

## Environnement et Santé

### Étude de la toxicité induite par le thiaméthoxame sur les paramètres morphologiques, hématologiques et sur l'équilibre oxydant/antioxydant chez des rats de souche Wistar

Study of the toxicity induced by thiamethoxam on morphological and hematological parameters and on the oxidant/antioxidant balance in Wistar rats

Amal FEKI.<sup>1</sup>, Intissar KAMMOUN.<sup>1</sup>, Choumous KALLEL.<sup>2</sup>, Ahmed HAKIM.<sup>3</sup>, Ibtissem BEN AMARA.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unité de Recherche de Chimie Médicinale et Environnementale (UR-17-ES-40), Institut Supérieur de Biotechnologie de Sfax, Université de Sfax, Tunisie. <sup>2</sup>Laboratoire d'hématologie. Hôpital Universitaire Habib Bourguiba, Sfax, Tunisie. <sup>3</sup>Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de Médecine de Sfax, Université de Sfax, 3029 Sfax, Tunisie

Auteur correspondant : amal.feki05@gmail.com

Reçu le 17 décembre 2021, Révisé le 02 novembre 2022, Accepté le 14 décembre 2022

**Résumé Introduction.** L'utilisation excessive des pesticides pose un véritable problème de santé publique, non seulement pour les personnes qui y sont exposées, mais aussi pour l'écosystème. **Objectif.** Etudier la toxicité induite par le thiaméthoxame (TMX) sur les paramètres morphologiques et hématologiques et sur les marqueurs du stress oxydatif au niveau des érythrocytes. **Matériel et méthodes.** Des rats mâles de souche Wistar ont été traités par voie intra-péritonéale pendant 30 jours avec trois doses croissantes de TMX (100, 150 et 300 mg/kg de poids corporel). **Résultats.** L'exposition des rats au TMX a provoqué une perturbation du comportement des rats, de leur poids corporel et de leur consommation quotidienne de nourriture et de boisson. De plus, des modifications du profil hématologique caractérisées par une anémie accompagnée de thrombopénie généralement liée à un déficit immunitaire, ont été détectées. Toutes ces altérations du profil hématologique sont confirmées par l'observation microscopique du frottis sanguin des différents groupes de rats. De plus, une altération du système de défense antioxydante, caractérisée par une diminution du glutathion réduit (GSH), de l'activité la catalase (CAT), de la superoxyde dismutase (SOD) et de la glutathion peroxydase (GPx), ainsi qu'une augmentation au niveau des marqueurs du stress oxydatif, tels que le malondialdéhyde (MDA) et les produits d'oxydation avancée des protéines (AOPP), est notée, témoignant de l'effet déstabilisant du TMX. **Conclusion.** Cette toxicité augmente avec l'élévation de la dose de TMX, reflétant que l'utilisation irrationnelle de cet insecticide peut affecter la santé des mammifères.

**Mot clés:** *Thiaméthoxame, Toxicité, Hématologie, Stress oxydatif*

**Abstract Introduction.** The excessive use of pesticides poses a real public health problem, not only for the people who are exposed to them, but also for the ecosystem. **Objective.** To elucidate the effect of thiamethoxam-induced toxicity (TMX) on morphological and hematological parameters, and on oxidative stress markers in erythrocytes. **Material and methods.** Male Wistar rats were treated intraperitoneally for 30 days with three increasing doses of TMX (100, 150 and 300 mg/kg body weight). **Results.** The exposition of the rats to TMX caused a disturbance in their behavior, their body weight, and their daily food and drink intake. In addition, a perturbation in the hematological profile was noted. In fact, anemia accompanied with thrombocytopenia usually related to an immune deficiency was also detected. All these alterations in the blood profile were ascertained by the microscopic observation of the blood smear for the different groups of rats. Moreover, an impairment of the antioxidant defense system characterized by a decrease in the reduced glutathione (GSH), the activity of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx), and by an increase in the level of oxidative stress markers, such as malondialdehyde (MDA) and advanced oxidation products of proteins (AOPP), was noted testifying the destabilizing effect of TMX. **Conclusion.** This toxicity increases with enhanced doses of TMX, reflecting that the irrational use of this insecticide can affect the health of mammals.

**Keywords:** *Thiamethoxam, Toxicity, Hematology, Oxidative stress*

## Introduction

Les pesticides sont largement utilisés dans la production agricole pour prévenir ou lutter contre les ravageurs, les maladies, les mauvaises herbes et d'autres pathogènes végétaux afin d'améliorer le rendement et la qualité des cultures. Cependant, suite à l'exposition excessive aux pesticides, ces composés chimiques peuvent se retrouver dans tous les compartiments environnementaux, y compris le sol, l'eau et l'air et provoquer des dommages des organismes non cibles [1]. De plus, mal utilisés, les pesticides peuvent être très dangereux pour la santé humaine [2]. De nombreux problèmes menacent la population humaine exposée à ces contaminants qui peuvent être à l'origine des effets toxiques sur le foie, les reins, le cerveau et d'autres organes. Ces molécules sont classées, d'une part en fonction de leurs cibles principales (insecticides, herbicides, fongicides, rodenticides et antiparasitaires) et, d'autre part en fonction de leur structure moléculaire (organophosphoré, organochloré, carbamate, thiocarbamates, pyrèthroïde et nicotinoides) [3].

Le thiaméthoxame (TMX) est un insecticide organique synthétique appartenant à la famille chimique des néonicotinoïdes et à la classe des thianicotynils. Le nom systématique de la molécule est 3-(2-chloro-1,2,4-thiazol-5-ylméthyl)-5-méthyl-[1,3,5]-oxadiazinan-4-ylidène-N-nitroamine [4]. Il s'agit d'une nouvelle molécule, développée au cours des trois dernières décen-

nies, dont l'intérêt est dû, d'une part à sa lutte contre les insectes qui sont résistants aux autres classes d'insecticides et, d'autre part à sa toxicité modérée pour les mammifères, les oiseaux et les poissons [5]. Le TMX est légèrement toxique par voie orale et par inhalation et il possède une faible toxicité par voie cutanée. Il est peu ou pas irritant pour la peau et les yeux et il ne cause pas de sensibilisation cutanée [6]. Cet insecticide est classé cancérigène probable chez l'humain en raison de la réponse tumorigène chez cette espèce [4].

Dans ce contexte, le présent travail consiste à étudier l'effet de l'exposition des rats adultes de souche Wistar à des doses croissantes de TMX durant 30 jours sur les paramètres morphologiques, hématologiques et sur les marqueurs du stress oxydatif.

## Matériel et méthodes

### Animaux et traitement

Les animaux utilisés sont des rats mâles de souche Wistar, pesant en moyenne  $190 \pm 3$  g, provenant d'un élevage de la Faculté des Sciences de Gabès-Tunisie. Trente-deux rats sont installés dans une animalerie où la température et l'humidité sont voisines de 20°C et 60% respectivement et avec une alternance de 12h d'obscurité et de luminosité. Les animaux ont reçu un aliment standard sous forme de poudre (provenant de la Société Industrielle de Concentrés, SNA, Sfax Tunisie). Il est composé de protéines (soja+blé) (200

g/kg), DL-méthionine (3g/kg), farine de maïs (393g/kg), huile de maïs (155g/kg), sucrose (154g/kg), cellulose (50g/kg), vitamines (10g/kg) et minéraux (35g/kg). La valeur énergétique est de 3895 Kcal/kg. L'eau de boisson est donnée *ad libitum*.

Toutes les procédures animales ont été menées en stricte conformité avec les «Directives du Comité d'éthique de l'Institut» pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire [7].

Les 32 rats ont été répartis en 4 groupes de 8 rats chacun : Groupe 1: rats témoins injectés par voie intrapéritonéale avec du NaCl comme véhicule; Groupe 2, Groupe 3 et Groupe 4: rats traités par le TMX par voie intrapéritonéale pendant 30 jours, à des doses, respectivement de 100mg/kg PC (1/15 DL50), 150mg PC (1/10 DL50) et 300mg PC (1/5 DL50). Après 30 jours de traitement, les animaux, à jeun, ont été sacrifiés par décapitation.

### **Prélèvement des échantillons**

Des échantillons sanguins sont prélevés dans des tubes à Éthylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA) pour la détermination de certains paramètres hématologiques. Les mêmes échantillons prélevés sur EDTA sont, par la suite, centrifugés pendant 15 min 2200 x g. Le culot obtenu est lavé 3-fois par une solution isotonique (0,9% NaCl+0,1M Tris-HCl, pH=7,4). Après élimination des débris cellulaires, les hémolysats obtenus sont conservés à -80°C pour le dosage des paramètres du stress oxydant au niveau des érythrocytes.

Les différents organes (cerveau, cervelet, cœur, poumons, intestin, rate, reins, estomac, foie et thyroïde) ont été prélevés et pesés. Les os des pattes droites ont été prélevés puis libérés de leurs adhérences conjonctives et pesés.

### **Détermination des paramètres hématologiques**

#### **Numération de la formule sanguine (NFS)**

La numération de la formule sanguine est déterminée par automate (Sysmex XT-2000i) du laboratoire d'Hématologie de l'hôpital Habib Bourguiba de Sfax-Tunisie. Des paramètres hématologiques ont été déterminés, à savoir le nombre de globules rouges, exprimé en GR/ $\mu$ L de sang, l'hématocrite (Ht), exprimé en %, la concentration en hémoglobine (Hb), exprimée en g/100 mL de sang, le volume globulaire moyen (VGM), exprimé en  $\text{mm}^3$ /GR, le nombre de globules blancs, exprimé en GB/ $\mu$ L de sang, la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) exprimée en g/100 mL, la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH) exprimée en pg/GR.

### **Frottis sanguins**

Une goutte de sang frais est étalée sur une lame, le May Grunwald est ajouté, par la suite, pendant 2 min, puis rincée avec de l'eau. Une coloration avec le Giemsa a été réalisée. Par la suite, une lecture au microscope optique au grossissement x100 avec l'huile à immersion est effectuée afin de visualiser les différentes cellules sanguines.

### **Détermination des paramètres du stress oxydatif au niveau des érythrocytes**

#### **Dosage des protéines**

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de Lowry *et al.*, [8]. Le principe est basé sur la réduction du réactif de Folin, mélange d'acides phosphotungstique et phosphomolybdique, en un complexe de coloration bleu en présence de protéines. La lecture de la densité optique se fait à 650-750 nm. Une gamme étalon de 25 à 100  $\mu$ g de protéines est réalisée à partir d'une solution mère de sérum albumine bovine à une concentration de 0,5 mg/mL.

#### **Dosage de la peroxydation lipidique**

La peroxydation des lipides membranaires est estimée par la mesure du produit de cette réaction, le MDA. La détection du MDA repose sur une réaction colorimétrique à l'aide d'acide thiobarbiturique (TBA). Après traitement acide à chaud, les aldéhydes réagissent avec le TBA pour former un produit de condensation chromogénique consistant en 2 molécules de TBA et une molécule de MDA, dont l'absorption est mesurée par spectrophotométrie à 532 nm [9].

#### **Dosage des produits d'oxydation avancée des protéines (AOPP)**

Les AOPP ont été déterminés selon la méthode de Witko *et al.*, [10]. Une prise aliquote de 0,4 mL du broyat du tissu est ajouté à 0,8 mL de tampon phosphate TP (0,1M ; pH 7,4). Après 2 min, 0,1 mL d'iodure de potassium 1,16M (KI) et 0,2mL d'acide acétique sont ajoutés. L'absorbance du mélange réactionnel est déterminée à 340 nm. La concentration de chaque échantillon en AOPP est calculée en utilisant le coefficient d'extinction ( $26\text{cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ) et les résultats sont exprimés en mmol/mg de protéines.

#### **Dosage du glutathion réduit (GSH)**

Le dosage du GSH, représentant le thiol non protéique le plus abondant dans les organismes vivants, est réalisé en utilisant la méthode d'Ellman [11] modifiée par Jollow *et al.*, [12]. Le glutathion réduit réagit avec le 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) pour donner un produit qui présente un maximum d'absorption calculé à 412 nm. Les résultats sont exprimés en  $\mu$ g/mg de protéines.

### Dosage de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD)

L'activité de la SOD a été déterminée par la méthode de Beauchamp et Fridovich [13]. Le dosage de l'activité SOD est basé sur le test nitrobluetetrazoliumchloride (NBT). Le principe repose sur la mesure de la capacité de la SOD à inhiber l'oxydation du NBT par l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot -}$ ) généré par la réduction photochimique du complexe riboflavine/méthionine. Dans un milieu aérobie éclairé, le mélange riboflavine, méthionine et NBT donne une coloration bleuâtre (bleu de formazan). La présence de SOD inhibe l'oxydation du NBT et limite la formation de ce bleu de formazan. La densité optique du blanc et des échantillons est mesurée à 580 nm et les résultats sont exprimés en termes d'activité spécifique (U SOD/mg protéines).

### Dosage de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx)

L'activité de GPx est mesurée selon la technique décrite par Flohe et Gunzler [14]. La méthode se base sur l'oxydation du glutathion (GSH) en présence de DTNB et donne naissance à un composé coloré, l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque (TNB) et au glutathion oxydé (GSSG). En présence de glutathion réductase et de NADPH, le GSSG est immédiatement converti sous forme réduite avec oxydation concomitante du NADPH en  $NADP^+$ . L'absorbance du mélange est mesurée à 412 nm. L'activité GPx est exprimée en nmoles de GSH consommées/min/mg protéines.

### Détermination de l'activité de la catalase (CAT)

Le dosage est effectué selon la technique décrite par Aebi [15]. Les catalases sont présentes dans un grand nombre de tissus. L'activité CAT est mesurée par le suivi à 240 nm de la dismutation du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Les résultats sont exprimés en  $\mu$ moles de  $H_2O_2$  transformées/min/mg de protéines.

### Analyse statistique

L'analyse statistique a été effectuée avec IBM SPSS Statistics version 20. L'analyse ANOVA est réalisée à un niveau  $p=0,05$ . La différence est considérée significative à  $p < 0,05$ .

## Résultats

### Etude des paramètres morphologiques

#### Etude comportementale des rats

L'administration du TMX induit l'apparition de signes cliniques qui varient selon la dose d'insecticide administrée. Les résultats obtenus (**Tableau I**) montrent l'apparition de dyspnée et de polyurie chez les

différents groupes de rats avec tremblement des mâchoires qui s'aggrave avec l'augmentation de la dose du TMX. A la dose 300 mg/kg de TMX, une importante irritation des yeux avec de fortes convulsions de muscles ont été notées. Dès le 8<sup>ème</sup> jour d'exposition, des mortalités ont été remarquées chez les rats injectés à forte dose de TMX.

### Croissance pondérale

L'administration du TMX chez les rats a provoqué une diminution significative du poids corporel durant la période d'exposition. En effet, une réduction de 10% du poids corporel chez les rats traités par 100 mg/kg PC a été notée, alors qu'une diminution de 30% chez les rats traités par 300 mg/kg PC comparé au poids initial a été détectée (**Fig. 1**).

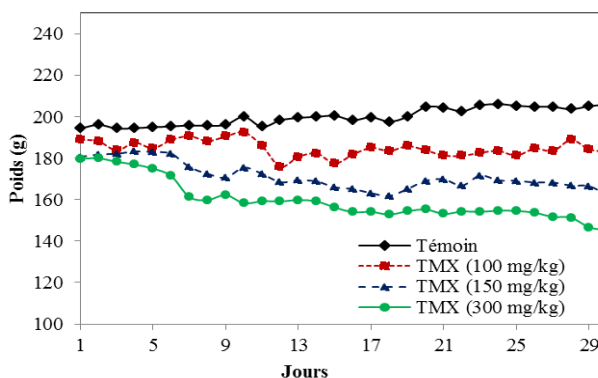


**Fig. 1. Evolution du poids corporel des rats**

TMX : Thiaméthoxame. Le nombre de rats/groupe est  $n = 8$  (sans mortalité).

### Nourriture et boissons ingérées

Le TMX administré, pendant 30 jours, à des rats adultes à raison de 100, 150 et 300 mg/kg PC, a provoqué, respectivement une diminution de 7, 11 et 14% de la nourriture ingérée et une augmentation de 17, 30 et 48% de la consommation d'eau, respectivement, comparé à celles des rats témoins (**Tableau II**).

### Poids des organes

Le poids des organes des différents groupes de rats sont présentés dans le **Tableau III**. Une importante augmentation du poids relatif est observée au niveau du cerveau (17, 33 et 45%), du cervelet (31, 52 et 68%), du cœur (67, 85 et 95%), des poumons (100%), de la rate (100%), des reins (37, 51 et 63%), du foie (100%) et des os (47, 66 et 76%) des rats traités respectivement par les 3 doses croissantes de TMX. Cependant, aucune modification n'a été notée pour le poids de l'intestin, de l'estomac et de la thyroïde (**Tableau III**).

Tableau I. Etude comportementale des rats durant les 30 jours de traitement

| Groupes       | Dose MT injectée | Mortalité | Temps de mort (Jours) | Signes cliniques                                                            |
|---------------|------------------|-----------|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Dose 1 de TMX | 100 mg/kg        | 0/8       | --                    | Léger tremblement, Polyurie, Dyspnée                                        |
| Dose 2 de TMX | 150 mg/kg        | 1/8       | Jour 10               | Léger tremblement, Polyurie, Dyspnée, Convulsion, Irritation des yeux       |
| Dose 3 de TMX | 300 mg/kg        | 2/8       | Jour 8<br>Jour 15     | Tremblement, Polyurie, Dyspnée, Forte convulsion, Forte irritation des yeux |

Tableau II. Taux de nourriture ingérée et de boisson chez les différents groupes de rats

|                              | Témoin                  | TMX (100 mg/kg)         | TMX (150 mg/kg)         | TMX (300 mg/kg)         |
|------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Nourriture ingérée (g/j/rat) | 31,35±1,67 <sup>a</sup> | 29,33±1,53 <sup>b</sup> | 27,99±2,34 <sup>c</sup> | 26,96±2,83 <sup>d</sup> |
| Boisson (ml/j/rat)           | 20,29±0,45 <sup>a</sup> | 24,25±0,96 <sup>b</sup> | 26,31±0,76 <sup>c</sup> | 29,86±0,94 <sup>d</sup> |

Tableau III. Variation du poids relatifs moyen des organes des différents groupes de rats

|          | Témoin                   | TMX (100 mg/kg)           | TMX (150 mg/kg)         | TMX (300 mg/kg)         |
|----------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Cerveau  | 0,51±0,01 <sup>a</sup>   | 0,60±0,023 <sup>b</sup>   | 0,68±0,016 <sup>c</sup> | 0,74±0,012 <sup>c</sup> |
| Cervelet | 0,19±0,01 <sup>a</sup>   | 0,25±0,021 <sup>b</sup>   | 0,29±0,029 <sup>b</sup> | 0,32±0,028 <sup>b</sup> |
| Cœur     | 0,22±0,01 <sup>a</sup>   | 0,37±0,012 <sup>b</sup>   | 0,41±0,01 <sup>b</sup>  | 0,44±0,01 <sup>b</sup>  |
| Poumon   | 0,25±0,23 <sup>a</sup>   | 0,75±0,004 <sup>b</sup>   | 0,85±0,02 <sup>c</sup>  | 0,93±0,01 <sup>c</sup>  |
| Intestin | 0,23±0,02 <sup>a</sup>   | 0,26±0,006 <sup>a</sup>   | 0,28±0,01 <sup>a</sup>  | 0,32±0,01 <sup>a</sup>  |
| Rate     | 0,13±0,009 <sup>a</sup>  | 0,26±0,007 <sup>b</sup>   | 0,29±0,006 <sup>b</sup> | 0,33±0,005 <sup>c</sup> |
| Rein     | 0,58±0,01 <sup>a</sup>   | 0,80±0,006 <sup>b</sup>   | 0,88±0,004 <sup>b</sup> | 0,95±0,007 <sup>c</sup> |
| Estomac  | 0,74±0,21 <sup>a</sup>   | 0,81±0,009 <sup>a</sup>   | 0,89±0,009 <sup>a</sup> | 0,95±0,006 <sup>a</sup> |
| Foie     | 2,05±0,03 <sup>a</sup>   | 4,31±0,51 <sup>b</sup>    | 4,66±0,54 <sup>b</sup>  | 5,006±0,57 <sup>b</sup> |
| Os       | 0,21±0,01 <sup>a</sup>   | 0,31±0,031 <sup>b</sup>   | 0,35±0,03 <sup>b</sup>  | 0,37±0,03 <sup>b</sup>  |
| Thyroïde | 0,033±0,001 <sup>a</sup> | 0,038±0,0007 <sup>b</sup> | 0,02±0,02 <sup>a</sup>  | 0,05±0,008 <sup>a</sup> |

TMX : Thiaméthoxame. Les résultats sont exprimés en moyenne de trois expériences ± ET. Le nombre de déterminations est n = 8 (sans mortalité). <sup>a,b,c,d</sup> sur la même ligne : différence significative (p < 0,05).

Tableau IV. Hémogramme des différents groupes de rats

|                            | Témoin                   | TMX (100 mg/kg)          | TMX (150 mg/kg)          | TMX (300 mg/kg)         |
|----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| GR (10 <sup>6</sup> /ml)   | 11,45±0,44 <sup>b</sup>  | 6,02±0,99 <sup>a</sup>   | 5,60±0,53 <sup>a</sup>   | 5,66±0,19 <sup>a</sup>  |
| GB (10 <sup>3</sup> /ml)   | 7,76±0,59 <sup>a</sup>   | 10,81±0,79 <sup>b</sup>  | 12,33±0,95 <sup>c</sup>  | 13,87±0,97 <sup>d</sup> |
| Hb (g/dl)                  | 14,52±0,91 <sup>c</sup>  | 10,72±0,18 <sup>b</sup>  | 10,13±0,39 <sup>b</sup>  | 9,28±0,47 <sup>a</sup>  |
| HT (%)                     | 45,52±0,91 <sup>a</sup>  | 44,58±0,65 <sup>a</sup>  | 44,99±0,88 <sup>a</sup>  | 45,27±0,32 <sup>a</sup> |
| VGM (mm <sup>3</sup> /RBC) | 55,78±0,62 <sup>a</sup>  | 55,07±0,76 <sup>a</sup>  | 55±0,87 <sup>a</sup>     | 55,01±0,62 <sup>a</sup> |
| TCMH (pg/RBC)              | 18,73±0,44 <sup>a</sup>  | 18,33±0,41 <sup>a</sup>  | 18,05±0,80 <sup>a</sup>  | 18,69±0,43 <sup>a</sup> |
| CCMH (g/dl)                | 33,43±0,73 <sup>d</sup>  | 33,6±0,91 <sup>c</sup>   | 33,35±0,92 <sup>b</sup>  | 33,91±0,28 <sup>a</sup> |
| Plt (10 <sup>3</sup> /ml)  | 983,47±1,77 <sup>d</sup> | 688,68±1,62 <sup>c</sup> | 674,34±1,71 <sup>b</sup> | 484,5±1,87 <sup>a</sup> |

GR : Globule rouge; GB : Globule blanc; Hb : Hémoglobine; HT : Hématocrite; VGM : Volume globulaire moyen; TCMH : Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine; CCMH : Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine; Plt : Plaquette; TMX: Thiaméthoxame. Les résultats sont exprimés en moyenne de trois expériences ± ET. Le nombre de déterminations est n = 8 (sans mortalité). <sup>a,b,c,d</sup> sur la même ligne : différence significative (p < 0,05).

**Etude des paramètres hématologiques****Numération de la formule sanguine (NFS)**

Les résultats obtenus montrent une variation de quelques paramètres hématologiques chez les rats traités pendant 30 jours par le TMX en comparaison avec les rats témoins (**Tableau IV**). En effet, une Diminution du nombre de GR, d'hémoglobine(Hb) et des plaquettes est enregistrée. De plus, une diminution du nombre de GB des rats du groupe traité par le TMX a été observée. La TCMH, la CCMH et le VGM subissent de légères variations mais non significatives.

**Frottis sanguins**

La **Fig. 2** illustre les observations microscopiques des frottis sanguins des différents groupes de rats. Les résultats sont en accord avec la numération sanguine, avec présence de lymphocytes et de plaquettes dans les frottis sanguins des rats témoins, alors que les rats traités par le TMX montrent la présence d'agrégats lymphocytaires observés avec 300 mg/kg PC de TMX. En effet, une diminution dose dépendante du nombre de plaquettes est notée chez les rats traités par le TMX.

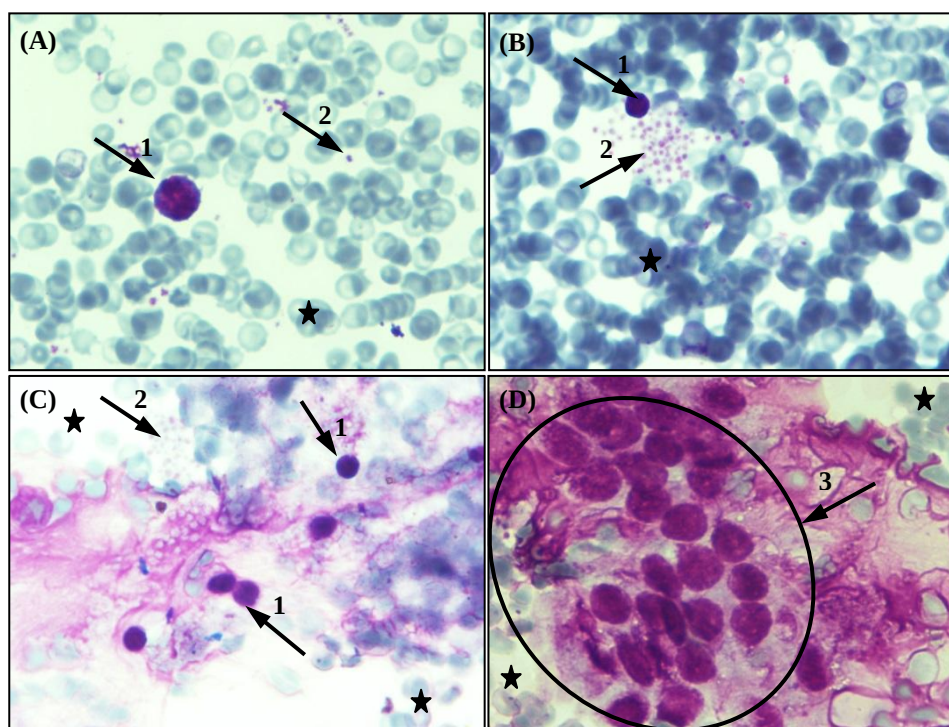


**Fig. 2. Frottis sanguins des différents groupes de rats (x100)**

A : rat témoin; B : rat traité par TMX (100 mg/kg PC); C : rat traité par TMX (150 mg/kg PC); D : rat traité par TMX (300 mg/kg PC). ★ Globule rouge ; 1: Lymphocyte ; 2: Plaquette ; 3 : Agrégat lymphocytaire.

**Tableau V. Effet du TMX sur l'activité antioxydante non enzymatique (GSH) et enzymatique (catalase, SOD et GPx)**

|                                                                             | Témoin                  | TMX<br>(100 mg/kg)      | TMX<br>(150 mg/kg)      | TMX<br>(300 mg/kg)      |
|-----------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| GSH (µg/mg protéines)                                                       | 53,24±2,00 <sup>d</sup> | 49,2±1,54 <sup>c</sup>  | 42,87±0,93 <sup>b</sup> | 38,04±1,68 <sup>a</sup> |
| CAT (µmoles H <sub>2</sub> O <sub>2</sub><br>transformées/min/mg protéines) | 53,87±0,49 <sup>d</sup> | 39,01±1,08 <sup>c</sup> | 30,26±2,61 <sup>b</sup> | 21,1±1,44 <sup>a</sup>  |
| SOD (U/mg protéines)                                                        | 19,11±2,65 <sup>c</sup> | 12,77±1,42 <sup>b</sup> | 9,37±1,57 <sup>b</sup>  | 8,12±1,59 <sup>a</sup>  |
| GPx (nmoles GSH/min/mg<br>protéines)                                        | 7,39±0,49 <sup>d</sup>  | 6,32±0,18 <sup>c</sup>  | 5,81±0,19 <sup>b</sup>  | 5,06±0,10 <sup>a</sup>  |

TMX : Thiaméthoxame. GSH : Glutathion réduit. CAT : Catalase. SOD : Superoxyde dismutase. GPx : Glutathion peroxydase. Les résultats sont exprimés en moyenne de trois expériences ± ET. Le nombre de déterminations est n = 8 (sans mortalité). <sup>a,b,c,d</sup> sur la même ligne : différence significative (p < 0,05).

### Détermination des paramètres du stress oxydatif au niveau des érythrocytes

#### Peroxydation lipidique

Le traitement par le TMX provoque une importante peroxydation lipidique, objectivée par une augmentation significative du taux de MDA et de l'AOPP érythrocytaire en comparaison avec le groupe témoin (**Fig. 3**). Cette augmentation est proportionnelle au taux de pesticide injecté aux rats.

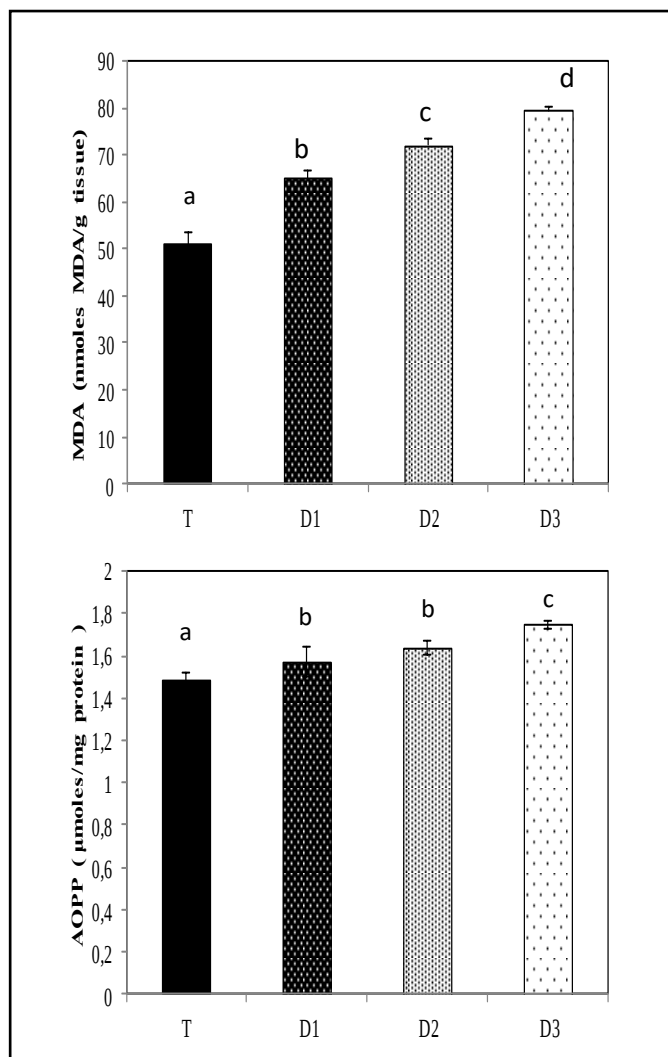


**Fig. 3.** Taux de MDA érythrocytaire et des AOPP chez les différents groupes de rats

TMX : Thiaméthoxame. T : rat témoin; D1 : rat traité par TMX à 100 mg/kg PC; D2 : rat traité par TMX à 150 mg/kg PC; D3 : rat traité par TMX à 300 mg/kg PC. Les résultats sont exprimés en moyenne de trois expériences  $\pm$  ET. Le nombre de rats/groupe est  $n=8$  (sans mortalité). <sup>a,b,c,d</sup> sur la même ligne : différence significative ( $p<0,05$ ).

#### Antioxydants enzymatiques et non enzymatiques

Les résultats montrent que le traitement des rats par TMX induit une diminution significative de l'activité des antioxydants enzymatiques, tels que la SOD, la catalase et la GPx (**Tableau V**). De même, une dimi-

nution au niveau du GSH, suite à l'exposition au TMX des rats, a été notée.

### Discussion

L'utilisation irrationnelle des pesticides est devenue un problème de santé touchant tous les mammifères [16,17]. Le présent travail consiste à étudier l'impact de l'administration intrapéritonéale d'un insecticide, le thiaméthoxame, sur des rats adultes et à tester son effet sur les paramètres morphologiques et hématologiques et sur les marqueurs du stress oxydatif au niveau des érythrocytes. En effet, l'administration du TMX a provoqué chez les rats différents signes cliniques dont la sévérité et l'intensité augmentent avec la dose administrée. Les résultats obtenus ne montrent aucun trouble du comportement et aucun signe clinique anormal chez les rats recevant du TMX à 100 mg/kgPC pendant les premières 24 heures qui suivent la 1<sup>ère</sup> injection. En revanche, juste après la 4<sup>ème</sup> injection, l'activité motrice commence à s'affaiblir et le rythme respiratoire s'accélère. Après une semaine, les perturbations existantes s'aggravent avec l'apparition d'une irritation des yeux et des mortalités. Chez le groupe recevant 150 mg/kgPC de TMX, l'activité motrice s'affaiblit dès le début du traitement, avec une irritation remarquable des yeux. De même, des signes de toxicité aigüe sont observés chez les rats traités, en particulier à la dose 300 mg/kg PC de TMX. Il s'agit essentiellement de l'absence totale de motricité, d'une forte irritation des yeux et d'une accélération du rythme respiratoire. La mort intervient dès le début du traitement.

Par ailleurs, la faible quantité de nourriture ingérée pourrait s'expliquer par le manque d'appétit, suite à l'intoxication des rats au TMX. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Ogutcu *et al.*, [18] et Swenson et Casida [19], qui ont signalé des perturbations au niveau des paramètres morphologiques après l'administration du TMX. Cette diminution est plus accentuée chez les rats traités avec 300 mg/kg PC de TMX. Quant à l'augmentation de la consommation d'eau, elle pourrait se traduire par une insuffisance rénale ou hépatique dont le symptôme est l'apparition d'une soif excessive. Généralement, les modifications morphologiques sont utilisées comme l'indicateur le plus sensible aux effets indésirables des xénobiotiques.

Il est bien connu que les érythrocytes sont considérés comme étant des cibles aux attaques par les espèces réactives d'oxygène (ERO) en raison de leurs concentrations élevées en acides gras polyinsaturés membranaires associées aux molécules actives de l'hémo-

globine, importantes sources des ERO [20]. Suite à l'exposition au TMX, une anémie, caractérisée par la diminution du taux des érythrocytes, chez les groupes exposés à 150 et 300 mg/kg PC de TMX, a été notée. Selon Rawat *et al.*, [21], l'hypo-production des GR s'expliquerait, soit par une hypo-production de la moelle osseuse due à la présence des cellules malades qui entraînent une production anormale des GR, soit par une hypoxie chronique au niveau des tissus de l'organisme, ou encore une diminution de la synthèse de l'érythropoïétine [22,23], suite à une infection ou une intoxication.

Toutefois, il est important de noter que l'injection du TMX a causé une réduction du nombre de plaquettes. Ceci peut être expliqué soit par des altérations de la moelle osseuse qui ne produit pas normalement les plaquettes, soit par le fait que la toxicité du TMX provoque la thrombopénie au niveau de la circulation sanguine. Par contre, l'injection du TMX a causé une augmentation du nombre de GB. Ces perturbations pourraient être dues à une inflammation comme le montre les études antérieures réalisées par Ben Amara *et al.*, [24] et Zhang *et al.*, [25].

Les résultats de la NFS sont confirmés par l'observation microscopique du frottis sanguin. En effet, l'injection du TMX a induit l'apparition d'anomalies au niveau du sang caractérisées par l'augmentation du nombre de GB avec l'apparition d'agrégats lymphocytaires et par la diminution du nombre de GR et de plaquettes. Ces perturbations sont liées à la toxicité induite par cet insecticide.

De plus, les érythrocytes sont vulnérables au stress oxydatif car ces cellules anucléés ne possèdent pas la capacité de réparer leur membrane ni de se régénérer [26]. Les GR se comportent comme des pièges de radicaux libres circulants et protègent ainsi les autres tissus et organes [20]. Dans la présente étude, le traitement par le TMX a induit une forte peroxydation lipidique comme le montre l'augmentation significative du taux de MDA et des AOPP érythrocytaires. En effet, cet insecticide induit un stress oxydatif marqué par la génération de radicaux libres capables d'oxyder et d'endommager les lipides et les protéines membranaires des érythrocytes. Ceci aboutit à une altération structurale de la membrane cellulaire, ce qui se manifesterait par une réduction de sa fluidité qui pourrait modifier l'activité des protéines membranaires [27]. Le stress oxydatif s'installe lorsque le système de défense antioxydante est submergé par la production des ERO. Les systèmes des antioxydants enzymatiques cellulaires agissent comme la première ligne de défense contre les ERO dans tous les compartiments cellulaires et extra-

cellulaires [16]. Afin de mettre en évidence les mécanismes sous-jacents de la toxicité induite par le TMX, le statut antioxydant au niveau des érythrocytes a été évalué. La SOD joue un rôle important dans la détoxification des radicaux libres et constitue la première ligne de défense enzymatique contre le stress oxydatif [28]. Suite à l'injection du TMX, une diminution significative de l'activité de la SOD et de la catalase est observée. Cet affaiblissement du système de défense par cet insecticide peut être expliqué par l'inactivation des antioxydants enzymatiques à cause de la production massive des ERO toxiques. La GPx joue un rôle intracellulaire très important en agissant sur les peroxydes d'hydrogène et les hydroperoxydes lipidiques par l'intermédiaire du GSH [29]. L'activité enzymatique de la GPx a diminué chez le groupe traité avec le TMX, comparativement à celle des témoins. L'effet de la production accrue des ERO est potentialisé par la réduction des défenses antioxydantes enzymatiques (GPx, CAT, SOD), ce qui confirme l'apparition d'un stress oxydant au niveau des érythrocytes des rats traités au TMX.

D'autres antioxydants non enzymatiques, tels que le GSH ont été également perturbés par l'injection du TMX. En effet, suite à la peroxydation lipidique, des altérations du système de défense antioxydante peuvent se manifester. Ainsi, le GSH constitue le thiol intracellulaire majoritaire nécessaire pour les réactions de conjugaison, réactions assurées par la glutathion S-transférase (GST) qui intervient dans la détoxification cellulaire. Le taux de GSH diminue avec l'augmentation du taux de TMX utilisé, ce qui confirme la toxicité induite de cet insecticide. Ces faibles teneurs en GSH peuvent être liées à la diminution des activités de la GPx et de la GST.

## Conclusion

À la lumière des résultats obtenus, il peut être conclu que le TMX injecté à des rats adultes de souche Wistar à trois doses croissantes (100, 150 et 300 mg/kg PC) peut entraîner des modifications du comportement des rats, de leur poids corporel et de la nourriture et boisson ingérées. De plus, des altérations du profil hématologique confirmées par l'observation microscopique du frottis sanguin des différents groupes de rats, sont notées. D'autre part, un déséquilibre de la balance oxydant/antioxydant suite à la génération des radicaux libres généralement lié à la présence du TMX, est observé. Cette toxicité augmente avec l'élévation de la dose du TMX, ce qui reflète que l'utilisation excessive de cet insecticide peut affecter la santé des mammifères.

## Conflit d'intérêts

Les auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêts.

## Références

- Kim K-H., Kabir E., Jahan SA. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci Total Environ* 2017;575: 525-35.
- Mostafalou S., Abdollahi M. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. *Arch Toxicology* 2016;91(2): 549-99.
- Cox C., Surgen M. Unidentified Inert Ingredients in Pesticides: Implications for Human and Environmental Health. *Environ Health Perspect* 2006; 114: 1803-6.
- Green T., Toghiani A., Lee R., Waechter F., Weber E., Noakes J., et al. Thiamethoxam Induced Mouse Liver Tumors and Their Relevance to Humans. *Toxicol Sci* 2005;86(1): 36-47.
- Bingham G., Gunning RV., Delogu G., Borzatta V., Field LM., Moores GD. Temporal synergism can enhance carbamate and neonicotinoid insecticidal activity against resistant crop pests. *Pest Manag Sci* 2008;64:81-5.
- Henry M., Beguin M., Requier F., Rollin O., Odoux J-F., Aupinel P., et al. A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. *Sci* 2012;336(6079): 348-50.
- Council of European Communities. Council instructions about the protection of living animals used in scientific investigations. *J Eur Commun* 1986;L358: 1-18.
- Lowry OH., Rosenbrough NJ., Farr AL., Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193: 265-75.
- Draper HH., Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. *Methods in Enzymology*, vol. 186, Elsevier; 1990, p.421-31.
- Witko V., Nguyen AT., Descamps-Latscha B. Microtiter plate assay for phagocyte-derived Taurine-chloramines. *J Clin Lab Anal* 1992;6: 47-53.
- Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82: 70-7.
- Jollow DJ., Mitchell JR., Zampaglione N., Gillette JR. Bromobenzene-Induced Liver Necrosis. Protective Role of Glutathione and Evidence for 3,4-Bromobenzene Oxide as the Hepatotoxic Metabolite. *Pharmacology* 1974;11: 151-69.
- Beauchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochem* 1971;44: 276-87.
- Flohé L., Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, vol. 105, Elsevier; 1984, p.114-20.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, vol. 105, Elsevier; 1984, p.121-6.
- Feki A., Ben Saad H., Bkhairia I., Ktari N., Naifar M., Boudawara O., et al. Cardiotoxicity and myocardial infarction-associated DNA damage induced by thiamethoxam in vitro and in vivo: Protective role of *Trigonella foenum-graecum* seed-derived polysaccharide. *Environ Toxicology* 2019;34: 271-82.
- Van Maele-Fabry G., Lantin A-C., Hoet P., Lison D. Childhood leukaemia and parental occupational exposure to pesticides: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Causes Control* 2010;21: 787-809.
- Ogutcu A., Suludere Z., Kalender Y. Dichlorvos-induced hepatotoxicity in rats and the protective effects of vitamins C and E. *Environ Toxicol Pharmacol* 2008;26: 355-61.
- Swenson TL., Casida JE. Neonicotinoid formaldehyde generators: Possible mechanism of mouse-specific hepatotoxicity/hepatocarcinogenicity of thiamethoxam. *Toxicology Letters* 2013;216: 139-45.
- Siems WG., Sommerburg O., Grune T. Erythrocyte free radical and energy metabolism. *Clin Nephrol* 2000;53: S9-17.
- Rawat SK., Singh RK., Bansode FW., Singh P., Singh RP. Nitrate induced toxicity on some haematological parameters of Charles Foster rats. *J Recent Adv Appl Sci* 2013;28: 35-8.
- Bhoopalan SV., Huang LJ., Weiss MJ.. Erythropoietin regulation of red blood cell production: from bench to bedside and back. *F1000 Res* 2020;9:F1000 Faculty Rev-1153.
- Elhamalawy OH., Al-Anany FS., El Makawy AI. Thiamethoxam-induced hematological, biochemical, and genetic alterations and the ameliorated effect of *Moringa oleifera* in male mice. *Toxicol Rep* 2022;9: 94-101.
- Ben Amara I., Ben Saad H., Cherif B., Elweij A., Lassoued S., Kallel C., et al. Methyl-thiophanate increases reactive oxygen species production and induces genotoxicity in rat peripheral blood. *Toxicol Mechanisms Methods* 2014;24: 679-87.
- Zhang L., Reddy N., Koyyalamudi SR. Isolation, Characterization, and Biological Activities of Polysaccharides from Medicinal Plants and Mush-

- rooms. *Studies Natural Products Chemistry Elsevier* 2014; vol.42,: p.117-51.
26. Jaballi I., Ben Saad H., Bkhairia I., Kammoun I., Droguet M., Magné C., et al. Increasing maneb doses induces reactive oxygen species overproduction and nephrotoxicity in adult mice. *Toxicol Mechanisms Methods* 2017;27(5):382-93.
27. Cazzola R., Russo-Volpe S., Cervato G., Cestaro B. Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls: Oxidative balance of soccer players. *Eur J Clin Invest* 2003 ;33 : 924-30.
28. Ben Amara I., Soudani N., Hakim A., Bouaziz H., Troudi A., Zeghal KM., et al. Dimethoate-induced oxidative damage in erythrocytes of female adult rats: possible protective effect of vitamin E and selenium supplemented to diet. *Toxicol Industr Health* 2011;28(3): 222-37.
29. Gan L., Liu Q., Xu H-B., Zhu Y-S., Yang X-L. Effects of Selenium Overexposure on Glutathione Peroxidase and Thioredoxin Reductase Gene Expressions and Activities. *Biological Trace Element Res BTER* 2002;89: 165-76.