes de lésion est la peroxydation lipidique (l'oxydation de la couche lipidique de la membrane cellulaire) (Schneider et de Oliveira, 2004) qui est la destruction par oxydation des lipides, c'est une réaction en chaîne auto-entre tenue destructrice, libérant MDA comme produit final (Vidyasagar et al., 2009).

Le mécanisme antioxydant est composé d'un système de défense antioxydant enzymatique constitué de piègeurs des radicaux libres comme la superoxydedismutase (SOD) et catalase (CAT) ainsi que la glutathion peroxydase (GPx), la glutathion réductase (GR) et de glutathion-S-transférase (GST) (Aly et al., 2010). La composition non enzymatique est principalement constituée de thiols, glutathion (GSH), la vitamine C et E (Costantini et Verhulst, 2009).

I.2.2.2. Hépatotoxicité

Le CPF provoque le dysfonctionnement hépatique (Goel et al., 2006). Sa biotransformation s'effectue dans le foie et sa désintoxication a lieu dans le foie et le plasma. Cette biotransformation est catalysée par CYP450 et des enzymes qui y sont associées dans les membranes des microsomes du foie (Jokanovic, 2001).

Il est démontré que le CPF provoque l'hépatotoxicité par des changements du profil des enzymes hépatiques comme PAI, AST, LDH et des changements histopathologiques (Gokcimen et al., 2007; Elhalwagy et al., 2008; Mansour et Mossa, 2010), ainsi des altérations des macromolécules (Chen et al., 2013). Ces altérations probablement transforment la fonction des cellules par des changements dans le calcium ou le pH intracellulaire, et finalement conduisent à la mort cellulaire et à des lésions tissulaires (Majhi et al., 2011).

Des rapports antérieurs ont aussi démontré les actions hépatotoxiques du CPF, dans lesquelles, le profil des enzymes du foie, des enzymes antioxydants et des éléments essentiels ont été trouvés affectés (Goel et al., 2000, 2005, 2006; Goel et Dhawan, 2001). La biotransformation hépatique du CPF entraîne une modulation de sa toxicité aiguë chez les mammifères.

II.1. Entretien des animaux

Des souris Swiss Albinos femelles, pesant environ 30.91g et fournies par l'Institut Pasteur d'Alger (Algérie) ont utilisées dans cette étude. Elles sont maintenues dans des cages en plastiques, à une température ambiante de $25 \pm 2C^\circ$, avec un cycle jour/nuit ; 12h/12h avec accès libre à la nourriture et à l'eau.

II.2. Préparation du modèle expérimental

Une étude préliminaire a été menée afin de déterminer la dose la plus toxique et non létale du CPF qui est capable de provoquer des signes de toxicité (neurotoxicité). Pour ce faire, 12 souris ont été divisées en 4 lots et puis chacun de ces quatre lots a été traité de manière séparée avec une dose de CPF (véhiculé dans l'huile du maïs) par voie orale et qui correspond à l'une des quatre doses employées, à savoir 20, 40, 60 et 80 mg/kg. Les souris ont été enlevées de leurs cages et examinées plusieurs fois avec soin le jour d'exposition, puis une fois par jour en minimum pendant les 14 jours qui ont suivi.

Après la détermination de la dose, une induction chimique de l'hépatotoxicité aiguë a été réalisée chez les souris par administration orale d'une suspension contenant 40mg/kg de CPF véhiculé dans l'huile de maïs. Les animaux sont répartis en six lots de sept souris dans des cages standards, à température ambiante avec l'accès libre à l'eau et nourriture. Tous les animaux ont reçu 0.2 ml de la suspension. Les souris du 6^{ème} lot (témoins) ont reçu l'huile de maïs seul. Les animaux des lots 1, 2, 3, 4, 5 et 6 ont été sacrifiés après 6, 24, 48, 72, 96, 96 heures respectivement. Les tissus hépatiques ont été collectés, lavés à plusieurs reprises dans le NaCl 9‰ et imbibés avec du papier buvard pour le débarrasser du sang, puis pesés et sauvegardés congelés ($-20^\circ C$) afin de les fractionner en vue d'extraction d'enzymes (CAT et GST) et de substrats (GSH, MDA). Le prélèvement sanguin a été réalisé par ponction cardiaque pour les animaux du lot 5 et 6. Le sang a été collecté dans des tubes héparines puis centrifugé à 3000 rpm pendant 10 minutes pour récupérer le sérum.

II.3. Dosage du MDA hépatique

Les taux du MDA hépatiques ont été évalués selon la méthode de Lovric et al. (2008). Elle repose sur la formation en milieu acide et à chaud $100^\circ C$ entre le MDA et deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) d'un chromogène rose-rouge absorbant à 530 nm, l'intensité de la coloration augmente avec la concentration du MDA. Pour ce faire, nous avons utilisé environ 0.15 g

du foie additionné à 1.5 ml de la solution de KCl (0,15 M), broyé par un homogénéiseur de DOUNCE. Pour 1 volume de l'homogénat, nous avons additionné 4 volumes d'acide trichloracétique (TCA) 5%, l'homogénat est centrifugé à 1780 g pendant 15 min, ensuite, 0.5 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) 0.375% (préparé dans l' HCl à 0.25 M) est additionné à 0.5 ml de surnagent récupéré. Le mélange est chauffé à 100°C pendant 15 minutes puis refroidis à température ambiante. La quantité du MDA dans l'échantillon est exprimée en μmol du MDA formé/g de tissu, en utilisant le coefficient d'extinction du MDA : $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Wright et al., 1981).

II.4. Dosage du GSH dans le foie

Afin d'évaluer les taux de GSH, nous avons utilisé la méthode colorimétrique d'Ellman (1959). Elle consiste à l'oxydation du GSH par l'acide 5,5' dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB), la fixation des molécules de DTNB aux groupements thiol (SH) a comme conséquence l'apparition d'une coloration jaune dont l'intensité est proportionnelle à la teneur en groupements SH ; ce qui libère l'acide thionitro-benzoïque (TNB), lequel à pH alcalin (8-9) présente une absorbance à 412 nm.

Pour ce faire, 0.2 g du foie a été coupé et homogénéisé avec 3 volumes de l'acide trichloracétique TCA (10%) à l'aide d'un broyeur de DOUNCE, l'homogénat est centrifugé à 2000 rpm pendant 15 min à 4°C, ensuite 50 μl du surnageant a été dilué dans 10 ml du tampon phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,1 M, pH=8). 20 μl de DTNB (0.01 M) sont ajoutés à 3 ml du mélange. Après 15 min d'incubation à l'obscurité, la lecture de la densité optique a été effectuée à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions qu'avec le TCA (10%). Le taux du GSH est déduit à partir d'une gamme étalon (2mM à 10 mM) du glutathion préparé dans les mêmes conditions que le dosage (Annexe), les concentrations sont exprimées en mmol de glutathion/mg de foie.

II.5. Mesure de l'activité de CAT hépatique

L'activité de la catalase a été déterminée par la méthode de Beutler (1984), son principe est basé sur la disparition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en présence de la source enzymatique à 25° C. 0.2 g du foie a été coupé et homogénéisé avec 0.8 ml de tris-HCl (50 mM) à l'aide d'un broyeur de DOUNCE, l'homogénat est centrifugé à 2000 g/15 min à 4°C. La cuve de mesure contient : 10 μl de la fraction cytosolique, 980 μL de l'eau distillée et la réaction a été déclenchée par addition de 10 μl de H_2O_2 (0.066 M). L'absorbance à 240 nm a été mesurée à chaque minute pendant 2 minutes à 25°C. L'activité enzymatique est exprimée en UI/g de protéine selon la relation suivante :

$$\text{UI/mg de protéine} = \left(\frac{2.3033}{T} \times \log \frac{A1}{A2} \times \frac{1}{mg} \right)$$

A1: Absorbance au temps 0 min ; A2: Absorbance après 1 min ; T : Intervalle du temps en minutes.

II.6. Mesure de l'activité de GST hépatique

L'activité de la GST a été déterminée selon la méthode de Habig et al. (1974). Le substrat utilisé est le 1-chloro-2-4-dinitrobenzène (CDNB) préparé dans l'éthanol 95° ; l'enzyme a besoin d'un second substrat pour être active, additionné sous forme de glutathion. L'enzyme permet le transfert du glutathion riche en électrons sur le CDNB chargé positivement par gain d'un proton.

Un mélange de 850 µl du tampon phosphate (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 0.1 M, pH 6.5) et de 50 µl de CDNB 20 mM (dissoudre dans l'éthanol 95°) a été incubé à 37°C pendant 10 min. la réaction est déclenchée par l'addition à ce mélange de 50 µl d'une solution de GSH 20 mM et 50 µl de la fraction cytosolique. Un contrôle a été préparé dans les mêmes conditions qu'avec le tampon phosphate. L'absorbance a été suivie pendant 5 minutes à 340 nm. L'activité de glutathion S-transférase est exprimée en UI/ml d'enzyme, en utilisant le coefficient d'extinction (9.6 mM⁻¹ cm⁻¹) selon la réaction suivante :

$$\text{GST activité } (\mu\text{mol/min/mg protéine}) = \frac{\Delta \text{ abs } 340\text{nm/ min test} \times Vt}{Vez} \times \frac{1}{9.6} \times \frac{1}{mg}$$

Sachant que : Δ abs 340nm/ min test : différence de l'absorbance ; Vt : volume totale de cuvette par ml, Vez : volume de la fraction cytosolique ajoutée par ml.

II.7. Mesure de l'activité de PAL sérique

Selon le Kit(TECO DIAGNOSTICS) le p-Nitrophenyl Phosphate (p-Npp) réageant avec l'eau en présence de Pal est incolore mais le p-Nitrophenol résultant a une forte absorbance à 405nm. Le réactif contient: [p-Npp (17mM), magnésium ions (4mM), tampon (pH 10.2 ± 0.2)], 1 ml du réactif a été mis dans des tubes appropriés, après incubation à 37°C, le spectrophotomètre a été réglé à 405 nm ,0.025 ml de sérum a été ajouté et bien mélangé. Après une minute, l'absorbance a été mesurée. Le tube a été retourné à 37°C. La lecture a été répétée pour les 2 minutes suivantes. La moyenne de l'absorbance a été calculée par minute : (Δ Abs/min), puis multipliée par le facteur 2187. Les résultats ont été exprimés en UI/L.

II.8. Mesure de l'activité de TGO sérique

Selon le Kit (TECO DIAGNOSTICS), l'AST catalyse le transfert d'un groupe amino entre L-aspartate et 2-oxoglutarate. L'oxalacetate formé dans la 1^{ère} réaction réagit après avec le NADH en présence de la malate déshydrogénase (MDH) pour former NAD⁺. L'activité de l'AST a été déterminée en mesurant le taux d'oxydation de NADH à 340 nm. Le réactif contient [L-Aspartate (240 mmol/L), MDH (>600 U/L), LDH (>600 U/L), tampon Tris : pH 7.5 (80 mmol /L), 2- Oxoglutarate (12 mmol/L), NADH (0.18mmol/L)]. 1 ml du réactif a été incubé à 37°C pour 3 minutes et 0.1 ml du plasma additionné et mélangé doucement. L'absorbance a été lue dès la 1^{ère} minute, puis, de nouveau à la 2^{ème} et 3^{ème} minute. L'absorbance moyenne a été déterminée par minute ($\Delta A/\text{min}$), multipliée par le facteur 1768 et les résultats ont été exprimés en U/L.

II.9. Mesure de l'activité de TGP sérique

Selon le Kit(TECO DIAGNOSTICS), le pyruvate formé par L-Alanine et 2-oxoglutarate en présence d'ALT dans la première réaction est réduit en présence de lactate déshydrogénase et NADH. L'activité d'ALT a été déterminée en mesurant le taux d'oxydation de NADH à 340 nm. Le réactif contient [L-Alanine (500 mmol/L), LDH (>1200 U/L), tampon Tris, pH 7.5 (100 mmol/L), le 2-Oxoglutarate (15mmol/L), le NADH (0.18mmol/L)]. 1ml du réactif a été incubé à 37°C pour au moins 5 minutes. 0.1 ml du sérum a été ajouté, mélangé doucement puis transféré dans une cuvette. L'absorbance a été lue et enregistrée à la 1^{ère} minute, puis de nouveau aux 2^{ème} et 3^{ème} minutes. L'absorbance moyenne a été déterminée par minute ($\Delta A/\text{min}$), multipliée par le facteur 1768, les résultats ont été exprimés en U/L.

II.10. Evaluation statistique

Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm écart type pour chaque échantillon. Ces résultats ont été traités statistiquement à l'aide du logiciel Excel 2007 par l'analyse du test de student. Pour p valeurs, des astérisques (*) sont utilisées afin d'indiquer l'importance de la signification en comparant les différents échantillons avec les témoins.

NS : Différence non significative ($P > 0.05$).

(*) : $P < 0.05$: Différence significative.

(**) : $P < 0.01$: Différence très significative.

(***) $P < 0.001$: Différence hautement significative.

Le but de notre étude a été d'évaluer la toxicité hépatique aiguë en analysant l'état du stress oxydatif induit par le CPF dans le foie au cours du temps ainsi que le fonctionnement physiologique hépatique chez la souris. Pour ce faire, nous avons tout d'abord induit une toxicité aiguë au niveau de cet organe selon un protocole expérimental après la détermination de la dose toxique (40 mg/kg). Le protocole a consisté à l'administration du CPF aux animaux par gavage. Ainsi, nous avons évalué quatre paramètres du stress oxydatif (GSH, MDA, CAT, GST) dans des conditions normales et d'intoxication par le CPF et 3 marqueurs biochimiques (TGO, TGP, PAL) indicateurs de la situation physiologique de l'activité du foie.

III.1. Détermination du seuil toxique et non létal de la dose du CPF

Nous avons observé deux mortalités lors de l'administration d'une dose de 80mg/kg, pendant que des effets cholinergiques proéminents et d'autres effets non-spécifiques ont été remarqués lorsque les souris recevaient les doses de 20, 40, 60 et 80 mg/kg. (Tableau 1).

Tableau 1. Résumé des fréquences des signes cliniques induits par le CPF chez la souris.

	Dose (mg/kg)			
	20	40	60	80
Diminution de l'activité	2/3	3/3	2/3	3/3
Inco ordination	1/3	2/3	3/3	3/3
Tics de muscles	0/3	0/3	0/3	1/3
Tremblement	0/3	1/3	3/3	3/3
Lacrimation	0/3	0/3	0/3	1/3
Salivation	0/3	0/3	0/3	0/3
Périnéal soiling				
fèces	0/3	0/3	0/3	1/3
urine	0/3	0/3	0/3	1/3
Respiration				
lente	1/3	1/3	0/3	1/3
rapide	1/3	2/3	2/3	2/3
Hyperactivité au stimulus	0/3	0/3	1/3	1/3

Le temps d'effet maximum était de 5 à 6 h après l'administration du composé. Toutes les souris ont montré un état normal du 5^{ème} jour jusqu'à la fin de la période de l'étude. Une haute dose de 40 mg/kg a été choisie pour l'étude d'hépatotoxicité à dose unique et qui été attendue pour provoquer une toxicité évidente et claire avec un risque minime de mortalité.

III.2. Mise en évidence de la cinétique des paramètres du stress oxydatif hépatique induit par CPF

Le stress oxydatif est largement étudié comme étant le point commun de plusieurs et peut être de la plupart des voies pathologiques. C'est un syndrome au cours duquel les éléments prooxydants dépassent la capacité antioxydante de l'organisme. Il en résulte un déséquilibre entre le système prooxydant et antioxydant. Il a été démontré que l'exposition au CPF induit la production de EOR, et modifie les niveaux de superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx), la glutathion-S-transférase (GST) et le malondialdéhyde (MDA) dans différents tissus d'animaux de laboratoire (Verma et al., 2007; Mansour et Mossa, 2009; Ambali et al., 2010; Shittu et al., 2012).

III.2.1. Variation du MDA hépatique

D'après les résultats obtenus, nous avons remarqué une variation des taux du MDA hépatique mesurés chez les souris au cours du temps. A 72h, une augmentation significative plus ou moins légère a été observée en comparaison avec les lots traités pendant 6h et 24h. Alors que pour les deux derniers lots (48h et 96h), nous avons remarqué une diminution des taux par rapport au témoin, ce qui indique qu'il y a une chute des radicaux libres issus du métabolisme du CPF.

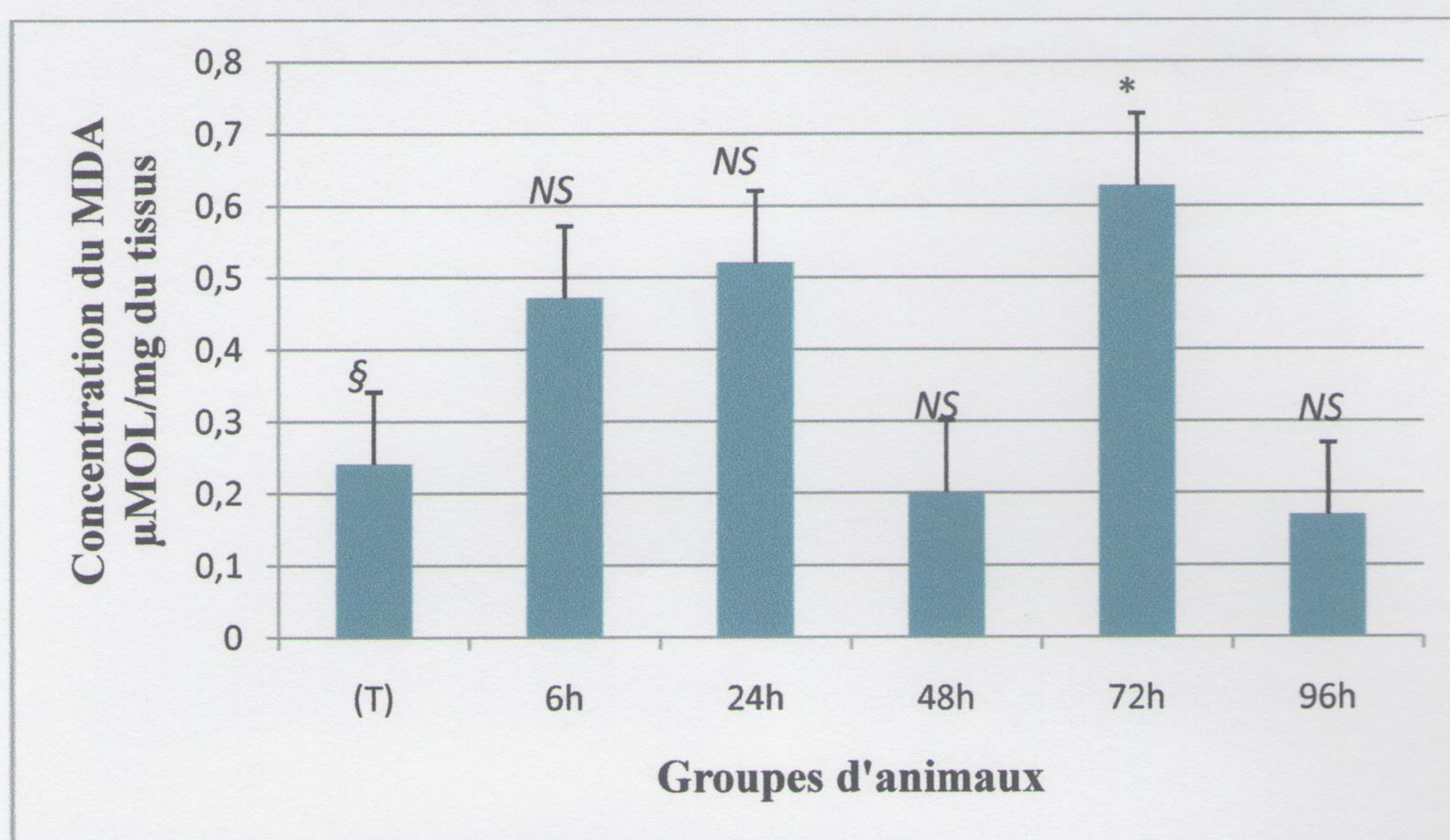


Figure 7. Effet du CPF sur le taux du MDA au cours du temps. Chaque valeur est exprimée en moyenne \pm écart-type. Significativité statistique : $p < 0,05$: significatif (*); $p < 0,01$: très significatif (**); NS (non significatif), référence (§).

Le MDA est un produit d'oxydation important d'acides gras polyinsaturés peroxydés, et est considéré comme étant un indicateur important de la peroxydation lipidique. Dans notre étude réalisée *in vivo*, les souris recevant le CPF et ont été sacrifiées après 72h, présentaient un taux du MDA cytosolique élevé de façon significative ($p < 0,05$) par rapport au lot témoin. Alors que, les animaux sacrifiés après 6h et 24h présentaient une augmentation légère bien qu'elle est non significative. Cette augmentation est en faveur d'une induction d'une peroxydation lipidique par les radicaux libres issus du métabolisme du chlorpyrifos dans le cytosol. En comparant avec l'étude faite par (Marnett, 1999), une fois le taux du MDA augmente de manière significative dans le foie des souris, le MDA devient mutagène et cancérigène chez les mammifères, et peut réagir avec les bases de l'ADN G, A et C pour former des adduits M1G M1A et M1C, respectivement. Les animaux sacrifiés après 48h et 96h présentaient une diminution non significative

III.2.2. Variation du taux du GSH hépatique

D'après les résultats, les souris sacrifiées après 48h et 72h de l'administration présentaient une diminution significative ($p < 0,05$) du taux du GSH contre les animaux témoins. Par conséquent, l'appauvrissement en GSH intracellulaire est généralement considéré comme un indicateur du stress oxydatif. Les effets de l'épuisement en GSH en raison de CPF reflétaient l'accumulation des ROS, ce qui conduirait à la formation d'un stress oxydatif dans les tissus de souris. Nous avons remarqué également une augmentation significative des taux de GSH hépatique ($p < 0,05$) chez les animaux sacrifiés après 96h d'administration en comparaison avec les souris sacrifiées après 6h ce qui

indique que les cellules ont commencé à récupérer leur équilibre de balance prooxydant/antioxydant.

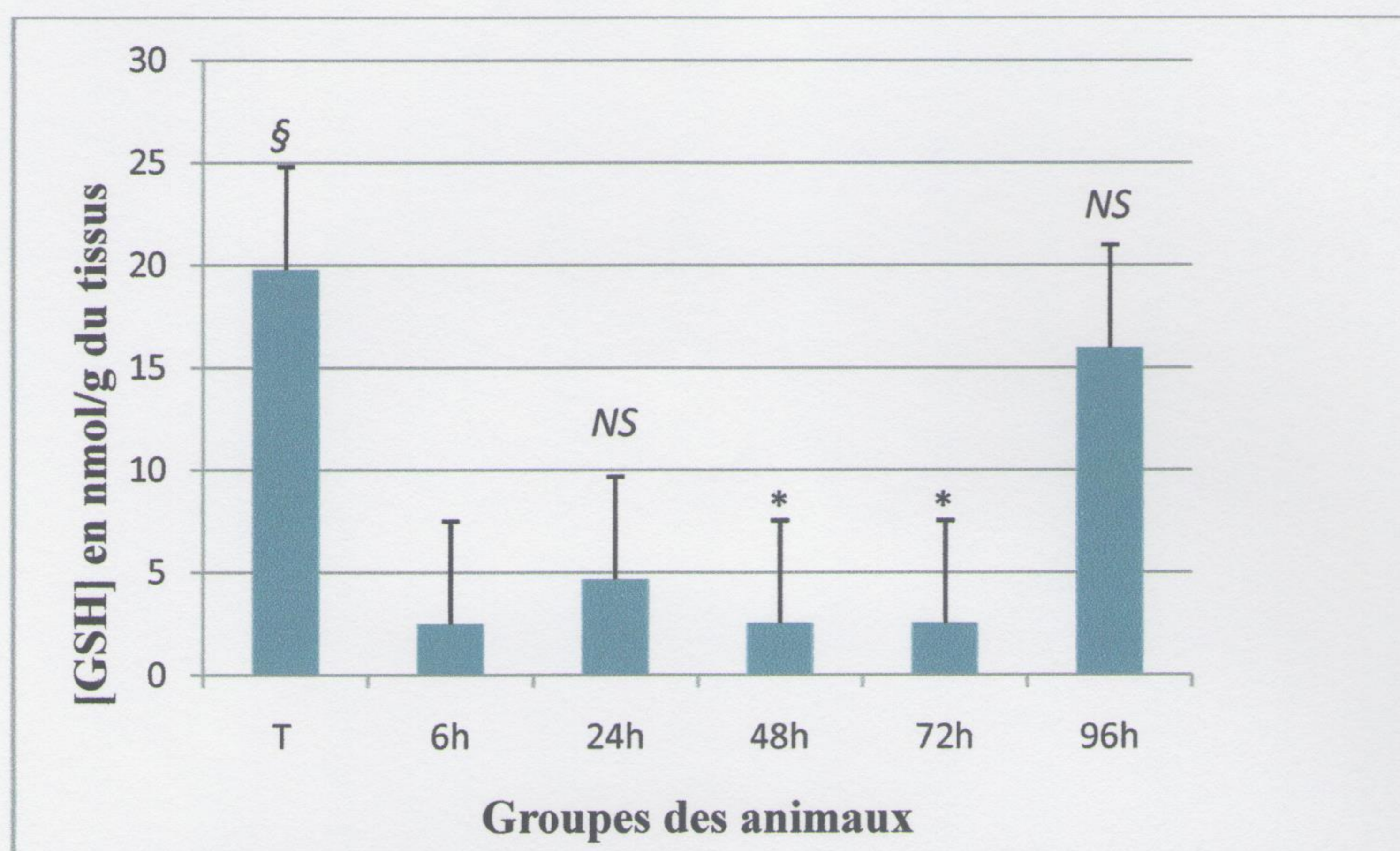


Figure 8. Effet du CPF sur le taux du GSH au cours du temps. Les résultats sont représentés en moyenne \pm écart-type, les comparaisons sont effectuées entre le groupe témoin(T) et les groupes CPF. Statiquement significatif (*) : $P < 0,05$, très significatif (**) : $p < 0,01$, hautement significatif (***) : $p < 0,001$, non significatif (NS), référence (§).

Le GSH agit comme un agent réducteur, c'est une substance vitale dans la désintoxication. Il offre une protection anti-oxydante dans la phase aqueuse des systèmes cellulaires. Le rôle central du GSH est la défense anti-oxydante, car il est capable de régénérer un autre anti-oxydant soluble dans l'eau, l'acide ascorbique, par l'intermédiaire du cycle ascorbate-glutathion (Valko et al., 2007). En situation de stress oxydatif, son rôle protecteur et détoxifiant résulte principalement de sa fonction de co-substrat de glutathion peroxydase et de glutathion-S-transférase. Mais, il fait aussi l'objet d'interactions synergiques avec d'autres composants du système de protection anti-oxydante tels que la vitamine C, la vitamine E et les superoxydes dismutases (Januel, 2003).

III.2.3. Mesure de l'activité de CAT hépatique

La catalase (CAT) figure parmi les enzymes appartenant au système de défense antioxydant. Elle représente le système le plus performant impliqué dans le contrôle de la concentration du peroxyde d'hydrogène. Son rôle consiste à la dismutation de deux molécules du H_2O_2 afin d'atténuer l'état oxydé. On remarque des diminutions non significatives dans l'activité de CAT lors d'une comparaison entre les souris intoxiquées et les souris témoins où la diminution la plus remarquable était enregistrée chez les souris sacrifiées après 24h ($0,01 \pm 0,25$ UI/ mg) contre ($0,55 \pm$

0,12 UI/ mg) chez les animaux témoins. D'après ce qui est montré sur l'histogramme, la diminution de l'activité de CAT chez les souris sacrifiées après 6h et 24h est suivie par une augmentation chez les souris sacrifiées après 48h, 72h et 96h respectivement.

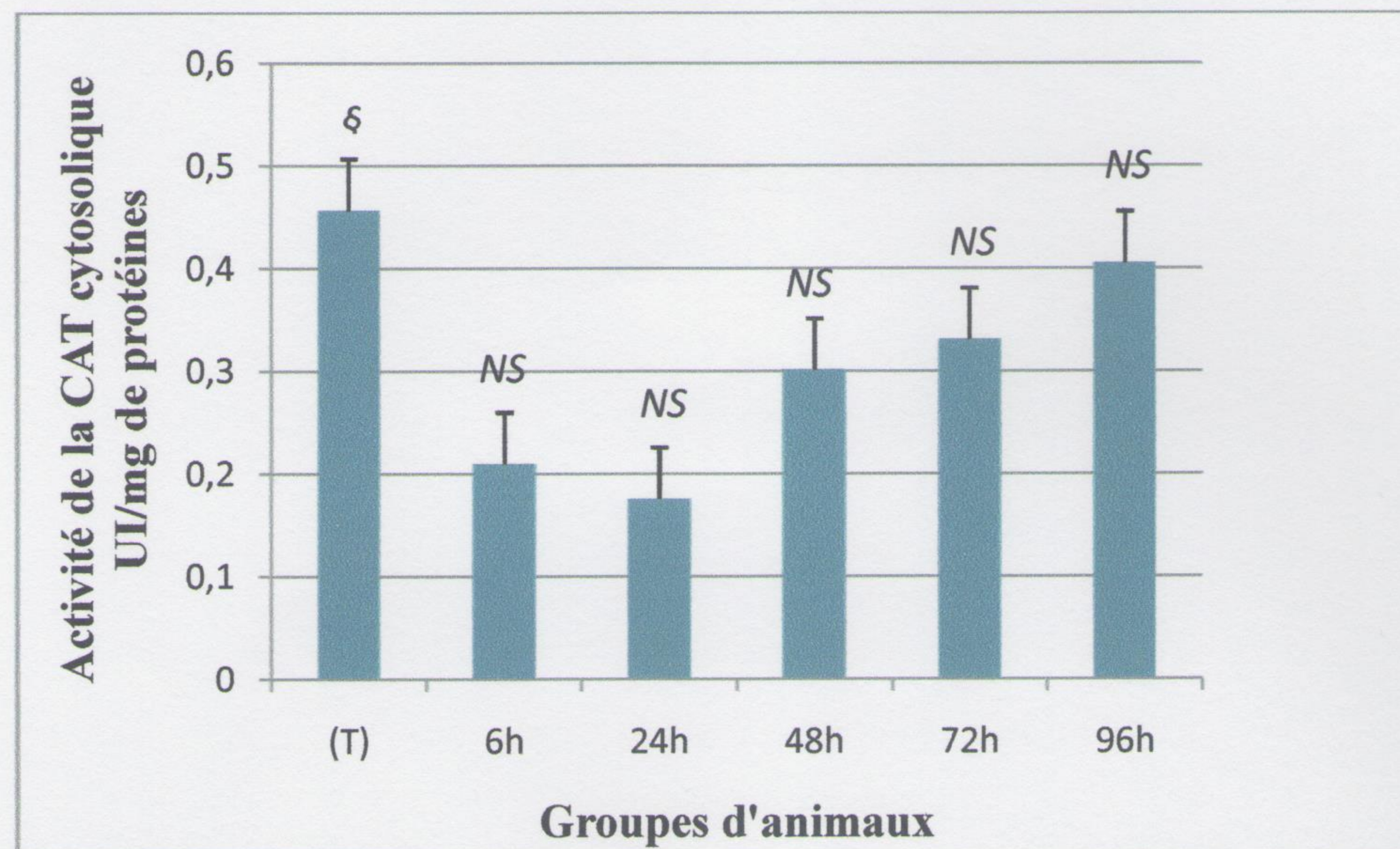


Figure 9. Effet du CPF sur l'activité de Catalase au cours du temps. Les résultats sont représentés en moyenne \pm écart-type, les comparaisons sont effectuées entre le groupe témoin (T) et les groupes CPF. Statiquement significatif (*) : $P < 0,05$, très significatif (**) : $p < 0,01$, hautement significatif (***) : $p < 0,001$, non significatif (NS), référence (§).

Ces résultats sont en désaccord avec plusieurs auteurs mais en accord aussi aux résultats de nombreux autres (Khan et Kour, 2007; Celik et Suzek, 2009), la diminution de l'activité peut être due à un déséquilibre du système antioxydant/prooxydant intense suite à des concentrations élevées du toxique, ce qui fait que l'enzyme devient saturé et épuisé, alors la cellule a besoin d'un temps au cours duquel elle peut s'adapter à cette situation afin que l'enzyme puisse récupérer et regagner son état initial après une régulation au niveau chimique, d'où l'activité augmente chez les souris sacrifiées après 48h, 72h et 96h.

III.2.4. Mesure de l'activité de GST hépatique

Nos résultats ont démontré une diminution hautement significative ($p < 0,001$) de l'activité hépatique de la GST chez le groupe d'animaux sacrifiés après 72h, en comparaison avec les témoins. Les animaux sacrifiés après 6h, 24h, et 48h présentaient une diminution très significative ($p < 0,01$) par rapport aux témoins. De même, pour les animaux sacrifiés après 96h qui ont présenté une diminution significative ($p < 0,05$). En comparant ces résultats au groupe d'animaux sacrifiés

après 6h, nous n'avons pas remarqué une différence significative dans l'activité cytosolique hépatique de la GST.

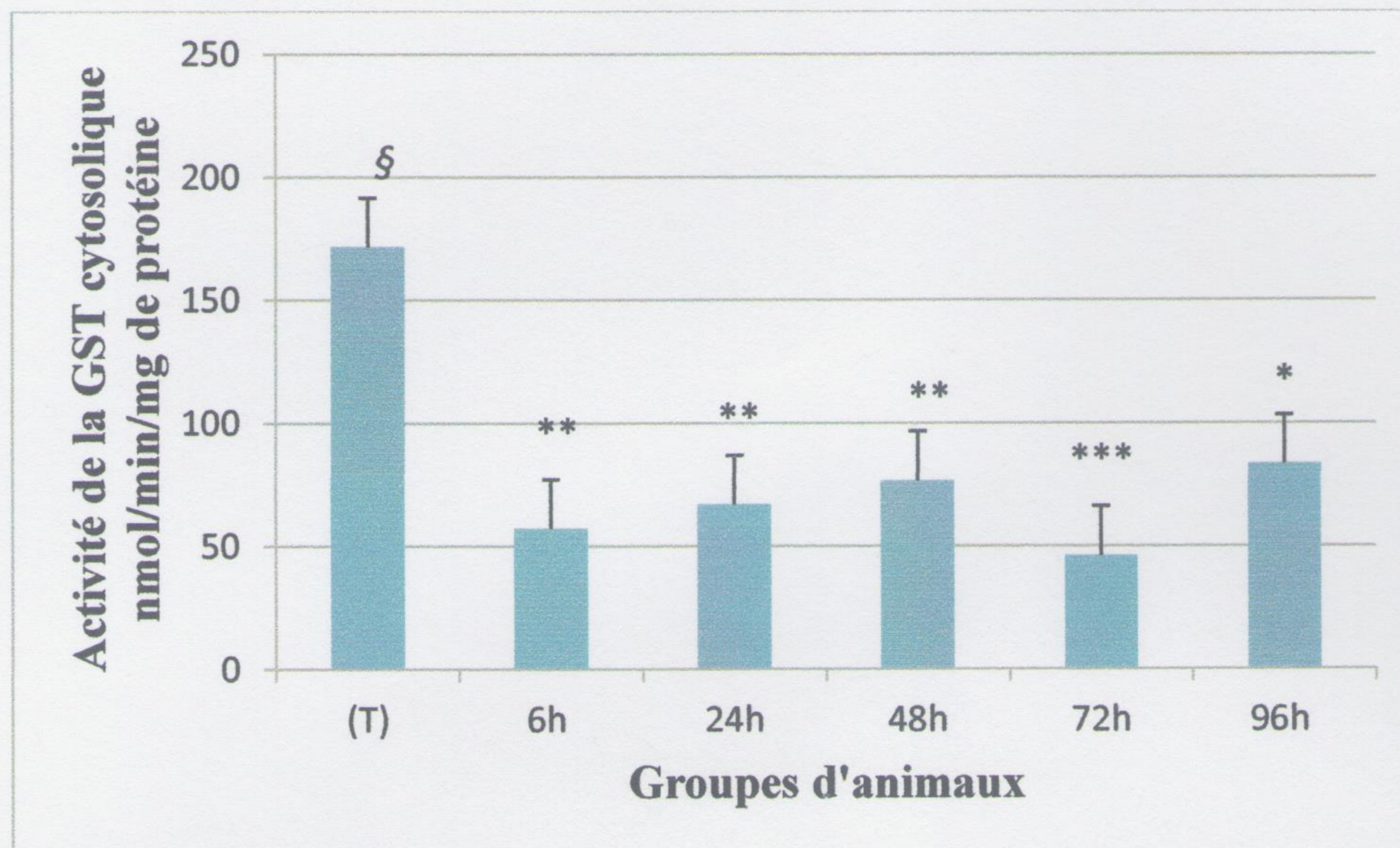


Figure 10. Effet du CPF sur l'activité de la GST au cours du temps. Les résultats sont représentés en moyenne \pm écart-type, les comparaisons sont effectuées entre le groupe témoin(T) et les groupes CPF. Statiquement significatif (*) : $P < 0,05$, très significatif (**) : $p < 0,01$, hautement significatif (***) : $p < 0,001$, non significatif (NS), référence (§).

Il est bien connu que le système antioxydant enzymatique est renforcé par les glutathion-S-transférases (GST), enzymes de la phase II de détoxification qui catalysent la conjugaison des xénobiotiques au GSH, facilitant donc l'élimination du CPF-oxon. En analysant nos résultats, nous avons mis en évidence la présence d'une corrélation étroite entre les proportions de GST et celles du GSH ce qui a permis aux hépatocytes de retourner à leur équilibre, cette corrélation est représentée par le rôle de GST comme catalyseur d'association GSH-toxique, alors une fois la concentration du GSH diminue dans le foie, l'activité de la GST aussi diminue automatiquement.

Les résultats de l'activité enzymatique de, CAT, GST et des taux de GSH et de MDA cytosoliques montrent clairement l'effet cytotoxique du CPF, *in vivo*, qui intervient dans l'induction du stress hépatique d'une part, et d'autre part nous avons remarqué que le système de détoxification commençait à récupérer son équilibre dans les cellules hépatiques à partir du 3^{ème} jour après l'administration, et plus clairement dans le 4^{ème} jour. Ces résultats sont en accord avec une autre étude montrant que la bioactivation et la détoxification du CPF survenaient très rapidement (Sultatos et Murphy, 1983). De la même manière, un rapport récent indiquait que l'exposition sub-chronique au CPF (30 mg/kg/jour) induisait une diminution de la teneur en glycogène et des changements histopathologiques ont été aussi observés dans le foie (Elsharkawya et al., 2013). De

changements histopathologiques ont été aussi observés dans le foie (Elsharkawya et al., 2013). De plus, le CPF est éliminé lentement à partir de matières grasses et relativement rapidement du foie, le cœur et les reins (ATSDR, 1997).

III.3. Mise en évidence biochimique de l'effet du CPF sur l'activité physiologique du foie

La mesure d'activité des biomarqueurs hépatiques sériques PAL, TGO et TGP a été réalisée et les résultats sont illustrés dans les figures : 11,12 et 13.

Pour le dosage de PAL, qui est une enzyme considérée ubiquitaire mais surtout présente au niveau du foie, les os, l'intestin, les reins et les globules blancs. Après l'évaluation de la variation de l'activité de l'enzyme, nous avons observé une augmentation légère mais pas significative ($P > 0.05$) de l'activité de PAL sérique dans le lot d'animaux traités par le CPF 40mg/kg (35.17 UI/L) par rapport au groupe témoin (29.88 UI/L) après 96h d'administration.

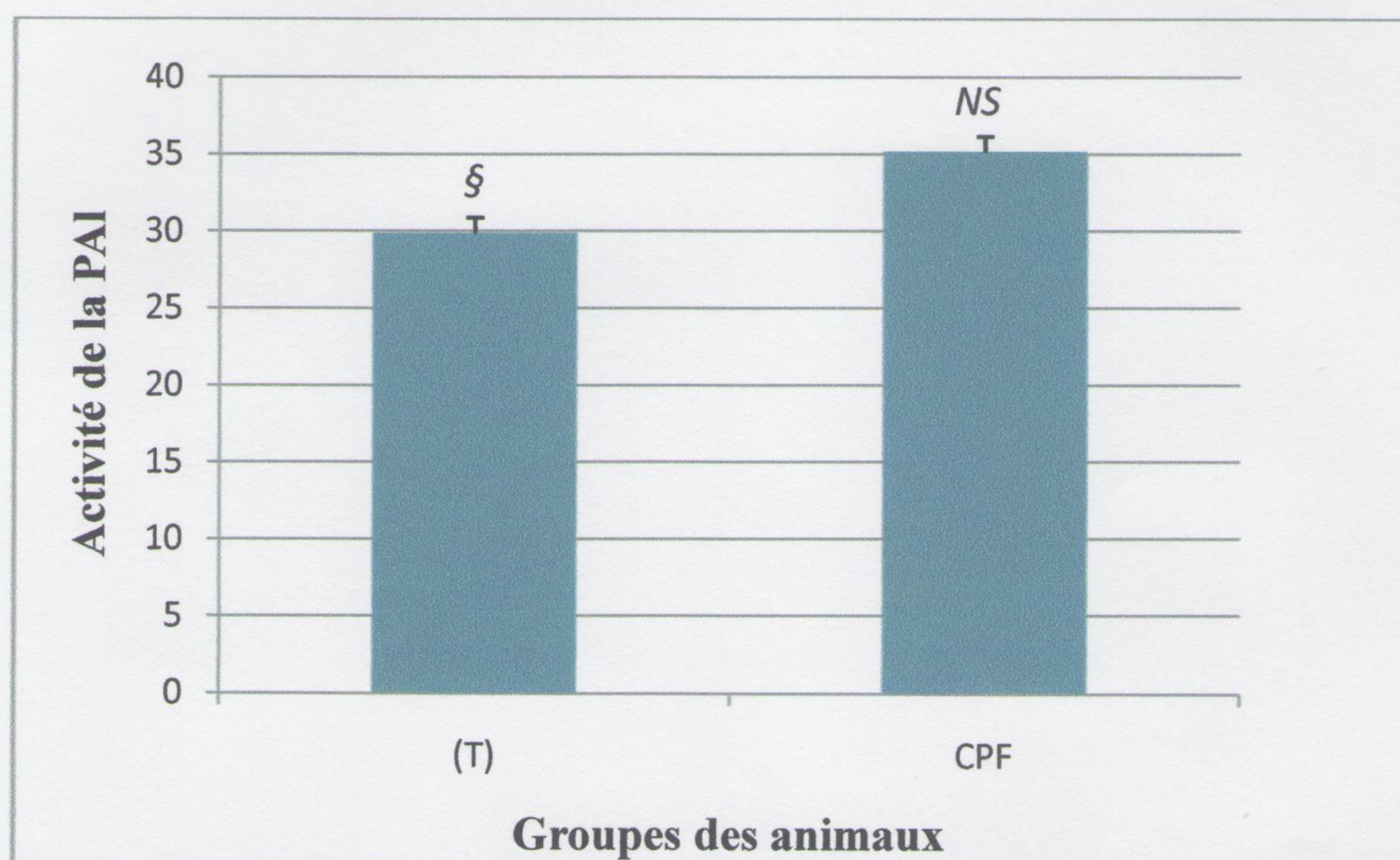


Figure 11. Effet du CPF sur l'activité du PAL dans le foie des souris. Chaque valeur est exprimée en moyenne \pm écart-type. Significativité statistique: $p < 0,05$: significatif (*), $p < 0,01$: très significatif (**), NS (non significatif), référence (§).

Nous avons remarqué que l'activité de TGO a été augmenté significativement ($P < 0.05$) après 96h d'administration dans le lot d'animaux traités par le toxique (55.69U/L) par rapport au groupe témoin (17.08U/L). Par contre, l'augmentation de l'activité de la TGP a été considérée comme étant très significative ($0.01 > P > 0.001$) pour les animaux intoxiqués (64.16 U/L) par rapport aux témoins (27.3U/L).

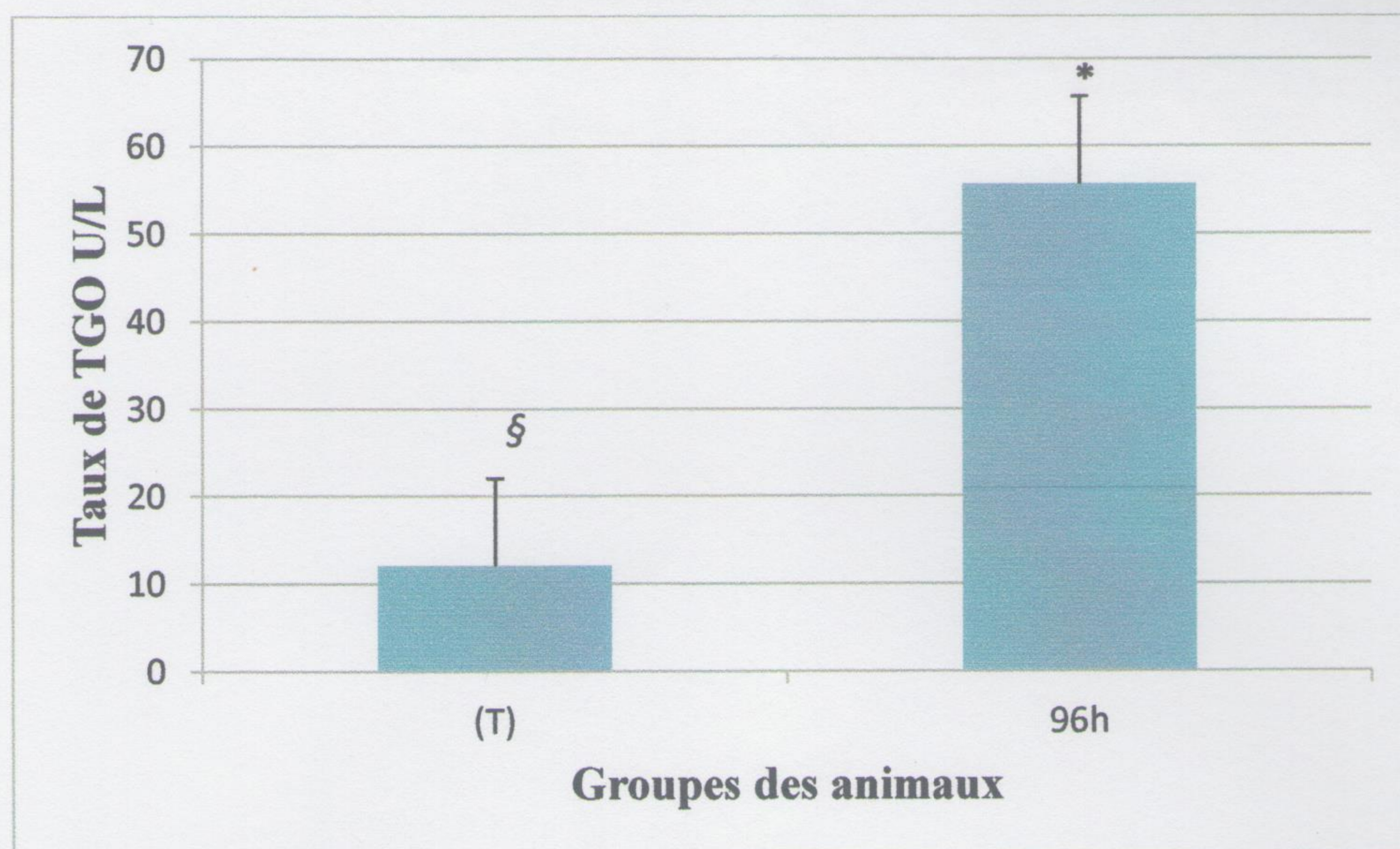


Figure 12. Effet du CPF sur l'activité du TGO dans le foie des souris. Chaque valeur est exprimée en moyenne \pm écart-type. Significativité statistique: $p < 0,05$: significatif (*), $p < 0,01$: très significatif (**), NS (non significatif), référence (§).

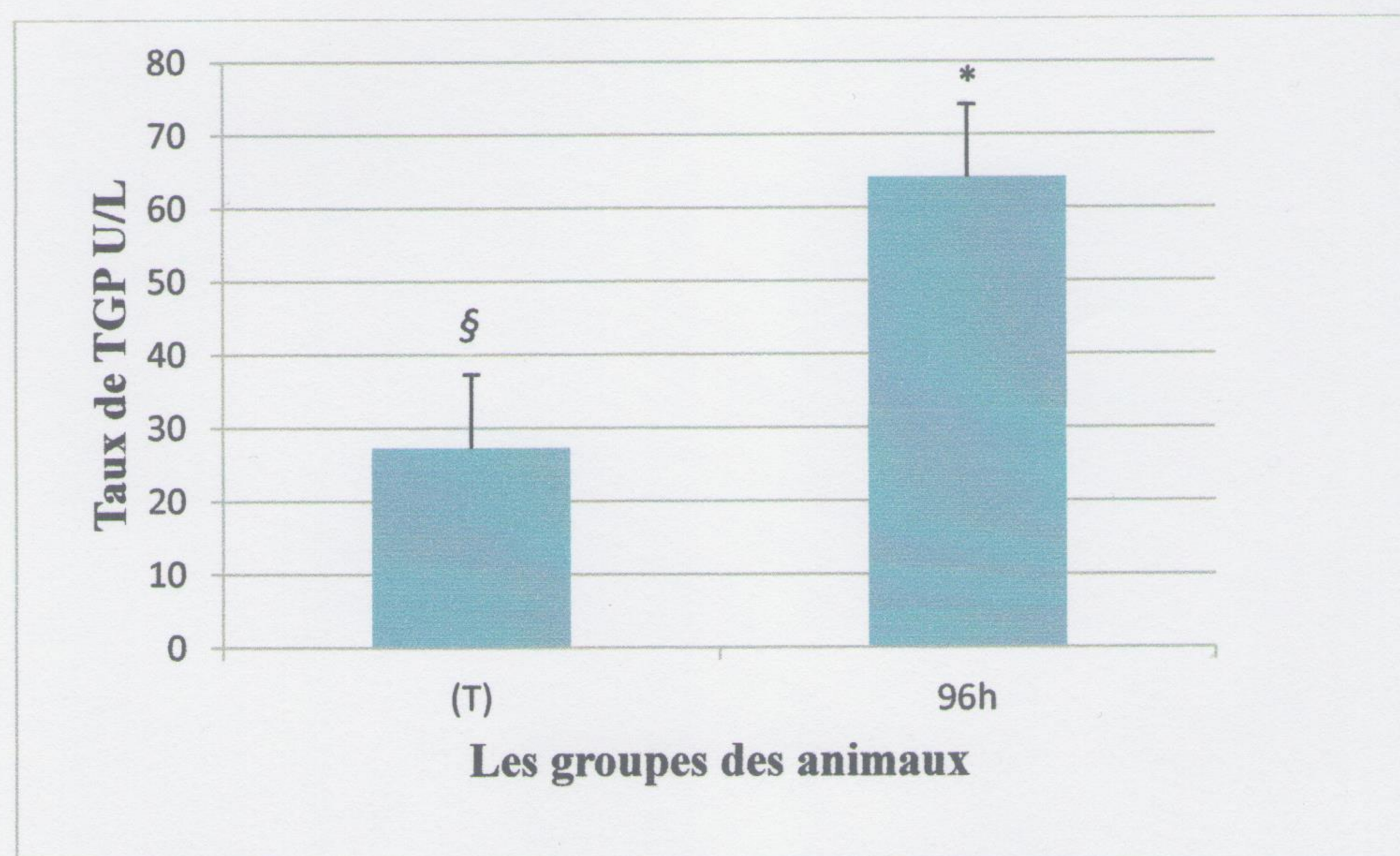


Figure 13. Effet du CPF sur l'activité du TGP dans le foie des souris. Chaque valeur est exprimée en moyenne \pm écart-type. Significativité statistique: $p < 0,05$: significatif (*), $p < 0,01$: très significatif (**), NS (non significatif), référence (§).

Selon nos résultats, nous avons enregistré une augmentation des taux sériques les trois biomarqueurs biochimiques indicateurs de l'état de fonctionnement du foie (PAL, TGO et TGP). En effet, nous avons obtenu des données significatives et très significatives, respectivement pour TGO et TGP lors l'administration du CPF à 40mg/kg.

Il est très utile de rappeler que nos résultats concernant l'activité de PAL et qui montraient une augmentation non significative d'environ 25% de cette enzyme, contrastaient clairement avec ceux obtenus par Uzun et Kalender (2013) et rapportaient une augmentation significative de 50%. Par conséquent, cette élévation pourrait être un révélateur de la présence d'une nécrose hépatocytaire sévère comme le soutenaient des travaux précédents (Ganzina, 1983; Dobbs et al., 2003). Cependant, nos résultats concernant les activités de ces trois paramètres enzymatiques concordaient avec ceux obtenus par Tukappa et al. (2015). L'augmentations d'activités de ces trois enzymes (GOT, GPT et PAL) dans le sérum permet de confirmer la présence d'une atteinte structurale du foie (Recknagel et al., 1976).

Le chlorpyrifos est le pesticide organophosphoré le plus couramment utilisé dans le monde entier, ce qui augmente les risques d'intoxication par ce xénobiotique et donc le développement des maladies plus ou moins graves chez les êtres humains.

Les résultats obtenus ont démontré que l'administration du toxique à une dose unique de 40mg/kg a entraîné une variation des paramètres du stress oxydatif hépatique au cours du temps, en diminuant l'activité de la GST, de CAT et le taux du GSH, et en augmentant le taux du MDA. Egalement, nous avons observé une élévation des paramètres biochimiques sériques tels que la phosphatase alcaline.

En fin, les résultats obtenus suggèrent que la dose déterminée de ce toxique a pu induire une hépatotoxicité aiguë et ceci a été bien démontré à travers la variation en fonction du temps des paramètres du stress oxydatif ainsi que les paramètres biochimiques. Ainsi, nous recommandons d'approfondir l'étude toxicologique beaucoup plus par l'utilisation de techniques plus performantes qui devraient nous permettre d'identifier clairement les molécules impliquées dans les mécanisme de toxicité des OP afin de développer des stratégies de prévention utiles et/ou des thérapies efficaces contre ce fléau.

- Abdollahi M, Rainba A, Shadnia S, Nikfar S, et Rezaie A. (2004). Pesticide and oxidative stress: a review. *Med. Sci. Monitor.* 10: RA141–RA147.
- Alavanja M C et Bonner M R. (2005). Pesticides and human cancers. *Cancer Invest.* 23(8):700–711.
- Alavanja M C, Ward M H, et Reynolds P. (2007). Carcinogenicity of agricultural pesticides in adults and children. *J Agromedicine.* 12(1):39–56.
- Alavanja M C. (2009) Introduction: pesticides use and exposure extensive worldwide. *Rev Environ Health.* 24(4):303–309.
- Aly N, El-Gendy K, Mahmoud F, et El-Sebae A K. (2010). Protective effect of vitamin C against chlorpyrifos oxidative stress in male mice. *Pest. Biochem. Phys.* 97: 7-12.
- Ambali S F, Shittu M, Yaqub L S, Aliyu H, Kobo P, Kawu MU, Aluwong T, et Ayo JO (2009). Adherence to pesticide withdrawal periods on stored products among farmers in Nigeria: a case study of Zaria, Kaduna State. A Paper presented at the *International Field Toxicology Symposium in Africa*, University of Zambia, Lusaka, October 15, 2009.
- Ambali S F, Ayo J, Ojo S, et Esievo K. (2010). Vitamin E protects Wistar rats from chlorpyrifos induced increase in erythrocyte osmotic fragility. *Food Chem. Toxicol.* 48: 3477–3480.
- ATSDR (Agent for Toxic Disease Substances Registry). (1997). Toxicological profile for chlorpyrifos. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services. 25 : 150-234.
- Aygun D, Erenler A K, Karataz A D, et Baydin A. (2007). Intermediate syndrome following acute organophosphate poisoning: correlation with initial serum levels of muscle enzymes. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 100: 201–204.
- Bagchi D, Bagchi M, Tang L, et Stohs S J. (1997). Comparative in vitro and in vivo protein kinase C activation by selected pesticides and transition metal salts. *Toxicology Letters.* 91 (1): 31-37.
- Banerjee B D, Seth V, Bhattacharya A, S.T. Pasha S T, Chakraborty A K. (1999). Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicol. Lett.* 107 : 33–47.
- Bas H et Kalender Y. (2011). Chlorpyrifos induced cardiotoxicity in rats and the protective role of quercetin and catechin. *GUJS.* 24 (3): 387–395.
- Bassil K L, Vakil C, Sanborn M, Cole D C, Kaur J S, et Kerr K J. (2007). Cancer health effects of pesticides: systematic review. *Can Fam Physician.* 53(10):1704–1711.
- Bebe F et Panemangalore M. (2003). Exposure to low doses of endosulfan and chlorpyrifos modifies endogenous antioxidants in tissues of rats, *J. Environ. Sci. Health B.* 38: 349–363.
- Beutler E. (1984). Red Cell Metabolism, A Manual of Biochemical Methods (third ed.), *Grune and Startton, New York.* p. 133.
- Biljana A et Milos P S. (2007). Unequal efficacy of pyridinium oximes in acute organophosphate poisoning. *Clin Med Res.* 5:71-82.
- Blanchet G, Carpentier P, et Lallement G. (1991). Vulnérabilité du système nerveux central vis-à-vis des neurotoxiques organophosphorés. *Méd Armées.* 19: 403-7.
- Bolognesi, C. (2003) Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat Res.* 543 (3): 251-72.

- Bomser J A, Quistad G B, et Casida J E. (2002). Chlorpyrifos oxon potentiates diacylglycerol-induced extracellular signal-regulated kinase (ERK 44/42) activation, possibly by diacylglycerol lipase inhibition. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 178 (1):29-36.
- Breslin W J, Liberacki A B, Dittenber D A, et Quast J F. (1996). Evaluation of the developmental and reproductive toxicity of chlorpyrifos in the rat. *Fund. Appl. Toxicol.* 29: 119-130.
- Buffat J J, Bonsignour J P, Ricordel I, et Diraison Y. (1989). Toxicité des "gaz" de combat. In: JEPU, éd. La réanimation respiratoire préhospitalière. Paris: Arnette. p. 67-91.
- Buratti F M, Volpe M T, Meneguz A, Vittozzi L, et Testai E. (2003). CYP-specific bioactivation of four organophosphorothioate pesticides by human liver microsomes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 186: 143-154.
- Buratti F M, Leoni C, et Testai E. (2007). The Human Metabolism of Organophosphorothionate Pesticides: Consequences for Toxicological Risk Assessment. *J Verbr Lebensm.* 2: 37-44.7.
- Buyukokuroglu M E, Cemek M, Yurumez Y, Yavuz Y, et Aslan A. (2008). Antioxidant role of melatonin in organophosphate toxicity in rats. *Cell Biol. Toxicol.* 24: 151-158.
- Cabello G, Valenzuela M, Vilax A, Duran V, Rudolph I, Hrepic N, et Calaf G. (2001). A rat mammary tumor model induced by the organophosphorous pesticides parathion and malathion, possibly through acetylcholinesterase inhibition. *Environ Health Perspect.* 109: 471-9.
- Casida J.E et Qistad G.B. (2004). Organophosphate Toxicology: Safety Aspects of Nonacetylcholinesterase Secondary Targets. *Chemical Research in Toxicology*. 17 (8): 983-998.
- Chakraborti T K, Farrar J D, et Pope C N. (1993). Comparative neurochemical and neurobehavioral effects of repeated chlorpyrifos exposures in young and adult rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 46, 219-224.
- Chambers J E, Chambers H W. (1989). Oxidative desulfuration of chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, and leptophos by rat brain and liver. *J. Biochem. Toxicol.* 4: 201-203.
- Chan D H Y, Woo J, Ho S C, Pang C P, Law L K, Ng P W, Hung W T, Kwok T, Hui E, Orr K, Leung M F, et Kay R. (1998). Genetic and environmental risk factors for Parkinson's disease in a Chinese population. *Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 65: 781-784.
- Checkoway H et Nelson L.M. (1998). Epidemiologic approaches to the Parkinson's disease etiology. *Epidemiology.* 10: 327-336.
- Chen L, Lan Z, Lin Q, Mi X, He Y, Wei L, et al. (2013). Polydatin ameliorates renal injury by attenuating oxidative stress-related inflammatory responses in fructose-induced urate nephropathic mice. *Food Chem. Toxicol.* 52: 28-35.
- Cohn J et Macphail R C. (1997). Chlorpyrifos produces selective learning deficit in rats working under a schedule of repeated acquisition and performance. *J. Pharm. Exp. Thera.* 283 (1): 312-320.
- Costantini D et Verhulst S (2009). Does high antioxidant capacity indicate low oxidative stress? *Funct. Ecol.* 23: 506-509.
- Cox C. (1994). Chlorpyrifos, Part I: Toxicology. *J. Pestic. Reform.* 14, 15-20.
- Croom E L, Wallace A D, et Hodgson E. (2010). Human variation in CYP-specific chlorpyrifos metabolism. *Toxicology.* 276: 184-191.

- Davis K J A (2000). Oxidative stress, antioxidant defences and damage removal, repair and replacement systems, *IUBMBL*. 50: 279-289.
- Demir F, Uzun F G, Durak D, Kalender Y. (2011). Subacute chlorpyrifos-induced oxidative stress in rat erythrocytes and the protective effects of catechin and quercetin. *Pestic. Biochem. Phys.* 99, 77–81. disease and cancer. *Crit Rev Oncog.* 2007; 13(1):75–82.
- Dobbs N, Twelves C, Gregory W, Cruikshank C, Richards M, et Rubens R. (2003). Epirubicin in patients with liver dysfunction : development and evaluation of a novel dose modification scheme. *European Journal of Cancer* 39. 580-586.
- Drevenkar V, Vasilic Z, Stengl B, Frobe O, et Rumenjak V. (1993). Chlorpyrifos metabolites in serum and urine of poisoned persons. *Chem. Biol. Interact.* 87, 315–322.
- Eddleston M, Buckley N A, Eyer P, et Dawson A H. (2008). Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *Lancet* .371:597—607.
- Elhalwagy M E A, Darwish N S, et Zaher E M. (2008). Prophylactic effect of green tea polyphenols against liver and kidney injury induced by fenitrothion insecticide. *Pestic. Biochem. Phys.* 91, 81-89.
- Ellman G L. (1959). Plasma antioxydants. *Archi Biochem Biophys.* 82: 70-77.
- Elsharkawya E E, Yahiaa D, et El-Nisr N A. (2013). Sub-chronic exposure to chlorpyrifos induces hematological, metabolic disorders and oxidative stress in rat attenuation by glutathione. *Environ. Toxicol. Phar.* 35: 218–227.
- Farag A T, Radwan A H, Sorour F, El Okazy A, El-Agamy E, et El-Sebae A E. (2010). Chlorpyrifos-induced reproductive toxicity in male rats. *Reprod. Toxicol.* 29: 80– 85.
- Fortunato J J, Agostinho F R, Reus G Z, Petronilho F C, Dal-Pizzol F, et Quevedo J. (2006). Lipid peroxidative damage on malathion exposure in rats. *Neurotox. Res.* 9: 23–28.
- Foxenberg, R J, McGarrigle, B P, Knaak, J B, Kostyniak, P J, et Olson R. (2007). Human hepatic cytochrome p450-specific metabolism of parathion and chlorpyrifos. *Drug Metab. Dispos.* 35, 189–193.
- Fugita H. (1939). Uber die Miorobestimmung der Blutphosphatase. *J.Biochem.* (Japan). 30:69.
- Galloway T. et Handy, R. (2003) Immunotoxicity of organophosphorus pesticides. *Ecotoxicology* 12: 345-363.
- Ganzina F (1983). 4-Epi-doxorubicin, a new analogue of doxorubicin: a preliminary overview of preclinical and clinical data. *Cancer Treat Rev* 10:1-22.
- Gérin M, Gosselin P, et Cordier S. (2003). Environnement et santé publique. *Fondements et pratiques.* 4 : 79.
- Goel A, Chauhan D P, et Dhawan D K. (2000). Protective effects of zinc in chlorpyrifos induced hepatotoxicity: a biochemical and trace elemental study. *Biol. Trace Elem. Res.* 74 (2): 171–183.
- Goel A, Dhawan D K. (2001). Zinc supplementation prevents liver injury in chlorpyrifos-treated rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 82 (1–3): 185–200.
- Goel A, Dani V, et Dhawan D K. (2005). Protective effects of zinc on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and hepatic histoarchitecture in chlorpyrifos-induced toxicity. *Chem. Biol. Interact.* 156 (2–3): 131–140.

- Goel A, Dani V, et Dhawan D K. (2006). Chlorpyrifos-induced alterations in the activities of carbohydrate metabolizing enzymes in rat liver: the role of zinc. *Toxicol. Lett.* 163 (3): 235–241.
- Gokcimen A, Gulle K, Demirin H, Bayram D, Kocak A, et Altuntas I. (2007). Effects of diazinon at different doses on rat liver and pancreas tissues. *Pestic. Biochem. Phys.* 87: 103–108.
- Gultekin F, Delibas N, Yasar S, et Kilinc I. (2001). 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. *Arch. Toxicol.* 75: 88–96.
- Gupta, R C. (2006) Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compound. *Elsevier Academic Press H.19* : 141-158.
- Habig W H, Pabst M J, et Jakoby W B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*; 249: 7130-7139.
- Hayes W.(1982). Organic phosphorus pesticides. In: Pesticides studied in man. Baltimore: Williams & Wilkins. p. 284-435.
- Hodgson E, et Rose R L. (2005). Human metabolism and metabolic interactions of deployment-related chemicals. *Drug Metabolism Reviews* . 37 (1): 1-39.
- Hodgson E, Rose R L. (2006). Organophosphorus chemicals: Potent inhibitors of the human metabolism of steroid hormones and xenobiotics. *Drug Metabolism Reviews.* 38 (1-2): 149-162.
- Hrejac I. (2009) Genotoxic, cogenotoxic and potential carcinogenic activity of model organophosphorous pesticides. Doctoral thesis, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia 2009.
- Hreljac I, Zajc I, Lah T, et Filipic M. (2008). Effects of model organophosphorous pesticides on DNA damage and proliferation of HepG2 cells. *Environ Mol Mutagen.* 49 (5): 360-7.
- Januel C, (2003). Stress oxydant au niveau des plaquettes sanguines humaines dans le contexte du diabète, étude du GSH et de Gpx4. Thèse de doctorat, institut National des sciences Appliquées de Lyon; p.p 41-57.
- Jett D A et Navoa R V. (2000). In vitro and in vivo effects of chlorpyrifos on glutathione peroxidase and catalase in developing rat brain. *Neurotoxicology.* 21: 141–145.
- Jokanovic M. (2001). Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology* .166 (3): 139–160.
- Joseph P D, Mannervik B. (2006) Molecular Toxicology. *New York: Oxford University Press.*
- Kalender Y, Kaya S, Durak D, Uzun F.G, et Demir F. (2012). Protective effects of catechin and quercetin on antioxidant status, lipid peroxidation and testishistoarchitecture induced by chlorpyrifos in male rats. *Environ. Toxicol. Pathol.* 33: 141–148.
- Kamanyire R et Karalliedde L. (2004). Organophosphate toxicity and occupational exposure. *Occupational Medicine-Oxford.* 54 (2): 69-75.
- Kammon A M, Barr R S, Sodhi S, Banga H S, Singh J, et Nagra N S. (2011). Chlorpyrifos chronic toxicity in broilers and the effect of vitamin C. *Open Vet. J.* 1: 21-27.
- Karmen A. (1955). A note on the spectrophotometric assay of glutamic-oxolacetic transaminase in human blood. *J Clin Invest.* 34:131.

Kell P J, Créer M H, Crown K N, Wirsig K, et Mchowat J. (2003) .Inhibition of platelet activating factor (PAF) acetylhydrolase by methyl arachidonyl fluorophosphonate potentiates PAF synthesis in thrombin-stimulated human coronary artery endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307: 1163-1170.

Khan S M, et Kour G. (2007): Subacute oral toxicity of chlorpyrifos and protective effect of green tea extract. *Pesticide and Biochemical Physiology*; 89:118-123.

Kiely T, Donaldson D, et Grube, A.(2004) Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances. systematic review. *Can Fam Physician.* 53(10):1704–1711.

Kojima H, Katsura E, Takeuchi S, Niyama K, et Kobayashi K. (2004). Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by in vitro reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells. *Environmental Health Perspectives.* 112 (5): 524-531.

Konradsen F, Van der Hoek W, Cole D C, Hutchison G, Daisley H, Singh S, et Eddleston M. (2003). Reducing acute poisoning in developing countries-options for restricting the availability of pesticides. *Tox.* 192: 249-261.

Kousba A A, Sultatos L G, Poet T S, et Timchalk C. (2004). Comparison of chlorpyrifos-oxon and paraoxonacetylcholinesterase inhibition dynamics: potential role of a peripheral binding site. *Toxicol. Sci.* 80: 239–248.

Koutros S, Alavanja M C, Lubin J H, Sandler D P, Hoppin J A, Lynch C F, Knott C, Blair A, et Freeman L E. (2010). An update of cancer incidence in the Agricultural Health Study. *J Occup Environ Med.* 52(11):1098–1105.

Lovric J, Mesic M, Macan M, Koprivanac M, Kelava M, et Bradamante V.(2008). Measurement of malondialdehyde (MDA) level in rat plasma after simvastatin treatment using two different analytical methods. *PeriodBiol.* 110:63–8.

Majhi C R, Khan S, Leo M D M, Manimaran A, Sankar P, et Sarkar S N. (2011). Effects of acetaminophen on reactive oxygen species and nitric oxide redox signaling in kidney of arsenic-exposed rats. *Food Chem. Toxicol.* 49: 974–982.

Mansour S A et Mossa A H. (2009). Lipid peroxidation and oxidative stress in rat erythrocytes induced by chlorpyrifos and the protective effect of zinc. *Pestic. Biochem. Phys.* 93: 34–39.

Mansour S A et Mossa A H. (2010). Oxidative damage, biochemical and histological alterations in rats exposed to chlorpyrifos and the antioxidant role of zinc. *Pest. Biochem. Physiol.* 96: 14-23.

Mansour S et Mossa A. (2010). Oxidative damage, biochemical and histopathological alterations in rats exposed to chlorpyrifos and the antioxidant role of zinc. *Pestic. Biochem. Physiol.* 96: 14–23.

Marnett L J. (1999) Chemistry and biology of DNA damage by malondialdehyde. *IARC Sci. Publ.* 150,17–27

Mates J M, Perez-Gomez C, et De Castro I N. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases, *Clin. Biochem.* 32: 595–603.

Mathew G, Rahiman M A, et Vijayalaxmi K K. (1990) In vivo genotoxic effects in mice of Metacid 50, an organophosphorus insecticide. *Mutagenesis* 5: 147-9.

Mehta A, Verma R S, et Srivastava N. (2009). Chlorpyrifos-induced alterations in the levels of hydrogen peroxide nitrate and nitrite in rat brain and liver. *Pest. Biochem. Phys.* 94:55-59.

Meister A. (1998). Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* 263: 17205-17208.

- Meyer A, Seidler F J, et Slotkin T A. (2004). Developmental effects of chlorpyrifos extend beyond neurotoxicity: critical periods for immediate and delayed-onset effects on cardiac and hepatic cell signaling. *Environ. Health Persp.* 112: 170–178.
- Miksys S, Lerman C, Shields P G, Mash D C, et Tyndale R F. (2003). Smoking, alcoholism and genetic polymorphisms alter CYP2B6 levels in human brain. *Neuropharmacology*. 45: 122–132.
- Milatovic D, Gupta R C, M. Aschner M. (2006). Anticholinesterase toxicity, oxidative stress. *Sci. World J.* 6 : 295–310.
- Mutch E et Williams F M. (2006). Diazinon, chlorpyrifos and parathion are metabolised by multiple cytochromes P450 in human liver. *Toxicology*. 224 (1-2): 22-32.
- Oral B, Guney M, Demirin H, Ozguner M, Giray S G, Take G, Mungan T, et Altuntas I. (2006) Endometrial damage and apoptosis in rats induced by dichlorvos and ameliorating effect of antioxidant vitamins E and C. *Reprod Toxicol.* 22(4): 783-90.
- Petrovitch H, Ross W, Abbott R D, Sanderson W T, Sharp D S, Tanner C M, Masaki K H, Blanchette P L, Popper J S, Foley D, Launer L, et White L R. (2002). Plantation work and risk of Parkinson disease in a population-based longitudinal study. *Arch. Neurol.* 59: 1787–1792.
- Poet T S, Wu H, Kousba A A, et Timchalk C. (2003). In vitro rat hepatic and intestinal metabolism of the organophosphate pesticides chlorpyrifos and diazinon. *Toxicol. Sci.* 72: 193–200.
- Poovala V S, Huang H, et Salahudeen A K. (1999). Role of oxygen metabolites in organophosphate-bidrin-induced renal tubular cytotoxicity. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10: 1746–1752.
- Possamai F P, Fortunato J J, Feier G, Agostinho F R, Quevedo J, Wilhelm Filho D, et Dal-Pizzol F. (2007). Oxidative stress after acute and sub-chronic malathion intoxication in Wistar rats, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23: 198–204.
- Qiao D, Seidler F J, Padilla S, et Slotkin T A. (2002). Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: what is the vulnerable period? *Environ. Health Persp.* 110: 1097–1103.
- Quistad G B, Liang S N, Fisher K J, Nomura D K, et Casida J E. (2006). Each lipase has a unique sensitivity profile for organophosphorus inhibitors. *Toxicological Sciences*. 91 (1): 166-172.
- Rahimi R, Nikfar S, et Abdollahi M. (2006). Increased morbidity and mortality in acute human organophosphate-poisoned patients treated by oximes: a metaanalysis of clinical trials. *Hum. Exp. Toxicol.* 25: 157–162.
- Rahimi R, et Abdollahi M. (2007). A review on the mechanisms involved in hyperglycemia induced by organophosphorus pesticides, *Pesticide Biochem. Physiol.* 88 : 115–121.
- Recknagel Jr RO, Glende R A, et Hruszkewycz M A. In: Pryor Jr EA, editor. Free radicals in biology, Vol. II. New York: *Academic Press*; 1976. p. 97–132.
- Rickett D L, Glenn J F, et Beers E T. (1986). Central respiratory effects versus neuromuscular actions of nerve agents. *Neurotoxicol.* 7: 225-236.
- Saleh A M, Vijayasarathy C, Masound L, Kumar L, Shahin A, et Kambal A. (2003). Paraoxon induces apoptosis in EL4 cells via activation of mitochondrial pathways. *Toxicol Appl Pharmacol.* 190: 47-57.
- Santiago M, Stüber F, Fortuny, Petras J M. (1981). Soman neurotoxicity. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1: 242-249.

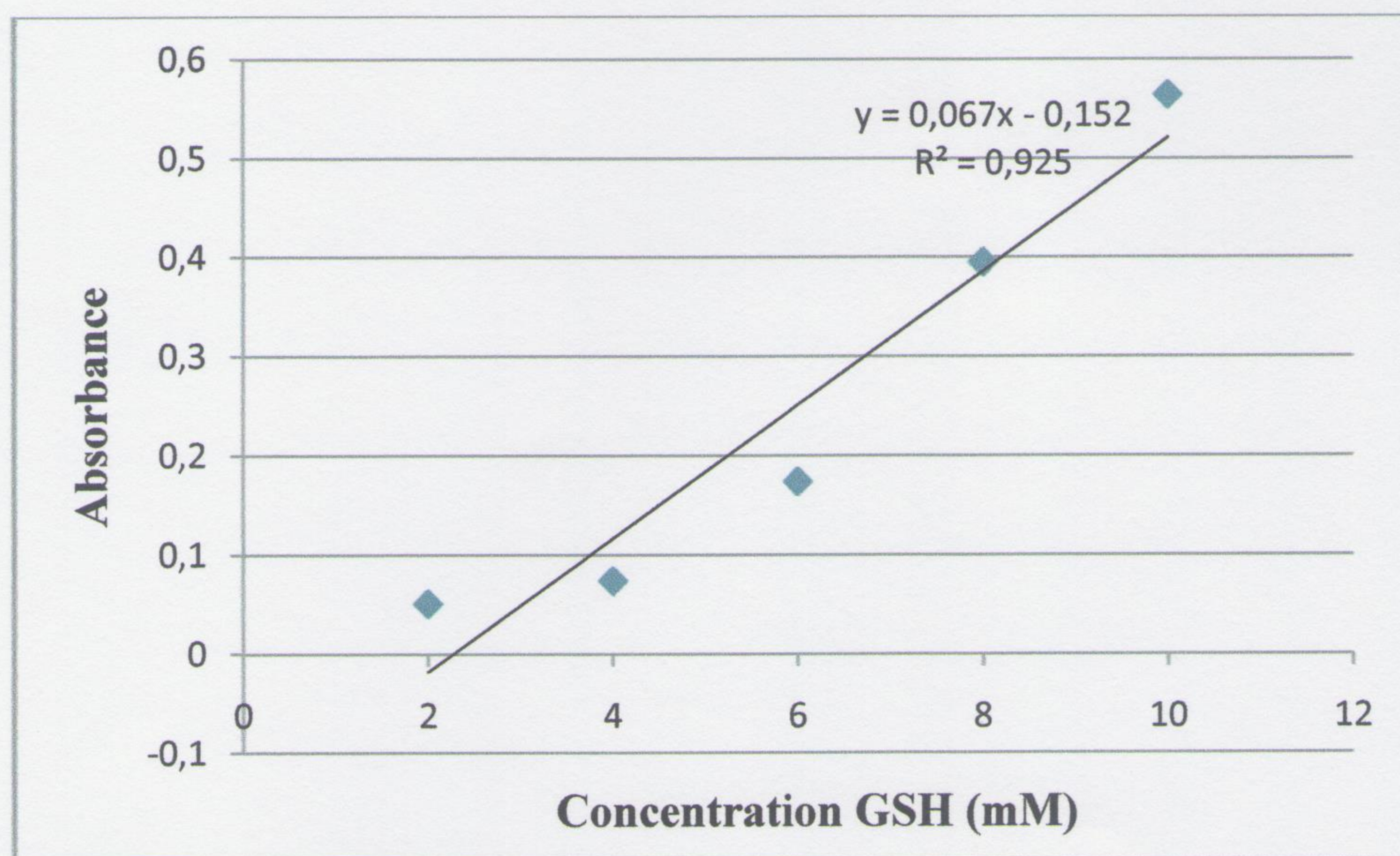
- Savolainen K. (2001). Understanding the toxic action of organophosphates, Handbook of Pesticide Toxicology, II Ed, *Academic Press, USA*. pp. 1013–1043.
- Schuh R A, Lein P J, Beckles R A, Jett D A. (2002). Noncholinesterase mechanisms of chlorpyrifos neurotoxicity: altered phosphorylation of Ca²⁺/cAMP response element binding protein in cultured neurons. *Toxicol Appl Pharmacol*. 182:176-185.
- Sharma Y, Bashir S, Irshad M, Gupta S D, et Dogra T D. (2005). Effects of acute dimethoate administration on antioxidant status of liver and brain of experimental rats. *Toxicology*. 206: 49–54.
- Shittu M, Ayo J O, Ambali S F, Fatihu, M Y, Onyeanusu B I, et Kawu, M U. (2012). Chronic chlorpyrifos-induced oxidative changes in the testes and pituitary gland of Wistar rats: ameliorative effects of vitamin C. *Pestic. Biochem. Phys.* 102, 79–85.
- Sidell F R et Borak J. (1992). Chemical warfare agent: nerves agents. *Ann Emerg Med*. 21: 865-71.
- Skinner M K et Anway M D. (2007) Epigenetic transgenerational actions of vinclozolin on the development of disease and cancer. *Crit Rev Oncog.* 13(1):75–82
- Slotkin T, Levin E, et Seidler F. (2006). Comparative developmental neurotoxicity of organophosphate insecticides: Effects on brain development are separable from systemic toxicity. *Environ. Health Perspect.* 114: 746–51.
- Sultatos L G et Murphy S D. (1983). Hepatic microsomal detoxification of the organophosphates paraoxon and chlorpyrifosoxon in the mouse. *Drug Metab. Dispos.* 11: 232–238.
- Sultatos L G, et Murphy S D. (1983). Kinetic analyses of the microsomal biotransformation of the phosphorothioate insecticides chlorpyrifos and parathion. *Fund. Appl. Toxicol.* 3: 16–21.
- Tamura H, Maness S C, Reischmann K, Dorman D C, Gray, L E, et Gaido K W. (2001). Androgen receptor antagonism by the organophosphate insecticide fenitrothion. *Toxicol Sci.* 60: 56-62.
- Tamura H, Yoshikawa H, Gaido K W, Ross S M, DeLisle R K, Welsh W J, et Richard A M. (2003) .Interaction of organophosphate pesticides and related compounds with the androgen receptor. *Environ Health Perspect.* 111: 545-552.
- Tang J, Cao Y, Rose R L, Brimfield A A, Dai D, Goldstein J A, et Hodgson E. (2001). Metabolism of chlorpyrifos by human cytochrome P450 isoforms and human, mouse, and rat liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* 29: 1201–1204.
- Taylor P, Hardman J G, Limbird L E, Molinoff P B, et Ruddon R W. (1996). Anticholinesterase agents. In: Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. *Hardcover*. P. 161-76.
- Teimouri F, Amirkabirian N, Esmaily H, Mohammadirad A, Aliahmadi A, et Abdollah M. (2006). Alteration of hepatic cells glucose metabolism as a non-cholinergic detoxication mechanism in counteracting diazinon-induced oxidative Stress. *Hum. Exp. Toxicol.* 25:697–703.
- Trasher J.D, Heuser G. et Broughton A. (2002). Immunological abnormalities in human chronically exposed to chlorpyrifos. *Arch. Environ. Health.* 57: 181–187.
- Tukappa H, Londonkar R, Nayaka H, et Kumar S. (2015). Cytotoxicity and hepatoprotective attributes of methanolic extract of *Rumex vesicarius*. *L. BIOL RES.* 48: 19-28.
- Uzun F G, Demir F, Kalender S, Bas H, et Kalender Y, (2010): Protective effect of catechin and quercetin on chlorpyrifosinduced lung toxicity in male rats. *Food and Chemical Toxicology.* 48:1714–1720.

- Uzun FG, Kalender Y (2013). Chlorpyrifos induced hepatotoxic and hematologic changes in rats: The role of quercetin and catechin. *Food Chem Toxicol* 55:549–556.
- Valko M, Rhodes C J, Moncol J, Izakovic M, et Mazur M. (2007). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*; 160: 1-40.
- Vandana S, Ram S, Ilavazhagan M, Kumar G D, et Banerjee P K. (2006). Comparative cytoprotective activity of vitamins C, E and betacarotene against chromium-induced oxidative stress in murine macrophages. *Biomed. Pharmacother.* 60: 71-76.
- Verma R, Mehta A, et Srivastava N. (2007). In vivo chlorpyrifos induced oxidative stress: attenuation by antioxidant vitamins. *Pestic. Biochem. Phys.* 88: 191–196.
- Vidyasagar J, Karunakar N, Reddy M S, Rajnarayana K, Surender T, Krishna D R. (2004). Oxidative stress and antioxidant status in acute organophosphorous insecticide poisoning. *Indian J. Pharmacol.* 36: 76–79.
- Washington, Konradsen F, Van der Hoek W, Cole D C, Hutchison G, Daisley H, Singh S, et Eddleston M. (2004). Reducing acute poisoning in developing countries - options for restricting the availability of pesticides. *Tox.*, 192: 249-261.
- Wright J R, Colby H D, et Miles P R. (1981). Cytosolic factors which affect microsomal lipid peroxidation in lung and liver. *Arch Biochem Biophys.* 206: 296 –304.
- Yu F, Wang Z , Ju B, Wang Y, Wang J, et Bai D. (2008) Apoptotic effect of organophosphorus insecticide chlorpyrifos on mouse retina in vivo via oxidative stress and protection of combination of vitamins C and E. *Exp Toxicol Pathol* 59 (6): 15-23.
- Zhang J L, Qiao C L, Lan W S. (2004). Detoxification of organophosphorus compounds by recombinant carboxylesterase from an insecticide-resistant mosquito and oxime-induced amplification of enzyme activity. *Inc. Environ. Toxic.* 19: 154–159.

1. Gamme d'étalonnage du GSH

Tableau 2. Concentration en GSH (mM) pour la réalisation de la gamme d'étalonnage

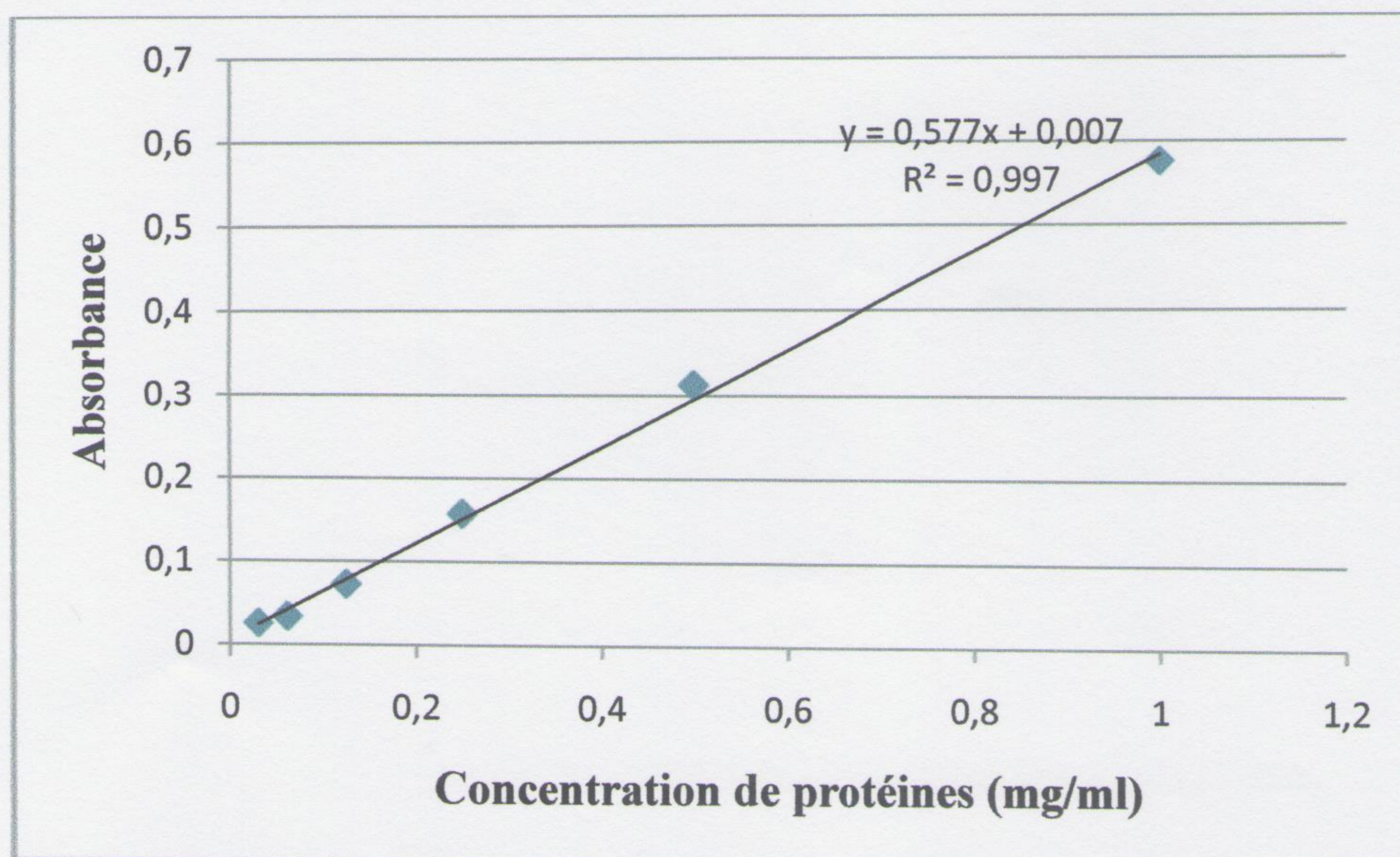
Concentration GSH (mM)	2	4	6	8	10
DO (412 nm)	0.051	0.074	0.174	0.395	0.564



2. Gamme d'étalonnage des protéines

Tableau 3. Concentration en BSA (mg/ml) pour la réalisation de la gamme d'étalonnage de protéines

Concentration en BSA (mg/ml)	0.031	0.062	0.125	0.25	0.5	1
DO (595 nm)	0.026	0.034	0.073	0.158	0.131	0.576



Dirigé par: Dr. RECHRECHE Hocine.

Présenté par: BOUBIDI Assia
ZITARI Sonia

Etude de l'hépatotoxicité induite par chlorpyrifos : Evaluation biochimique de l'état du stress oxydatif et de l'intégrité du foie.

Résumé :

Le chlorpyrifos est un insecticide organophosphoré largement utilisé, il provoque des effets toxiques sur les organismes, en particulier les mammifères. Ce travail avait pour objectif d'induire une hépatotoxicité aiguë chez les souris par le CPF après une étude préliminaire dont on a précisé la dose toxique non mortelle par 40mg/kg. Le sacrifice a été réalisé après 6h, 24h, 48h, 72h et 96h d'administration. L'effet hépatotoxique a été caractérisé par l'induction du stress oxydatif qui est démontré par la diminution de l'activité de catalase (CAT), la glutathion-S-transférase (GST) et le taux de glutathion avec une augmentation du niveau de MDA dans le foie, ainsi qu'une augmentation au niveau des paramètres sériques: PAL, TGO et TGP. Ces résultats ont démontré que le CPF a un effet hépatotoxique sur le foie de souris en induisant le stress oxydatif.

Mots clés: Hépatotoxicité, Chlorpyrifos, Antioxydant, Stress oxydatif, Peroxydation lipidique.

Abstract :

Chlorpyrifos is an organophosphate insecticide widely used, it causes toxic effects on organisms, particularly mammals. This work was intended to induce acute hepatotoxicity in mice by CPF after determination of the non-lethal toxic dose 40mg / kg by a preliminary study. The sacrifice was made after 6h, 24h, 48h, 72h and 96h of the administration. The hepatotoxic effect was characterized by the induction of oxidative stress which is demonstrated by the decrease in the activity of catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and glutathione levels, with increasing level MDA in the liver and an increase in serum parameters: PAL, TGO and TGP. These results demonstrated that the CPF has a hepatotoxic effect on the liver of mice by inducing oxidative stress.

Keywords: Hepatotoxicity, Chlorpyrifos, Antioxidant, Oxidative stress, Lipid peroxidation.

ملخص:

الكلوربيريفوس مبيد حشري فوسفور عضوي، يستخدم على نطاق واسع، يسبب تأثيرات سامة على الكائنات الحية، خاصة الثدييات. هدف الدراسة هو تحريض تسمم كبدي حاد عند الفئران عن طريق CPF بعد الدراسة الأولية التي تم من خلالها تحديد الجرعة السامة غير المميتة و المقدرة بـ 40مغ/كغ. التضحية تمت بعد 6سا، 24سا، 48سا، 72سا و 96سا بعد التزقيم وقد نتج عن فعل التسمم الكبدي تحريض الأوكسدة في الجسم التي تتجلى في انخفاض مستويات الجلوتاثيون ترانفيراز (GST)، الجلوتاثيون (GSH) و الكتلز (CAT) مع ارتفاع الدهن البروكسيدي في الكبد (MDA) و كذلك ارتفاع نسبة البروتينات معلمات المصل: (PAL, TGO et TGP). النتائج توضح أن CPF يملك عامل التسمم الكبدي لدى الفئران محفزا الاجهاد التأكسدي.

الكلمات المفتاحية : التسمم الكبدي، الكلوربيريفوس، مضاد الأوكسدة، الاجهاد التأكسدي، الأوكسدة الليبيدية.