

EFFET TOXICO - IMMUNO - GONADOTROPE DU BENZENE CHEZ LA RATTE GESTANTE WISTAR

SAKRAOUI F. *, SACI F.Z. **, GUELLATI M. A. **, OUALI K. **, TAHRAOUI A. K. **

* : Département de Biologie, Centre Universitaire d'El Tarf.

** : Département de Biologie, Université Badji Mokhtar Annaba.

RESUME

L'objectif de la présente étude est d'évaluer l'impact nociceptif du benzène durant la phase de gestation, à travers l'évaluation du potentiel détoxifiant (dosage du GSH, dosage de la méthémoglobine), de l'activité hormonale (dosage de l'hormone chorionotrope HCG), de la riposte immunitaire (dénombrement lymphocytaire), de la reproductivité et de la tératogénicité (taux de fécondité, poids fœtal). Ainsi, l'administration per os du benzène aux doses de 50, 100 et 150 mg/kg de poids corporel chez les ratte gestantes provoquent une toxicité tissulaire et hématologique, associée à une diminution du poids de la rate et une immunodépression. La dose la plus forte semble perturber la sécrétion d'HCG, prépondérante dans l'intégrité de la gestation. Enfin, l'effet nociceptif du benzène présente un caractère tératogène qui se traduit par la chute pondérale chez le fœtus et la diminution du taux de fécondité.

Mots clés : benzène – ratte gestante – GSH – met hémoglobine – immunodépression – tératogénicité.

ABSTRACT

The objective of the present study is to value the effects of benzene during gestating period, by valuation of the detoxifiant potential (measuring GSH and met Hb), the hormonal activity (measuring HCG), the immune response (lymphocytes level), the reproduction and the teratogenicity (fecundity level, body weight of foetus). Thus, the administration of benzen in gestating rats with doses 50, 100 and 150mg/kg, provokes an immunodepression, wich was confirmed by fall in lymphocyte levels, a reduction in spleen weight, tissular and hematological toxicity. The highest dose (150 mg/kg) affected the HCG secretion, preponderating in integrity of gestation. The nociceptif effect of benzen shows a teratogenic characteristic, that is distinguished by a fall in body weight of foetus and reduce the rate of fertility.

Key words: benzene – gestating rats – GSH – met HB – immunodepression – teratogenicity.

INTRODUCTION

La survie de l'espèce et de l'individu sont deux fonctions essentielles qui dépendent de l'équilibre et de l'étroite coordination qui existe, entre les deux systèmes de communication intercellulaires : le système endocrinien et le système immunitaire. Aussi, toute agression spontanée ou provoquée constitue un état de perturbation physique ou métabolique et ralentit l'activité du système neuroendocrinien qui exerce une action stimulatrice ou inhibitrice sur le système immunitaire. Dans ce contexte, la présente étude met en évidence les retombées d'une agression chimique par administration de benzène. C'est un hydrocarbure aromatique polycyclique qui a fait l'objet de nombreux travaux compte tenu de la généralisation dans l'utilisation de ce produit que l'on retrouve non seulement dans tous les milieux, à différentes concentrations mais surtout sous diverses forme dérivées, d'où l'ampleur de sa propagation [1 ; 2 ; 3 ; 4]. Les principales voies d'exposition du benzène sont l'inhalation qui est la voie majoritaire [5], l'absorption par voie orale [6 ; 7] et l'exposition

cutanée qui demeure une source secondaire, l'absorption étant inférieure à 1% [8]. L'absorption de benzène induit des effets toxicologiques qui ont été étudiés chez l'homme et chez l'animal. Ces effets se traduisent par des pancytopénies et des anémies aplasiques [9], une altération de l'immunité cellulaire et humorale [3], des leucopénies et des états pré - leucémiques [10]. Enfin, de nombreux travaux ont révélé le caractère exceptionnel de l'effet du benzène au cours de la gestation qui est la phase cruciale du développement [11]. En effet, le benzène passe la barrière placentaire et est retrouvé dans la moelle osseuse du fœtus [12]. Cependant, les effets du benzène sur la reproduction [7] et le développement [13 ; 14] ne sont pas suffisants pour établir une relation causale.

Dans ce contexte, la présente étude se distingue par l'application d'un traitement par voie orale au benzène, ce qui constitue une stimulation antigénique au cours d'une étape physiologique critique, à savoir la gestation, sur des modèles dont les capacités d'adaptation se trouvent perturbés par l'utilisation de cet agent chimique.

MATERIEL ET METHODES

Le modèle biologique utilisé est le rat femelle albinos wistar (Inst. Pasteur Alger). Les animaux sont soumis à une photopériode naturelle (12h, 12h), à une humidité de 70% et à une température ambiante (21 ± 1). Les rats ont bénéficié d'une alimentation spécialisée (bâtonnets constitués de maïs, d'orge et de lait) et d'un approvisionnement journalier en eau. Après accouplement, 24 rattees gestantes sont réparties en quatre lots à raison de six rattees gestantes par lot : un lot témoin et des lots traités au benzène à raison de 50, 100 et 150 mg/kg de poids corporel respectivement.

Le traitement consiste à mélanger le benzène dans de l'huile d'olive à raison de volume par volume et de l'administrer par voie de gavage une fois par jour tous les trois jours du 1^{er} au 15^{ème} jour de gestation. Le prélèvement s'effectue à 18^{ème} jour, nous avons prélevé et pesé les organes (foie et rate) et les fœtus. Le dosage du glutathion dans le foie est basé sur la technique de Weckberker et Cory, (1988) [15]. Les prélèvements sanguins ont été effectués à 6, 12 et 15 jours. Le sang est recueilli sur EDTA (dosage de la HCG), sur héparine (dosage de la méthémoglobine par la méthode d'Evelyn et Malloy et sur lames pour les frottis sanguins).

Le prélèvement des embryons s'effectue par section au niveau de l'utérus pour noter le nombre des embryons et déterminer le taux de fécondité. Les résultats obtenus sont comparés par le Student - t - test.

RESULTATS

Les résultats obtenus révèlent une diminution des taux de glutathion hépatique. Cette différence est plus marquée chez les groupes recevant les doses les plus élevées (Tab. 1).

La diminution de l'activité hépatique, particulièrement chez le lot traité à la dose la plus importante, se traduit par une baisse significative de la masse hépatique. On constate également une légère diminution non significative du poids de la rate chez l'ensemble des lots traités par rapport au lot témoin.

Nos résultats mettent en évidence l'effet méthémoglobinisant du benzène chez le rat femelle. Cet effet atteint un pic au 12^{ème} jour, puis diminue significativement à la fin de la gestation (Tab. 2).

L'analyse de l'hormone chorionique gonadotrope au cours de la gestation signale une augmentation très significative des niveaux plasmatiques de base au 12^{ème} jour en dehors de tout traitement. En revanche, l'administration de benzène aux doses 50, 100 et particulièrement à 150 mg/kg de poids corporel, fait chuter les taux plasmatiques d'HCG (Tab. 3).

Au 6^{ème} jour, le traitement au benzène n'entraîne aucune modification de la réponse immunitaire exprimée par le taux de lymphocytes. En revanche, au 12^{ème} jour de gestation, on enregistre une

lymphocytopénie uniquement pour la dose la plus importante (150 mg/kg). Cet immunodépresseur s'aggrave au 18^{ème} jour où elle atteint les groupes traités aux doses 100 et 150 mg/kg (Tab. 4).

Nos résultats signalent une diminution très marquée du taux de fécondité chez les rattees traitées avec le benzène. Il semblerait que le benzène affecte les organes génitaux femelles d'où la réduction du pourcentage de fécondité. Enfin, la foetotoxicité se manifeste uniquement par une diminution du poids fœtal, particulièrement chez le groupe traité à 150 mg/kg de poids corporel (Tab. 5).

DISCUSSION

Il semble que l'organisme d'un être vivant répond à des faibles concentrations de benzène contenues dans l'air atmosphérique par une réaction d'augmentation de la méthémoglobine, une augmentation du glutathion sous sa forme réduite (GSH) et une élévation du glucose 6 phosphate deshydrogénase, et le plus important, une augmentation de l'activité méthémoglobine réductase

[16 ; 17]. Nos résultats ont révélé que l'effet méthémoglobinisant du benzène disparaît à la fin de la gestation. Cette disparition est due à l'activation des systèmes enzymatiques tels que, la méthémoglobine réductase dans les cellules sanguines. A l'augmentation de la méthémoglobine s'associe une baisse importante de la teneur en glutathion hépatique. Devant ce type de toxicité, le foie développe une activité enzymatique intense en vue d'éliminer les agents toxiques et leurs dérivés, la concentration du cytochrome P450 y est très élevée [18]. Il convient de noter que le métabolisme hépatique du benzène est responsable de la détoxification à travers la formation de l'ethral sulfate et du glutathion conjugué [19 ; 20]. La diminution de l'activité glutathion associée à une

pondérale du foie s'explique par le fait qu'une concentration de GSH ne permet pas de protéger le tissu contre les métabolites toxiques et la diminution de GSH dans un organe provoque des lésions tissulaires [21].

De nombreux travaux ont montré que les hormones liées à la reproduction sont transférées par l'hypothalamus et de l'hypophyse aux glandes génitales, et au placenta dont les sécrétions oestrogéniques (dans notre cas l'hormone chorionique gonadotrope) concourent à assurer la fertilité, l'implantation embryonnaire et la gestation [11]. La régulation est soumise à de nombreuses interactions avec d'autres systèmes tels que le système immunitaire et des influences exogènes. Il a été bien démontré dans notre cas que le benzène perturbe la sécrétion de l'HCG et fait diminuer son taux.

Concernant le système hématopoïétique, les effets du benzène observés varient en fonction de l'espèce, de la durée d'exposition et du mode de l'exposition.

Cependant, toutes les études réalisées chez l'animal confirment les observations faites chez l'homme [18]. Les études pratiquées chez le rat sont en nombre limité, des leucopénies et des lymphocytopénies ainsi que des hypoplasies myéloïdes sont rapportés [22 ; 23] ont mis en évidence l'absence de modification du nombre de cellules de la moelle osseuse mais montre une diminution pondérale de la rate et une diminution du nombre de lymphocytes. De nombreuses études ont mis en évidence le pouvoir cancérogène du benzène chez l'animal pour des expositions par inhalation ou par voie orale. D'une façon générale, la majorité des tumeurs rencontrées en dehors du système hématopoïétique sont d'origine épithéliale [24].

Concernant la lymphocytopénie, plusieurs travaux ont montré que le benzène est un déprimeur de l'immunité cellulaire et humorale [25 ; 26]. Dans les études d'exposition répétée chez la souris et le rat, le benzène induit de manière dose dépendante des lymphocytopénies [27].

L'étude de l'impact du benzène sur les caractères tératologiques (poids des fœtus, malformations internes ou externes) ne montre aucun cas de malformation. Il est probable que le traitement avec le benzène durant la période de l'organogenèse, mais à des jours bien décalés, permet à l'organisme des mères d'éliminer rapidement les composés du métabolisme et ne permet aucun transfert au fœtus. La foetotoxicité dans nos résultats ne se manifeste qu'à travers une diminution pondérale des fœtus, particulièrement chez le groupe traité avec la dose la plus élevée. Ce résultat caractérise l'effet tératogène du benzène [28 ; 29].

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1) Cody. R. P., Strawderman. W. W., and Kipen. H. M.(1993) – Hematologic effects of benzen. Job – Specific trends during the first year of employment among a cohort of benzen exposed rubber workers. *J. Occup. Med.* 35 : 776 – 782.
- 2) Crump. K. S.(1994) – Risk of benzen induced leukemia, a sensitivity analysis of the pliefilm cohort and the new exposure estimated. *Journal of toxicology and environmental health.* 42 : 219 – 242.
- 3) ATSDR (1997) – Toxicological profile for benzen, Agency for toxic substances and diseases registry. Atlanta, Georgia, USA.
- 4) CE (2001) – Benzène. Evaluation des risques dans le cadre du règlement. Commission européenne 793 – 93, sur les substances existantes (projet 8, mai 2001).
- 5) Bisson. M., Bureau. J., Hulot. C., Lefavre. J. P., Leveque. S., Magaud. H., Pichard. A., Dujardin. R., et Villey. C. (2000) – Benzène. Fiche des données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. Document INERIS.
- 6) Sandmayer.E. – E. (1981) – Aromatic hydrocarbène. Vol 2B, in : *tatt'ys industrial hygiene and toxicology*, G. D. Claton F. E. eds. pp. 3253 – 3283.
- 7) Stucker, L., Mandereau, L., Aubert – Berleur, M – P, Deplan. F., Paris. A., Richard. A. , et Hemond. D. (1994) – Occupational paternal exposure to benzene and risk of spontaneous absorption. *Occup. Environ. Med.* 51: 475 – 478.
- 8) Maibach. H. I., Anjo. D. M.(1981) – Percutaneous penetration of benzen and benzen compound in solvents used in the rubber industry. *Arch. Environ. Health.* 36 : 256 – 260.
- 9) Paci. E. (1998) – Leukemia and aplasic anemia in a worker cohort exposed to benzen. Elsevier science publisher. pp. 133 – 136.
- 10) Askoy. M. (1987) – Chronic lymphoid leukemia and hairy cell leukemia due to chronic exposure to benzen. Report of three cases. *BR. J. Hematol.* 66 : 209 – 211.
- 11) Saci. F. Z.(1998) – Effet toxico - immuno - gonadotrope du benzène chez les rattes gestantes wistar. Thèse de magiser. Univ. Badji Mokhtar. Annaba. 100pp.
- 12) Dowty. B.J., Laseter. J. L., Storer. J (1976) – The transplacental migration and accumulation in blood of volatil organic constituents peditres. *10* : 696 – 701.
- 13) Budnick. L. D., Sokal. B. C., Falk. H., Logue. J. N., et Fox. J. M. (1984) – Cancer and buth defects near the drake super found site. *Pensilvania.* 39 : 406 – 409.
- 14) Goldman. I. R., Palgen. B., and Magnant. M. M.(1985) – Low birth weight prematurity and birth defects in children living near the hazardouswaste site, love canal. *Hazardous waste and hazardous materials.* 2: 209 – 223.
- 15) Weckberker. O et Cory. J.(1988) – Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione depleted mousse leukemia L 1216 cells in vitro. *Can. Letters.* 40 : 257 – 264.
- 16) Jacyezn. Y. M ; Lesiecki. W.(1985) – Biological response to nitrogen oxide receptor on other targets for toxic substances. *Arch. Toxicol. Suppl.*
- 17) El Farra. M.(1999) – The capacity of glutathione enzymatic system and glucose – 6 – phosphate deshydrogenase in the detoxification of oestrogen hormones and corresponding metabolites. Thèse de doctorat. Univ. Badji Mokhtar. Annaba. 126 pp.
- 18) El Farra. M, et Saka. S. (1999) – The role of glutathione reductase in living cell protection from toxic effect of lipid peroxydes arising from heated oils. *Comptes rendus de l'académie bulgare des sciences.* 50 : 1 – 11.
- 19) El Farra. M., Saka. S., Guellati. M. A., et Bouzerna. N.(2000) – The role of glutathione in the detoxification of lipid peroxides arising from

- heated oils. Comptes rendus de l'académie bulgare des sciences. 53 : 91 – 94.
- 20) Bairi. A, Saka. S., et Guellati. M. A. (2000) – Capacités de détoxification du GSH dans un environnement nociceptif, relation immuno – corticotrope. L'eurobiologiste. pp. 248 – 249.
- 21) Ward. C. O., Kuna. R. A., Snider. N. K., Alsaker. R. D., Coate. W. D., and Craig. p. H. (1985) – Suchronic inhalation toxicity of benzen in rats and mice. AM. J. Ind. Med. 7 : 457 – 473.
- 22) NTP (1986) – National toxicology program. Toxicology and carcinogenesis studies of benzen (cas N°71 – 43 – 2) in F 344 – N rats and B 6 C3 F1 mice (gavage study). United state departement.
- 23) Thienes. H., Haley. T. J.(1972) – Clinical toxicology. Vol. in : L. Febiger eds. Pp. 124 – 127.
- 24) Hsieh. G. C ; Parker. R. D. D ; et Sharma. R. P.(1988) – Sub – clinical effects of ground water contaminants. Alteration of regional brain monoamine neurotransmitters by benzene in CD mince. Arch. Environ contam toxical. 17 : 799 – 805.
- 25) Farris. J. M., Everitt. J. L., Irons. R. D., and Popp. J. A.(1993) – Carcinogenecity of inhaled benzen in CBA mice. Fond. Appl. Toxicol. 20 : 503 – 507.
- 26) Rozen. M. G ; Snyder. C. A et Albert. R. E.(1984) – Depression in band T lymphocytes mitrogen – induced blastogenesis in mice exposed to low concentration of benzen. Toxicol. Lett. 20 : 343.
- 27) Robinson. S. N., Shah. R., Wong. B. A., and Farris. G. M.(1997) – Immuni – toxicological effects of benzen inhalation in male sprague dawley rats. Toxicology. 119. 3 : 227 – 237.
- 28) Kuna. R. A ; Kapp. R. W.(1981) – Embryotoxic/teratogenic potential of benzen vapor in rats. Toxicol appl pharmacol. 57 : 1 – 7.
- 29) Green. J. D., Leong. B. K et Laskin. S. (1978) – Inhaled benzen foetotoxicity in rat. Toxical app. Pharmacal. 46 : 9 – 18.

Tableau 1 : Variations de la teneur en glutathion hépatique (GSH µg/mg prot.), du poids du foie et de la rate chez les rattes en fin de gestation après gavage par le benzène aux doses de 50, 100 et 150 mg/kg de PC (n=6 ; * : p< 0,05 ; ** : p< 0,01).

Lot	T	50mg/kg	100mg/kg	150mg/kg
GSHµg/mg prot.	86,68 ± 5,7	49,7 ± 20,02*	43,53 ± 14,12 *	39,05 ± 13,24 **
Foie	6,83 ± 0,31	6,24 ± 0,65	6,80 ± 0,88	5,52 ± 0,56 *
Rate	0,70 ± 0,14	0,68 ± 0,35	0,70 ± 0,27	0,62 ± 0,09 *

Tableau 2 :Variation du taux de méthémoglobine (%) chez les rattes au 6^{ème},12^{ème}et 18^{ème} après gavage par le benzène aux doses de 50, 100 et 150 mg/kg de Pc (n=6 ; * : p< 0,05 ; ** : p< 0,01).

Lot	T	50mg/kg	100mg/kg	150mg/kg
6 ^{ème} jour	2,13 ± 0,53	2,30 ± 0,522	2,10 ± 0,631	4,83 ± 0,219 *
12 ^{ème} jour	2,09 ± 0,52	2,08 ± 0,20	2,10 ± 0,83	10,8 ± 0,49 ***
18 ^{ème} jour	2,10 ± 0,83	2,26 ± 0,57	2,10 ± 0,76	2,54 ± 0,251

Tableau 3 : Variation des niveaux plasmatiques d’HCG (mUI/ml) chez les rattes au 6^{ème},12^{ème}et 18^{ème} après gavage par le benzène aux doses de 50, 100 et 150 mg/kg de PC (n=6 ; * : p<0.05).

Lot	T	50mg/kg	100mg/kg	150mg/kg
6 ^{ème} jour	138,94 ± 56,53	118,56 ± 60,46	122,72 ± 35,57	76,64 ± 17,84 *
12 ^{ème} jour	496,42 ± 93,79	124,80 ± 49,97	253,68 ± 19,99 *	112,52 ± 49,61*
18 ^{ème} jour	135,20 ± 48,78	101,92 ± 55,71	99,84 ± 15,77	41,60 ± 37,78 *

Tableau 4 :Variation des taux de lymphocytes (%) chez les rattes au 6^{ème},12^{ème}et 18^{ème} après gavage par le benzène aux doses de 50, 100 et 150 mg/kg de PV (n=6 ; * : p<0.05).

Lot	T	50mg/kg	100mg/kg	150mg/kg
6 ^{ème} jour	54,12 ± 5,20	55,16 ± 5,10	55,00 ± 6,20	55,80 ± 5,92
12 ^{ème} jour	56,16 ± 2,40	57,50 ± 7,30	55,40 ± 5,43	50,40 ± 2,08 *
18 ^{ème} jour	57,00 ± 5,02	58,80 ± 4,41	52,12 ± 3,81 *	40,20 ± 1,77 *

Tableau 5 : Variations du taux de fécondité et du poids foetal chez les rattes gestantes après gavage par le benzène aux doses de 50, 100 et 150 mg/kg de PV (n=6 ; * : p<0.05).

Lot	T	50mg/kg	100mg/kg	150mg/kg
Fécondité (%)	83,33	83,33	66,66	16
Poids foetal (g)	3,78 ± 0,30	3,78 ± 0,38	3,64 ± 0,38	3,56 ± 0,27 *