

Stress oxydatif induit par deux pesticides : l'endosulfan et le chlorpyrifos

SAMIRA CHEBAB
NASSIMA BELLI
ESSAÏD LEGHOUCHI
MESBAH LAHOUEL

Laboratoire de pharmacologie, chimie pharmaceutique et environnement
Faculté des sciences
Université de Jijel
18000 Jijel
Algérie
<samira_univjijel@yahoo.fr>
<belli_nana@yahoo.fr>
<leghouchi_s@yahoo.com>
<lahouelmesbah@yahoo.fr>

Tirés à part :
M. Lahouel

Résumé. L'endosulfan (6,7,8,9,10,10-hexachloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahydro-6,9 methano-2,4,3-benzodioxathiepin-3-oxide) et le chlorpyrifos (O,O'-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothionate, CPF) sont respectivement des insecticides organochlorés et organophosphorés. Le but de la présente étude a été d'évaluer les effets oxydatifs consécutifs à une exposition *in vitro* et *in vivo* à ces deux pesticides. L'endosulfan (4 mg/kg), le CPF (4 mg/kg), ainsi que l'association endosulfan (4 mg/kg) + CPF (4 mg/kg), ont été administrés quotidiennement à des rats (n = 8/groupe) par gavage pendant 4 semaines. Pour l'étude *in vitro*, les deux pesticides à des concentrations de 10^{-10} - 10^{-2} M ont été examinés quant à leurs effets sur des homogénats hépatiques et des mitochondries isolés du foie des rats mâles. L'évaluation du stress oxydatif a été fondée sur la peroxydation lipidique par la mesure du taux de malondialdéhyde (MDA) et sur l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) et catalase (CAT) – deux enzymes détoxifiant respectivement le radicale superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le peroxyde d'hydrogène – ainsi que sur les niveaux du glutathion réduit (GSH). L'incubation des mitochondries hépatiques avec des concentrations croissantes (de 10^{-10} à 10^{-2} M) du CPF et de l'endosulfan entraîne l'augmentation des taux du MDA, et conduit à une inhibition de l'activité de la SOD et de la catalase par les fortes concentrations de deux pesticides. Les activités de la SOD et de la catalase mitochondriales et cytosoliques ont été augmentées chez les rats recevant l'endosulfan ou le CPF et inversement inhibées chez ceux recevant l'association de deux pesticides. La peroxydation lipidique a été augmentée suite à l'exposition *in vivo* à l'endosulfan, CPF et leur association comparant à celle des témoins. De plus, les taux de GSH sont significativement diminués par comparaison avec les témoins ($p < 0,01$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ respectivement). Ces résultats renforcent l'implication du stress oxydatif et, en particulier, la peroxydation lipidique dans la toxicité de ces pesticides et suggèrent un effet synergique entre le chlorpyrifos et l'endosulfan agissant en simultanéité.

Mots clés : endosulfan ; pesticides ; stress oxydatif ; rats.

Abstract

Oxidative stress induced by two pesticides: endosulfan and chlorpyrifos

Endosulfan (6,7,8,9,10,10-hexachloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahydro-6,9 methano-2,4,3-benzodioxathiepin-3-oxide) is an organochlorine insecticide and chlorpyrifos (O,O'-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothionate, CPF) an organophosphate. The aim of this study was to assess the oxidative effects after *in vitro* and *in vivo* exposure to each of these insecticides, separately and together. The *in vitro* effects of the two pesticides on liver homogenates and mitochondria isolated from liver of male rats was assessed at concentrations ranging from 10^{-10} to 10^{-2} M. Endosulfan (4 mg/kg), CPF (4mg/kg), and a combination of Endosulfan (4 mg/kg) + CPF (4mg/kg) were given daily to rats (n=8/group) for 4 weeks, via gavage, for *in vivo* exposure. Oxidative stress was evaluated according to lipid peroxidation, measured by malondialdehyde (MDA) levels, the activity of superoxide dismutase and catalase (antioxidant enzymes that detoxify, respectively, superoxide radicals ($O_2^{\cdot-}$) and hydrogen peroxide), and the levels of reduced glutathione (GSH). Incubation of hepatic mitochondria with increasing concentrations (from 10^{-10} to 10^{-2} M) of CPF and endosulfan induced concentration-dependent increases in MDA levels and inhibition of SOD and catalase activity. SOD and catalase activity increased in animals treated with endosulfan or CPF and conversely decreased in those treated with the combination. Lipid peroxidation increased after exposure *in vivo*

to endosulfan, CPF, and the combination dose, compared with controls. Moreover, levels of antioxidant GSH were significantly lower than in controls ($p < 0.01$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ respectively). Our results present additional evidence that oxidative stress and particularly lipid peroxidation are involved in pesticide toxicity and suggest a synergistic effect when chlorpyrifos and endosulfan act simultaneously.

Key words: endosulfan; oxidative stress; pesticides; rats.

Les pesticides, parfois appliqués anarchiquement en de grandes quantités provoquant la pollution de l'environnement, sont une cause d'inquiétude. Des quantités résiduelles des pesticides organochlorés (OC) et organophosphorés (OP) ont été détectées dans le sol, les ressources en eau, les légumes, les grains et les autres produits alimentaires [1].

Le chlorpyrifos (O,O'-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothionate, CPF), est un insecticide organophosphoré (OP) à large spectre d'action avec de nombreuses utilisations en milieu urbain et en agriculture. En dépit de la restriction imposée à son utilisation, il continue à être l'un des insecticides les plus couramment utilisés. Ce dernier est responsable des effets cholinergiques aigus exercés par son métabolite actif : le chlorpyrifos-oxon qui inhibe l'acétylcholinestérase, empêchant ainsi l'hydrolyse de l'acétylcholine, ce qui mène à une stimulation massive des récepteurs cholinergiques. Les signes de toxicité incluent un dysfonctionnement autonome, des fasciculations, des saisies et des convulsions, et une détresse respiratoire [2, 3].

L'endosulfan (6,7,8,9,10,10-hexachloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahydro-6,9 methano-2,4,3-benzodioxathiepin-3-oxide) est un insecticide organochloré appartenant au groupe des cyclodiènes [4]. Il est l'un des pesticides les plus couramment utilisés en agriculture et en horticulture pour contrôler des insectes nuisibles pour les grains, thé, fruits, légumes, tabac et coton. La nature lipophile de ce composé lui permet de persister dans l'environnement pour de longues périodes de temps [5].

Des études récentes indiquent que l'exposition aux pesticides produit le stress oxydant par la génération des radicaux libres et induit la peroxydation lipidique dans les tissus des mammifères et des autres organismes [6-8]. Toutefois, seuls les effets des molécules séparées ont été étudiés, mais les risques associés aux mélanges des pesticides sont loin d'être estimés [9].

Au cours de cette étude, nous nous sommes donc intéressés à évaluer l'effet d'une mixture de deux pesticides – CPF et endosulfan – sur les paramètres du stress oxydatif.

Les effets oxydatifs potentiels des deux pesticides ont été d'abord identifiés *in vitro*, puis ces molécules ont été administrées à des lots d'animaux, séparément et en association. Le cytosol et des mitochondries isolées de foie ont été utilisés pour déterminer l'activité enzymatique du superoxyde dismutase et de la catalase, ainsi que les taux du glutathion réduit (GSH) et du malondialdéhyde (MDA).

Matériel et méthodes

Étude *in vivo*

Animaux

L'étude a été réalisée sur des rats wistar albinos mâles pesant environ 150 g. Les animaux sont repartis en plusieurs groupes de huit. Ils ont libre accès à l'eau et à la nourriture. La température de l'animalerie est maintenue à 22 °C, avec une hygrométrie de 60 % et une photopériode de 12 heures sur 24.

Traitement des animaux

Les rats (n = 32) sont répartis en quatre lots de huit rats chacun :

- **lot 1** : animaux témoins, recevant 0,2 mL d'huile de maïs par voie orale chaque jour pendant 1 mois ;
- **lot 2** : animaux recevant par gavage gastrique une dose quotidienne de 4 mg/kg de pesticide chlorpyrifos pendant 1 mois ;
- **lot 3** : animaux recevant par gavage gastrique une dose quotidienne de 4 mg/kg de pesticide endosulfan pendant 1 mois ;
- **lot 4** : animaux recevant par gavage gastrique une dose quotidienne de 4 mg/kg de l'association de deux pesticides, chlorpyrifos et endosulfan, pendant 1 mois.

À la fin de la période d'administration, les animaux sont sacrifiés, le foie est prélevé et utilisé pour effectuer les différents dosages.

Étude *in vitro*

Pour l'étude *in vitro*, des homogénats de tissu (cytosol), ainsi que des mitochondries isolées du foie, ont été incubés avec des concentrations croissantes (10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-6} , 10^{-4} , 10^{-2} M) des pesticides chlorpyrifos et endosulfan.

Extraction des mitochondries hépatiques [10]

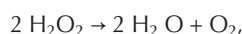
10 g de foie sont broyés dans un *potter* contenant 30 mL de TSE (Tris-Sucrose-EGTA) (250 mM de sucrose, 50 mM de Tris, 5 mM d'EGTA ; pH 7,2), ce qui permet la libération des mitochondries. L'homogénat obtenu est centrifugé à 1 770 rpm (tours par minutes) pendant 10 minutes ; le surnageant est récupéré et centrifugé à 9 600 rpm pendant 10 minutes. Le culot mitochondrial ainsi obtenu est remis en suspension dans 13 mL de TSE. Cette suspension est de nouveau centrifugée à 9 600 rpm pendant 10 minutes. Le culot contenant les mitochondries est alors repris dans 15 mL de tampon TS (Tris-Sucrose) (250 mM

de sucrose, 50 mM de Tris ; pH 7) puis subir une dernière centrifugation à 9600 rpm pendant 10 minutes.

Le culot final est subdivisé en deux fractions : la première est reprise dans 200µL du tampon TS, pour obtenir la suspension mitochondriale, et la seconde dans la solution hypotonique (25 mM de KH₂PO₄, 5 mM de MgCl₂ ; pH 7,2) qui sert à l'étude des enzymes antioxydantes mitochondriales.

Mesure de l'activité catalasique (CAT)

L'activité catalytique a été mesurée selon la méthode de Clai-borne (1985) [11] par la mesure de la diminution de l'absorbance d'une solution d'H₂O₂ à 240 nanomètres pendant 1 minute à 25 °C. Cette diminution étant due à la dismutation du peroxyde d'hydrogène par la catalase selon la réaction :



l'activité enzymatique est exprimée en Unités internationales (UI)/g de protéines.

Mesure de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) [12]

L'activité SOD a été évaluée grâce à sa propriété de diminuer la photoréduction du NBT (nitrobleu tetrazolium). Dans un milieu aérobie, le mélange riboflavine/méthionine/NBT donne une coloration bleue, dont la densité optique (DO) a été mesurée à 560 nanomètres. Une unité de SOD correspond à la quantité de protéines nécessaire pour inhiber la photoréduction de 50 %.

Dosage du glutathion hépatique (GSH) [13]

Un gramme de foie est homogénéisé dans trois volumes d'acide trichloroacétique 5 %, puis centrifugé à 2 000 tours/minute. Ensuite, 50 µL de surnageant sont dilués dans 10 mL de tampon phosphate 0,1 M ; pH = 8. À 3 mL du mélange de dilution, nous avons additionné 20 µL d'acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque (0,01 M). La lecture de la densité optique est effectuée à 412 nanomètres, contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA 5 %. Les concentrations sont exprimées en millimoles de glutathion/gramme de foie. Elles sont déduites à partir d'une gamme étalon de glutathion préparée dans les mêmes conditions que le dosage.

Dosage du malondialdéhyde (MDA) [14]

Le MDA est l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés (PUFA) médiée par les radicaux libres. Le dosage repose sur la formation, en milieu acide et à chaud (100 °C), entre le MDA et deux thiobarbiturique (TBA), d'un pigment coloré absorbant à 530 nanomètres, extractible par les solvants organiques comme le butanol.

Les concentrations de MDA sont déduites à partir d'une gamme étalon préparée dans les mêmes conditions en utilisant le tétraméthoxypropane.

Évaluation statistique

Les résultats sont donnés sous forme de moyenne et d'écart type. L'évaluation statistique est effectuée en comparant les moyennes des groupes traités par les pesticides à celles des groupes témoins en utilisant le test t de Student :

- Ns : différence non significative ;
- p < 0,05 : différence significative ;
- ** p < 0,01 : différence très significative ;
- *** p < 0,001 : différence hautement significative.

Résultats

Etude in vivo

Variation de taux du MDA mitochondrial et cytosolique

Comparés aux rats témoins, les rats traités par les deux pesticides montrent une augmentation statistiquement significative (p < 0.01) des taux du MDA mitochondrial et cytosolique par rapport aux rats non traités. L'augmentation la plus accentuée est enregistrée chez les rats ayant reçu l'association de deux pesticides : une augmentation très hautement significative du taux du MDA mitochondrial et cytosolique a été enregistrée (p < 0.001) par rapport aux témoins (figures 1 et 2).

Variations des taux de glutathion hépatique

Le traitement des rats par les pesticides chlorpyrifos et endosulfan (4mg/kg/jour) pendant 1 mois conduit à une diminution très significative (p < 0,01) des taux de GSH.

On constate une diminution de l'ordre de -27,16 % et -21,60 % par rapport aux témoins, entraînée respectivement par le chlorpyrifos et par l'endosulfan.

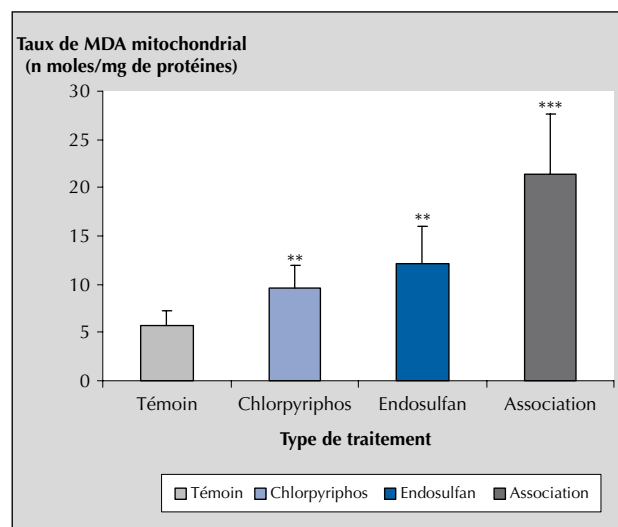


Figure 1. Variations des taux du MDA mitochondrial (nmoles/mg de protéines) après administration de l'endosulfan, du chlorpyrifos et de leur association à la dose de 4 mg/kg/jour pendant un mois.

Figure 1. Variations in the concentration of mitochondrial A) and cytosolic B) MDA (nmole/mg protein) after administration of endosulfan, of chlorpyrifos, and of the two combined at a dose of 4 g/kg/d for 1 month.

Les valeurs représentent la moyenne±écart-type pour chaque groupe. (n = 8). Comparaison avec les rats (T) : ** p < 0,01 ; *** p < 0,001.

The values represent the mean±standard deviation for each group (n = 8). Comparison with rats (T) : ** p < 0.01 ; *** p < 0.001.

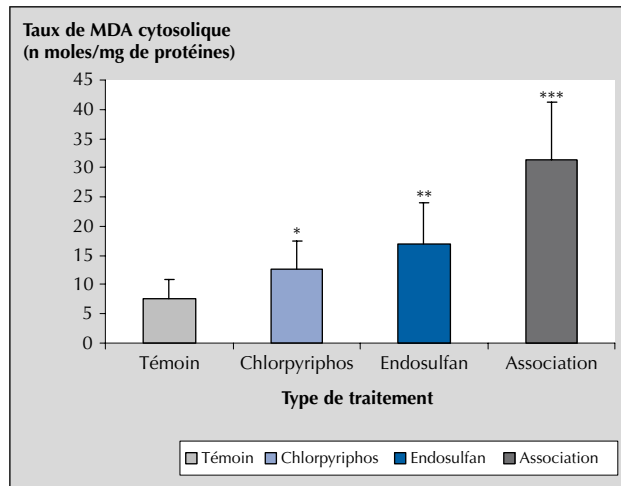


Figure 2. Variations des taux du MDA cytosolique (nmoles/mg de protéines) après administration de l'endosulfan, du chlorpyriphos et de leur association à la dose de 4 mg/kg/j pendant un mois.

Figure 2. Variations in the concentration of cytosolic MDA (nmole/mg protein) after administration of endosulfan, of chlorpyrifos, and of the two combined at a dose of 4 g/kg/d for 1 month.

Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type pour chaque groupe ($n = 8$). Comparaison avec les rats (T) : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.
The values represent the mean \pm standard deviation for each group ($n = 8$). Comparison with rats (T): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

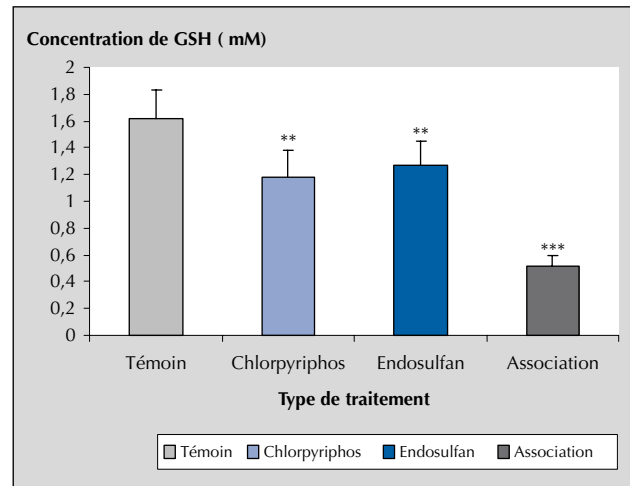


Figure 3. Variations des taux de GSH cytosolique hépatique (mM) après administration de l'endosulfan, du chlorpyriphos et de leur association à la dose de 4mg/kg/jour pendant un mois.

Figure 3. Variations in the level of hepatic cytosolic GSH (mM) after administration of endosulfan, of chlorpyrifos, and of the two combined at a dose of 4 g/kg/d for 1 month.

Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type pour chaque groupe ($n = 8$). Comparaison avec les rats (T) : ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.
The values represent the mean \pm standard deviation for each group ($n = 8$). Comparison with rats (T): ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

L'association des deux pesticides a montré une diminution plus importante des taux de GSH cytosolique par rapport aux groupes ayant reçu l'un des deux pesticides. On observe une diminution supplémentaire d'environ -55,93 % et -59,05 % des taux de GSH cytosolique par rapport aux groupes traités respectivement par le chlorpyriphos et par l'endosulfan (figure 3).

Variation de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique et mitochondriale

Le traitement par l'endosulfan et le chlorpyriphos à 4 mg/kg/jour conduit à une augmentation significative ($p < 0,01$) de l'activité enzymatique de la SOD mitochondriale qui atteint $601,92 \pm 41,51$ UI/g de protéines, chez les rats traités par l'organophosphoré, et $798,57 \pm 45,13$ UI/g de protéines, chez les rats recevant l'organochloré, contre $513,95 \pm 38,92$ UI/g de protéines chez les témoins, soit une augmentation de l'ordre de + 14,61 % et + 35,64 % respectivement. L'activité enzymatique de la SOD mitochondriale se trouve toutefois largement altérée chez les rats recevant l'association de deux pesticides. Une diminution significative de l'activité sodique est, en effet, enregistrée par rapport aux témoins.

Le même constat a été enregistré avec l'activité SOD cytosolique (figures 4 et 5).

Variation de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale et cytosolique :

L'activité catalytique mitochondriale et cytosolique se trouve augmentée de façon significative ($p < 0,01$) dans les groupes d'animaux recevant 4 mg/kg/jour de chlorpyriphos et de l'endosulfan pendant 1 mois. Cette activité est, toutefois, altérée, suite à

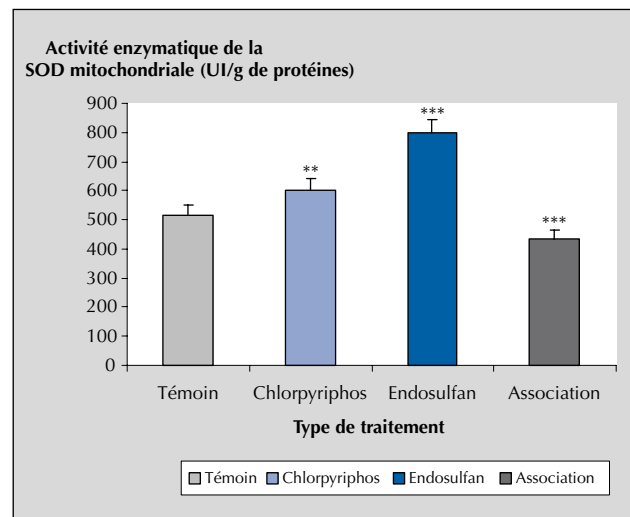


Figure 4. Variations de l'activité enzymatique de la SOD mitochondriale hépatique (UI/g de protéines) après administration de l'endosulfan, du chlorpyriphos et de leur association à la dose de 4 mg/kg/jour pendant un mois.

Figure 4. Variations in the enzymatic activity of hepatic mitochondrial SOD (IU/g protein) after administration of endosulfan, of chlorpyrifos and of the two combined, at a dose of 4 g/kg/d for 1 month.

Les valeurs représentent la moyenne \pm écart type pour chaque groupe ($n = 8$). Comparaison avec les rats (T) : ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.
The values represent the mean \pm standard deviation for each group ($n = 8$). Comparison with rats (T): ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

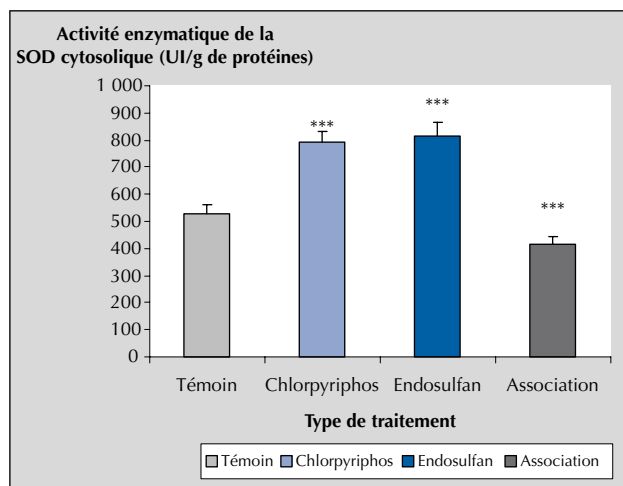


Figure 5. Variations de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique hépatique (UI/g de protéines) après administration de l'endosulfan, du chlorpyriphos et de leur association à la dose de 4 mg/kg/j pendant un mois.

Figure 5. Variations in the enzymatic activity of hepatic cytosolic SOD (IU/g protein) after administration of endosulfan, of chlorpyriphos and of the two combined, at a dose of 4 g/kg/d for 1 month.

Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type pour chaque groupe ($n = 8$). Comparaison avec les rats (T) : *** $p < 0.001$.

The values represent the mean \pm standard deviation for each group ($n = 8$). Comparison with rats (T): *** $p < 0.001$.

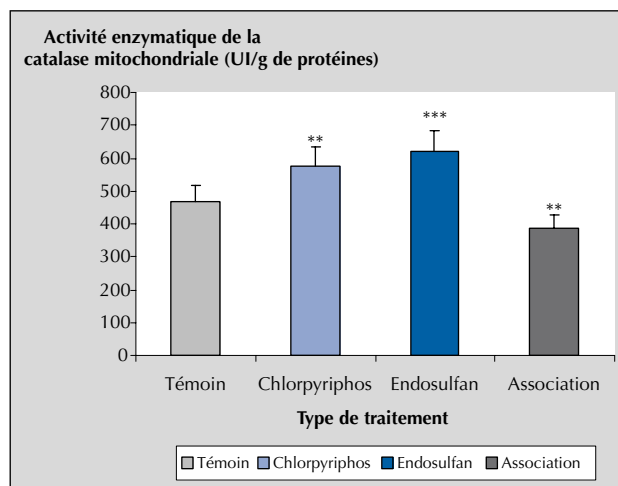


Figure 6. Variations de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale hépatique après administration de l'endosulfan, du chlorpyriphos et de leur association à la dose de 4 mg/kg/j pendant un mois.

Figure 6. Variations in the enzymatic activity of hepatic mitochondrial catalase after administration of endosulfan, of chlorpyriphos and of the two combined, at a dose of 4 g/kg/d for 1 month.

Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type pour chaque groupe ($n = 8$). Comparaison avec les rats (T) : ** $p < 0,01$; *** $p < 0.001$.

The values represent the mean \pm standard deviation for each group ($n = 8$). Comparison with rats (T): ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

l'administration des deux pesticides en association. Une diminution significative a, en effet, été enregistrée par rapports aux témoins (figures 6 et 7).

Étude *in vitro*

Les résultats de l'étude de l'effet *in vitro* des concentrations croissantes (10^{-10} à 10^{-2}) du chlorpyriphos et de l'endosulfan sur le taux du MDA mitochondrial, ainsi que sur les activités enzymatiques SOD et CAT mitochondriale et cytosolique des homogénats et des mitochondries isolées du foie des rats, sont rassemblés dans le tableau 1.

L'incubation des mitochondries hépatiques avec des concentrations croissantes (de 10^{-10} à 10^{-2} M) de deux pesticides chlorpyriphos et endosulfan entraîne une augmentation statistiquement significative ($p < 0.05$) des taux du MDA. Cette augmentation est, en effet, fortement proportionnelle aux concentrations de deux substances (coefficient de corrélation = 0,93 pour le chlorpyriphos et $r = 0,94$ pour l'endosulfan).

On constate une induction de l'activité enzymatique de la SOD mitochondriale – même par les plus faibles concentrations des deux pesticides – maximale, avec la concentration de 10^{-6} M pour les deux pesticides. En présence des plus fortes concentrations de deux pesticides (10^{-4} et 10^{-2} M), l'activité sodique mitochondriale se trouve toutefois largement altérée : une diminution de l'activité, de l'ordre de -36,63 % et -30,93 % par rapport aux témoins, a été enregistrée, en présence de 10^{-2} M respectivement d'endosulfan et de chlorpyriphos.

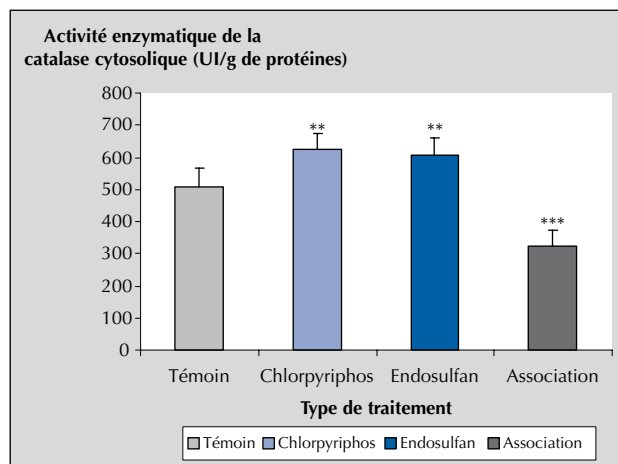


Figure 7. Variations de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique hépatique après administration de l'endosulfan, du chlorpyriphos et de leur association à la dose de 4 mg/kg/j pendant un mois.

Figure 7. Variations in the enzymatic activity of hepatic cytosolic catalase after administration of endosulfan, of chlorpyriphos and of the two combined, at a dose of 4 g/kg/d for 1 month.

Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type pour chaque groupe ($n = 8$). Comparaison avec les rats (T) : ** $p < 0,01$; *** $p < 0.001$.

The values represent the mean \pm standard deviation for each group. ($n = 8$). Comparison with rats (T): ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Tableau 1. Influence de différentes concentrations molaires de l'endosulfan et du chlorpyrifos sur le taux du MDA mitochondrial (nmoles /mg de protéines) et sur les activités SOD (UI/g de protéines) et CAT (UI/g de protéines) mitochondriales et cytosoliques *in vitro*.

Table 1. Influence of different molar concentrations of endosulfan and chlorpyrifos on the concentration of mitochondrial MDA (nmoles/mg protein) and on the mitochondrial and cytosolic activities of SOD (IU/g de proteins) and catalase (IU/g of protein) *in vitro*.

	Témoïn	Traitement	10 ⁻¹⁰ M	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻² M
MDA mitochondrial (n moles/mg de protéines)	3,26 ± 1,46	Endosulfan	5,79 ± 2,21*	6,56 ± 2,32**	7,98 ± 3,06***	9,25 ± 2,26***	13,46 ± 3,18***
		Chlorpyrifos	5,18 ± 2,14*	5,56 ± 1,96*	6,13 ± 2,36**	8,29 ± 3,12***	11,32 ± 3,52***
SOD mitochondriale (UI/g de protéines)	403,13 ± 49,76	Endosulfan	483,06 ± 48,15**	525,32 ± 49,12***	741,65 ± 51,61***	469,20 ± 46,31**	306,11 ± 24,13***
		Chlorpyrifos	481,68 ± 46,16**	693,08 ± 51,32***	714,31 ± 43,28***	472,63 ± 44,89**	333,63 ± 32,66**
SOD cytosolique (UI/g de protéines)	523,95 ± 40,09	Endosulfan	598,65 ± 43,47**	663,23 ± 45,36**	843,01 ± 52,23***	470,69 ± 38,35**	401,62 ± 36,34***
		Chlorpyrifos	607,84 ± 53,34**	611,94 ± 54,55**	798,69 ± 53,36***	469,32 ± 39,58**	395,96 ± 38,65***
Catalase cytosolique (UI/g de protéines)	697,69 ± 47,85	Endosulfan	834,36 ± 55,13ns	880,71 ± 58,16 ns	939,65 ± 61,39**	1225,65 ± 78,65 ***	701,72 ± 59,27***
		Chlorpyrifos	829,87 ± 56,79ns	836,79 ± 49,15ns	1012,3 ± 69,58***	1317,63 ± 76,54***	732,84 ± 61,19**
Catalase mitochondriale (UI/g de protéines)	825,74 ± 62,23	Endosulfan	703,24 ± 49,81ns	780,31 ± 53,62*	905,61 ± 63,21***	996,36 ± 65,25* **	536,95 ± 49,35***
		Chlorpyrifos	699,63 ± 48,10ns	683,35 ± 46,96ns	744,35 ± 47,51**	964,32 ± 55,32* **	630,87 ± 48,65**

Les valeurs représentent la moyenne ± écart-type pour chaque groupe. (n = 10). Comparaison avec les témoins (T) : * p < 0.05 ; ** p < 0.01 ; *** p < 0.001. The values represent the mean ± standard deviation for each group. (n = 10). Comparison with controls (T): * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

Le même profil de variations est constaté avec l'activité de la SOD cytosolique.

Les concentrations de 10⁻¹⁰ et 10⁻⁸ M de chlorpyrifos, et de 10⁻¹⁰ M d'endosulfan n'ont aucun effet sur l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale et cytosolique. Cette activité se trouve toutefois augmentée de façon significative avec les concentrations de 10⁻⁶ et 10⁻⁴ M des deux pesticides.

En présence d'une plus forte concentration (10⁻² M), l'activité catalasique ne montre toutefois plus cette tendance à augmenter, elle se trouve, en effet, significativement diminuée par rapport aux témoins.

Discussion et conclusion

Dans la présente étude, des dosages concernant le stress oxydatif (MDA) et le statut antioxydant enzymatique (catalase, SOD) et non enzymatique (GSH) ont été réalisés, suite à une exposition *in vitro* et *in vivo* à deux pesticides largement utilisés en agriculture : le chlorpyrifos et l'endosulfan.

Les résultats de l'étude *in vitro* montrent que l'exposition à l'endosulfan ou au chlorpyrifos engendre l'induction de l'activité de la SOD mitochondriale et cytosolique. Ceci pourrait être expliqué par la production de l'anion superoxyde, qui stimule l'activité de la SOD, laquelle, en dismutant O₂⁻, produit de l'H₂O₂, qui stimule l'activité de la catalase.

L'induction de l'activité catalasique ne se produit toutefois qu'à partir de la concentration de 10⁻⁶ M d'endosulfan et de CPF (p < 0,05). Ceci suggère que l'H₂O₂ généré suite à l'exposition à des faibles concentrations de deux pesticides était en quantité insuffisante pour induire l'activité catalasique. Ce dernier est alors pris en charge par la glutathion peroxydase (Gpx) [15].

La production excessive et l'accumulation de ces espèces réactives de l'oxygène pourraient expliquer les effets secondairement inhibiteurs des fortes concentrations (10⁻⁴, 10⁻² M) des deux pesticides sur l'activité de la SOD et de la CAT. Kano *et al.* [16] ont montré que l'anion superoxyde inhibe l'activité de la CAT, tandis que le peroxyde d'hydrogène bloque celle de la SOD.

Dans des études réalisées *in vitro*, une diminution de l'activité de la catalase et de la SOD, suite à une exposition aux pesticides, a été rapportée [17-19].

Le taux de MDA augmente proportionnellement aux concentrations de deux pesticides témoignant ainsi la survenue des dommages au niveau des membranes cellulaires. Ce résultat est en accord avec les résultats d'autres études qui ont mis en évidence une augmentation de la peroxydation lipidique après traitement par les pesticides [20, 21].

Les résultats de l'étude *in vivo* montrent que le traitement des rats par 4 mg/kg du chlorpyrifos pendant un mois engendre une augmentation significative de l'activité de la SOD et de la CAT, mais aussi des niveaux élevés de MDA.

Le chlorpyrifos, comme tous les autres organophosphorés, exerce son action notamment par une inhibition de l'activité des acétylcholinestérases [22, 23]. En dépit de ce mode d'action spécifique, les effets toxiques de chlorpyrifos se manifestent également par des dysfonctionnements hépatiques sévères. Il a été montré que l'exposition aiguë ou chronique à cet insecticide induisait une élévation importante des transaminases AST et ALT [24]. Une atrophie hépatique et une destruction de l'architecture hépatique normale ont été constatées suite à l'exposition des rats à ce pesticide [25, 26].

Les dommages hépatiques engendrés par l'exposition au chlorpyrifos sont souvent accompagnés par une remarquable altéra-

tion de la défense antioxydante dans le foie, ce qui laisse supposer que ces derniers sont en rapport avec une production massive de ROS (*Reactive Oxygen Species*) induite par ce pesticide *in vivo*. C'est ainsi que plusieurs auteurs proposent le stress oxydant comme le mécanisme clé de la toxicité du chlorpyrifos [25-28].

Administré à la même dose que le chlorpyrifos, l'endosulfan provoque une augmentation significative de l'activité de la SOD et de la CAT, et des taux de MDA.

Plusieurs études récentes ont prouvé la capacité des organochlorés (endrine, HCH, lindane et autres) à induire le stress oxydant dans les différents organes [29-32].

Hincal *et al.* [33] ont pu mettre en évidence une augmentation de la peroxydation lipidique dans les tissus cérébraux et hépatiques, suite à une exposition à l'endosulfan. Dans le même contexte, Jalili *et al.* [34] ont constaté que l'endosulfan a une influence sur les enzymes antioxydantes dans le cœur et ont attribué les dommages constatés à des dégâts oxydatifs. Selon plusieurs auteurs, la toxicité engendrée par ce pesticide s'exerce notamment *via* sa biotransformation dans le foie par les mono-oxygénases à cytochrome P450 en des dérivés hautement réactifs causant un stress oxydant [35-37].

Chez les animaux des deux lots traités par les pesticides, le taux du glutathion hépatique est significativement diminué en comparaison avec les témoins ($p < 0,01$).

Grâce à la fonction thiol de la cystéine, le glutathion est un composé important pour le maintien de l'état réduit de la cellule. Selon plusieurs auteurs, la conjugaison du GSH à des pesticides ou aux métabolites *in vivo* pourrait être la voie majeure de leur détoxification [38-40]. On suppose donc que le glutathion a été utilisé pour la détoxification des pesticides administrés, ce qui a engendré une baisse des taux de ce dernier.

Administrés en association, les deux pesticides provoquent une diminution significative de l'activité enzymatique antioxydante (SOD et CAT) par rapport à celle des témoins ($p < 0,01$), une augmentation drastique des taux de MDA ($p < 0,001$), ainsi qu'une déplétion très remarquable du glutathion hépatique ($p < 0,001$). Il se peut donc qu'il existe une synergie entre les deux pesticides agissant en simultanéité.

En effet, comme la multiexposition aux pesticides augmente, la question cruciale qui se pose est de savoir si la toxicité des mélanges est simplement additive ou s'il y a amplification de la toxicité [41]. Dans des études récentes, une amplification de la toxicité de certains pesticides dans des mélanges a été rapportée : Jin-Clark *et al.* [42] ont montré une augmentation de la toxicité du chlorpyrifos en présence des pesticides alachlore et métolachlore chez le moucheron *Chironomus tentans*.

Les combinaisons qui conduisent à une toxicité plus qu'additive sont sources d'une inquiétude croissante, car la toxicité des mélanges ne peut pas être prédite à partir des effets des composés individuels de ces mélanges [43, 44].

Il y a deux mécanismes actuellement reconnus qui peuvent augmenter la toxicité d'un pesticide dans un mélange. D'une part, la présence d'un composé peut causer une augmentation du taux d'activation enzymatique de l'autre composé. D'autre part, une inhibition des enzymes responsables de la détoxification pourrait avoir lieu et, par conséquent, les composés restent sous leurs formes toxiques et sont donc plus susceptibles d'interagir avec leurs cibles [44].

Woods *et al.* [43], ont étudié, chez le cladocère *Ceriodaphnia dubia*, la toxicité aiguë des pesticides chlorpyrifos, profenofos et endosulfan, séparément et en différentes combinaisons. Leurs résultats ont montré un effet antagoniste entre l'endosulfan et le profenofos, mais synergique entre le chlorpyrifos et l'endosulfan. Les auteurs ont suggéré une induction par l'endosulfan des formes de cytochrome P450 responsables de l'activation métabolique du chlorpyrifos, ce qui amplifie sa toxicité. Il se peut, dans notre étude, que l'endosulfan ait activé la transformation du chlorpyrifos en son métabolite secondaire, chlorpyrifos-oxon, qui est plus actif et plus toxique que le chlorpyrifos, ce qui pourrait expliquer la forte toxicité engendrée par l'association de deux pesticides.

L'influence des systèmes enzymatiques responsables de la métabolisation d'un pesticide par présence d'autres pesticides a été rapportée. Canistro *et al.* [45] ont montré que le traitement des souris mâles *Swiss albino* CD1 par différentes combinaisons de trois pesticides – acéphate, fenarimol et vinclozoline – perturbe l'activité des enzymes dépendantes des cytochromes P450 hépatiques d'une manière très complexe et imprévisible.

Une attention particulière doit ainsi être accordée aux interactions biochimiques responsables des réponses synergiques observées lors d'expositions à des mélanges de pesticides. La mesure de l'activité des enzymes impliquées dans les processus d'activation et de détoxification (cytochromes P450s) et des enzymes cibles (acétylcholinestérase, dans le cas des organophosphorés (OP) serait un outil valable pour déterminer les causes réelles de l'amplification de la toxicité lorsque les organismes sont exposés à plus d'un pesticide. ■

Remerciements et autres mentions

Conflit d'intérêt : aucun ; financement : aucun.

Références

1. John S, Kale M, Rhthore N, Bhatnager D. Protective effect of vitamin E in dimthoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *J Nutr Biochem* 2001 ; 12 : 500-4.
2. Stapleton AR, Chan VT. Subtoxic chlorpyrifos treatment resulted in differential expression of genes implicated in neurological functions and development. *Arch Toxicol* 2009 ; 83 : 319-33.
3. Abou-Donia MB, Khan WA, Dechkovskaia AM, Goldstein LB, Bullman SL, Abdel-Rahman A. In utero exposure to nicotine and chlorpyrifos alone, and in combination produces persistent sensorimotor deficits and Purkinje neuron loss in the cerebellum of adult offspring rats. *Arch Toxicol* 2006 ; 80 : 620-31.
4. Gupta PK, Gupta RC. Pharmacology, toxicology and degradation of endosulfan. *Toxicology* 1979 ; 13 : 115-30.

5. Chaturvedi AK. Toxicological evaluation of mixture of ten widely used pesticides. *J Appl Toxicol* 1993 ; 13 : 183-8.
6. Banerjee BD, Seth V, Bhattacharya A, Pasha ST, Chakraborty AK. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free radical scavengers. *Toxicol Lett* 1999 ; 107 : 33-47.
7. Yarsan E, Tanyuksel M, Celik S, Aydin A. Effect of aldicarb and malathion on lipid peroxidation. *Bull Environ Contam Toxicol* 1999 ; 63 : 575-81.
8. Banerjee BD, Seth V, Ahmed RS. Pesticide induced oxidative stress: perspective and trends. *Rev Environ Health* 2001 ; 16 : 1-40.
9. Ross JH, Driver JH, Lunchick C, Wible C, Selman F. Pesticide exposure monitoring databases in applied risk analysis. *Rev Environ Contam Toxicol* 2006 ; 186 : 107-32.
10. Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, et al. Biochemical and biomolecular investigation in the respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 1994 ; 228 : 35-51.
11. Claiborne A. Catalase activity. In : *CRC handbook of methods for oxygen radical research*. Boca Raton : Greenwald RA; CRC Press, 1985.
12. Beauchamp C, Fridovich I. Assay of superoxide dismutase. *Anal Biochem* 1971 ; 44 : 276-87.
13. Ellman GL. Plasma antioxidants. *Arch Biochem Biophys* 1959 ; 82 : 70-7.
14. Okhawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *Anal Biochem* 1979 ; 95 : 351-8.
15. Altuntas I, Delibas N, Doguc DK, Ozmen S, Gultekin F. Role of reactive oxygen species in organophosphate insecticide phosalone toxicity in erythrocytes in vitro. *Toxicol In Vitro* 2002 ; 17 : 153-7.
16. Kono Y, Fridovich I. Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem* 1982 ; 257 : 5751-4.
17. Malik J, Summer K. Toxicity and metabolism of malathion and its impurities in isolated rat hepatocytes: role of glutathione. *Toxicol Appl Pharmacol* 1982 ; 66 : 69-76.
18. Lechner WD, Rehman Abdel MS. The effect of carbamyl and malathion in combination of gamma-glutamyl transpeptidase and glutathione-S-alkyl transferase activity in vitro. *Arch Environ Contam Toxicol* 1986 ; 15 : 647-51.
19. Kalra J, Mantha SV, Prasad K. *Oxygen free radicals: key factors in clinical diseases*. *Lab Med Int* 1994 ; 1 : 16-21.
20. Kehrer JP. Free radical as mediator of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 1993 ; 23 : 21-48.
21. Ahmed RS, Seth V, Pasha ST, Banerjee BD. Influence of dietary (Zingiber officinales Rosc) on oxidative stress induced by malathion in rats. *Food Chem Toxicol* 2000 ; 38 : 443-50.
22. Richardson RJ, Moore TB, Kayyali US, Fowke JH, Randall JC. Inhibition of hen brain acetylcholinesterase and neurotoxic esterase by chlorpyrifos in vivo and kinetics of inhibition by chlorpyrifos oxon in vitro: application to assessment of neuropathic risk. *Fundam Appl Toxicol* 1993 ; 20 : 273-9.
23. Amitai G, Moorad D, Adani A, Doctor BP. Inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by chlorpyrifos-oxon. *Biochem Pharmacol* 1998 ; 56 : 293-9.
24. Goel A, Chauhan DP, Dhawan DK. Protective effects of zinc in chlorpyrifos induced hepatotoxicity: a biochemical and trace elemental study. *Biol Trace Elem Res* 2000 ; 74 : 171-83.
25. Miyazaki Z, Hodgson GC. Chronic toxicity of dursban and its metabolites, 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol in chickens. *Toxicol App Pharmacol* 2001 ; 23 : 391-8.
26. Goel A, Dani V, Dhawan DK. Protective effects of zinc on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and hepatic histoarchitecture in chlorpyrifos-induced toxicity. *Chem Biol Interact* 2005 ; 156 : 131-40.
27. Verma RS, Mehta A, Srivastava N. In vivo chlorpyrifos induced oxidative stress: attenuation by antioxidant vitamins. *Pestic Biochem Physiol* 2007 ; 88 : 191-6.
28. Mahaboob Khan S, Kour G. Subacute oral toxicity of chlorpyrifos and protective effect of green tea extract. *Pestic Biochem Physiol* 2007 ; 89 : 118-23.
29. Bagchi D, Hassoun EA, Bagch M, Stohs SJ. Protective effects of antioxidants against endrin-induced hepatic lipid peroxidation, DNA damage and excretion of urinary lipid metabolites. *Free Rad Biol Med* 1993 ; 15 : 217-22.
30. Bagchi M, Hassoun EA, Akubue P, Bagchi D, Stohs SJ. Comparative effects of endrin on hepatic lipid peroxidation and DNA damage, and nitric oxide production by peritoneal macrophage from C57BL/6J and DBA/2 mice. *Comp Biochem Physiol* 1993 ; 105C : 525-9.
31. Hassoun EA, Stohs SJ. TCDD, endrin and lindane oxidative stress in foetal and placental tissues of C57BL/6J and BDA/2J mice. *Comp Biochem Physiol* 1996 ; 115C : 11-8.
32. Ananya R, Subeena S, Kumar AD, Kumar ID, Kumar SM. Oxidative stress and histopathological changes in heart following oral lindane (gamma hexachlorohexane) administration in rats. *Med Sci Monit* 2005 ; 11 : 325-9.
33. Hincal F, Gurbay A, Giray B. Induction of lipid peroxidation and alteration of glutathione redox status by endosulfan. *Biol Trace Elem Res* 1995 ; 47 : 321-6.
34. Jalili S, Ilkhanipour M, Heydari R, Farshid AA, Salehi S. The effects of vitamin E on endosulfan - induced oxidative stress in rat heart. *Pakistan J Nutr* 2007 ; 6 : 375-80.
35. Kurutas EB, Doran F, Ciralik H. The effect of endosulfan on lactic dehydrogenase enzyme system in liver of musculus: a histochemical study. *Eur J Gen Med* 2006 ; 3 : 148-51.
36. Kilchin KT. An enzymatic approach of biotransformation. *Meth Find Exptl Clin Pharmacol* 1984 ; 6 : 303-10.
37. Maqvi SM, Vaishnai C. Bioaccumulative potential and toxicity of endosulfan insecticide to non-target animals. *Comp Biochem Physiol* 1993 ; 105 : 347-61.
38. Agrawal D, Sultana P, Gupta GSD. Oxidative damage and changes in the glutathione redox system in erythrocytes from rats treated with hexachlorocyclohexane. *Food Chem Toxicol* 1991 ; 29 : 459-62.
39. Almeida MG, Fanini F, Davino SC, Aznar AE, Koch OR, Barros SBM. Pro and antioxidant parameters in rat liver after short term exposure to hexachlorobenzene. *Hum Exp Toxicol* 1997 ; 16 : 257-61.
40. El-Sharkawy AM, Abdel Rahman SZ, Hassan AA, Gabr MH, El-Zoghby SM, El-Sewedy SM. Biochemical effects of some insecticides on the metabolic enzymes regulating glutathione metabolism. *Bull Environ Contam Toxicol* 1994 ; 52 : 505-10.
41. Johnston G, Walker CH, Dawson A. Interactive effects between EBI fungicides (prochloraz, propiconazole and penconazole) and OP insecticides (dimethoate, chlorpyrifos, diazinon and malathion) in the hybrid red-legged partridge. *Environ Toxicol Chem* 1994 ; 13 : 615-20.
42. Jin-Clark Y, Anderson TD, Zhu KY. Effect of Alachlor and Metolachlor on Toxicity of Chlorpyrifos and Major Detoxification Enzymes in the Aquatic Midge, *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). *Arch Environ Contam Toxicol* 2008 ; 54 : 645-52.
43. Woods M, Kumar A, Correll R. Acute toxicity of mixtures of chlorpyrifos, profenofos, and endosulfan to *Ceriodaphnia dubia*. *Bull Environ Toxicol* 2002 ; 68 : 801-8.
44. Forget J, Pavillon JF, Beliaeff B, Bocquene G. Joint action of pollutant combinations (pesticides and metals) on survival (LC50 values) and acetylcholinesterase activity of *Tigriopus brevicornis* (Copepoda, Harpacticoida). *Environ Toxicol Chem* 1999 ; 5 : 912-8.
45. Canistro D, Pozzetti L, Sapone A, et al. Perturbation of murine liver cyp-superfamily of isoforms by different combinations of pesticide mixtures. *Food Chem Toxicol* 2007 ; 46 : 34-42.