

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Béjaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département Biologie physico-chimique
Spécialité Biochimie Fondamentale



Réf :

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

*Intérêt des substances bioactives dans
la protection des perturbations
physiologiques liées aux xénobiotiques*

Réalisé par :

M^{elle} SMAINI Faiza & M^{elle} SOUAGUI Yasmina

Soutenu le : 25/06/2023

Membres de jury :

Mme. Ayouni K.	MCB	Président
Mme. Mehenni C.	MCB	Promoteur
Mr. Zaidi H.	MCB	Examineur

Année universitaire : 2022 / 2023



Dédicace

Je dédie ce mémoire à :

À mes parents qui m'ont soutenu tout au long de cette carrière de 17ans, ma mère Brahmi. F qui a sacrifiée sa vie pour me voir toujours au sommet et à mon père Smaini. A qui était toujours présent à mes côtés et m'a soutenu afin de vivre ce jour.

A mon binôme Yasmina et camarade depuis toujours pour sa persévérance jusqu'à l'accomplissement de ce travail

A mes chères sœurs « Nesrine, Warda, Anaïs, Nancy » et frères « Oussama, Rayen » ceux qui m'ont soutenue tout au long de ces années d'études. Que Dieu le Tout Puissant vous gardes et vous procure santé et bonheur

Je remercie infiniment le professeur IGUER-OUADA.M et l'ingénieur de laboratoire Mme. INOURJA, sans oublier notre encadrant Mme. MEHENNI Chafiaa.

A toute ma famille, proche ou éloignée,

A tous mes amis,

A mes collègues de la promotion,

Enfin, à tous ceux que j'aime et qui m'aiment de prés et de loin.

Faiza



Dédicace

Je dédie ce mémoire à :

A mes chers parents

Les bougies de la famille, qui m'ont entourée par leurs amours et soutenu tout au long de ces années d'études et m'ont toujours donné confiance en moi et m'ont encouragé dans ma vie pour leurs sacrifices pour mon éducation et ma réussite. Je leur dis merci infiniment, et je l'ai remercié jamais assez.

Ama sœur et mes chers frères

Je les remercie pour leurs soutiens, encouragement

Ama binôme Faiza

Merci pour ces années qu'on a passé ensemble, des moments inoubliables, des bon souvenir.

A toute ma famille, proche ou éloignée,

A tous mes amis,

A l'ensemble du personnel du département BPC

Merci pour tout le temps que vous m'avez consacré et pour tout le savoir que vous m'avez transmis durant mon cursus.

Je remercie infiniment le professeur IGUER-OUADA.M et l'ingénieur de laboratoire Mme. INOURIA, sans oublier notre encadrant Mme. MEHENNI Chafiaa.

Enfin, à tous ceux que j'aime et qui m'aiment de près et de loin.

Yasmina

Remerciements

Nous remercions en premier lieu ALLAH le tout puissant pour toute la volonté et le courage qui nous a donnés pour l'achèvement de ce mémoire, il a été et sera toujours à côté de nous pour réussir à terminer n'importe quel travail.

Nous tenons à vous exprimer nos sincères remerciements à notre promotrice Mme. MEHENNI Chafiaa, non seulement pour avoir accepté de diriger ce travail, mais pour avoir tout mis en œuvre pour son bon déroulement grâce à votre disponibilité et à la qualité de vos conseils.

Nous vous remercions de nous avoir fait bénéficier de votre expérience, de votre patience à nous guider et surtout de la rigueur scientifique que vous avez sue nous inculquer, puissiez-vous trouver ici un témoignage de notre plus grande attention et de notre plus profond respect.

Nous adresserons aussi nos sincères remerciements aux membres du jury Mme AYOUNI. K et Mr Zaidi .H qui ont accepté d'enrichir ce modeste travail par leur expertise.

Nous remercions également le personnel du centre de transfusion sanguine (CTS) de Bejaia, ainsi qu'au le personnel du Laboratoire de la Faculté SNV de l'Université de Bejaia, qui nous a ouvert les portes et nous a fourni tous les moyens et équipements dont nous avons besoin.

Nos profonds remerciements vont également à nos chères familles et les personnes qui nous ont aidés et soutenus durant tout le long de notre cursus.

SMAINI Faiza & SOUAGUI Yasmina

Sommaire

Remerciements

Dédicace

Liste Des Abréviations

Liste Des Figures

Liste Des Tableaux

Introduction	01
I. Revue bibliographique	02
I.1 Généralités sur les pesticides	02
I.1.1. Définition	02
I.1.2. La classification des pesticides	02
I.1.3. Voies de pénétration des pesticides dans l'organisme	03
I.1.4. Influence des pesticides sur les fonctions physiopathologiques	04
I.2. Chlorpyrifos	05
I.2.1. Définition	05
I.2.2. Propriétés physico-chimiques	05
I.2.3. Mécanismes d'action de chlorpyrifos	06
I.2.4. Métabolisme du chlorpyrifos.....	07
I.2.5. Impact des pesticides sur les maladies neurodégénératives.....	08
I.3. Le stress oxydant	08
I.3.1. Radicaux libres	09
I.3.2. Rôles biologiques des espèces réactives d'oxygènes	10
I.3.3. La peroxydations des lipides	10
I.4. Mécanismes de défense antioxydant	11
I.4.1. Les anti-oxydants enzymatiques	11
I.4.2. Les anti-oxydants non enzymatiques	11
I.5. Les vitamines	12
I.5.1. La vitamine C	12
I.5.2. La vitamine E	13
I.6. Les érythrocytes	15
I.6.1. La membrane érythrocytaires	15
I.6.2. Hémoglobine.....	16
I.6.3. La méthémoglobine.....	17

II. Matériel et méthodes.....	18
II.1. Matériel	18
I.1.1. Matériel biologique.....	18
I.1.2. Appareils et équipements utilisés.....	18
I.1.3. Produits chimiques et réactifs.....	18
II.2. Méthodes	19
II.2.1. Préparation de la suspension érythrocytaires.....	19
II.2.2. Préparation de la solution antioxydants.....	19
II.2.3. Etude d'hématotoxicité de chlorpyrifos seul ou combiné avec les antioxydants.....	19
II.2.3.1. Test de turbidité cellulaire	20
II.2.3.2. Dosage de méthémoglobine et d'hémoglobine extracellulaire (libérée).....	20
II.2.3.3. Dosage de l'hémoglobine intracellulaire.....	20
II.2.4. Test de peroxydation lipidique.....	22
II.2.4.1. Principe.....	22
II.2.4.2. Protocole expérimentale.....	22
II.2.5. Test de la stabilité de l'hémoglobine.....	23
II.2.5.1. Protocole expérimentale.....	23
II.2.6. Analyse statistique.....	24
III. Résultats et discussion.....	25
III.1. Etude de la cytotoxicité de GRs induits par le chlorpyrifos.....	25
III.1.1. Induction de l'hémolyse.....	25
III.1.2. Etude de l'effet cytoprotecteur de la vitamine C, E et (C+E) sur la cytotoxicité.....	26
III.2.1. Taux de l'hémoglobine et de méthémoglobine extracellulaire.....	27
III.2.2. Etude d'hémoglobine et de méthémoglobine intracellulaire	29
III.3. Effet cytoprotecteur de la vitamine C, E et (C+E) sur la peroxydation lipidique.....	31
III.4. Test de stabilité d'hémoglobine	32
Conclusion	34
Références bibliographiques	35

Liste des tableaux

Tableau I : Classifications des pesticides selon leurs cibles.....	02
Tableau II : Quelques troubles physiopathologiques liés à l'exposition des pesticides.....	04
Tableau III : Propriétés physico-chimiques de CPF.....	05
Tableau IV : Espèces réactives de l'oxygène.....	09
Tableau V : Répartition des tubes de test de turbidité cellulaire.....	20

Liste des figures

Figure 01 : Structure chimique du chlorpyrifos.....	05
Figure 02 : Représentation chimique des molécules de CPF-éthyl et de CPF-méthyl.....	06
Figure 03 : Mécanisme d'action de chlorpyrifos.....	07
Figure 04 : Biotransformation du chlorpyrifos.....	07
Figure 05 : Espèces réactives oxygénées (ERO) et antioxydants.....	08
Figure 06 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et la nature de produits terminaux formé.....	10
Figure 07 : La structure de la vitamine C.....	12
Figure 08 : Structure chimique de la vitamine E.....	13
Figure 09 : Observation au microscope à balayage électronique des globules rouges.....	15
Figure 10 : La structure de la membrane du globule rouge.....	15
Figure 11 : Structure de l'hémoglobine.....	16
Figure 12 : La forme méthémoglobine.....	17
Figure 13 : Schéma récapitulatif de protocole expérimental des tests réalisés.....	21
Figure 14 : Schéma récapitulatif de protocole expérimentale de la peroxydation lipidique.....	23
Figure 15 : Turbidité cellulaire à différentes concentrations du pesticide CPF.....	25
Figure 16 : Turbidité cellulaire lors de l'induction d'hémolyse par CPF, et le prétraitement par différentes vitamines (vitamine C, E, et C+E).....	26
Figure 17 : Taux d'hémoglobine et méthémoglobine extracellulaire traité par pesticide et vitamines.....	28
Figure 18 : Taux d'hémoglobine et méthémoglobine intracellulaire traité par pesticide et vitamines.....	29
Figure 19 : Taux de MDA.....	31
Figure 20 : Taux d'hémoglobine traité par H ₂ O ₂ , CPF, vit C, vit E, vit C+E après la lyse cellulaire pour libérée l'hémoglobine.....	32

Liste des abréviations

¹O₂ : Oxygène singulier.

AA: Acide ascorbique.

Ach: Acétylcholine.

AchE : Acétylcholine estérase.

AchE-Er : Acétylcholinestérases érythrocytaires.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AGPI : Acides gras poly insaturés.

BPC : Biologie physico-chimique.

CPF : Chlorpyrifos.

CPFO : Chlorpyrifos-oxon.

CTS : Centre de transfusion sanguine.

CYP : Cytochrome P450.

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane.

DDVP : dichlorvos

DEP : Diéthylphosphate.

DETP : Diethylthiophosphate.

EC : Concentré émulsionnable.

EDTA : Acide éthylène-diamine tétra acétique.

ERO : Espèces réactives oxygénées.

GR : Globule rouge.

GRs : globules rouges

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

Hb : Hémoglobine.

HOCL : Acide hypochlorique.

HTC: Hématocrite.

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry.

MDA : Malondialdéhyde.

MDA-TBA : Complexe Malondialdéhyde- Acide thiobarbiturique.

MetHb : Méthémoglobine.

NaCl : Chlorure de sodium.

NaOH : Hydroxyde de sodium.

NO \cdot : Monoxyde d'azote.

O $_2^{\cdot-}$: Anion superoxyde.

OH \cdot : Radical hydroxyle.

OP : Organophosphorés.

pH : Potentiel d'hydrogène.

ROOH : Hhydroperoxydes.

rpm: Rond par minute (nombre de rotation).

SOD : superoxyde dismutase

TBA : Acide thiobarbiturique.

TCA : Acide trichloracétique.

TCP : 3,5,6 trichloro 2-pyridinol.

UV : Ultraviolet.

Vit C : Vitamine C.

Vit E : Vitamine E.

Introduction

Les xénobiotiques sont des molécules étrangères à l'organisme, généralement de nature organique, et qui peuvent produire des effets toxiques selon le moment, la durée et la dose d'exposition. La pollution des écosystèmes peut avoir différentes origines, notamment l'agriculture intensive qui constitue une grande source de la dispersion des pesticides dans l'environnement. L'objectif était d'une part la lutte contre les maladies nuisibles aux plantes, à l'homme et aux animaux, d'autre part l'amélioration du rendement et de la qualité des cultures (**Tudi et al., 2021**).

Les pesticides peuvent affecter les fonctions biochimiques et physiologiques des globules rouges (GR), ces dernières sont particulièrement sensibles aux dommages oxydatifs en raison de la présence d'une teneur élevée en acides gras poly-insaturés (AGPI) dans leurs membranes et des concentrations cellulaires élevées d'oxygène et d'hémoglobine (Hb) (**Prasanthi et al., 2005; Mansour et Mossa, 2009**).

Le stress oxydatif se produit lorsque la production de molécules nocives (les radicaux libres) excède la capacité de neutralisation du système de défense antioxydant. Au cours d'un fonctionnement normal, le corps produit des radicaux libres qui sont normalement neutralisés et détruits par les antioxydants. Dans le cas des carences en antioxydants, l'équilibre se rompt avec apparition du stress oxydatif annonciateur de maladies diverses (**Favier, 2006 ; Burton et Jauniaux, 2011 ; Sosa et al., 2013**).

Les antioxydants constituent un arsenal de défense contre les dommages oxydatifs en neutralisant les radicaux libres (**Baudin et al., 2020**). Selon le mécanisme d'action, on distingue les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (**Park et al., 2001**). Dans la présente étude, on s'intéresse aux antioxydants non enzymatiques plus exactement, la vitamine C (acide ascorbique) et la vitamine E (α -tocophérol), qui sont des molécules bioactives connues pour leur bonne réputation à l'égard des consommateurs et ainsi la facilité de leur commercialisation.

A la lumière de ces données et dans ce contexte, l'objectif de notre travail consiste à connaître l'intérêt des deux vitamines C et E contre le stress oxydant induit par l'insecticide chlorpyrifos sur les érythrocytes humains *in vitro*. Et pour cela, on suit un protocole expérimental ou on va doser la turbidité cellulaire, hémoglobine (Hb) et méthémoglobine (MetHb) intracellulaire et extracellulaire, la peroxydation lipidique, et la stabilité de l'hémoglobine comme des biomarqueurs de stress oxydant.

Chapitre I

Revue bibliographique

I.1. Généralités sur les pesticides

Le monde agricole a connu une révolution qui la progressivement fait passer à une activité industrielle. L'augmentation des rendements s'est faite en parallèle à une utilisation intensive de produits phytosanitaires (**Karami et Abdollahi,2011**). Ils assistent à une explosion d'utilisation de ces produits désignés d'une manière désagréable par le public sous le terme de « pesticide » dans plusieurs domaines, agricole, domestique, industriel et en médicale (**Rajapakse et al., 2012**).

I.1.1. Définition

Les pesticides sont un groupe de composés chimiques largement appliqués pour limiter le développement d'un large éventail d'organismes nuisibles, notamment les ravageurs, les insectes, les mauvaises herbes et autres (**Abhilash et Singh,2009 ; Rohani,2023**).

La consommation de pesticides est encore très élevée en Algérie (**Bettiche et al.,2017 ; Hadjer et al.,2018**). Plus de 480 de matières actives de pesticides sont enregistrées. En Algérie, Dans la région de zibans (Biskra), les primeurs sont cultivés sous serre, nécessitant d'importants apports de ressources chimiques (fertilisants et pesticides) (**Bettiche et al.,2017**).

I.1.2. La classification des pesticides

➤ Selon leurs cibles

Tableau I : Classifications des pesticides selon leurs cibles. (**Rohani,2023**).

Bactéricides	Contre	Bactéries
Insecticides		Insectes
Fongicides		Champignons
Herbicides		Mauvaises herbes
Acaricides		Acariens
Nématocides		Nématodes
Rodenticides		Rongeurs
Algicides		Algues
Piscicides		Poissons
Virucides		Virus
Avicides		Oiseaux
Molluscides		Escargots

➤ **Selon la composition chimique**

Il existe quatre principaux pesticides classés selon leur composition chimique : les organochlorés, les organophosphorés et les pesticides à base de plantes (Sulaiman et al., 2019).

Les pesticides organophosphorés (OP) : ont une efficacité modérément élevée et une moindre persistance (Yan et al., 2015). On les trouve couramment dans le sol, l'atmosphère, les eaux souterraines et les produits agricoles. (Exemple : Le parathion et le malathion), (Sulaiman et al., 2019).

Les organochlorés : sont des pesticides organiques qui contiennent au moins cinq atomes de chlore. Les pesticides organochlorés, peuvent provoquer des convulsions et des paralysies en perturbant le système nerveux de l'insecte cible (exemple : le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) et le chlordane) (Yadav et Devi ,2017 ; Sulaiman et al., 2019).

Les carbamates : les carbamates et les organophosphorés sont similaires en termes de structure et de principe de fonctionnement, Cependant, ces pesticides ont une origine différente de celle des carbamates, qui sont dérivés de l'acide carbamique, (exemple : Le carbaryl et l'aminocarb) (Sulaiman et al., 2019).

Pesticides pyréthroïdes synthétiques : définis comme une combinaison de pesticides organiques qui sont fabriqués par duplication des pyréthrines naturelles. Il s'agit de l'un des insecticides les plus sûrs qui puisse être appliqué sur les produits alimentaires, (exemple : cyperméthrine et la perméthrine) (Sulaiman et al., 2019).

I.1.3. Voies de pénétration des pesticides dans l'organisme

Les pesticides pénètrent dans le corps humain de trois manières principales :

Voie cutanée : L'exposition cutanée est la voie d'exposition la plus courante et la plus efficace (Krieger et al., 2000), pour les agriculteurs qui sont exposés aux pesticides en raison d'éclaboussures, de déversements ou de dérives de pulvérisation de pesticides (Mahaboonpeti et al., 2018) en particulier lorsqu'ils utilisent des pesticides en agriculture ou dans les activités ménagères (Siriwat et al., 2021).

Voie respiratoire : L'exposition respiratoire (par inhalation ou respiration) se produit en raison des composants volatils des pesticides (Msibi et al., 2021 ; Ratanachina et al., 2022), et est dangereuse pour la santé des travailleurs, en particulier pour leur nez, leur gorge et leurs

tissus pulmonaires s'ils inhalent de grandes quantités de pesticides dans l'environnement par l'air, l'eau et le sol (Tudi et al., 2021 ; Ratanachina et al., 2022).

Voie orale (digestive) : La voie la plus courante est l'exposition orale, qui provoque de graves problèmes de santé (Zhao et al., 2014 ; Lei et al., 2015). L'exposition orale aux pesticides peut survenir lorsque les personnes qui produisent ou utilisent des pesticides ne se lavent pas les mains avant de consommer des aliments contaminés par des pesticides ou de fumer (Kwong et al., 2021).

I.1.4. Influence des pesticides sur les fonctions physiopathologiques

Tableau II : Quelques troubles physiopathologiques liés à l'exposition des pesticides (Chubilleau et al., 2011).

Pathologie	Population cible	Exposition	Conclusion	Références
Cancer (de la prostate, de pancréas, du poumon, de l'ovaire)	Agriculteurs	Organochlorés ; Organophosphorés Thiocarbantes ;TriazinesFumigantes ; DDT Fongicides	Association claire entre cancer de la lèvre et pesticides uniquement	(Acquavella et al., 1998) ; (Brown, 2006) ; (Alvanaja, 2004)
Maladie de Parkinson	Consommateurs	Pesticides	Exposition aux pesticides augmente le risque de maladie de parkinson	(Brown, 2006) ; (Alvanaja, 2004)
Troubles neurologiques	Consommateurs	Pesticides Organophosphorés	Effets neurologiques Controversés	(Alvanaja, 2004)
Leucémie	Agriculteurs	Organochlorés Organophosphorés Carbamates	Association suggérée entre leucémie et activité agricole	(Alvanaja, 2004)
Cancer de la prostate	Agriculteurs	Organochlorés ; Organophosphorés Thiocarbantes ;TriazinesFumigantes	Association positive entre cancer de la prostate at activité agricole	(Alvanaja, 2004)

I.2. Chlorpyrifos

I.2.1. Définition

Le chlorpyrifos (CPF) (figure 1), un composé organophosphoré à large spectre, est un produit phytosanitaire efficace et largement utilisé contre une grande variété de ravageurs, notamment les insectes, les mauvaises herbes, les rongeurs, les champignons et d'autres agents pathogènes des plantes (**Huang et al., 2020**), (**Saulsbury et al., 2009**). Le chlorpyrifos est l'un des insecticides OP les plus utilisés dans le monde aujourd'hui (**Echeverri-Jaramillo et al., 2021**).

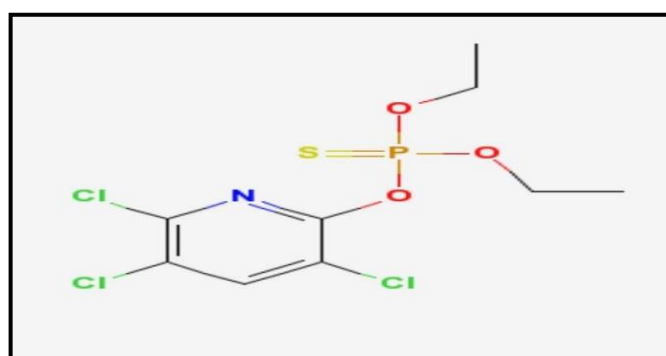


Figure 1 : Structure chimique du chlorpyrifos (**Saulsbury et al., 2009**).

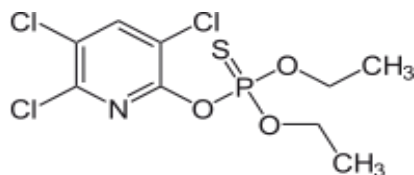
- **Utilisation** : le chlorpyrifos utilisé pour tuer des moustiques que des cancrelats, des larves de scarabées, des puces, des mouches, des fourmis et des poux (**Sawicki et al., 2018**). Il est utilisé aussi comme insecticide sur les graines, le coton, les fruits, les noix dans les champs et vergers. Il est aussi répertorié comme antiparasitaire en utilisation sur le mouton et les dindes, des logements domestiques, des bâtiments agricoles, des poubelles de stockage (**Ubaid Ur Rahman et al., 2021**).

I.2.2. Propriétés physico-chimiques :

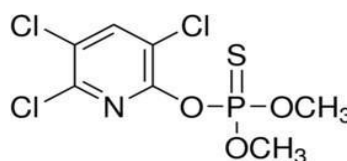
Tableau III : Propriétés physico-chimiques de CPF (**Bourai et Abdelghany, 2020**).

Nom propre	Chlorpyrifos
Nom IUPAC	O, O-diéthyl-O-3,5,6-trichloro-2-pyridylphosphonothioate
Formule moléculaire	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
Poids moléculaire	350.6 g/mol
Classification chimique	Pesticide organophosphoré
pH	4,5-6,5 (solution saturée)
Longueur d'onde maximale (λ_{max})	290 nm

- ✓ **Persistance** : La vitesse d'hydrolyse du CPF dans l'eau augmente en fonction du pH et de la température ainsi qu'en présence de cuivre. Le temps de demi-vie dans l'eau à 25°C est de 35 à 48 jours (**Eaton et al., 2008**).
- ✓ **Forme sur le marché** : poudre, granulés, suspension micro-encapsulées, liquide et gel (**Eaton et al., 2008**).
- ✓ **Les formes chimiques** : on peut trouver le CPF sous deux formes : le CPF-méthyl et le CPF-éthyl.



CPF-éthyl



CPF-méthyl

Figure 2 : Représentation chimique des molécules de CPF-éthyl et de CPF-méthyl (**Loyant, 2017**).

- ✓ La formulation commerciale testée dans cette étude est le PYRICAL 480 EC contenant 480 g/L de la molécule active.

I.2.3. Mécanisme d'action du Chlorpyrifos

Les organophosphorés, extrêmement lipophiles, Il surmonte facilement toutes les barrières biologiques et se lie de manière covalente au cholinestérase. Il se lie également aux acétylcholinestérases érythrocytaires (AChE-Er) et aux pseudocholinestérases ou « butyrylcholinestérases » du foie et du plasma. Ces dernières sont très sensibles mais peu spécifiques, renseignant généralement sur une exposition à un inhibiteur des cholinestérases (**Worek et al., 2005**).

L'action insecticide de la chlorpyrifos repose sur l'inhibition de l'activité de l'acétylcholine estérase (AChE) (**Ubaid Ur Rahman et al., 2020**). L'inhibition de l'AChE entraîne un niveau élevé d'acétylcholine (ACh) dans la synapse, ce qui se traduit par une sursimulation des cellules neuronales et des spasmes musculaires (figure 3) (**George et al., 2014**). Les cas graves peuvent entraîner une insuffisance respiratoire, une paralysie, voire la mort (**Echeverri-Jaramillo et al., 2021**). L'interaction covalente du CPF avec les sites actifs des enzymes de la cholinestérase (ChE) entraîne une phosphorylation et son inactivation, ce qui provoque une neurotoxicité à la fois chez les espèces d'insectes cibles et chez les vertébrés non ciblés.

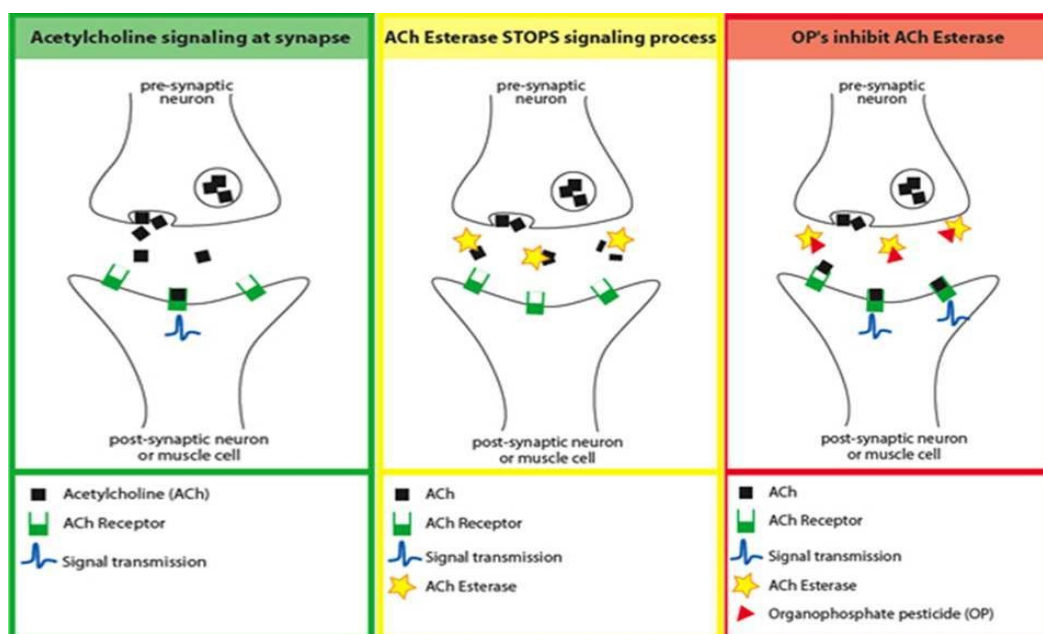


Figure 3 : mécanisme d'action de chlorpyrifos (George et al.,2014).

I.2.4. Métabolisme du chlorpyrifos

Le chlorpyrifos lui-même est incapable d'inhiber significativement l'AChE. D'une part, il est transformé à un métabolite actif : le chlorpyrifos-oxon (CPFO) par action des isoformes du cytochrome P450 (CYP). L'oxon peut être en suite hydrolysé par l'estérase A ou B en diéthylphosphate (DEP) et 3,5,6 trichloro 2-pyridinol (TCP) : C'est la voie de détoxification du CPF comme indique la (figure 4) sous dessous (Eaton et al., 2008). D'autre part, le CPF parent peut subir une dearylation et former le TCP et le diéthylthiophosphate (DETP), ce qui réduit sa toxicité in vivo. Le TCP peut être conjugué dans divers tissus avec l'acide glucuronique (médié par les glucuronyl transférases) ou le sulfate résultant un produit plus soluble dans l'eau qui peut être excrété dans la bile ou l'urine. (Cometa et al., 2007 ; Eaton et al., 2008).

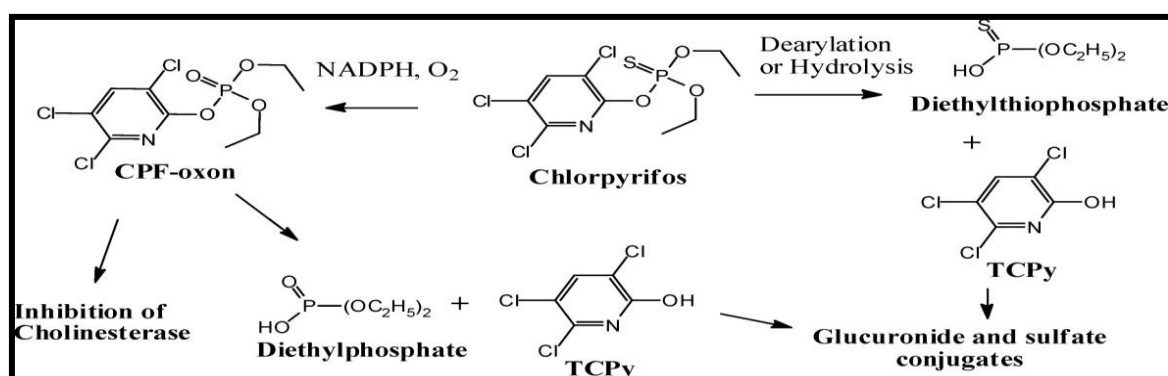


Figure 4 : Biotransformation du chlorpyrifos (Eaton et al., 2008).

I.2.5. Impact des pesticides sur les maladies neurodégénératives :

Des études épidémiologiques et environnementales récentes ont mis en évidence soulignant le rôle des pesticides dans le développement de diverses pathologies, exemples : cancer ; trouble de la reproduction, maladie neurodégénérative. Parmi les conséquences de l'exposition aux pesticides, les maladies neurodégénératives sont une source importante d'inquiétude, et ces études suggèrent un lien entre la survenue de maladies neurodégénératives et le statut d'agriculteur et/ou travaillant ou vivant à proximité d'une exploitation. Parmi ces maladies : maladie de Parkinson, maladie d'Alzheimer, et comme pour la sclérose latérale amyotrophique, peu d'études ont montré les effets des pesticides, et la maladie de Parkinson est la maladie neurodégénérative la plus fortement suspectée d'être liée à l'exposition aux pesticides (Thany *et al.*, 2013 ; Vidart d'Egurbide Bagazgoitia *et al.*, 2018).

L'inhibition de l'acétylcholine estérase est le mécanisme principal de la toxicité du chlorpyrifos, mais des preuves récentes suggèrent d'autres mécanismes. Plusieurs études ont montré le rôle du stress oxydatif dans l'empoisonnement induit par le CPF (Gultekin *et al.*, 2001 ; Ambali *et al.*, 2010).

I.3. Le stress oxydant

Le stress oxydatif fait référence à un état dans lequel l'oxydation et les effets antioxydants sont déséquilibrés et ont tendance à s'oxyder dans l'organisme, ce qui est un facteur important de vieillissement et de maladies (Zhang *et al.*, 2023).

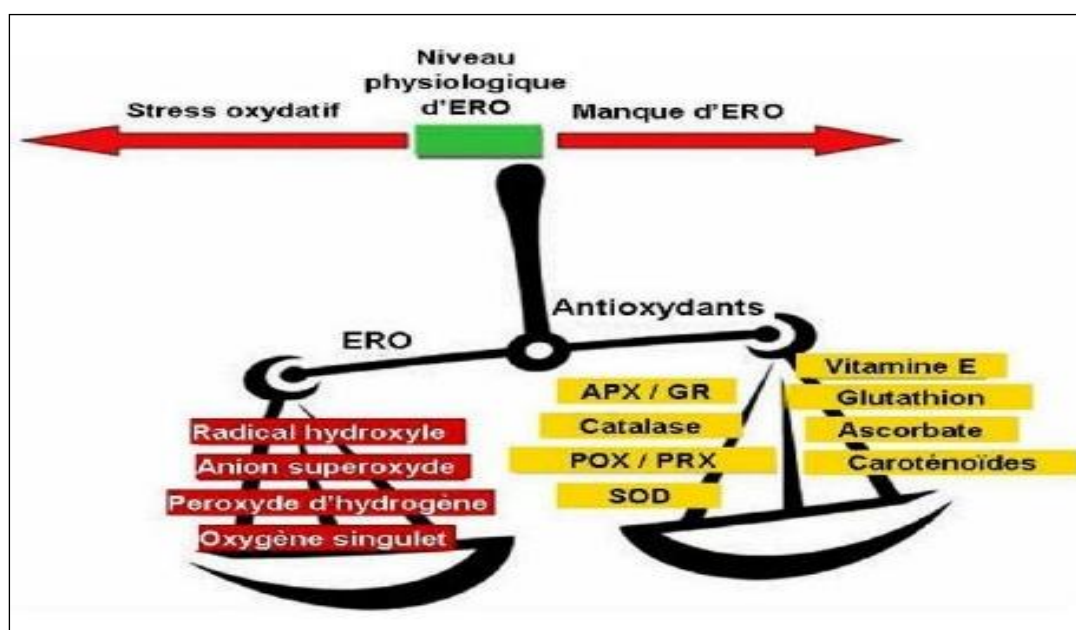


Figure 5 : Espèces réactives oxygénées (ERO) et antioxydants (Pourrut, 2008)

I.3.1. Radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) possédant au moins un électron célibataire (ou non apparié) sur leur couche externe et sont en générale très réactifs et instables (Maquart *et al.*, 2006 ; Valko *et al.*, 2007).

➤ Les sources des radicaux libres

Les sources des radicaux libres sont nombreuses. Il existe deux grandes voies de formation de ces derniers :

- La première voie consiste en un transfert d'électrons catalysé par les métaux de transition (Fe, Cu), ils transforment H_2O_2 en radical hydroxyle (OH°) encore plus toxique, et accélèrent la peroxydation lipidique.
- La deuxième voie se fait au niveau de la scission homolytique des liaisons covalentes des molécules. Cette voie nécessite de l'énergie qui pourra être fournie par les radiations ionisantes, par la lumière, la chaleur et les ultrasons.

• Sources endogènes

Les sources sont soit enzymatiques (xanthine oxydase, la NO synthase, etc...) ou non enzymatiques (phagocytoses, inflammation, etc...) (Valko *et al.*, 2007).

• Sources exogènes

Comprennent les radiations, les infections pathogènes, les pesticides, les toxines, les UV et la fumée de cigarette (Kregel *et Zhang*, 2007).

Les ERO peuvent être divisés en deux catégories : comme indiqué dans le tableau suivant :

Tableau IV : Espèces réactives de l'oxygène (Migdal *et al.*, 2011).

Espèces radicalaires	Espèces non radicalaires
Contient un ou plusieurs électrons non appariés dans son orbitale moléculaire :	N'a pas d'électrons non appariés mais est chimiquement réactif et peut être converti en radicaux libres ERO :
Anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$	Peroxydes d'hydrogènes H_2O_2
Radical hydroxyle HO^\cdot	Acide hypochlorique $HOCl$
Monoxyde d'azote NO^\cdot	Oxygène singulier 1O_2

I.3.2. Rôle biologique des espèces réactives d'oxygènes

➤ Actions non délétères

Les ERO jouent le rôle de seconds messagers, régulant divers processus physiologiques moléculaires, cellulaires et tissulaires. Elles sont impliquées dans la défense antibactérienne lors des réactions de cytotoxicité face aux agents pathogènes, la régulation des gènes par un phénomène appelé contrôle redox des gènes, la destruction par apoptose des cellules tumorales, la transduction de signaux cellulaires, la modulation du métabolisme cellulaire par interaction ligand – récepteur, le développement embryonnaire, la croissance, la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (Afonso *et al.*, 2007).

➤ Actions délétères

Formés en trop grande quantité, les ERO deviennent « pathologiques » en activant l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires ou des protéines d'adhésion (Haleng *et al.*, 2007). En outre, leur nature instable les rend très réactifs vis-à-vis de substrats biologiques et capables d'induire des modifications oxydatives délétères potentiellement impliquées dans l'apparition de pathologies telles que le cancer, les maladies coronariennes, les maladies cardiaques, les maladies respiratoires, et l'ostéoporose. Les Principaux cibles biologiques des ERO sont : l'acide désoxyribonucléique (ADN), les lipoprotéines ; les protéines et les lipides membranaires (peroxydation des lipides) (Haleng *et al.*, 2007 ; Satish et Dilipkumar, 2015).

I.3.3. La peroxydation des lipides

La peroxydation lipidique induit un mécanisme en chaîne de dégradation des acides gras au sein de ma membrane, conduisant à la formation d'hydroperoxydes (ROOH) qui sont eux-mêmes instables et réactifs. D'autres produits sont formés au cours de ce processus d'oxydation lipidique comme le malondialdéhyde (MDA) (Hong *et al.*, 2004).

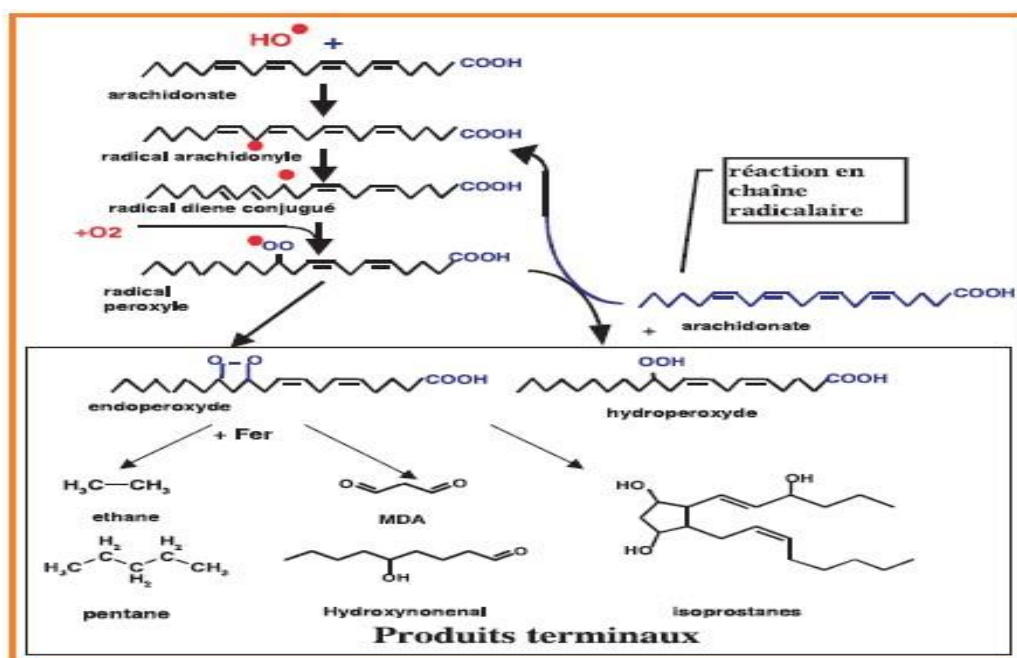


Figure 6 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et la nature des produits terminaux formés (Favier, 2003).

I.4. Mécanismes de défense antioxydant

Les antioxydants sont des piègeurs qui aident à réduire l'excès d'ERO et à maintenir l'équilibre oxydant-antioxydant du corps. Par antioxydant, on entend toutes les substances qui, à de faibles concentrations, sont capables de retarder ou d'inhiber significativement l'oxydation des substrats. (Sathiya et al., 2015). Ils sont soit produits dans le corps (endogènes), soit ingérés par la nourriture (exogènes). Selon le mécanisme d'action, on distingue les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques. (Park et al., 2001).

I.4.1. Les antioxydants enzymatiques

Le corps humain se protège des radicaux libres en synthétisant des enzymes qui les neutralisent. Les principales enzymes antioxydantes sont la catalase, la superoxyde dismutase et la glutathion peroxydase (Vincent et al., 2004).

I.4.2. Antioxydants non-enzymatiques

Les antioxydants non enzymatiques sont naturellement présents dans les végétaux et les aliments et dont le rôle essentiel est de neutraliser les effets toxiques des ERO (Pizzino et al., 2017). On peut distinguer deux types : les antioxydants endogènes (le glutathion et l'acide urique) et les antioxydants exogènes (vitamine E, vitamine C, composés phénoliques, flavonoïdes et caroténoïdes) (Valko, 2007 ; Zhao et al., 2009).

I.5. Les vitamines

Les vitamines sont des agrégats de substances organiques, elles sont vitales car sont actives en très petite dose et l'organisme ne sait pas comment la synthétiser. Ses tâches sont diverses et sa classification est basée sur la solubilité (Guilland *et al.*, 2007).

I.5.1. La vitamine C

➤ Définition

La vitamine C (Vit C) ou acide ascorbique (AA) (figure 7), est un nutriment hydrosoluble essentiel qui ne peut pas être synthétisé ou stocké par l'homme (Carr *et al.*, 2017), fut établie par Haworth en 1932, sensible à la chaleur, aux ultraviolets et à l'oxygène, composée de six carbones, similaire au glucose $C_6H_8O_6$ (Kyle *et Shampo*, 2002). Dans les organismes, Il possède une fonction ène-diol, deux fonctions alcool et une fonction lactone qui les carbones C_1 et C_4 (Guilland *et al.*, 2007)

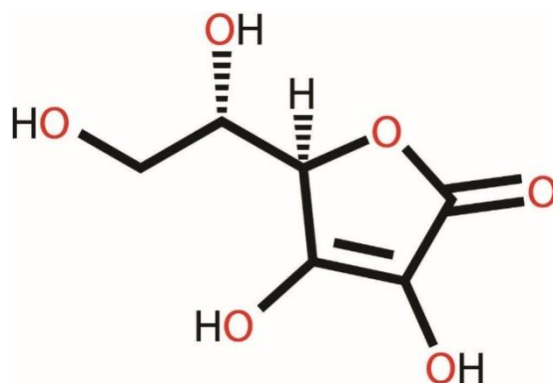


Figure 7 : la structure de la vitamine C (Devaki *et Reshma*,2017).

➤ La source de la vitamine C

La vitamine C se trouve principalement dans les légumes frais, en particulier les agrumes, les fruits frais et les légumes verts (Fujita *et al.*,2001).

➤ Mécanisme d'antioxydant

L'acide ascorbique réagit avec les radicaux libres soumis à une oxydation à un seul électron pour produire un intermédiaire réactif relativement pauvre, le radical ascorbyle, qui se disproportionne en ascorbate et en déhydroascorbate. Ainsi, l'acide ascorbique peut réduire les espèces réactives toxiques de l'oxygène (Devaki *et Reshma*,2017).

➤ **Les rôles physiologiques et avantages de l'acide ascorbique**

Impliqué dans la synthèse du collagène, de la tyrosine, de la carnitine, du cholestérol et des acides biliaires. Il est également impliqué dans le métabolisme du fer et joue un rôle dans l'élimination des agents cancérogènes (**Feng et al., 2005**).

I.5.2. La Vitamine E

➤ **Définition**

La vitamine E (α -tocophérol) est le principal antioxydant. Elle neutralise les radicaux libres et stoppe la chaîne de réactions de peroxydation des lipides. Cette vitamine devient à son tour un radical moins réactif, qui pourra être régénéré par l'acide ascorbique (**Bationo et al., 2015**). La vitamine E est reconnue comme antioxydant, grâce à sa capacité à inhiber les peroxydations lipidiques (**Cuvelier et al., 2003**).

➤ **Structure**

Est un groupe de composés contenant 8 composés naturels :

La vitamine E fait partie de la famille des tocophérols. Cette famille comprend 4 substances : l' α -tocophérol, qui est la vitamine E proprement dite, le β -tocophérol, le γ -tocophérol et le δ -tocophérol. Ces composés ont, par ailleurs, beaucoup de similitudes structurelles avec 4 autres molécules appartenant à la famille des tocotriénols : l' α -tocotriénol, le β -tocotriénol, le γ -tocotriénol et le δ -tocotriénol (**Cuvelier et al., 2003**).

La structure chimique des tocophérols se compose d'un cycle chromanol mono-, di-, ou tri-méthylé auquel se trouve rattachée une chaîne carbonée latérale (chaîne phytyle) saturée de 16 carbones. Les tocophérols diffèrent entre eux seulement par le nombre et l'arrangement des groupements méthyles autour du cycle benzène du noyau chromanol (**Fernholz, 1938 ; Cuvelier et al., 2003**).

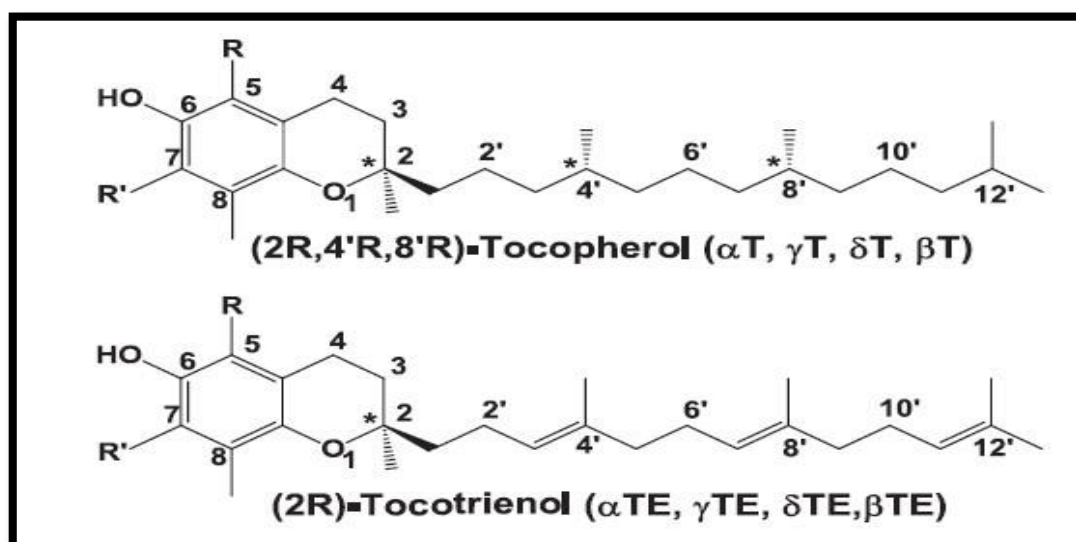


Figure 8 : Structure chimique de la vitamine E (Jiang, 2014).

➤ Rôles dans l'organisme

La principale fonction de la vitamine E est sa capacité anti-oxydant : elle protège les membranes des cellules de l'organisme en piégeant les radicaux libres et en empêchant leur propagation. Elle inhibe les peroxydations lipidiques (Cheesman et Slater, 1993). En plus de son action anti-oxydant, la vitamine E jouerait un rôle dans l'agrégation plaquettaire (évite une trop importante agrégation) et dans les processus inflammatoires. (Cuvelier et al., 2003).

➤ Origines de la vitamine E

La vitamine E existe sous formes naturelles (animal : dans les viandes, les œufs, le foie, le lait et ses dérivés /végétale : dans céréales et les huiles ainsi que dans les fruits secs tels que les noisettes, les arachides et les amandes) ou synthétiques (l' α -tocophérol on peut la trouver dans les suppléments alimentaires en vitamine E. et également sous la forme l'acétate ou le succinate de tocophérol (Cuvelier et al., 2003).

❖ Effet synergique de la vitamine C et de la vitamine E

De nombreuses études ont montré les effets synergiques de la vitamine C et de la vitamine E. En fait, la capacité de la vitamine C à stocker et à régénérer la vitamine E in vivo est bien documentée. Étant donné que la vitamine E est régénérée par la vitamine C, l'administration de vitamine C et de vitamine E peut contrecarrer plus efficacement les effets néfastes du stress oxydatif (Guilland, 2011).

I.6. Les érythrocytes

Les érythrocytes ont été utilisés comme un modèle simple pour étudier le stress oxydant induit par chlorpyrifos, on raison de leurs disponibilité et facilités de préparation (facilement séparer de plasma par centrifugation). Aussi, les érythrocytes sont considérés parmi les cibles directes de la toxicité par les pesticides.

Les globules rouges (GR), hématies, ou érythrocytes, chargées d'acheminer l'oxygène vers les tissus de l'organisme et le dioxyde de carbone des tissus de l'organisme vers les poumons. Ils possèdent une forme discoïdale, sont dépourvus de noyau et de la plupart des organites, ont un diamètre de 6-8 microns (figure 9) (Inaba *et al.*, 1996), et contiennent principalement de l'hémoglobine (Barbalato et Pillarisetty, 2022). Ces cellules font partie du composant hématopoïétique et mettent 7 jours à se former. Proviennent de la moelle osseuse et a préalablement circulé dans le sang pendant 120 jours décomposé dans la rate (Bhargava *et al.*, 2018).

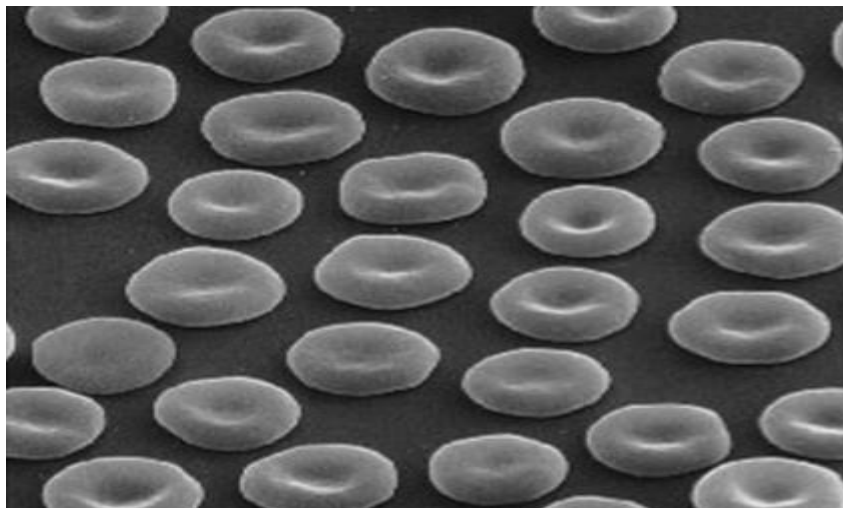


Figure 9 : Observation au microscope à balayage électronique des globules rouges

(Inaba *et al.*, 1996).

I.6.1. La membrane érythrocytaire

La membrane érythrocytaire est constituée d'une double couche lipidique dans laquelle s'insère nombre important des protéines reliées au cytosquelette sous membranaire (figure 10). Certaines de ces glycoprotéines et certains glycolipides expriment à la surface du globule des déterminants des groupes sanguins, le cytosquelette comprend plusieurs protéines dont la spectrine, l'ankyrine et l'actine (Manaargadoo-catin *et al.*, 2016).

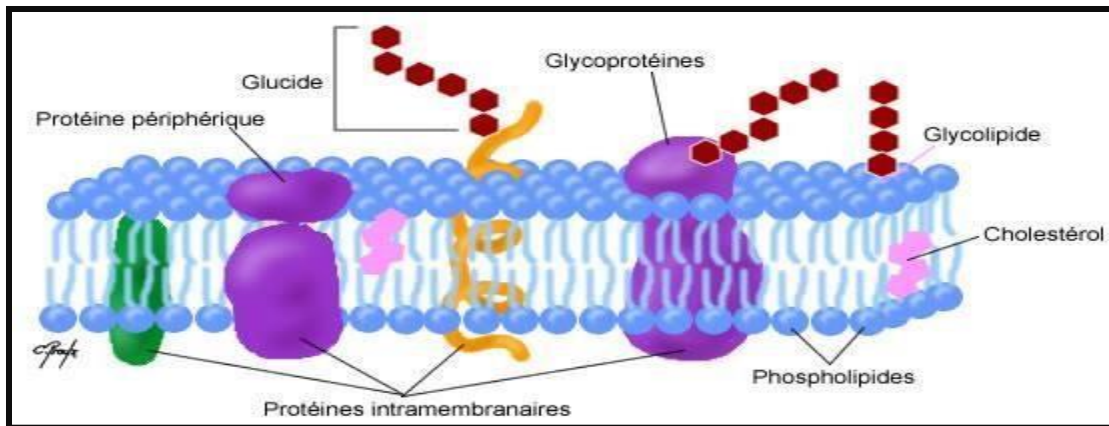


Figure10 : la structure de la membrane du globule rouge

I.6.2. Hémoglobine

L'hémoglobine est molécule d'échange de gaz présente dans les globules rouges qui est responsable de l'apport d'oxygène aux tissus et par la suite de l'élimination du dioxyde de carbone (Butcher et al.,2014).

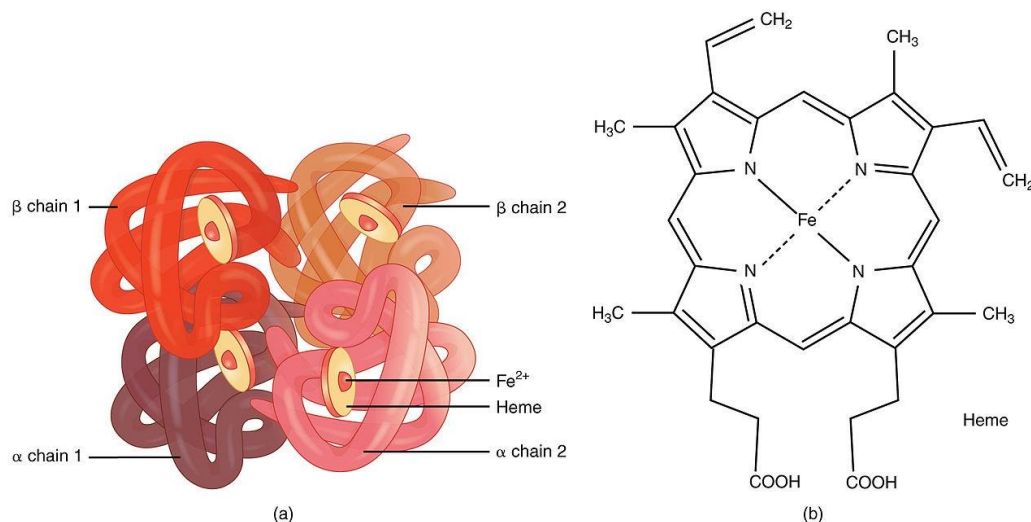


Figure 11 : structure de l'hémoglobine (Panawala, 2017).

C'est une molécule caractéristique des globules rouges, c'est une métalloprotéine contenant de fer qui se trouve à l'intérieur des hématies et est responsable de couleur rouge de sang, c'est un tétramère de chaîne de globine (α et β) (figure 11) (Panawala, 2017), et chaque unité globine est associée à un groupe hème, qui contient un atome de fer capable de s'associer à l'oxygène (Bauer et al.,2012).

I.6.3. La méthémoglobine

La méthémoglobine (MetHb) (figure 12), c'est la forme oxydée de l'hémoglobine, elle se forme lorsque l'oxydation de l'atome de fer ferreux de l'Hb (ion Fe^{2+}) en fer ferrique (ion Fe^{3+}) par un agent oxydant, la MetHb ne peut pas lier ou transporter des molécules d'oxygène puisque la sixième position de coordination du fer est liée soit à une molécule d'eau, soit à un groupe hydroxyle. De plus, la présence de MetHb augmente l'affinité des groupes Hb ou hèmes restants pour l'oxygène, ce qui rend plus difficile la libération d'oxygène dans les tissus, il peut causer des problèmes de santé connus sous le nom de méthémoglobinémie. Normalement, 1-2 % de l'Hb d'une personne est MetHb. Un pourcentage plus élevé, peut être d'origine génétique ou causé par l'exposition à divers produits chimiques (Kaewprayoon et *al.*, 2020).

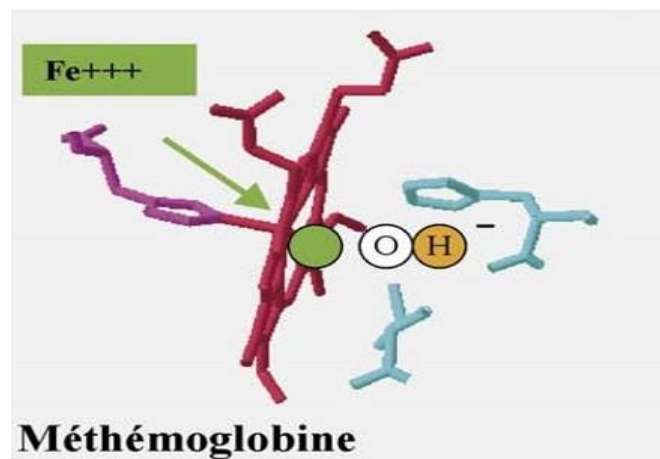


Figure 12 : La formes de méthémoglobine (Wajcman, 2005).

Chapitre II

Matériel et Méthodes

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel

Ce travail ayant pour but d'évaluer l'effet cytoprotecteur de molécules antioxydantes vis-à-vis de la toxicité induite par le pesticide chlorpyrifos. Il a été réalisé au niveau de laboratoire de BPC, de l'Université Abderrahmane mira de Béjaia.

II.1.1. Matériel biologique

Toutes les expériences ont été réalisées sur des globules rouges sains provenant du sang humain. Le sang a été obtenu au sein du centre de transfusion sanguine (CTS) de Béjaia et conservé au frais dans des poches à 4 °C.

II.1.2. Appareils et équipements utilisés

- Balance analytique / balance de précision (KERN).
- Centrifugeuse réfrigérée (Centrifuge 5702 R, eppendorf).
- Réfrigérateur.
- Bain Marie (memmert).
- Vortex (VELP, SCIENTIFICA).
- Spectrophotomètre à UV (JENWAY, 7305 Spectrophotometer).
- Portoirs, micropipettes.
- Verrerie (Becher, fioles, éprouvettes, tubes secs et en verre, erlen Meyer, éprouvettes, entonnoirs ...).
- Barreau magnétique.
- Agitateur magnétique (VELP, SCIENTIFICA).
- pH mètre.

II.1.3. Produits chimiques et réactifs

- Chlorpyrifos (pesticide)
- Acide ascorbique (vitamine C).
- α - tocophérol (vitamine E).
- Chlorure de sodium (NaCl).
- Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).
- Hydroxyde de sodium (NaOH).
- Acide thiobarbiturique (TBA).
- Acide trichloracétique (TCA).
- Acide éthylène-diamine tétra acétique (EDTA).

II.2. Méthodes

II.2.1. Préparation de la suspension érythrocytaire

Un volume de 4 ml de sang était prélevé dans un premier temps à l'aide d'une seringue, ensuite réparti dans des tubes. Ces derniers ont été centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min. Le plasma et la couche fine blanchâtre (plaquettes et leucocytes) ont été soigneusement éliminés puis remplacés par une solution isotonique (le volume prélevé doit être remplacé par le même volume de NaCl à 0,9%, afin de garder l'état hydrique des cellules). Des lavages des GRs (culot) avec de l'eau physiologique 2 à 3 fois ont été effectués.

C'est à partir du sang isotonique obtenu, qu'une solution d'hématocrite à 20% a été préparée.

II.2.2. Préparation des solutions antioxydants

Les antioxydants utilisés sont les vitamines (C et E), solubilisés dans du NaCl à 0,9%, la vitamine C à une concentration de 0,1 mg/ml et la vitamine E 0,25 mg/ml.

II.2.3. Études d'hématotoxicité du chlorpyrifos seul ou combiné avec les antioxydants

Le principe de base de cette méthode consiste à traiter les globules rouges avec une concentration optimale du pesticide CPF préparée préalablement et de déterminer la turbidité cellulaire, le taux d'hémoglobine libérée et le taux d'hémoglobine intracellulaire par spectrophotométrie.

➤ Optimisation de la concentration de l'oxydant (pesticide)

Dans le but d'optimiser la concentration nécessaire pour avoir un effet cytotoxique estimable sur 50% des érythrocytes. La solution de pesticide est préparée dans du NaCl à 0,9% à différentes concentrations (250 µg/ml ; 150 µg/ml ; 100 µg/ml ; 50 µg/ml et 25 µg/ml).

II.2.3.2. Test de turbidité cellulaire

A partir de l'hématocrite à 20%, des échantillons sont préparés et répartis suivants (Tableau V) le protocole de **Bellik** et ses collaborateurs (2016) avec quelques modifications.

Tableau V : Répartition des tubes de test de turbidité cellulaire

Echantillon	Mélange réactionnel
Tubes témoin négatif	Un volume (μ l) d'hématocrite + un volume de solution isotonique (NaCl 0,9%).
Tubes cytotoxicité (pesticide)	Un volume d'hématocrite + un volume de solution isotonique.
Tubes cytoprotecteur (vitamines)	Un volume d'hématocrite+ un volume de l'un des antioxydants (vit C ; vit E et vit C+E).

Les tubes ensuite sont incubés pendant 30 min à 37°C, après l'incubation 400 μ l de pesticide est ajouté pour les tubes de cytotoxicité et ceux de cytoprotection à l'exception du témoin négatif, là où on rajoute du l'eau physiologique à 0,9%. L'incubation est poursuivie à 37°C pendant 15 min.

Une fois le temps est écoulé, un volume de 200 μ l est prélevé de chaque tube est diluée dans 4 ml du NaCl (0,9%), dans le but de mesurer la turbidité cellulaire à une longueur d'onde de 620 nm.

II.2.3.3. Dosage de méthémoglobine et d'hémoglobine extracellulaire (libérée)

Les échantillons précédents ont été centrifugés pendant 10 min à 3000 rpm. Puis les surnageants ont été récupérés et des absorbances de méthémoglobine et d'hémoglobine à une longueur d'onde 540 et 412 nm ont été mesurés respectivement à l'aide d'un spectrophotomètre.

II.2.3.4. Dosage de l'hémoglobine intracellulaire

Le culot cellulaire contenant des GRs intactes, est centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min, après avoir lysé les cellules avec du l'eau distillée pour libérer l'hémoglobine intracellulaire, récupéré les surnageants et mesurée l'absorbance à 412 nm (**Mitrofan-Oprea et al., 2007**).

Le schéma au-dessous (figure 13) illustre le protocole expérimental suivi durant l'expérience lors l'induction de l'hémolyse par le pesticide et la protection par les vitamines.

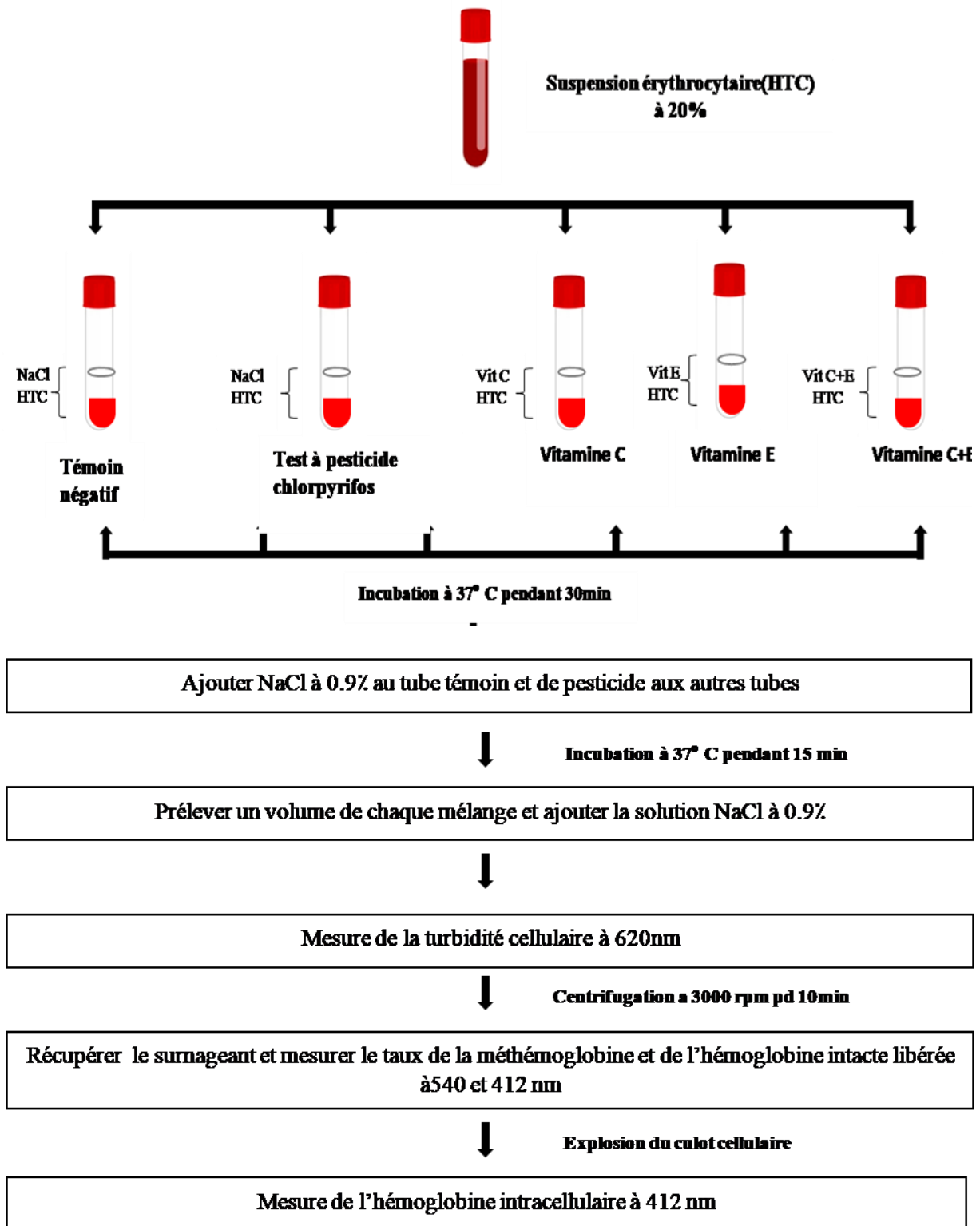


Figure 13 : Schéma récapitulatif de protocole expérimental des tests réalisés.

II.2.4. Le test de peroxydation lipidique

II.2.4.1 Principe

On appelle une peroxydation lipidique, la dégradation des lipides membranaires suite à une attaque radicalaire en induisant la formation des aldéhydes toxiques appelés Malondialdéhyde (MDA). L'objectif de ce test est de mettre en évidence l'action d'un pesticide sur la membrane phospholipidique des globules rouges, qui est riche en acide gras polyinsaturés sensibles à l'action des radicaux libres (Ayala et al., 2014).

Un test de protection de la peroxydation lipidique a été réalisé pour mettre en évidence le mode d'action des substances naturelles (vitamines) sur la protection des membranes phospholipidiques des GRs contre le CPF (inducteur de stress oxydant).

La méthode est basée sur la mesure des absorbances de complexe MDA-TBA à une longueur d'onde de 535 nm.

II.2.4.2 Protocole expérimentale

Des échantillons ont été préparés à partir d'hématocrite à 20% ont été préparés et répartis comme le teste de cytotoxicité du pesticide seul ou combiné avec les antioxydants (II.2.3). Après la deuxième incubation, 500 µl de l'acide trichloracétique (TCA) ont été ajoutés puis le mélange a été incubé à 0°C pendant 1heures.

Les tubes ont été ensuite centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min puis 250 µl d'acide thiobarbiturique (TBA, 1%) avec 75 µl d'Éthylène diamine tétra-acétique (EDTA ; 0,1M) sont ajoutés à 1 ml de surnageant, suivis d'un chauffage à 95°C pendant 30 minutes. Après refroidissement des tubes, les absorbances des échantillons ont été mesurées à 535 nm (Devasaganyam et al., 2003).

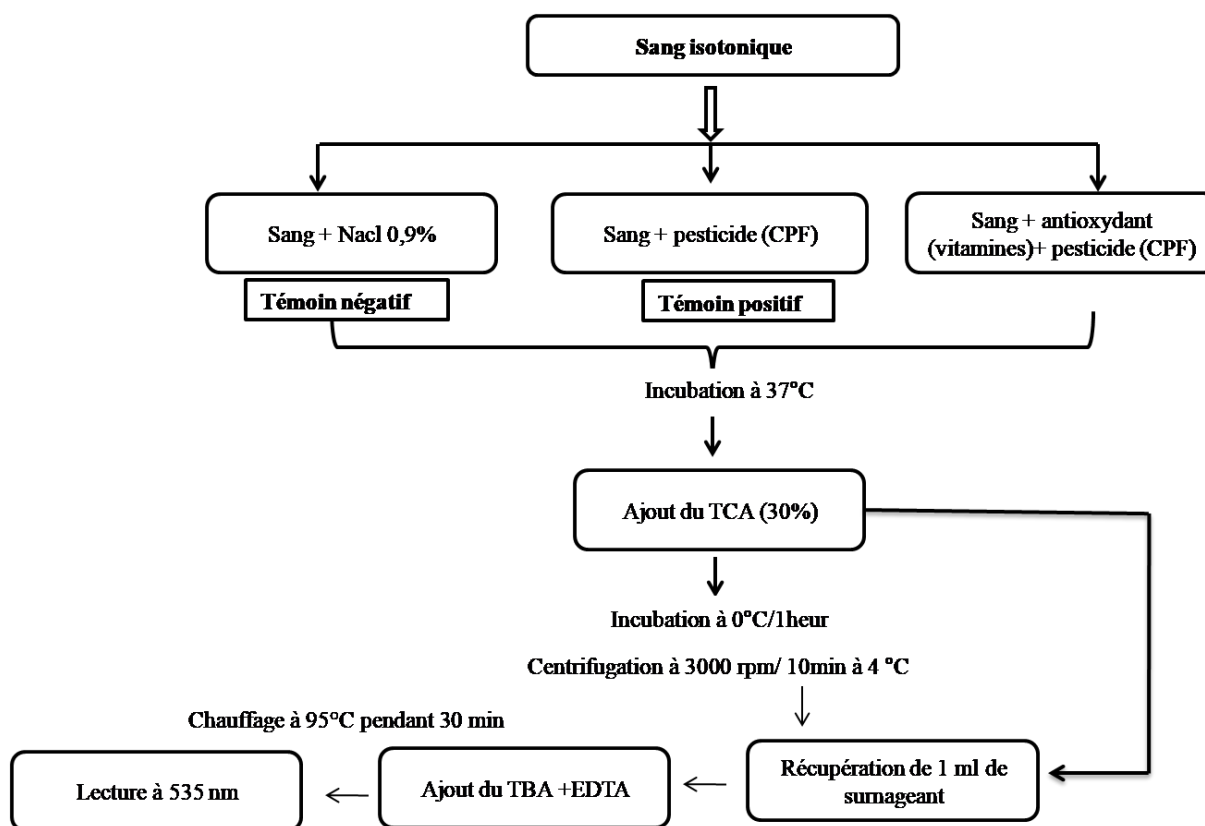


Figure 14 : Schéma récapitulatif de protocole expérimentale de la peroxydation lipidique (Devasagayam *et al.*, 2003)

II.2.5 Test de stabilité de l'hémoglobine

Plusieurs xénobiotiques (pesticides) sont capables de pénétrer à l'intérieur des cellules sanguines et provoquent l'oxydation de l'hémoglobine, d'où l'intérêt d'utilisation des molécules antioxydantes (vitamines) pour prévenir les altérations oxydatives de l'Hb.

Ce test envisage l'effet oxydant direct de la molécule de pesticide (CPF), sur les érythrocytes, en utilisant l'hémoglobine comme molécule indicatrice de l'état oxydatif. Ce dernier peut se traduire par une dénaturation et une modification de sa conformation (Mitrofan-Oprea *et al.*, 2007, Bellik *et al.*, 2016).

II.2.5.1 Protocole expérimentale

Un volume de 4 ml du sang a été centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min, puis des lavages à l'aide d'une solution isotonique (NaCl, 0,9%) 2 à 3 fois ont été effectués. Cette suspension a été lysée

et diluée dans de l'eau distillée et centrifugée (3000 rpm, 10 min). Encore une fois afin de récupérer l'hémoglobine.

➤ **Préparation de gamme de tube à manipulée :**

1. **Tubes témoins négatives** : un volume de surnageant plus un volume de NaCl (0,9%).
2. **Tubes témoins positif** : un volume de surnageant plus un volume de NaCl plus un volume de H₂O₂.
3. **Tubes de l'oxydant (CPF)** : un volume de surnageant plus un volume de NaCl (0,9%) plus un volume de pesticide CPF.
4. **Tubes de vitamine E** : un volume de surnageant plus un volume de NaCl (0,9%) plus un volume de vitamine E.
5. **Tubes de vitamine C** : un volume de surnageant plus un volume de NaCl (0,9%) plus un volume de vitamine C.
6. **Tubes des vitamines combinées** : un volume de surnageant plus un volume de NaCl (0,9%) et un volume de vitamine E et un volume de vitamine C.

Après la réalisation de gamme de tubes, une préincubation à (30 min, 37°C) a été envisagée. Puis un volume de NaCl (0,9%) a été rajouté pour tubes témoins négatives, un volume de H₂O₂ pour les tubes contrôles et un volume de pesticide pour les tubes de l'oxydant et les tubes des vitamines. Une incubation (30 min, 37°C) a été effectuée et la stabilité de l'Hb a été enregistrée par spectrophotométrie à 412 nm.

II.2.6. Analyse statistique

L'analyse statistique a été effectuée avec le logiciel Graph Pad Prism 5. Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm Ecart type (n=3) pour chaque échantillon. Les valeurs sont données ont (* 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 pesticide chlorpyrifos. Les valeurs de p < 0,05 ont été considérées comme significatives.

Chapitre III

Résultats et discussion

III. Résultats et discussion

III.1. Étude de la cytotoxicité des GR induite par le chlorpyrifos

III.1.1. Induction de l'hémolyse

Dans le but d'estimer la dose cytotoxique minimale adéquate de pesticide chlorpyrifos sur les globules rouges, nous avons mesuré la turbidité cellulaire (figure 15) à différentes concentrations de pesticide, les résultats sont les suivants :

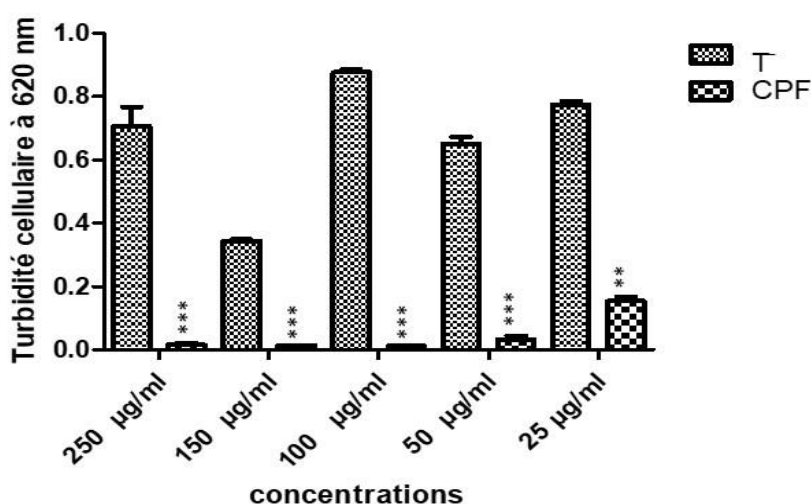


Figure 15 : Turbidité cellulaire à différentes concentrations du pesticide CPF, T⁻ : Témoin négatif, CPF : chlorpyrifos, * : comparaison la concentration cellulaire de CPF avec le T⁻. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM des différentes expérimentations (* p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001).

On voit bien qu'il y a une hémolyse totale dans les différents échantillons de pesticide aux concentrations de 250 µg/ml ; 150 µg/ml ; 100 µg/ml ; 50 µg/ml, respectivement 0,015±0,010 abs ; 0,014±0,0005 abs ; 0,012±0,0005 abs ; 0,032±0,021 abs ; 0,154±0,023 abs, après 15 min d'incubation. Ce qui a été confirmé par une étude statistique qui a révélée l'existence des différences très hautement significative (p<0,001) entre les différents échantillons comparés à leurs témoins négatifs.

Tandis que l'effet cytotoxique apparaît après 15 min à la concentration de 25 µg/ml, est modéré d'où le taux de turbidité cellulaire est élevé en comparant au témoin négatif et par rapport à celui trouvé par les autres différentes concentrations.

De ce fait, 25 $\mu\text{g/ml}$ est la concentration de pesticide minimale adéquate, choisi pour l'évaluation de l'effet cytotoxique induit par le CPF sur les GRs, ainsi que la mise en évidence la cytoprotection par les antioxydants.

L'étude de **Altuntas** et ses collaborateurs en 2002, a enregistré un fort pourcentage d'hémolyse sur les érythrocytes des rats, à des concentrations de 100 et 200 $\mu\text{g/ml}$ contrairement à celui trouvé (9% d'hémolyse) au plus basses concentrations (25 et 50 $\mu\text{g/ml}$) de pesticide, le diméthoate, un insecticide de la même famille de chlorpyrifos (organophosphorés). Une autre étude (**Santi et al., 2011**) montre que le pesticide clomazone de la famille des herbicides exerce une forte cytotoxicité sur les érythrocytes humains *in vitro* à des concentrations de 100, 250 et 500 $\mu\text{g/L}$. Cela confirme que les pesticides ont un effet hématotoxique sur le sang, notamment sur les érythrocytes.

III.2. Etude de l'effet cytoprotecteur de la vitamine C, E et (C+E) sur la cytotoxicité

Le chlorpyrifos (CPF) induit un stress oxydatif via la génération des radicaux libres provoquant l'hémolyse des globules rouges (**Sameeh et al., 2009 ; Saxena et al., 2011 ; Abderrahim et al., 2022**). Il a été démontré que la combinaison de la vit E et vit C empêchent le stress oxydatif induit par les organophosphorés (OP) dans les érythrocytes (**Zhou et al., 2002**).

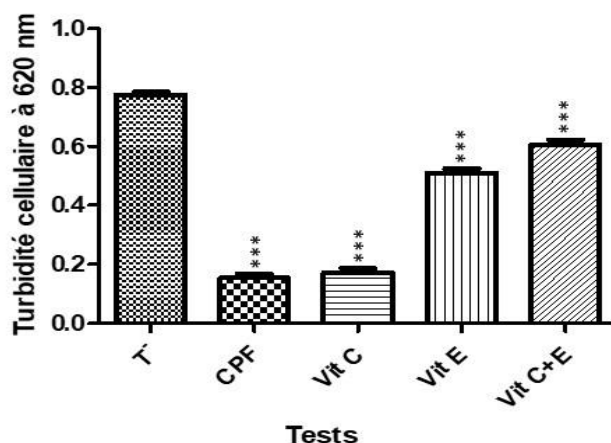


Figure 16 : Turbidité cellulaire lors de l'induction d'hémolyse par CPF, et le prétraitement par différentes vitamines (vitamine C, E, et C+E). T⁻ : témoin négatif, CPF : chlorpyrifos (25 $\mu\text{g/ml}$), vit C : vitamine C à 0,1mg/ml, vit E : vitamine E à 0,25mg/ml, Vit C+E : combinaison vitamine C et E, * : comparaison de la concentration cellulaire de CPF, vit C avec T⁻. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM des différentes expérimentations (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Les résultats de turbidité cellulaire (figure 16) montrent qu'une diminution de la concentration cellulaire est enregistré dans le test de CPF (0.154 ± 0.023 abs) qui se diffère d'une manière significative par rapport au test de témoin négative (0.775 ± 0.017 abs) d'où on a enregistré la concentration cellulaire la plus élevée.

L'étude statistique de test de protection avec la vitamine C seule a révélé qu'il n'y a pas une différence significative (0.173 ± 0.024 abs) par rapport au test de CPF (0.154 ± 0.023 abs), cela suggère qu'il n'y a pas de protection par la vit C seule à la concentration utilisée 0,1 mg/ml. Tandis que l'étude faite par l'équipe de **Eroğlu** en **2013** a révélé un bon effet protecteur de la vitamine C sur la toxicité des GRs humains *in vitro*, induite par le pesticide dichlorvos (DDVP) ce qui est peut-être dû à la différence entre les deux pesticides en termes de structure, et la qualité de la vitamine C utilisée. Ou le fait qu'elle est très sensible et s'oxyde facilement à la lumière et à la chaleur (**Gonzales-Molina, 2008**).

Les résultats montrent que les valeurs de concentrations cellulaires révélées par les tests de protection par la vit E ($0,552 \pm 0,049$ abs) et la combinaison (Vit C + Vit E) ($0,606 \pm 0,029$ abs) augmentent significativement après l'ajout de ces derniers. La cytoprotection des GRs révélée par la vit E seule peut être dû à la nature de la vitamine et le mécanisme de protection de chaque vitamine qui est différent. D'autre part, la cytoprotection élevée qui a été enregistrée lors de l'association des deux vitamines signifie qu'il y a un effet synergie des deux vitamines qui donne une meilleure protection des globules rouges. En outre, il a été suggéré que la vit C élimine les radicaux libres liés à la vit E, servant ainsi à régénérer la vit E (**Kumar et al., 2004 ; Raval et al., 2013**).

III.2.1. Taux de l'hémoglobine et de méthémoglobine extracellulaire

La (figure 17) illustre le taux d'Hb et d'Hb oxydée en MethHb libéré par les GRs lors du traitement avec du CPF, vit C et vit E. Par conséquent, un taux de l'hémoglobine extracellulaire élevé est un révélateur d'une cytotoxicité et un taux faible est un indicateur d'une cytoprotection.

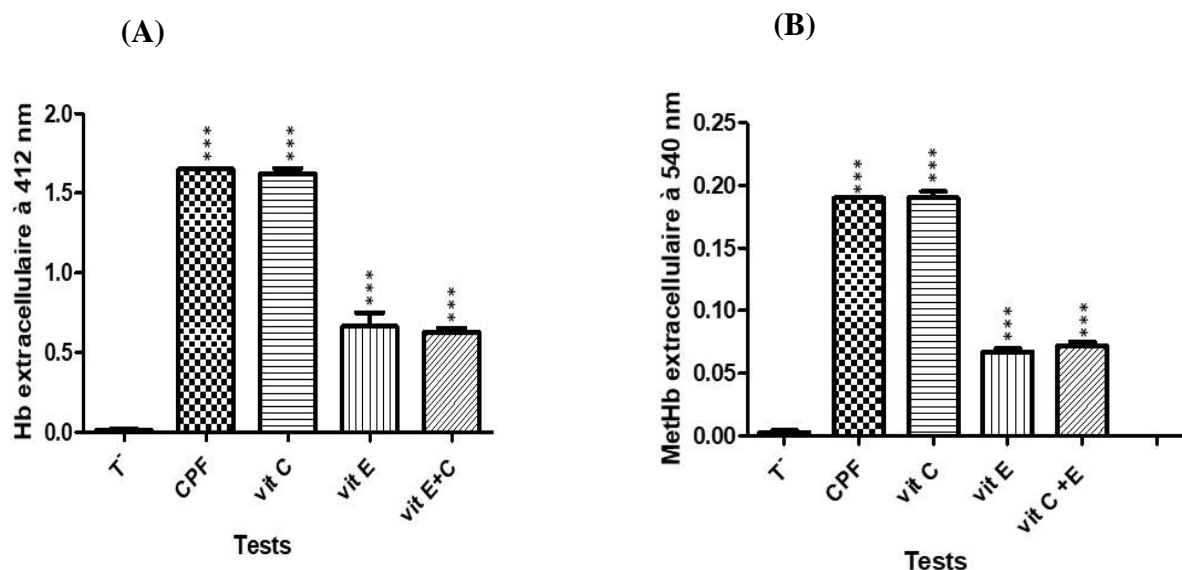


Figure 17 : Taux d'hémoglobine et méthémoglobine extracellulaire traité par pesticide et vitamines. T⁻ : témoin négatif, CPF : chlorpyrifos, vit C : vitamine C à 0,1mg/ml, vit E : vitamine E à 0,25mg/ml, Vit C+E : combinaison vit C et E, * (A) : comparaison de la libération de Hb dans le test de CPF, Vit C par rapport au T⁻,*(B) : comparaison de l'oxydation de Hb libéré dans le test de CPF, Vit C par rapport au T⁻. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM des différentes expérimentations (* p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001).

Les résultats du graphe(A) montrent que le taux d'Hb libérée dans le test de CPF est hautement significatif ($1,651 \pm 0,005$ abs) à l'égard du test témoin négative ($0,016 \pm 0,004$ abs) qui est presque nul, cela signifie qu'une hémolyse des globules rouges a eu lieu par CPF et une libération d'Hb a été réalisée.

Les traitements avec les antioxydants (vitamines), montrent une cytoprotection significative de l'hémolyse des GRs. L'étude statistique à révéler que les taux d'Hb libéré dans le test de protection a la vit E ($0,666 \pm 0,149$ abs) et à la combinaison (vit E+ vit C) ($0,631 \pm 0,043$ abs) sont hautement significatif comparés au test de CPF ($1,651 \pm 0,005$ abs) et de la protection a la vit C ($1,623 \pm 0,059$ abs).

Ça confirme les résultats trouvés en haut (figure 17), que la nature de la vitamine peut influencer sur le mécanisme de protection de cette dernière. En similitude avec les résultats obtenus dans la turbidité cellulaire ; la vit C seule n'a pas d'effet protecteur sur les globules rouges par contre elle montre un bon effet synergique une fois combiné avec la vit E. (Eroğlu et al.,2013).

Les résultats du graphe (B) montrent que les taux de MetHb sont élevés et hautement significatifs dans le test de CPF ($0,186 \pm 0,005$ abs), comparé au test témoin négative ($0,003 \pm 0,002$ abs), dû à l'oxydation d'Hb par l'effet du pesticide en MetHb. L'hémoglobine libérée est oxydée en méthémoglobine (MetHb), dans laquelle l'atome de fer à l'état oxydé Fe^{3+} est incapable de transporter l'oxygène (Bardakdjian-Michau et al., 2006 ;Gu et al.,2022).

Le taux de MetHb dans la protection par la vit E est faible ($0,099 \pm 0,055$ abs) à l'égard de test de CPF. Aussi le taux de MetHb dans le test de protection de la combinaison vit (C+E) est significativement faible ($0,072 \pm 0,005$ abs) comparé au test de CPF et au test de protection de vit C ($0,190 \pm 0,008$ abs), ce qui confirme l'effet synergique de vit C et E.

Les agents antioxydants sont connus pour leur propriété de neutraliser les radicaux libres et par conséquent réduisent les effets du stress oxydant en améliorant l'activité enzymatique de la SOD et de la catalase (Faridi et al., 2017). L'effet protecteur obtenu avec la combinaison (vit C+E) peut être attribué à la l'inhibition de la formation de radicaux libres.

III.2.2. Etude d'hémoglobine et méthémoglobine intracellulaire

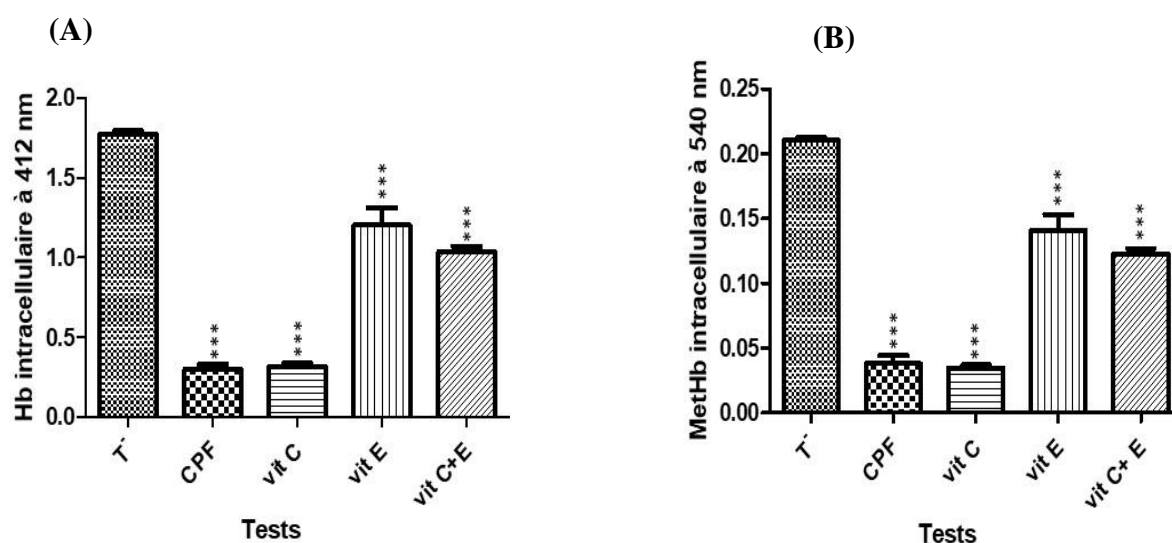


Figure 18 : Taux d'hémoglobine et méthémoglobine intracellulaire traité par pesticide et vitamines. T⁻ : témoin négatif, CPF : chlorpyrifos, vit C : vitamine C à 0,1mg/ml, vit E : vitamine E à 0,25mg/ml, Vit C+E : combinaison vit C et E, *(A) : comparaison de la libération de Hb dans le test de CPF, Vit C par rapport au T⁻ après la lyse cellulaire, *(B) : comparaison de l'oxydation de Hb libéré dans le test de CPF, Vit C par rapport au T⁻ après la lyse cellulaire. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM des différentes expérimentations (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Les valeurs de l'Hb intracellulaire s'opposent à celles de l'Hb libérée et vont dans le même sens que les valeurs enregistrées dans la turbidité cellulaire. Des valeurs faibles en Hb intracellulaire indiquent une cytotoxicité membranaire élevée.

Les résultats du graphe (A), (figure 18) montrent des valeurs très faibles en Hb intracellulaire pour le test de CPF ($0,298 \pm 0,056$ abs), hautement significatif comparé au témoin négatif ($1,778 \pm 0,027$ abs). Par conséquent, un taux de l'hémoglobine intracellulaire élevé est révélateur d'une préservation de la cellule.

Les taux élevés de Hb intracellulaire trouvés dans le test à vit E et le test de la combinaison (vit C+ vit E) ; ($1,203 \pm 0,188$ abs) et ($1,035 \pm 0,061$ abs), respectivement révèlent un pouvoir protecteur important de ces vitamines vis-à-vis la cellule de GR.

Les résultats du graphe (B), (figure 18) montrent que le taux de MetHb est très faible dans le test de CPF, il est hautement significatif ($0,038 \pm 0,010$ abs) par rapport au test de témoin négative ($0,210 \pm 0,004$ abs).

Le Taux de MetHb est aussi faible dans le test de protection de la vit C ($0,0346 \pm 0,004$ abs), comme il est non significatif par rapport au test de CPF ($0,038 \pm 0,010$ abs), donc la vitamine C seule n'a pas d'effet protecteur contre le CPF, ce qui est peut-être dû à la nature de pesticide utilisé qui est lipophile contrairement à la vitamine C connu hydrophile.

Dans le test de protection de la vit E et de la combinaison, un taux élevé ($0,140 \pm 0,021$ abs) ($0,122 \pm 0,007$ abs) de MetHb a été enregistré, respectivement.

Cela confirme ce qu'il a dit (Ambali et al.,2010 ; Atyabi et al.,2012) que certaines vitamines, en particulier les vitamines C et E, peuvent réduire la formation de méthémoglobine induite par l'oxydation *in vitro* de manière dose-dépendante, séparément ou en combinaison.

III.3. Effet cytoprotecteur de la vitamine C, E et (C+E) sur la peroxydation lipidique

Les érythrocytes constituent un modèle pratique pour comprendre les dommages oxydatifs membranaires induits par divers pro-oxydants xénobiotiques (Mansour et al., 2009). Pour mieux comprendre l'origine des perturbations causées par le chlorpyrifos, nous avons opté à un test qui indique le degré de peroxydation des lipides membranaires des GRs.

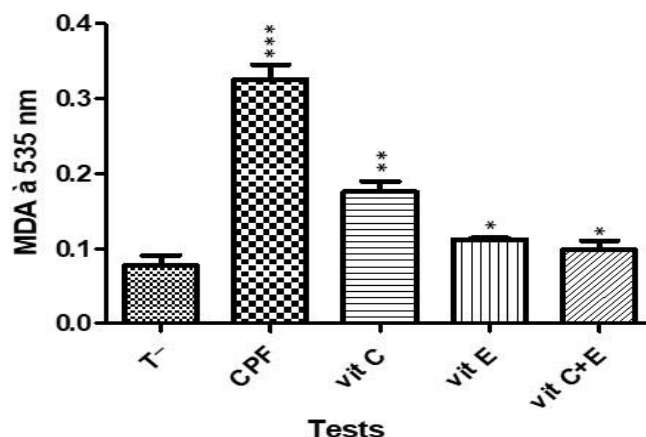


Figure 19 : Taux de MDA. T⁻ : témoin négatif, CPF : chlorpyrifos, vit C : vitamine C à 0,1mg/ml, vit E : vitamine E à 0,25mg/ml, Vit C+E : combinaison vit C et E, * : comparaison de taux de MDA dans CPF par rapport au T⁻. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM des différentes expérimentations (* p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001).

La (figure 19) révèle le taux des MDA formés en fonction des traitements utilisés. Ce test a montré que le pesticide (CPF), induit en partie la dégradation des acides gras insaturés des membranes biologiques en MDA. Les valeurs les plus élevées sont obtenues avec le test de pesticide (0.325±0.035 abs) comparé au test de témoin négatif (0,148±0,031 abs).

Concernant les traitements par les vitamines, la formation des MDA dans le test de la vit E et dans le test de l'association des deux vit (E +C) ;(0,112±0,003 abs), (0,137±0,020 abs), respectivement sont proche de taux des MDA trouvés dans le test de témoin négative (0,148±0,031 abs), la vit E protège les globules rouges de la peroxydation lipidique (**Vertuani et al.,2004 ; Atyabi et al.,2012**).

La formation du complexe MDA-TBA signifié qu'il y a la peroxydation des lipides de la membrane des globules rouges, cette peroxydation résulte par le contact des radicaux libres et les lipides de la membrane érythrocytaire qui sont formé par le stress oxydatif induit par le chlorpyrifos (**Ayala et al.,2014**).

Une étude sur les anticancéreux comme molécule xénobiotique, a démontré que les polyphénols interagissent avec la membrane phospholipidique, via la formation des ponts hydrogène, sur les groupements polaires de ces derniers, par conséquent ces composés s'accumulent sur les deux faces de la membrane plasmique, bloquant ainsi la peroxydation lipidique induite par les agents oxydants (**Bellik et al., 2016**).

L'augmentation du taux des MDA peut être due à une augmentation des radicaux libres due à des conditions de stress causées par l'exposition des globules rouges à des substances toxiques (Duchnowicz *et al.*, 2005 ; Prasanthi *et al.*, 2005).

III.4. Test de stabilité d'hémoglobine

La (figure 20) représente les taux de l'Hb après action directe de pesticide (CPF) ainsi que les vitamines sur la molécule de l'hémoglobine. Ce test a pour but de mettre en évidence le mécanisme d'action de CPF pour induction de stress oxydatif chez le GR.

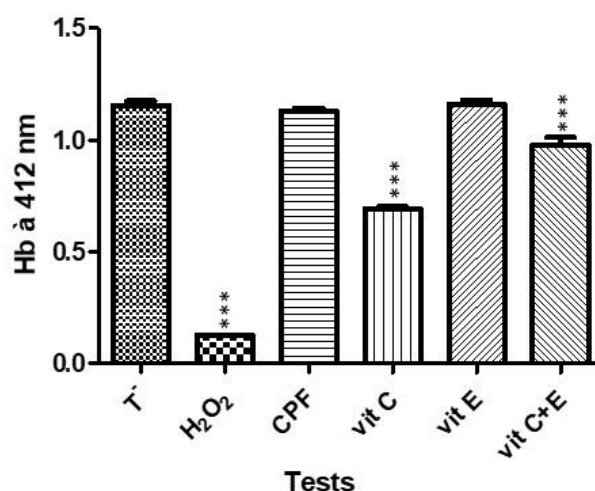


Figure 20 : Taux d'hémoglobine traité par H₂O₂, CPF, vit C, vit E, vit C+E après la lyse cellulaire pour libérée l'hémoglobine. T⁻ : témoin négatif, CPF : chlorpyrifos, vit C : vitamine C à 0,1mg/ml, vit E : vitamine E à 0,25mg/ml, Vit C+E : combinaison vit C et E, H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène, * : comparaison de taux de Hb oxydé dans le test CPF, et H₂O₂ par rapport au T⁻. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM des différentes expérimentations (* p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001).

Les teneurs en Hb les plus élevés sont enregistrés dans les tests de cytotoxicité de CPF (1,129±0,023 abs) et la protection de la vit E (1,159±0,033 abs) suivi par les tests de combinaison et de vitamine C. Tandis que les taux d'Hb les plus faibles sont enregistrés par le test de control positif (H₂O₂) avec (0,126±0,004 abs).

Ces résultats (figure 20) montrent qu'il y'a une possibilité que le CPF s'il est en contact direct avec l'hémoglobine il ne l'oxyde pas en méthémoglobine. Le H₂O₂ est une espèce radicalaire elle est connue qu'elle oxyde l'Hb en MetHb (Nagababu *et al.*, 2013).

D'après les tests effectués, en remarquant que le CPF ne possède pas une action directe sur la molécule d'Hb, par conséquent, il n'oxyde pas l'hémoglobine en méthémoglobine dans le milieu intracellulaire, vu que le taux de méthémoglobine intracellulaire est toujours faible par rapport à la méthémoglobine libérée donc on peut supposer que :

- ✓ Le CPF induit un stress oxydant au niveau de la membrane érythrocytaire mais pas à l'intérieur du globule rouge veut dire que la molécule d'Hb n'est pas la cible de CPF.
- ✓ L'hémoglobine c'est une molécule hydrophile, et le CPF c'est une molécule lipophile donc incapable d'interagir avec l'Hb, donc on n'aura pas un taux élevé de MetHb.
- ✓ Peut-être car le CPF est analogue de structure avec les polyphénols (pourvus du cycle benzène), donc il va jouer le rôle de pseudo antioxydant.

Au cours de cette étude, nous avons constaté que les agents antioxydants utilisés exercent un effet protecteur contre la destruction de GR, en préservant la membrane érythrocytaire du stress causé par CPF.

Conclusion

Conclusion

L'objectif principal de ce travail est d'étudier l'hématotoxicité de pesticide CPF qui induit un stress oxydant via la génération des radicaux libres et l'effet protecteur des vitamines C et E (seul ou combinés) sur les globules rouges.

Notre travail expérimental, consiste en premier lieu à chercher la concentration optimale de chlorpyrifos à laquelle on peut mettre en évidence l'effet protecteur des vitamines. Dans le but d'évaluer l'effet cytotoxique du CPF sur les érythrocytes (membrane plasmique et hémoglobine), et de déterminer le mécanisme d'action de ce dernier ainsi l'effet cytoprotecteur de deux molécules antioxydantes (vit C et vit E) ; nous avons mesuré la turbidité cellulaire, le taux d'hémoglobine et méthémoglobine extracellulaire et intercellulaire, la peroxydation lipidique et la stabilité d'hémoglobine.

D'après nos résultats on peut conclure que le pesticide CPF c'est un hématotoxique qui génère un stress oxydant au niveau de la membrane érythrocytaire mais pas à l'intérieur du globule rouge, suggérant que la molécule d'Hb n'est pas la cible de ce pesticide. La vit E seule exerce un bon effet protecteur sur les membranes des globules rouges, la vit C s'avère qu'elle n'a pas un effet protecteur à la concentration utilisée qui est de 0,1 mg/ml, par contre la synergie de vit C et E donne une meilleure protection.

Au final, cette étude démontre le degré de gravité de chlorpyrifos sur la santé humaine non seulement sur le système nerveux mais aussi sur les globules rouges, pour cela il serait nécessaire d'élargir cette étude et de mieux comprendre le mécanisme d'action, que ce soit pour le CPF ou pour les molécules antioxydantes bioactives ; et d'essayer plusieurs concentrations non seulement pour le pesticide mais aussi pour les vitamines C et E et, d'aller plus loin on compare aux autres pesticides de même ou de différentes familles. Comme il serait intéressant à tester l'effet de ce pesticide sur les autres cellules figurantes du sang tel que les leucocytes et les thrombocytes.

***Références
bibliographiques***

Références bibliographiques

- Abderrahim K, Bensalah M, Bouanane S, Babaahmed FZ, Merzouk H. Effects of Exposure of Chlorpyrifos-Ethyl on Metabolism and Oxidative Damage in Rats and Their Offspring. *jnpra* 2022; 1:17-28.
- Abhilash PC, Singh N. Pesticide use and application: an Indian scenario. *J Hazard Mater* 2009 ;165(1-3) :1-12.
- Acquavella J, Olsen G, Cole P, et al. Cancer among farmers: a meta-analysis. *Ann Epidemiol* 1998;8(1):64-74.
- Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine* 2007;74(4):324-329.
- Alavanja MC, Dosemeci M, Samanic C, et al. Pesticides and lung cancer risk in the agricultural health study cohort. *Am J Epidemiol* 2004 ;160 (9):876-885.
- Altuntas I, Delibas N, Sutcu R. The effects of organophosphate insecticide methidathion on lipid peroxidation and anti-oxidant enzymes in rat erythrocytes: role of vitamins E and C. *Hum Exp Toxicol* 2002;21(12):681-685.
- Ambali S, Akanbi D, Muftau S, Giwa A, Oladipo O, Ayo J. Chlorpyrifos-Induced Clinical, Hematological and Biochemical Changes in Swiss Albino Mice- Mitigating effect by co-administration of vitamins C and E. *J Life Sci* 2010; 7: 37-44.
- Ambali S.F., Abubakar A.T., Shittu M., Yaqub L.S., Anafi S.B., Abdullahi A. Chlorpyrifos-induced alteration of hematological parameters in Wistar rats: Ameliorative effect of Zinc. *Res J Environ Toxicol* 2010 ;4: 55-66.
- Atyabi N, Yasini SP, Jalali SM, Shaygan H. Antioxidant effect of different vitamins on methemoglobin production: An in vitro study. *Vet Res Forum* 2012;3(2):97-101.
- Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014:1-31.
- Barbalato L, Pillarisetty LS. Histology, Red Blood Cell. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls 2022.

- Bardakdjian-Michau J, Dhondt JL, Ducrocq R, Galactéros F, Guyard A, Huchet FX, Lahary A, Lena-Russo D, Maboudou P, North ML, Prehu C, Soummer AM, Verschelde M, Wajcman H. Haemoglobinopathy diagnosis. 2nd edition. *Oxford: Blackwell Publishing* 2006; 313.
- Bationo F, Savadogo A, Kabore D, Ouattara L, Ouedraogo H, Savadogo B, Traore A. Storage influence on beta-carotene and alpha-tocopherol contents of solar-dried *Spirulina platensis* (Spirulina). *Afr J Food Sci* 2015; 9(12): 546-554.
- Baudin B. Stress oxydant et protections antioxydantes. *Rev Francoph Lab* 2020 ;2020 (522) :22-30.
- Bauer DE, Kamran SC, Orkin SH. Reawakening fetal hemoglobin: prospects for new therapies for the β -globin disorders. *Blood* 2012;120(15): 2945-2953.
- Bellik Y, Iguer-Ouada M. A useful method based on cell-free hemoglobin analysis for evaluating antioxidant activity. *Anal Methods* 2015 ;7(12): 4934-4938.
- Bellik Y, Iguer-Ouada M. Concurrent measurement of cellular turbidity and hemoglobin to evaluate the antioxidant activity of plants. *Food Chem* 2016 ; 190 : 468-473.
- Bettiche F, Olivier G, Belhamra M. Contamination des eaux par les pesticides sous système de production intensive (serres), cas de Biskra, Algérie. *Courrier du Savoir* 2017 :39-48.
- Bhargava P, Etzell MJ, Finn MW. color atlas of hematology Erythrocytes. 2eme edition 2018: 50-55.
- Bouraié ME, Abdelghany A. Sorption Features of Polyurethane Foam Functionalized with Salicylate for Chlorpyrifos: Equilibrium, Kinetic Models and Thermodynamic Studies. *Polymers (Basel)* 2020;12 (9):1-25.
- Brown TP, Rumsby PC, Capleton AC, Rushton L, Levy LS. Pesticides and Parkinson's disease--is there a link? . *Environ Health Perspect* 2006;114(2):156-164.
- Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin ObstetGynaecol* 2011 ;25(3): 287-299.
- Butcher JT, Johnson T, Beers J, Columbus L, Isakson BE. Hemoglobin α in the blood vessel wall. *Free Radic Biol Med* 2014; 73: 136-142.

- Carr AC, Maggini S. Vitamin C and Immune Function. *Nutrients* 2017;9(11):1-25.
- Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993 ; 49(3) : 481-493.
- Chubilleau C, Pubert M, Comte J, Giraud J. Pesticides et santé. Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes. *Rapport 136 Paris* 2011; 222.
- Cometa, M. F., Buratti, F. M., Fortuna, S., Lorenzini, P., Volpe, M. T., Parisi, L., Testai, E., & Meneguz, A. Cholinesterase inhibition and alterations of hepatic metabolism by oral acute and repeated chlorpyrifos administration to mice. *Toxicology* 2007 ;234(1-2) :90-102.
- Cuvelier C, Dotreppe O, Istasse L. Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E. *Ann Méd Vét* 2003 ; 147 : 315-324.
- Devaki SJ, Reshma LR. Vitamin C: Sources, Functions, Sensing and Analysis. *chapter 1 in book vitamine C*,2017: 3-20.
- Devasagayam TP, Bolor KK, Ramasarma T. Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits. *Indian J BiochemBiophys* 2003;40(5):300-308.
- Duchnowicz P, Szczepaniaka P, Koter M. Erythrocyte membrane protein damage by phenoxy acetic herbicides and their metabolites. *PesticBiochemPhysiol* 2005; 82:59–65.
- Eaton, D. L., Daroff, R. B., Autrup, H., Bridges, J., Buffler, P., Costa, L. G., Coyle, J., McKhann, G., Mobley, W. C., Nadel, L., Neubert, D., Schulte-Hermann, R., & Spencer, P. S. Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. *Crit Rev Toxicol* 2008 ;38 :1-125.
- Echeverri-Jaramillo G, Jaramillo-Colorado B, Sabater-Marco C, Castillo-López MÁ. Cytotoxic and estrogenic activity of chlorpyrifos and its metabolite 3,5,6-trichloro-2-pyridinol. Study of marine yeasts as potential toxicity indicators. *Ecotoxicology* 2021;30(1):104-117.
- Eroğlu S, Pandir D, Uzun FG, Bas H. Protective role of vitamins C and E in dichlorvos-induced oxidative stress in human erythrocytes in vitro. *Biol Res* 2013 ;46(1) :33-38.

- Faridi U, Alatawi F, Mostafa M. Protective role of tocopherol and ascorbic acid in taxol-treated human erythrocytes in vitro. *Toxicology Research and Application* 2017 ;1 :1-7.
- Favier A. Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann Phar Fr* 2006 ;64(6) :390-396.
- Favier, A. Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actchim*2003 ;108-115.
- Feng S, Wang J, Chen X, Fan J. Kinetic spectrofluorimetric determination of trace ascorbic acid based on its inhibition on the oxidation of pyronine Y by nitrite. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2005; 61(5): 841–844.
- Fujita Y, Mori I, Yamaguchi T, Hoshino M, Shigemura Y, Shimano M. Spectrophotometric determination of ascorbic acid with iron (III) and p-carboxyphenylfluorone in a cationic surfactant micellar medium. *Anal Sci* 2001 ;17(7) :853-857.
- George N, Chauhan P, Sondhi S, Saini S, Puri N, Gupta N. Biodegradation and Analytical Methods for Detection of Organophosphorous Pesticide: Chlorpyrifos. *Int J Pure Appl Sci Technol* 2014; 20(2): 79-94.
- González-Molina E, Moreno DA, García-Viguera C. Genotype and harvest time influence the phytochemical quality of Fino lemon juice (*Citrus limon* (L.) Burm. F.) for industrial use. *J Agric Food Chem* 2008;56(5):1669-1675.
- Gu X, Hickey R, Rath A, Palmer AF. Scalable manufacturing platform for the production of methemoglobin as a non-oxygen carrying control material in studies of cell-free hemoglobin solutions. *PLoS One* 2022 ;17(2) :0263782.
- Guilland JC, Herbeth B, Le Moel G. Les vitamines. *Bio Méd* 2007 ; 38 : 17-80.
- Guilland JC. Les interactions entre les vitamines A, D, E et K : synergie et/ou compétition. *OCL* 2011; 18(2): (59-67).
- Gultekin F, Delibas N, Yasar S, Kilinc I. 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* 2001 ;75(2) :88-96.

- HadjerRahmoune, Fateh Mimeche, Kamel Guimeur& Kamel Cherif. Utilisation des pesticides et perception des risques chez les agriculteurs de la région de Biskra (Sud Est d'Algérie). *Int J Environ Stud* 2018 ;1-12.
- Haleng J, Pincemail J, Defraigne OJ, Charlier C, Chapelle JP. sterssoxydant. *Rev Med Liege* 2007; 62 (10): 628-638.
- Hong JH, Kim MJ, Park MR, et al. Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Chim Acta* 2004;340(1-2):107-115.
- Huang X, Cui H, Duan W. Ecotoxicity of chlorpyrifos to aquatic organisms: A review. *Ecotoxicol Environ Saf* 2020; 200: 1-17.
- Inaba M, Yawata A, Koshino I, et al. Defective anion transport and marked spherocytosis with membrane instability caused by hereditary total deficiency of red cell band 3 in cattle due to a nonsense mutation. *J Clin Invest* 1996 ;97(8):1804-1817.
- Jiang Q. Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. *Free Radic Biol Med* 2014; 72 :76-90.
- Kaewprayoon W, Suwannasom N, Kloypan C, Steffen A, Xiong Y, Schellenberger E, Pruß A, Georgieva R, Bäuml H. Determination of Methemoglobin in Hemoglobin Submicron Particles Using NMR Relaxometry. *Int J Mol Sci* 2020 ;21(23) :1-13.
- Karami-Mohajeri S, Abdollahi M. Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: a systematic review. *Hum Exp Toxicol* 2011 ;30(9) :1119-1140.
- Kregel KC, Zhang HJ. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am J PhysiolRegulIntegr Comp Physiol* 2007 ;292(1): 18-36.
- Krieger RI, Bernard CE, Dinoff TM, Fell L, Osimitz TG, Ross JH, Ongsinthusak T. Biomonitoring and whole body cotton dosimetry to estimate potential human dermal exposure to semivolatile chemicals. *J Expo Anal Environ Epidemiol.* 2000 ;10(1):50-57.

- Kwong LH, Ercumen A, Pickering AJ, et al. Soil ingestion among young children in rural Bangladesh. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2021 ;31(1) :82-93.
- Kyle RA, Shampo MA. Walter Haworth--synthesis of vitamin C. *Mayo Clin Proc* 2002;77(2):108.
- Lei B, Zhang K, An J, Zhang X, Yu Y. Human health risk assessment of multiple contaminants due to consumption of animal-based foods available in the markets of Shanghai, China. *Environ Sci Pollut Res Int* 2015 ;22(6) :4434-4446.
- Loyant L. Neurotoxicité développementale du chlorpyrifos via le système endocannabinoïde : effets comportementaux chez le rat. Thèse pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire. *Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse* 2017 :112.
- Mahaboonpeeti R, Kongtip P, Nankongnab N, Tipayamongkholgul M, Bunngamchairat A, Yoosook W, Woskie S. Evaluation of Dermal Exposure to the Herbicide Alachlor Among Vegetable Farmers in Thailand. *Ann Work Expo Health* 2018; 62(9):1147-1158.
- Manaargadoo-Catin M, Ali-Cherif A, Pognas J L, Perrin C. Hemolysis by surfactants-A review. *Adv Colloid Interface Sci* 2016; 228: 1-16.
- Mansour SA, Mossa AT. Lipid peroxidation and oxidative stress in rat erythrocytes induced by chlorpyrifos and the protective effect of zinc. *PesticBiochemPhysiol*2009 ;93 : 34-39.
- Maquart FK, Borel JP, Giller Y. Précis de biochimie moléculaire. *De la biologie à la clinique*. Rison-Roch, paris, 1er eEdition,2006 :99.
- Migdal C, Serres M. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant [Reactive oxygenspecies and oxidative stress]. *Med Sci (Paris)* 2011 ;27(4) :405-412.
- Mitrofan-Oprea L, Palii C, Tissier JP, Héron A, Verpoort T, Behague M, Smagghe E, Schooneman F, Huart JJ, Goudaliez F, Montreuil J, Bratosin D. Nouveaux critères d'évaluation de la viabilité des hématies destinées à la transfusion. *Transfus Clin Biol* 2007 ;14(4) :393-401.
- Msibi SS, Chen CY, Chang CP, Chen CJ, Chiang SY, Wu KY. High pesticide inhalation exposure from multiple spraying sources amongst applicators in Eswatini, Southern Africa. *Pest Manag Sci* 2021 ;77(10):4303-4312.

- Nagababu E, Mohanty JG, Friedman JS, Rifkind JM. Role of peroxiredoxin-2 in protecting RBCs from hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Free Radic Res* 2013;47(3):164-171.
- Panawala L. what is the Function of Hemoglobin in the Human Body. *Mol Biol Biochem* 2017:1-7.
- Park PJ, Jun WK, Nam KS, Shahidi F, Kim SK. Purification and characterization of antioxidative peptides from lecithin-free egg yolk protein. *J Am Oil Chem Soc* 2001;78(6) :651-656.
- Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Vincenzo A, Suadrito F, Altavilla D, Bitto A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 2017: 1-13.
- Pourrut B, Perchet G, Silvestre J, Cecchi M, Guiesse M, Pinelli E. Potential role of NADPH-oxidase in early steps of lead-induced oxidative burst in *Vicia faba* roots. *J Plant Physiol* 2008 ;165(6) :571-579.
- Prasanthi K, Rajini PS. Morphological and biochemical perturbations in rat erythrocytes following in vitro exposure to Fenvalerate and its metabolite. *Toxicol In Vitro* 2005; 19:449–456.
- Rajapakse BN, Thiermann H, Eyer P, et al. Evaluation of the Test-mate ChE (cholinesterase) field kit in acute organophosphorus poisoning. *Ann Emerg Med* 2012 ;58(6) :559-564.
- Ratanachina J, Amaral A, De Matteis S, Cullinan P, Burney P. Farming, pesticide exposure and respiratory health: a cross-sectional study in Thailand. *Occup Environ Med* 2022;79(1):38-45.
- Raval JS, Fontes J, Banerjee U, Yazer MH, Mank E, Palmer AF. Ascorbic acid improves membrane fragility and decreases haemolysis during red blood cell storage. *Transfus Med* 2013 ;23(2) :87-93.
- Rohani, Md. Fazle. Pesticides toxicity in fish: Histopathological and hemato-biochemical aspects – A review. *EmergContam* 2023 ; 9 : 1-15.
- Santi A, Menezes C, Duarte MM, Leitemperger J, Lópes T, Loro VL. Oxidative stress biomarkers and acetylcholinesterase activity in human erythrocytes exposed to clomazone (in vitro). *InterdiscipToxicol* 2011 ;4(3) :149-153.

- Satish BN, Dilipkumar P. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv* 2015; 5: 27986–28006.
- Saulsbury MD, Heyliger SO, Wang K, Johnson DJ. Chlorpyrifos induces oxidative stress in oligodendrocyte progenitor cells. *Toxicology* 2009;259(1-2):1-9.
- Sawicki, K., Czajka, M., Matysiak-Kucharek, M., Kruszewski, M., Skawiński, W., Brzóska, K., & Kapka-Skrzypczak, L. Chlorpyrifos stimulates expression of vitamin D₃ receptor in skin cells irradiated with UVB. *PesticBiochemPhysiol* 2018; 154 :17-22.
- Saxena R, Garg P, Jain DK. In Vitro Anti-oxidant Effect of Vitamin E on Oxidative Stress Induced due to Pesticides in Rat Erythrocytes. *Toxicol Int* 2011;18(1):73-76.
- SiriwatS, Nganchamung T, Ponracho C, Siri Wong W, Robson M. Health risk assessment of dermal exposure to Chlorpyrifos among children in agricultural areas in Sakon Nakhon Province, Thailand. *Hum. Ecol. Risk Assessment* 2021; 27:1-11.
- Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, LLeonart ME. Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Res Rev* 2013 ;12(1):376-390.
- Sulaiman NS, Rovina K, Joseph VM. Classification, extraction and current analytical approaches for detection of pesticides in various food products. *J ConsumProt Food Saf* 2019 :209–221.
- Thany SH, Reynier P, Lenaers G. Neurotoxicité des pesticides - Quel impact sur les maladies neurodégénératives ? [Neurotoxicity of pesticides: its relationship with neurodegenerative diseases]. *Med Sci (Paris)* 2013;29(3):273-278.
- Tudi M, Daniel Ruan H, Wang L, et al. Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. *Int J Environ Res Public Health* 2021;18(3):1-23.
- Ubaid Ur Rahman H, Asghar W, Nazir W, Sandhu MA, Ahmed A, Khalid N. A comprehensive review on chlorpyrifos toxicity with special reference to endocrine disruption: Evidence of mechanisms, exposures and mitigation strategies. *Sci Total Environ* 2021 ;755 (2) :142649.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007 ;39(1) :44-84.

- Vertuani S, Angusti A, Manfredini S. The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Curr Pharm Des* 2004;10(14):1677-1694.
- Vidart d'Egurbide Bagazgoitia N, Bailey HD, Orsi L, Lacour B, Guerrini-Rousseau L, Bertozzi AI, Leblond P, Faure-Contier C, Pellier I, Freycon C, Doz F, Puget S, Ducassou S, Clavel J. Maternal residential pesticide use during pregnancy and risk of malignant childhood brain tumors: A pooled analysis of the ESCALE and ESTELLE studies (SFCE). *Int J Cancer* 2018;142(3):489-497.
- Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev* 2004 ;25(4) :612-628.
- Wajcman H. Hémoglobines : structure et fonction. *EMC Hématologie* 2005 ; 2(3) : 145-157.
- Worek F, Koller M, Thiermann H, Szinicz L. Diagnostic aspects of organophosphate poisoning. *Toxicology* 2005; 214 (3):182-189.
- Yadav IC, Devi NL. Pesticides Classification and Its Impact on Human and Environment. *Environ Sci Eng* 2017 ;6 :140–158.
- Yan X, Li H, Yan Y, Su X. Selective detection of parathion-methyl based on near-infrared CuInS₂ quantum dots. *Food Chem* 2015 ;173 :179-184.
- Zhang C, Li H, Li J, Hu J, Yang K, Tao L. Oxidative stress: A common pathological state in a high-risk population for osteoporosis. *Biomed Pharmacother* 2023 ;163 :114834.
- Zhao P, Wang J, Ma H, Xiao Y, He L, Tong C, Wang Z, Zheng Q, Dolence EK, Nair S, Ren J, Li J. A newly synthetic chromium complex-chromium (D-phenylalanine)₃ activates AMP-activated protein kinase and stimulates glucose transport. *Biochem Pharmacol* 2009 ;77(6) :1002-1010.
- Zhao Z, Zhang L, Cai Y, Chen Y. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) residues in several tissues of edible fishes from the largest freshwater lake in China, Poyang Lake, and associated human health risk assessment. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2014 ;104 :323-331.
- Zhou JF, Xu GB, Fang WJ. Relationship between acute organophosphorus pesticide poisoning and damages induced by free radicals. *Biomed Environ Sci* 2002 ; 15 :177–186.

Site web:

<http://www.cours-pharmacie.com/biologie-cellulaire/les-membranes-cellulaires.html>.

Résumé

Le but de cette étude était d'évaluer l'effet de l'insecticide organophosphoré (OP) le chlorpyrifos (CPF) sur les biomarqueurs du stress oxydant via la génération des radicaux libres dans les érythrocytes humains dans des conditions *in vitro*. Le pouvoir protecteur de la vitamine C (vit C) seule, vitamine E (vit E) seule, et la combinaison des deux vitamines (E+C), ainsi que le taux d'hémoglobine (Hb) et méthémoglobine (MetHb), les niveaux de substance réactive à l'acide thiobarbiturique (TBARS) et la stabilité d'hémoglobine ont été mesurés dans des érythrocytes humains exposés *in vitro* au CPF à une concentration optimale (25 µg/ml) pendant 15 min à 37°C. La formation du complexe MDA-TBA était significativement élevée, dans les érythrocytes incubés avec CPF à 25 µg /ml. Cependant les tests de protection par la vit E (0.25 mg/ml) seule et la combinaison de vit (E+C) ont donné une protection élevée par contre la protection par la vit C seule n'a pas protégé à une concentration de (0.1 mg/ml). Le contact direct de CPF avec Hb ne montre aucun changement. Dans tous les tests, le taux de MetHb reste faible. Ces résultats sont clairement montrés que le CPF induit un stress oxydatif au niveau des érythrocytes humains *in vitro*.

Mots clés : chlorpyrifos, stress oxydant, globules rouges, vitamine C, vitamine E.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of the organophosphate (OP) insecticide chlorpyrifos (CPF) on biomarkers of oxidative stress via free radical generation in human erythrocytes under *in vitro* conditions. The protective power of vitamin C (vit C) alone, vitamin E (vit E) alone, and the combination of the two vitamins (E+C), as well as hemoglobin (Hb) and methemoglobin (MetHb) levels, thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) levels and hemoglobin stability were measured in human erythrocytes exposed *in vitro* to CPF at optimal concentration (25 µg /ml) for 15 min at 37 °C. MDA-TBA complex formation was significantly higher in erythrocytes incubated with CPF at 25 µg /ml. However, tests for protection by vit E (0.25 mg /ml) alone and the combination of vit (E+C) gave high protection, while protection by vit C alone failed to protect at a concentration of (0.1 mg /ml). Direct contact of CPF with Hb showed no change. In all tests, MetHb levels remained low. These results clearly show that CPF induces oxidative stress in human erythrocytes *in vitro*.

Key words: chlorpyrifos, oxidative stress, red blood cells, vitamin C, vitamin E.

ملخص

كان الغرض من هذه الدراسة هو تقييم تأثير المبيدات الحشرية الفوسفاتية العضوية (OP) الكلوربيريفوس (CPF) على المؤشرات الحيوية المؤكسدة للإجهاد من خلال توليد الجذور الحرة في كريات الدم الحمراء البشرية في ظروف المختبر. القوة الواقية لفيتامين ج (vit C) وحده، فيتامين هـ (vit E) وحده، ومزيج من الفيتامينين (E C)، وكذلك مستويات الهيموجلوبين (Hb) والميثيموجلوبين (MetHb)، تم قياس مستويات المادة التفاعلية مع حمض ثيوباربيتوريك (TBARS) وثبات الهيموجلوبين في كريات الدم الحمراء البشرية المعرضة في المختبر لـ CPF بالتركيز الأمثل (25 µg/ml) لمدة 15 دقيقة عند 37 درجة مئوية. تم ارتفاع تشكيل مركب MDA-TBA بشكل كبير في كريات الدم الحمراء المحتضنة مع CPF عند 25 µg/ml. ومع ذلك، فإن Vit E (0.25 ملغ/مل) وحدها ومزيج من اختبارات Vit (E C) توفر حماية عالية، في حين أن Vit C وحده لا يحمي بتركيز (0.1 ملغ/مل). لا يظهر الاتصال المباشر لـ CPF مع Hb أي تغيير. في جميع الاختبارات، يظل معدل MetHb منخفضًا. تظهر هذه النتائج بوضوح أن CPF يحفز الإجهاد التأكسدي في كريات الدم الحمراء البشرية في المختبر.

الكلمات الرئيسية: الكلوربيريفوس، الإجهاد المؤكسد، خلايا الدم الحمراء، فيتامين ج، فيتامين هـ.