

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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-Chimique
Filière : Biologie
Option : Biochimie Physiopathologique



Réf :.....

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

MASTER

Thème

**Etude histopathologique
d'organes de souris traitées aux
pesticides**

Présenté par : IKHLEF Nawal
YAHIAOUI Melissa

Soutenu en: **Juin 2017**

Devant le jury composé de :

Mme ADRAR S.
Melle AIT ALI Dj.
Mr BELKACEM N.

MAA
MCB
MAA

Présidente
Encadreur
Examineur

Année universitaire : 2016 / 2017

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier **Mlle AIT ALI** d'avoir accepté d'être notre promotrice, de nous avoir orienté et corrigé avec soin cet ouvrage

Nous remercions grandement **Mr GHIDOUCHE** d'avoir toujours été présent pour répondre à nos questions et pour nous avoir guidé tout au long de notre expérimentation.

Nous remercions le doyen de la faculté de médecine de Bejaia, **Pr TLIBA**, pour nous avoir permis de travailler au sein du laboratoire de médecine d'Aboudaou.

Nous remercions chaleureusement **Mme KADJI** pour nous avoir aidé dans l'interprétation des lames histologiques.

Nous tenons à exprimer un grand merci à tous les membres de l'équipe travaillant au sein du laboratoire d'anatomopathologie de l'université d'Aboudaou : **YAHY Hakima, MEZHOUD Linda** et **BOUGANDOURA Louiza**, qui nous ont grandement aidé dans la réalisation des coupes histologiques.

Nous remercions également les membres du jury:

Mme ADRAR S. qui a bien voulu présider ce jury

Mr BELKACEM N. pour avoir examiné ce mémoire

Pour finir, nous adressons nos remerciements à tous nos enseignants qui ont su nous transférer leur savoir et sans qui nous n'aurions pas pu arriver aussi loin dans nos études.

Dédicace

*Je tiens au premier lieu à remercier **Dieu** de m'avoir créée en bonne image, de m'avoir accordé sa bénédiction, de m'avoir permis d'être là où je suis aujourd'hui et de m'avoir offert la patience nécessaire pour traverser tout les moments difficiles et résoudre tout les problèmes que j'ai eu.*

*A **ma chère mère**, pour tous ses sacrifices, son amour, son soutien et ses prières tout au long de mes études, merci maman, tu as été ma mère et mon père, tu ne m'as jamais laissé sentir son absence, merci pour tout ce que t'as fait pour nous.*

*A Ma chère sœur **Wissam** pour ses encouragements, ses conseils et surtout son soutien moral.*

*A mon petit frère **Djaaffer** pour son aide, son appui, ses encouragements, et sa présence au prés de moi.*

*A mon binôme **Melissa** pour sa compréhension, son aide, et sa collaboration avec moi.*

*A mon cousin **Massinissa** pour ses conseils, ses encouragements et pour avoir toujours été à mes côtés.*

*A toute **ma famille** pour leur soutien et leur présence tout au long de mon parcours universitaire.*

*A tous mes amis **Ibtissam, Akila, Massilia, Fadia, Rima, Sonia, Hassina, Youna, Donia, Samra, Hanane, Kahina, Samia, Imane et Diana** pour leur soutien et surtout pour tous les bons moments qu'on a vécu ensemble, ils resteront a jamais gravé dans ma mémoire.*

IKHLEF Nawal

Dédicaces

Je tiens à dédier ce travail :

A ma très chère mère, pour l'éducation qu'elle m'a inculquée, pour avoir toujours cru en moi et pour m'avoir toujours grandement encouragée tout au long de ma vie.

A mon très cher père, pour m'avoir aidée dans la correction de ce mémoire, pour avoir été le meilleur enseignant que je n'ai jamais eu et sans qui je n'aurais jamais pu arriver là où je suis.

A ma chère sœur, Laetitia, l'amie qui m'a toujours fait pression pour me perfectionner tout au long de mon cursus universitaire et qui m'a également aidé dans la correction de ce travail.

A ma binôme, pour sa gentillesse et pour le sérieux avec lequel elle a su diriger la réalisation de ce travail.

A Chalabia, Lamia et Rym pour nous avoir aidé et soutenu avec beaucoup de sympathie et de gentillesse.

YAHIAOUI Melissa

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION..... 1

PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I- Généralités sur les pesticides

I-1- Historique..... 2

I-2- Définition des pesticides 2

I-3- Classification des pesticides 2

I-3-1- Classification selon la cible biologique..... 3

I-3-1-1- Les insecticides 3

I-3-1-2- Les fongicides 3

I-3-1-3- Les herbicides 3

I-3-2- Classification selon la nature chimique..... 3

I-3-2-1- Les organochlorés (OC) 4

I-3-2-2- Les carbamates 4

I-3-2-3- Les organophosphorés (OP)..... 4

I-4- Les pesticides en Algérie 6

II- Effets des pesticides sur la santé humaine 7

II-1- Les voies d'exposition aux pesticides 7

II-2- Effets toxiques des pesticides 7

II-2-1- Toxicité aiguë 7

II-2-2- Toxicité chronique et subchronique..... 8

II-2-2-1- Effets neurologique..... 8

II-2-2-2- Effets immunitaire 9

II-2-2-3- Effets cancérogènes 9

II-2-2-4- Effets sur la reproduction..... 9

II-2-2-5- Effets sur le foie..... 11

II-3- Effets des mélanges de pesticides..... 12

PARTIE II : MATERIEL ET METHODES

| | |
|--|-----------|
| I-1- Animaux | 13 |
| I-2- Pesticide..... | 13 |
| I-3- Traitements | 14 |
| I-3-1-Matériel..... | 14 |
| I-3-2-Méthodes..... | 14 |
| I-4- Analyse <i>in vivo</i> | 15 |
| I-4-1- Comportement et symptômes cliniques..... | 15 |
| I-4-2- Mesure du poids des souris..... | 15 |
| I-4-3- Sacrifice des animaux et observation macroscopique | 15 |
| I-4-3-1-Matériel | 15 |
| I-4-3-2-Méthode | 15 |
| I-5- Etude histologique | 16 |
| I-5-1-Matériel..... | 16 |
| I-5-2-Méthode | 17 |
| I-5-2-1- Fixation et incubation..... | 17 |
| I-5-2-2- Enrobage et confection des coupes | 18 |
| I-5-2-3- Coloration et montage des coupes | 19 |
| I-6- Observation microscopique | 20 |
| I-7- Etude statistique | 21 |
| PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION | |
| I- RESULTATS | 22 |
| I-1- Comportement et symptômes cliniques..... | 22 |
| I-2- Etude macroscopique | 22 |
| I-3- Variation du poids corporel et du poids relatifs des organes | 23 |
| I-4- Résultats de l'étude histologique..... | 26 |
| II- DISCUSSION | 30 |
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 34 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | |
| REFERENCES ELECTRONIQUES | |
| Annexes | |
| Glossaire | |

Liste des abréviations

AChE : Acétylcholinestérase

ALP : Phosphatase alcaline

ALT ou ALAT : Alanine Aminotransférase

AMPA : Acide aminométhyl phosphonique

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

AST ou ASAT : Aspartate aminotransférase

BALB/C : Souche Albinos

CAT : Catalase

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer

CPF : Chlorpyrifos

cVC : Congestion de la Veine Centro-lobulaire

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane

DL50 : Dose létale médiane

DS : Sinusoïde dilaté

dVC : Dilatation de la Veine Centro-lobulaire

FSH : Hormone Folliculo-Stimulante

GLP : Glyphosate

GPx : Glutathion Peroxydase

GSH : Glutathion réduit

H&E : Hématoxyline et Eosine

i.p. : Intra-péritonéal

IgG : Immunoglobulines de type G

IP3 : Inositol triphosphate

LDH : Lactate déshydrogénase

LH : Hormone Lutéinisante

OC : Organochlorés

OMS : Organisation Mondiale de la santé

OP : Organophosphorés

P450scc : *cholesterol side-chain cleavage enzyme*

PC : Poids Corporel

pH : Potentiel Hydrogènique

ROS : Espèces Réactives Oxygénées

SEM : Erreur type de la moyenne

SOD : Superoxyde Dismutase

StAR : *Steroidogenic Acute Regulatory Protein.*

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Photographie originale de l'une des cages hébergeant les souris..... | 13 |
| Figure 2 : Photographie originale représentant le traitement d'une souris par injection intrapéritonéale | 14 |
| Figure 3 : Photographie originale montrant la dissection d'une souris du groupe traité | 16 |
| Figure 4 : Photographies originale montrant l'étape de fixation et d'incubation | 18 |
| Figure 5 : Photographie originale représentant l'étape d'enrobage et de déparaffinage..... | 19 |
| Figure 6 : Photographie originale récapitulant l'étape de coloration et celle du montage | 20 |
| Figure 7 : Photographie originale représentant l'observation microscopique des lames effectuées grâce à un microscope optique relié à un ordinateur..... | 21 |
| Figure 8 : Image représentant les foies et testicules des souris des deux lots..... | 23 |
| Figure 9 : Histogrammes représentant la comparaison des valeurs de la masse relative des organes des animaux du groupe contrôle et du groupe traité | 25 |
| Figure 10 : Photographie originale représentant la coupe histologique transversale du foie d'une souris témoin aillant ressue de l'eau physiologique..... | 26 |
| Figure 11 : Photographie originale représentant les coupes histologique des foies de souris traitées | 27 |
| Figure 12 : Photographie originale représentant la coupe histologique transversale du testicule d'une souris témoin aillant ressue de l'eau physiologique | 28 |
| Figure 13 : Photographie originale représentant la coupe histologique transversale des testicules des souris traitées par le mélange de pesticides..... | 29 |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau I : Produits, instruments et appareils utilisé lors des différentes étapes de l'histologie..... | 16 |
| Tableau II : Variation du poids corporel des souris témoins et traités aux mélange de pesticide (GLY et CPF) après six semaines de traitement..... | 24 |

INTRODUCTION

INTRODUCTION

De nos jours, le besoin de produire sans cesse des aliments en grande quantité et de meilleure qualité nécessite l'emploi de manière fréquente et intensive de pesticides. Ces derniers sont des produits chimiques généralement utilisés dans le domaine agricole pour lutter contre les ravageurs (**Garcia et al., 2012**). Les pesticides sont le plus souvent classés, selon leurs cibles biologiques et selon leurs natures chimiques, en plusieurs familles (**Baldi et al., 2013**). L'une des familles les plus utilisées en Algérie est celle des organophosphorés (**Ayad Mokhtari, 2012**).

L'usage intensif de ces produits chimiques, individuellement ou sous forme de mélange entraîne leur dispersion dans l'environnement (**Baldi et al., 2013**). Cela conduit à l'élévation du risque d'exposition humaine aux pesticides (**Joshi et al., 2007**). Ces derniers ont été incriminés dans l'apparition de diverses pathologies allant des troubles de la reproduction à des troubles neurologiques en passant par diverses maladies hépatiques et immunologiques et une multitude de cancers tant chez les consommateurs, généralement par l'alimentation, que chez les agriculteurs dû à un mauvais emploi de ces produits chimiques. Ils sont responsables d'environ un million d'intoxications aiguës par an avec un taux de mortalité de 0,4 à 1,9% d'après les estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (**Garcia et al., 2012**).

Les pesticides utilisés dans notre étude sont le Glyphosate et le Chlorpyrifos. Ils ont été sélectionnés par rapport à leur utilisation intensive sur le marché agricole Algérien et leur impact sur la santé. En ce qui concerne les organes étudiés, notre choix s'est porté sur le foie et les testicules. Le premier est le principal organe de détoxification et du métabolisme des xénobiotiques, dont font partie les pesticides, et le second qui est l'organe de la reproduction, est connu pour être la cible de nombreux pesticides.

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'effet sub-chronique d'un mélange constitué des deux pesticides cités précédemment sur l'histologie du foie et des testicules des souris BALB/C mâles traitées par voie intra-péritonéale. Les résultats de l'observation anatomopathologique de ces deux organes permettront d'avoir un aperçu de l'action combinée de ces deux pesticides sur la santé humaine.

PARTIE I : REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

I-Généralités sur les pesticides

I-1-Historique

Depuis des siècles, les pesticides étaient utilisés pour lutter contre les maladies mais surtout pour lutter contre les ravageurs des cultures. Ces produits étaient dérivés de composés minéraux ou végétaux tels que l'arsenic et le sulfate (**Boland et al., 2004**).

Vers les années 1940, le secteur des pesticides a commencé à se développer grâce à l'évolution de la chimie organique, ce qui donna naissance au premier pesticide de synthèse qui est le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT). Toutefois au cours des années 1950, les scientifiques se sont aperçus de la dangerosité de l'utilisation excessive de ces produits chimiques, ce qui conduit à l'élaboration de diverses recherches pour la prévention des risques. Malgré cela, la production des pesticides n'a cessé d'augmenter jusqu'à nos jours (**Boland et al., 2004**).

I-2-Définition des pesticides

L'étymologie du terme pesticide est composée de l'anglais « *pest* » qui signifie « ravageurs » et du suffixe « *cide* » (*cida* en latin) qui signifie « tuer » (**Foubert, 2012**).

Ce mot est une appellation générique regroupant diverses substances (molécules) et produits (formulations) (**Boland et al., 2004**). Leur rôle est de contrôler les nuisibles (insectes transmetteurs de maladies, ravageurs et mauvaises herbes) ainsi que les produits du domaine médical et vétérinaire (**Periquet et al., 2004**).

Les pesticides sont commercialisés sous plusieurs formulations composées de mélanges de substance active, de solvants, d'adjuvants, de surfactants, de vecteurs, de coloris et de marqueurs olfactifs (**Hurst et Kirby, 2004**).

I-3- Classification des pesticides

Il existe plusieurs types de classifications des pesticides. Parmi elles, il existe la classification basée selon leur cible biologique et celle basée selon leur nature chimique (**Garcia et al., 2012**).

I-3-1-Classification selon la cible biologique

Cette classification se base sur le type de parasite à combattre. Plusieurs familles appartiennent à ce système de classification telles que : Les acaricides, les aphicides, les ovicides, les larvicides, les molluscicides, les hélicides, les rodenticides, les taupicides, les corvicides et les termicides. Toutefois les principales familles sont : les insecticides, les fongicides et les herbicides (**Periquet *et al.*, 2004**).

I-3-1-1- Les insecticides

Leur rôle est de protéger les plantes contre les insectes en entraînant des actions neurotoxiques, régulatrices de croissance et inhibitrices de la respiration. Les principes actifs des produits de cette classification sont généralement des organochlorés (**Periquet *et al.*, 2004**). Parmi les insecticides figurent le Perméthrine et le Chlorpyrifos (**Baldi *et al.*, 2013**).

I-3-1-2- Les fongicides

Leur rôle est de combattre les maladies cryptogamiques (protection contre le développement des champignons microscopiques). Les fongicides agissent en perturbant le métabolisme glucidique, la biosynthèse de l'ADN et de l'ARN tout en inhibant la respiration ainsi que la division cellulaire (**Periquet *et al.*, 2004**). Le Mancozeb et le Maneb sont des exemples de pesticides appartenant au groupe des fongicides (**Baldi *et al.*, 2013**).

I-3-1-3- Les herbicides

Les herbicides sont des pesticides couramment utilisés dans le monde (**Samuel, 2001**). Leur rôle est de détruire les plantes adventices (végétation indésirable) qui détournent les ressources organiques et minérales du sol des cultures. Ils peuvent agir de différentes façons sur les plantes, tel qu'en inhibant la division cellulaire et la synthèse des acides aminés, de la cellulose ainsi que des lipides ou encore en perturbant la photosynthèse et la régulation de l'auxine qui est l'hormone de croissance des végétaux (**Periquet *et al.*, 2004**). Parmi les herbicides figurent le Glyphosate et le Paraquat (**Baldi *et al.*, 2013**).

I-3-2-Classification selon la nature chimique

Il existe plusieurs familles de pesticides appartenant à cette classification telles que : Les pyrethrinoides, les thiocarbamates, les urées substituées, les triazines, les phtalimides, les phenoxyherbicides et les pyridines. Toutefois, les trois principales familles de cette

classification sont les organochlorés (OC), les carbamates et les organophosphorés (OP) (**Baldi *et al.*, 2013**).

I-3-2-1- Les organochlorés (OC)

Les OC étaient les premiers insecticides synthétisés et utilisés à grande échelle (**Lanoix et Roy, 1976**). Ils sont composés de carbone, d'hydrogène et de chlore (**Periquet *et al.*, 2004**).

Ce sont des composés stables qui s'accumulent dans les tissus adipeux. Principalement utilisés pour combattre les vecteurs de maladies comme le paludisme, ils sont aussi utilisés dans l'agriculture comme le DDT. Les OC pénètrent chez les insectes par voie orale ou par contact direct.

Chez l'être humain, ces substances, ou leurs métabolites, agissent principalement au niveau du système nerveux central, perturbant les propriétés électrophysiologiques provoquant des altérations au niveau de la cinétique du flux de Na^+ et K^+ à travers la membrane de la cellule nerveuse, ce qui entraîne de multiples propagations de potentiels d'action à chaque stimulus. Ce mécanisme d'action est responsable de l'apparition de divers symptômes tels que des crises de convulsion et dans les cas extrêmes, la mort par arrêt respiratoire après un empoisonnement aigu (**Garcia *et al.*, 2012**).

I-3-2-2- Les carbamates

Les pesticides de cette famille sont des esters dérivés de l'acide carbamique (**Periquet *et al.*, 2004**). Ils sont utilisés autant qu'insecticides, fongicides, herbicides et nématicides (**Garcia *et al.*, 2012**). Toutefois, ils ne peuvent pas avoir d'effet sur les larves car ils sont instables en milieu aqueux (**Lanoix et Roy, 1976**).

Ils ont l'avantage d'être peu toxique chez les mammifères tout en ayant un grand impact chez les insectes par leur mode d'action (**Periquet *et al.*, 2004**). Ce dernier se résume à l'inhibition rapide de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (AChE) par l'association covalente de groupes électrophiles (carbamylation) au niveau de l'enzyme (**Garcia *et al.*, 2012**). Parmi les carbamates figure le carbofuran, l'aldicarbe, le carbosulfan et le fénoxy-carbe (**Periquet *et al.*, 2004**).

I-3-2-3- Les organophosphorés (OP)

Les pesticides de cette famille sont des esters de l'acide phosphorique. Leurs substances actives sont chimiquement instables et se terminent généralement par « phos » ou « thion ».

Ils se divisent en trois groupes : Les organophosphorés aliphatiques, les dérivés phényles et les hétérocycles (**Periquet *et al.*, 2004**).

Les OP agissent sur les plantes de deux manières : soit par un effet systémique, lorsqu'il y a distribution du produits dans la plante après sa pénétration ; soit par une action de surface, lorsque le produit n'est pas véhiculé dans le végétal (**Periquet *et al.*, 2004**).

Ces composés sont distribués dans tout l'organisme et ont la capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique. Parmi eux, les plus liposolubles sont stockés dans les graisses, ce qui conduit à leur redistribution, et donc, à l'apparition de symptômes retardés et d'évolutions prolongées (**Testud et Grillet, 2007**).

Les OP, que cela soit chez l'animal ou chez l'homme, inhibent l'activité des enzymes qui assurent le fonctionnement du système nerveux, essentiellement l'acétyl cholinestérase (**Noworyta-Glowacka *et al.*, 2012**). Cette dernière module le taux d'un neurotransmetteur appelé acétylcholine. Cette inhibition est possible par la phosphorylation de sérine du groupe hydroxyle dans le site actif de l'enzyme, ce qui a pour conséquence la perturbation de l'influx nerveux (**Garcia *et al.*, 2012**). Divers mécanismes d'action sur d'autres estérases liés à la toxicité cholinergique (les carboxylestérases et les estérases A) ont été répertoriés chez cette famille de pesticides (**Karanth et Pope, 2000**).

Les OP peuvent aussi causer des mutations au niveau de l'acide désoxyribonucléique (ADN) grâce à leurs propriétés alkylantes (ajouts des groupements alkyles méthyle et éthyle aux bases azotées) (**Garcia *et al.*, 2012**).

Certains éléments et exemples de toxicité des insecticides organophosphorés sont cités dans l'annexe N°4.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à deux organophosphorés : le Chlorpyrifos et le Glyphosate.

✓ Le Chlorpyrifos

Le Chlorpyrifos O,O-diethyl-O-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl) phosphorothioate, abrégé en CPF, (**Elsharkawy *et al.*, 2012**), et de formule chimique $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$, est la molécule active de plusieurs insecticides OP (**Ncibi *et al.*, 2008**).

Cet insecticide est utilisé dans l'agriculture, mais aussi dans l'hygiène sanitaire afin de lutter contre les insectes des habitations (**Noworyta-Glowacka *et al.*, 2012**).

Ce produit chimique, commercialisé depuis 1965, est un solide blanc cristallin, dont la stabilité diminue avec l'augmentation du pH, retrouvé dans diverses formulations (tels que le lorsban, le dursban, le suscon green, empire et equity). Son principal métabolite est le Chlorpyrifos-oxon, qui peut être plus toxique que la molécule mère (**Watts, 2012**).

✓ Le Glyphosate

Cette OP est un herbicide systémique non sélectif (**Ting, 2007**). Il est également appelé (N-(phosphonométhyl) glycine et sa formule chimique est $C_3H_8NO_5P$ (**Laure et al., 2012**). Il a été commercialisé pour la première fois en 1974 sous le nom de Roundup (composé essentiellement de sel d'isopropylamine du Glyphosate, mais aussi d'ingrédients inertes, y compris les tensioactifs).

Le Glyphosate (GLP) est un solide non volatil de couleur blanchâtre, soluble à 1.2% dans l'eau à température ambiante, sans pour autant être soluble dans les solvants organiques (**Chan et al., 1992**). Cet herbicide pourrait réagir avec les nitrites se trouvant dans les aliments pour donner le N-nitrosophosphonométhylglycine, potentiellement cancérigène (**Samsel et Seneff, 2015**). Son absorption au niveau du tractus gastro-intestinal est incomplète (**OMS., 2005**), tout comme sa biotransformation, de sorte que la grande majorité du GLP est excrétée sous forme inchangée, le reste est métabolisé en acide aminométhylphosphonique (AMPA) (**Ting, 2007**).

Le mode d'action du GLP dans les plantes consiste en l'inhibition d'une enzyme appelée 5-énolpyruvylshikimate3-phosphate synthase (voie shikimique) qui est très importante pour la formation d'acides aminés aromatiques. Ce phénomène conduit à la mort de la plante (**Watts et al., 2016**).

I-4-Les pesticides en Algérie

La production de pesticides en Algérie a été assurée par des entreprises de gestion des pesticides répondant aux noms d'Asmidal et Moubydal. Cependant l'économie du marché Algérien a poussé l'importation de ces produits par plusieurs entreprises. Cela s'explique par l'utilisation massive des pesticides dans divers domaines (**Bouziati, 2007**). Le domaine agricole est celui qui utilise le plus de ces produits pour le traitement des cultures et la lutte contre les ravageurs, ce qui permet d'augmenter la production agricole (**Testud et Grillet, 2007**).

Une enquête effectuée par **Ayad Mokhtari, (2012)** a montré que les OP, tel que le Chlorpyrifos, font partie des pesticides les plus utilisés en Algérie.

Les quantités de pesticides utilisées en Algérie étaient d'environ 4 mille tonnes en 2013. Ainsi l'hypothèse d'un risque d'exposition chronique des agriculteurs et des consommateurs algériens aux pesticides peut être formulée (**Mokhtari et Mouhouche, 2016**).

II-Effets des pesticides sur la santé humaine

Quel que soit leur rang taxonomique, les êtres vivants ont divers processus et mécanismes physiologiques en commun. Ce qui fait que les pesticides ont un pouvoir de toxicité envers les organismes non ciblés tel que l'Homme (**Baldi et al., 2013**).

II-1- Les voies d'exposition aux pesticides

Que ce soit les agriculteurs ou les consommateurs, l'Homme peut être exposé, volontairement ou non, aux pesticides par : voie orale (alimentation), voie cutanée (contact avec la peau) et la voie pulmonaire (inhalation) (**Alavanja et al., 2004**).

II-2- Effets toxiques des pesticides :

Certaines substances sont rapidement éliminées par différentes voies, provoquant une toxicité aiguë, et d'autres peuvent s'accumuler dans l'organisme, ce qui peut conduire à l'apparition d'effets toxiques à long terme (**Tron et al., 2001**).

Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), les facteurs influant sur la toxicité des pesticides pour l'homme sont : la dose, la voie d'exposition, le degré d'absorption, les effets de la matière active ainsi que ses métabolites, l'accumulation et la persistance du produit dans l'organisme.

L'état de santé de la personne exposée est aussi un facteur influençant la toxicité du pesticide (**Tron et al., 2001**). Les éléments permettant la détermination du profil toxicologique d'une substance active sont cités dans l'annexe N°3.

II-2-1-Toxicité aiguë

La littérature décrivant l'effet aiguë des pesticides note principalement : Des brûlures chimiques au niveau oculaire, des lésions cutanées, des troubles au niveau du foie et des effets neurologiques. Une forte intoxication peut conduire à de graves effets pouvant aller jusqu'à la

mort chez certains individus, alors que pour d'autres seuls des symptômes biochimiques pouvaient témoigner de l'intoxication (**Tron *et al.*, 2001**).

✓ Le Chlorpyrifos

Sa toxicité aiguë change selon l'espèce et la voie d'exposition (**Elsharkawy *et al.*, 2012**). En effet, une étude a déduit que la DL50 du chlorpyrifos, administré par voie intra-péritonéale chez les souris males, est de 192 mg/kg pc (**Sultatos *et al.*, 1982**). L'exposition aiguë à cet insecticide provoque une augmentation du taux sérique des transaminases aspartate aminotransférase (AST) et alanine Aminotransférase (ALT), qui sont des indices de toxicité hépatique, et d'autres signes de toxicité tels que des crises d'épilepsie et une détresse respiratoire (**Chebab *et al.*, 2009**).

✓ Le Glyphosate

De par sa faible absorption dans l'organisme, le GLP est peu toxique par ingestion et contact direct, par contre, il est bien plus toxique par voie intra-péritonéale (i.p.) (**Ting, 2007**). Toutefois, plusieurs formulations (tel que le Roundup) sont beaucoup plus toxiques que le GLP par la toxicité des autres ingrédients qui le composent (**Watts *et al.*, 2016**). Diverses études ont trouvé que la DL 50 de ce produit chimique chez les souris est de 130 mg/kg de poids corporel par i.p. L'exposition aiguë au GLP provoque une convulsion asphyxiant occasionnelle, un stress sévère, l'hyperémie et une respiration accélérée (**Ting, 2007**).

II-2-2- Toxicité chronique et subchronique

La majorité des effets chroniques et subchroniques apparaissent après des expositions répétées à de faibles doses de pesticides dans l'organisme (**Periquet *et al.*, 2004**).

Les troubles neurologiques, les troubles de la reproduction, les altérations du développement et les cancers font partie des pathologies les plus étudiées pour démontrer les effets chroniques des pesticides sur l'être humain. Cependant d'autres effets ont été répertoriés tel que l'effet mutagène (**Baldi *et al.*, 2013**).

II-2-2-1- Effets neurologiques

Les troubles neurodégénératifs peuvent avoir diverses origines, mais les pesticides semblent être les principaux facteurs environnementaux liés à leur déclenchement (**Astiz *et***

al, 2009a). Les organophosphorés font partie de ces pesticides car la neurotoxicité est leur principal mode d'action (inhibition de l'activité de l'AChE) (*Alavanja et al., 2004*).

La maladie de parkinson est un parfait exemple de maladies neurologiques provoquées par ces produits chimiques. En effet, les utilisateurs de pesticides semblent avoir un risque accru de développer cette maladie (*Baldi et al., 2013*).

II-2-2-2- Effets immunitaires

Les recherches épidémiologiques ont trouvé certains mécanismes à l'origine des pathologies immunitaires provoquées par les pesticides. Parmi ces derniers, les OC provoquent diverses pathologies respiratoires tel que l'asthme bronchique (*Salameh et al., 2006*). Certains OP, tel que le CPF, semblent réduire le taux d'IgG, de leucocytes et de lymphocytes tout en augmentant le taux de granulocytes chez les rats (*Elelaimy et al., 2012*).

II-2-2-3- Effets cancérigènes

Ces effets ont été prouvés par des études épidémiologiques et in vivo. Cela a permis au centre international de recherche sur le cancer (CIRC) de classer certains pesticides selon leur cancérigénicité, à titre d'exemple le DDT. L'effet cancérigène de ces produits chimiques est dû à plusieurs mécanismes tels que leur action sur les hormones, pour certains, qui sont à l'origine de l'apparition de cancers hormonodépendants (*Baldi et al., 2013*).

II-2-2-4- Effets sur la reproduction

Les pesticides peuvent être en cause de divers troubles de la reproduction, surtout rapportés chez les personnes travaillant avec ces produits, tels que l'infertilité, la stérilité ou encore les avortements spontanés (*Periquet et al., 2004*).

L'effet de certains pesticides sur le système endocrinien (tel que le DDT) sont susceptibles d'être à l'origine de ces troubles de la reproduction (*PRSE, 2010*).

✓ Le Chlorpyrifos

Une étude a révélé que le CPF altère la structure des testicules, diminue le poids des organes génitaux, ainsi que le nombre et la mobilité des spermatozoïdes se trouvant dans la queue de l'épididyme (*Kenfack et al., 2007*).

Une autre étude a montré que le CPF est capable de réduire le taux de testostérone, qui est la principale hormone sexuelle mâle, ainsi que l'activité de certaines enzymes se trouvant au niveau des testicules. Ceci pourrait être à l'origine des effets du CPF observés sur la spermatogenèse. Cette même étude a montré, dans les testicules des rats, une diminution de l'expression de l'enzyme phosphatase alcaline et une faiblesse du système de défense antioxydant. Ce dernier induit un stress oxydatif qui a un effet néfaste sur la reproduction masculine (**Elsharkawy *et al.*, 2012**). Le stress oxydatif atteint également les organes reproducteurs féminins tels que répertoriés dans une étude subchronique effectuée sur des rats (**Nishi et Hundal, 2013**).

En plus de cela, chez les souris femelles, le CPF augmente la peroxydation des lipides, diminue le taux d'hormone folliculo-stimulante (FSH) tout en provoquant divers changements histologiques au niveau des ovaires. Ces derniers peuvent être dus à la propriété oestrogénique de cette substance active (**Nishi et Hundal, 2013**).

Il semblerait que, du point de vue moléculaire, la diminution de la biosynthèse de la testostérone des cellules de Leyding par le CPF soit due à la réduction du nombre de récepteurs LH couplé à la protéine G, ce qui entraîne une baisse du taux d'AMPc menant à la réduction de l'expression des gènes StAR et P450scc codant pour les principales enzymes de la stéroïdogène (**Viswanath *et al.*, 2010**).

✓ Le Glyphosate :

L'exposition aux herbicides à base de Glyphosate (Roundup) peut provoquer des effets néfastes sur la reproduction, y compris à de très faibles doses, tels que la mort des cellules testiculaires et la réduction du nombre de spermatozoïdes, contribuant ainsi à la stérilité masculine (**Watts *et al.*, 2016**).

En plus de cela, ce pesticide peut perturber l'activité hormonale des rats mâles et femelles en modifiant les taux de testostérones ainsi que l'activité des aromatasés synthétisant l'oestrogène (**Ho, 2014**).

D'après une étude effectuée sur des rats, cet OP est toxique au niveau des testicules des jeunes animaux car il induit l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants des cellules de Sertoli et l'activation des récepteurs de l'inositol triphosphate (IP3) et de la ryanodine, dont le rôle est de contrôler la libération des ions calciques par le réticulum endoplasmique

(Cavalli et al., 2013). Un stress oxydatif serait à l'origine de cet afflux d'ions Ca^{2+} . Ce dernier, après sa pénétration dans les mitochondries et le noyau, cause la mort cellulaire par nécrose ; et la régulation de la transcription des gènes responsables de l'apoptose respectivement (Ho, 2014).

De plus, le GLP provoque une diminution des réserves de glutathion, accentuant le stress oxydatif (Cavalli et al., 2013). Cette diminution est due à l'activation de plusieurs enzymes responsables de la régulation négative du taux de GSH (glutathion réduit) (Ho, 2014).

II-2-2-5- Effets sur le foie

Cet organe est le principal site du métabolisme des produits chimiques exogènes tels que les pesticides, entraînant la production de métabolites plus ou moins toxiques que le composé parent (Ncibi et al., 2008).

Cette biotransformation diffère selon le type de pesticide. Chez les OP contenant un soufre lié au phosphore, elle se fait par désulfuration oxydative par le cytochrome P450 (principalement au niveau du foie). Une intoxication aiguë ou chronique par les pesticides peut sévèrement endommager le foie (Costa, 2006).

✓ Le Chlorpyrifos

De nombreux auteurs ont démontré que le stress oxydant est le principal mécanisme de toxicité du Chlorpyrifos car les dommages au niveau du foie, dus à l'exposition à cet insecticide, sont généralement suivis d'une importante altération de l'activité antioxydante hépatique. Ceci laisse à penser que ce dernier est lié à une production excessive de ROS (Espèces réactives de l'oxygène) (Chebab et al., 2009).

L'intoxication chronique des rats au Chlorpyrifos peut engendrer des dommages hépatiques tout en perturbant les fonctions de cet organe noble. Les divers changements de la fonction hépatique sont associés à l'augmentation de l'activité enzymatique de l'aspartate aminotransférase (AST), de la phosphatase alcaline (ALP), du lactate déshydrogénase (LDH) et de l'alanine aminotransférase (ALT) (Watts, 2013).

Le CPF et le Chlorpyrifos oxon inhibent les métabolismes dépendant du cytochrome P450 hépatique et le métabolisme de la perméthrine respectivement (Watts, 2013).

✓ Le Glyphosate

Le GLP perturbe l'activité enzymatique des ALT (ALAT) et AST (ASAT), élève l'activité du glutathion peroxydase au niveau du foie, perturbe la phosphorylation oxydative mitochondriale endommageant les cellules hépatiques et l'ADN et peut provoquer des tumeurs. Certains des effets cités précédemment peuvent apparaître à de faibles degrés d'exposition (**Mesnager *et al.*, 2015; Watts *et al.*, 2016**).

Cette substance active, tout comme ses formulations commerciales, ont d'autres effets au niveau des mitochondries tel que l'interaction dans le site de liaison de la succinate déshydrogénase, des perturbations au niveau de la chaîne respiratoire, l'élévation de la perméabilité membranaire des mitochondries aux protons et aux ions calciques. Ces effets peuvent être à l'origine du stress oxydatif, ainsi que de l'affaiblissement de l'activité respiratoire (**Mesnager *et al.*, 2015**).

II-3- Effets des mélanges de pesticides

Dans l'agriculture, les pesticides sont fréquemment utilisés sous forme de mélanges (**Beane-Freeman, 2014**). Les effets de ces derniers peuvent être antagonistes, cumulatifs, synergiques ou additifs (**Gamet-Payraastre, 2011**). Les substances composant le mélange peuvent influencer les unes les autres à différents niveaux de toxico-cinétique (absorption, distribution, métabolisme et excrétion), ce qui peut modifier leurs activités biologiques (**Baldi *et al.*, 2013**). Plusieurs tests, *in vivo* et *in vitro*, sur les mélanges de pesticides sont choisis selon divers critères tels que les données d'utilisation agricole (**Gamet-Payraastre, 2011**).

Les interactions cellulaires et moléculaires des substances actives composant les mélanges, ou leurs métabolites, sont en cause de la complexité de leurs effets. En effet, ces substances actives peuvent influencer la fonction ou l'expression de transporteurs agissant contre les xénobiotiques et de certains cytochromes P450. Ces mécanismes d'action peuvent modifier leurs propres biodisponibilités ou celle des autres constituants du mélange. En plus de cela, certaines molécules pro-oxydantes ont un effet sur l'activité des voies de signalisation impliquées dans la régulation de la croissance et de la survie cellulaire (**Baldi *et al.*, 2013**).

En conclusion, les mélanges de pesticides peuvent avoir des impacts sanitaires imprévisibles, rendant la recherche et l'évaluation de leur danger un intérêt majeur pour la santé publique (**Baldi *et al.*, 2013**).

PARTIE II MATERIEL
ET METHODES

I-1-Animaux

L'étude est réalisée sur des souris albinos (BALB/C) mâles âgées de quatre à six semaines provenant de l'institut Pasteur d'Alger. Elles étaient hébergées dans des cages marquées d'un numéro de lot (Figure 1), contenant une couche de sciure renouvelée tous les jours afin d'entretenir les conditions d'hygiène appropriées. Les animaux avaient un accès libre à l'eau et à une alimentation standard (croquettes) et étaient soumis à des conditions de température et d'éclairage contrôlées (de 25 à 30°C avec un cycle de 12h de lumière / obscurité).



Figure 1 : Photographie originale de l'une des cages hébergeant les souris.

I-2-Pesticides

Pour notre étude, nous avons d'abord effectué une petite recherche pour déterminer les pesticides les plus utilisés dans la wilaya de Bejaia pour la protection des champs de fruits et de légumes tels que les pommes de terre, ce qui nous a permis de choisir le Glyphosate (Roundup contenant 450g/l de cette substance active) et le Chlorpyrifos (Pyrical contenant 480g/l de substance active) comme pesticides à tester. Ces deux produits chimiques, sous forme liquide, ont été achetés dans un commerce spécialisé de la ville de Bejaia.

I-3-Traitements

I-3-1-Matériel

Le matériel utilisé pour le traitement des animaux est cité dans l'annexe N°1

I-3-2-Méthode

Les doses des mélanges testés *in vivo* sont calculées par rapport à la DL50 (1/6 DL50) :

- La DL50 du Chlorpyrifos est de 192 mg/kg (Sultatos *et al.*, 1982). Donc : $DL50/6 = 32$ mg/kg de poids corporel.
- La DL50 du Glyphosate est de 130 mg/kg (Ting, 2007). Donc : $DL50/6 = 21.66$ mg/kg de poids corporel.



Figure 2 : Photographie originale représentant le traitement d'une souris par injection intra-péritonéale.

Deux solutions ont été obtenues après avoir mélangé de l'eau physiologique avec une concentration de 10 g/l de Roundup (450 g/l de Glyphosate) et de Pyrycal (480 g/l de Chlorpyrifos) pour chacune. C'est à partir du mélange de ces deux préparations qu'un volume de 400 μ l de solution est injecté aux animaux, à l'aide de seringues stériles, selon leur poids corporel (Figure 2).

Les animaux ont été traités ainsi après une période d'adaptation de 18 jours. Pour ce faire, ils ont été divisés en deux groupes, puis traités toutes les 72 h, six semaines durant, comme suit :

- **Groupe 1 (lot témoin)** : Contenant six souris recevant des injections d'eau physiologique par voie intra-péritonéale.

- **Groupe 2 (lot traité)** : Contenant six souris, recevant des injections du mélange de pesticides (Chlorpyrifos et Glyphosate) par voie intra-péritonéale.

I-4- Analyse *in vivo*

I-4-1- Comportement et symptômes cliniques

Le comportement et les symptômes cliniques des animaux des deux groupes ont été observés et notés avant et après chaque injection tout au long de la durée de l'étude subchronique (six semaines) afin de mettre en évidence les effets de ces produits chimiques sur ces rongeurs.

I-4-2- Mesure du poids des souris

La mesure du poids du groupe contrôle et du groupe de souris traité aux pesticides a été régulièrement effectuée, à l'aide d'une balance électronique, avant chaque injection afin de déduire la dose du mélange de pesticides à administrer et de connaître l'effet de ce dernier sur le poids des souris.

I-4-3- Sacrifice des animaux et observation macroscopique

I-4-3-1- Matériel

Le matériel utilisé pour le sacrifice des animaux et l'observation macroscopique sont cités dans l'annexe N°2.

I-4-3-2- Méthode

Les souris des deux lots ont été pesées puis sacrifiées par dislocation cervicale après avoir été anesthésiés à l'aide d'une solution de chloroforme, et ce, deux jours après avoir reçu leur dernière injection afin de laisser aux produits le temps de se métaboliser. Cette étape a été suivie de la dissection des animaux sur une surface de travail après avoir fixé les pattes ainsi que la peau à l'aide d'épingles. Par la suite, une incision a été faite tout le long de la ligne médiane ventrale à l'aide d'une paire de ciseaux (Figure 3).



Figure 3 : Photographie originale montrant la dissection d'une souris du groupe traité.

Le foie, les testicules ainsi que d'autres organes (le cœur, les poumons et les reins) ont été observés macroscopiquement *in situ* (aspect, taille et couleur) à l'aide d'un microscope de dissection Leica DM650 avant d'être extraits du corps des souris, débarrassés de l'excès de graisse, rincés avec de l'eau physiologique (NaCl à 0.9%) puis pesés avec une microbalance pour ensuite être mis dans des boîtes de prélèvement contenant le fixateur.

I-5-Etude histologique

I-5-1-Matériel

Tableau I: Produits, instruments et appareils utilisés lors des différentes étapes de l'histologie

| Produits | Instruments | Appareils * |
|---------------------------|------------------------|---|
| Eau du robinet | Histocassettes | Appareil d'enrobage |
| Formol (10%) | Paniers | Plaque refroidissante |
| Ethanol | Moules pour l'enrobage | Microtome |
| Xylène | Bain marie | Automate d'inclusion |
| Paraffine | Lame et lamelles | Plaque chauffante |
| Hématoxyline éosine (H&E) | Porte-lame | Etuve |
| Eukit | Pinces | Microscope photonique (Leica DM1000LED) |

* Tous les appareils utilisés sont de la marque Leica.

I-5-2-Méthode

La technique d'anatomopathologie utilisée au laboratoire de la faculté de médecine de l'Université Abderrahmane Mira de Bejaia est adaptée de l'ouvrage de **René Hould (1984)** intitulé : Technique d'histopathologie et de cytopathologie.

I-5-2-1- Fixation et incubation

Les foies et les testicules, précédemment prélevés, ont été fixés dans une solution contenant un volume, 10 fois plus important que l'organe, de formol à 10% pendant une durée d'environ 48h à 4°C.

Cette étape a pour but de préserver la morphologie cellulaire et tissulaire afin de garder l'échantillon dans un état aussi proche que possible de l'état *in vivo* tout en renforçant la consistance du tissu (**Djoudad-Kadji et al., 2011**).

Les organes ont été par la suite découpés transversalement puis placés dans des cassettes histologiques marquées (Figure 4A) avant d'être plongées dans un erlenmeyer contenant le fixateur (Figure 4B). Ces cassettes ont ensuite été mises dans un panier de l'appareil automate de circulation, contenant 12 cuves (Figure 4C), qui a permis la réalisation de trois étapes :

- **La déshydratation** qui a été faite par passage des échantillons dans 8 cuves d'éthanol de concentration croissante (de 70° à 100°) pour une durée de 45 min chacune. Cette étape permet d'éliminer l'eau des tissus pour les préparer à l'inclusion (**Alturkistanu et al., 2016**).

- **La clarification**, qui a une durée d'une heure, a été effectuée par passage du panier dans deux bains de xylène. Cette étape élimine toute trace d'éthanol dans l'échantillon (**Alturkistanu et al., 2016**).

- **L'inclusion** (imprégnation), qui a été faite par immersion des cassettes dans deux bains successifs de paraffine de 1h30 chacun à une température de 56°C.

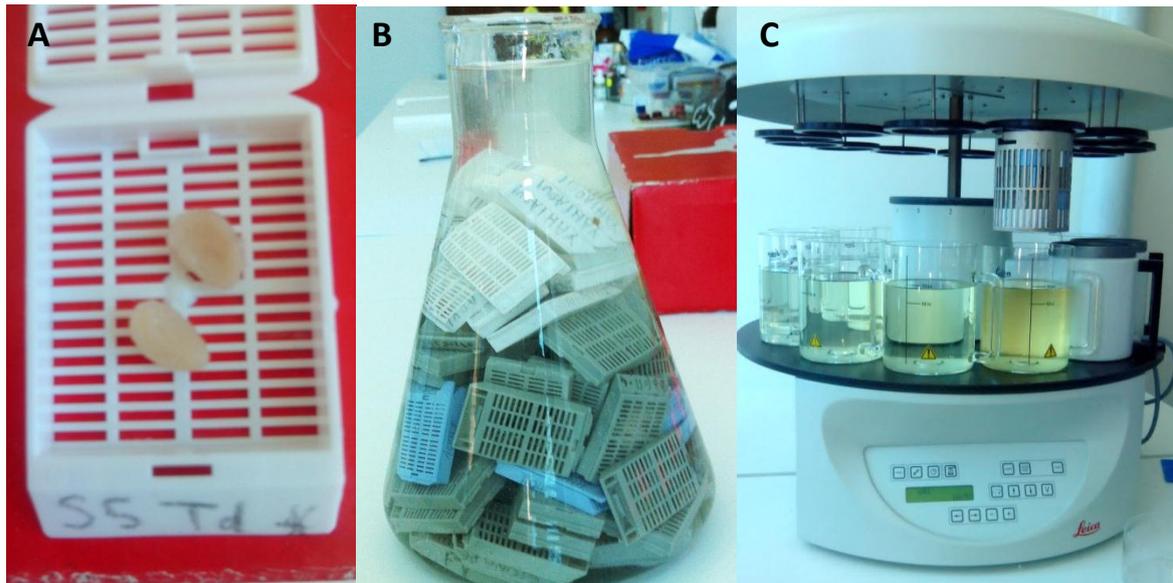


Figure 4 : Photographies originale montrant l'étape de fixation et d'incubation. A. Un testicule découpé et mis dans une cassette ; **B.** La fixation des échantillons dans le formol 10% ; **C.** L'inclusion des échantillons dans un automate de circulation.

I-5-2-2- Enrobage et confection des coupes

Les échantillons ont été délicatement retirés des cassettes avec une pince puis mis dans des moules en inox avant de les remplir de paraffine liquide (Figure 5A). Après cela, les moules ont été déposés sur une plaque refroidissante afin de solidifier la paraffine pour la réalisation des coupes. Par la suite, les blocs de paraffine ont été démoulés pour y être placés dans un microtome afin de confectionner des coupes d'environ 3 μm (Figure 5B). Ces rubans ont été déposés sur des lames marquées recouvertes d'une fine couche d'eau albumineuse, puis immergées un court instant dans un bain marie de 60°C.

Après cela, les lames ont été rangées sur un porte-lame puis placées dans l'étuve pendant une durée de 30 minutes (Figure 5C), avant d'être immergées dans un solvant (bain de xylène) pendant la même durée de temps afin d'éliminer toute trace de paraffine, et ainsi permettre la pénétration des colorants hydrophiles dans les tissus.

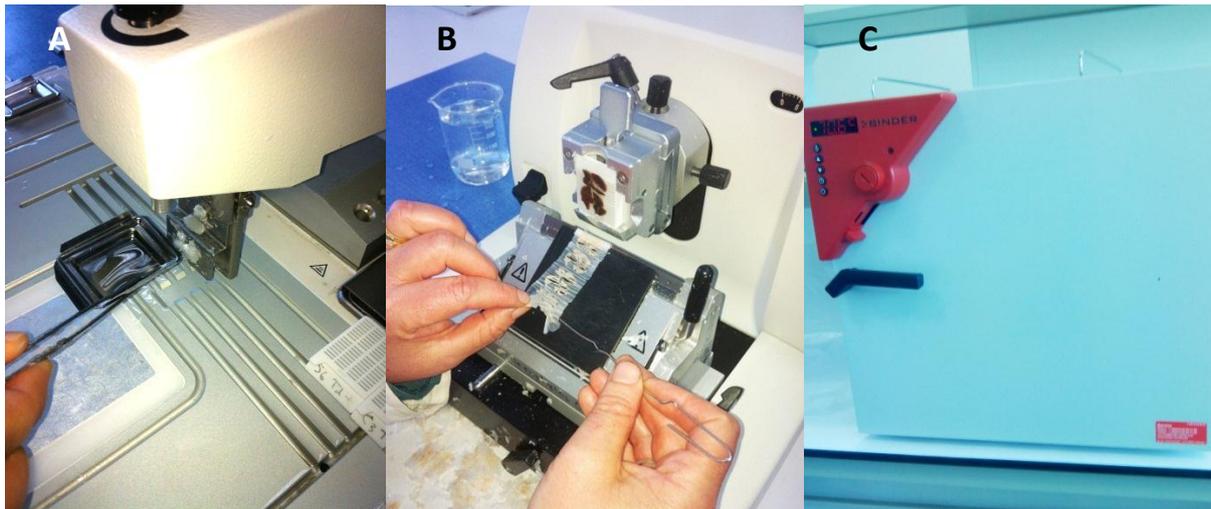


Figure 5 : Photographie originale représentant l'étape d'enrobage et de déparaffinage. A. l'enrobage des échantillons ; **B.** La coupe des blocs au microtome ; **C.** Le déparaffinage des lames dans l'étuve.

I-5-2-3- Coloration et montage des coupes

Cette étape a été précédée d'une hydratation consistant en l'immersion des lames dans un bain d'éthanol suivi d'une immersion dans un bain d'eau pour une durée de 10 min chacun.

La coloration des lames a été faite avec deux colorants qui permettent de mettre en évidence la morphologie cellulaire et tissulaire : l'hématoxyline basique qui colore le noyau acide (basophile) en bleu-violet et l'éosine acide qui colore le cytoplasme basique (acidophile) en rose (**Kierszenbaum, 2006**).

Les lames ont tout d'abord été plongées dans un bain d'hématoxyline pendant 5 minutes, puis rincées à l'eau du robinet. Par la suite, elles ont été plongées dans un bain d'éosine pendant 3 minutes avant de subir un ultime rinçage (Figure 6A).

La dernière étape de l'histologie est le montage. Elle se déroule par le passage des lames dans un bain d'éthanol suivi d'un bain contenant un mélange d'éthanol/xylène et pour finir dans deux bains successifs de xylène (Figure 6A). Quelques gouttes d'Eukit (colle biologique) ont été déposées sur des lamelles avant d'être placées sur les lames (Figure 6B). L'ensemble lame et lamelles a été par la suite séché à l'air libre (Figure 6C).

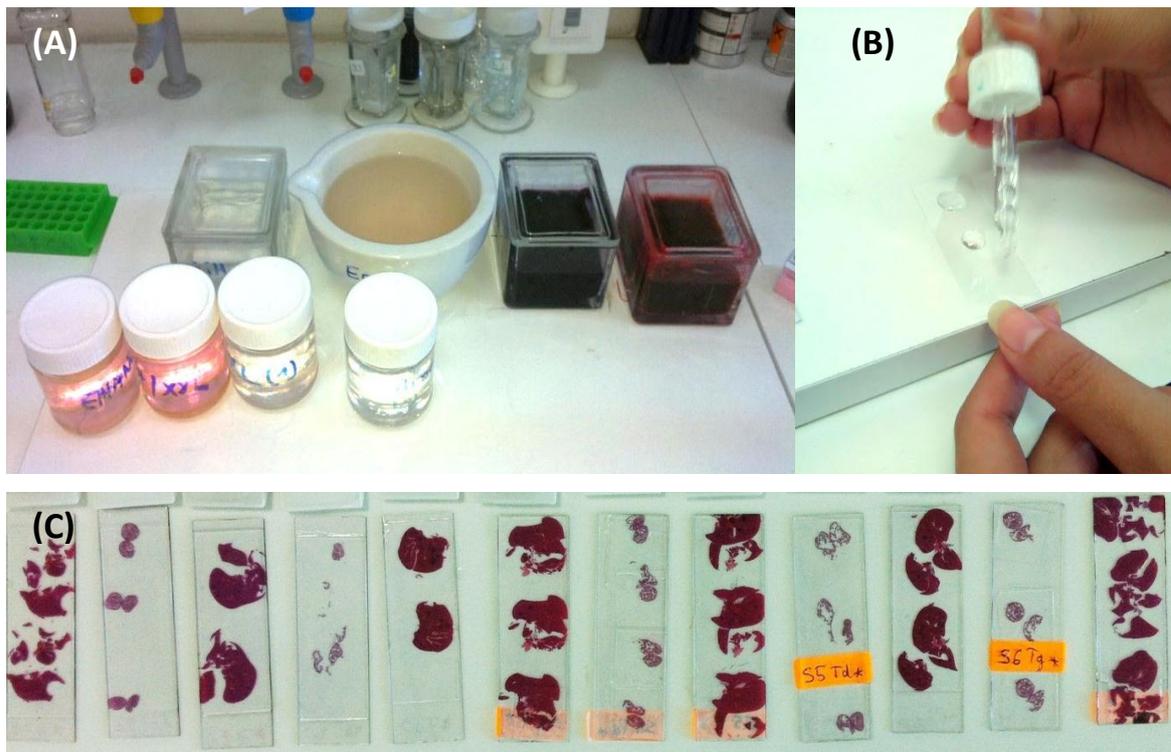


Figure 6 : Photographie originale récapitulant l'étape de coloration et celle du montage. A. Les produits utilisés lors de la coloration et du montage des lames; **B.** L'application de l'Eukit sur une lamelle; **C.** Les lames prêtes pour l'observation microscopique.

I-6- Observation microscopique

Une fois l'histologie terminée, les lames ont été observées à l'aide d'un microscope optique de type Leica DM1000LED muni d'une caméra Leica MC170HD. Les images obtenues par cette caméra ont été transférées sur l'écran d'ordinateur à l'aide du logiciel Leica Application EZ (LASEZ) (Figure 7).



Figure 7 : Photographie originale représentant l'observation microscopique des lames effectuées grâce à un microscope optique relié à un ordinateur.

I-7- Etude statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6. Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm SEM (N=6). La comparaison de l'évolution du poids relatifs des organes des animaux traités tout au long de l'expérimentation (six semaines) avec ceux des animaux témoins s'est faite en utilisant le Mann-Whitney test. Les résultats étaient considérés comme statistiquement significatifs pour $p < 0,05$. Les poids relatifs des organes utilisé dans l'analyse statistique ont été calculés avec la formule suivante :

$$\text{Poids relatif} = \frac{\text{Poids de l'organe}}{\text{Poids corporel}} \times 100$$

PARTIE III RESULTATS
ET DISCUSSION

I- RESULTATS

Le comportement, les symptômes cliniques, l'étude macroscopique, la variation du poids corporel et du poids relatif des organes ainsi que les résultats de l'étude histologique ont permis de mettre en évidence les conséquences d'un traitement intra-péritonéal d'un mélange de pesticides composé de Glyphosate (21.66 mg/kg) et de Chlorpyrifos (32 mg/kg de pc) sur des souris mâles pendant six semaines.

I-1- Comportement et symptômes cliniques

Tout au long de la période d'observation, les souris des deux lots ont présenté une activité physique et une consommation de nourriture et d'eau normale.

L'une des souris du groupe traité a été isolée des autres animaux après avoir eu un comportement agressif envers les autres souris au point d'avoir mortellement blessé l'une d'entre elles. Cette dernière a eu des symptômes alarmants quelques temps après la troisième injection (peu avant sa mort), tels qu'un affaiblissement, un gonflement de la patte droite et une diarrhée. La souris décédée a été remplacée par une autre.

I-2- Etude macroscopique

Cette étape consiste à l'observation de l'aspect général de l'animal à l'œil nu suivi de l'observation des organes (mesure de taille, morphologie et couleur) à l'aide d'un microscope de dissection (Leica DM650) afin d'apprécier plus en détail tout ce qui est difficilement observable sans instrument de grossissement.

L'examen macroscopique des animaux à montrer que les souris traitées avec le mélange de pesticides avaient une taille et un pelage semblable à celui des souris du groupe contrôle.

En ce qui concerne les organes, on n'a constaté aucune lésion apparente pour la plupart d'entre eux excepté les foies de cinq souris sur six qui possédaient des régions décolorées. La taille de ces derniers était semblable à ceux du lot contrôle avec une moyenne de 3.5 cm (Figure 9A et C). Pour ce qui est des gonades masculines, la taille de ces organes était similaire à celle du groupe témoin (0.78cm) (Figure 8B et D), hormis celles d'une des souris qui avait un testicule clairement plus petit et entouré d'une masse importante de graisse

contrairement à ceux des autres animaux. En ce qui concerne les autres organes, leurs apparences et leurs tailles entrent dans les normes car comparables à ceux du lot contrôle.

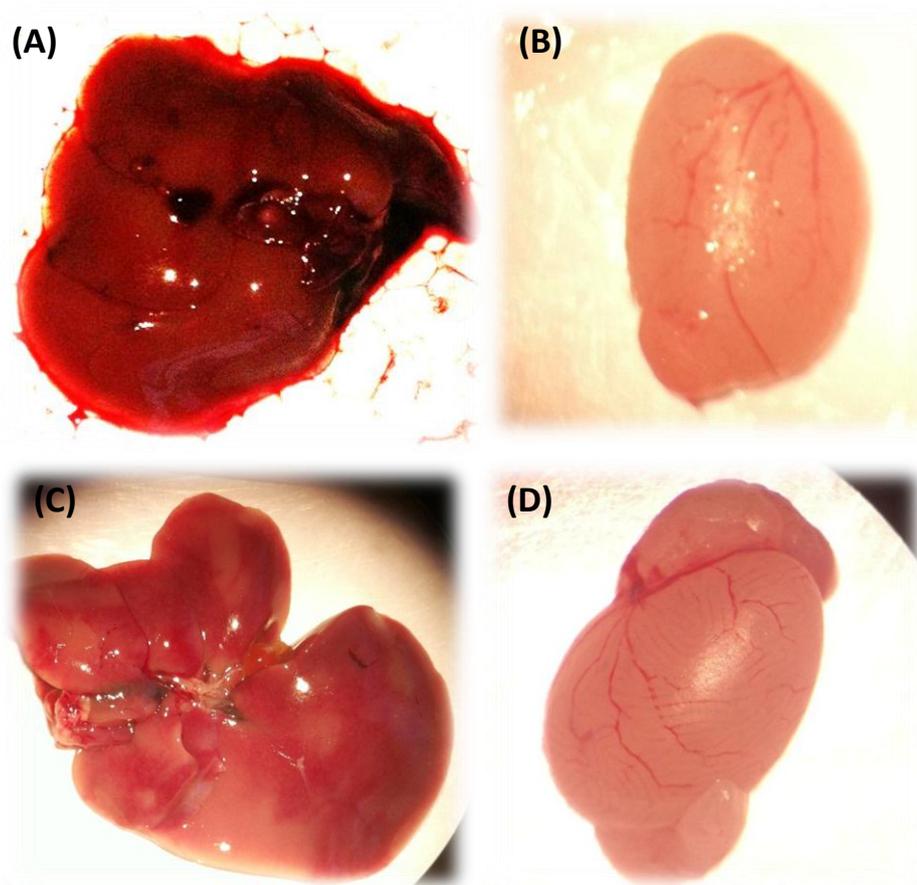


Figure 8 : Image représentant les foies et testicules des souris des deux lots. A et B représentent le foie et le testicule gauche d'une souris du groupe contrôle respectivement. C et D représentent le foie et le testicule gauche d'une souris du groupe traité aux pesticides respectivement.

I-3- Variation du poids corporel et du poids relatif des organes

Le poids corporel des souris des deux lots a évolué tout au long de la période d'expérimentation, au point d'avoir enregistré un gain de poids d'un ratio de 1.43 et de 1.32 chez les souris du groupe contrôle et celles du groupe traité aux pesticides respectivement (Tableau II).

Tableau II : Variation du poids corporel des souris témoins et traitées au mélange de pesticides (GLP et CPF) après six semaines de traitement.

| Paramètres | Groupes expérimentaux | |
|-----------------------|-----------------------|-------------|
| | Contrôle | Traité |
| Poids initial (g) | 24.17 ± 0,31 | 27,83 ±1.47 |
| Poids final (g) | 34.50 ± 1.64 | 37 ± 2.90 |
| Gain de poids (ratio) | 1.43 | 1.32 |

Les valeurs sont exprimées par la moyenne ± SEM (N = 6).

Le graphe représentant les courbes de variation du poids corporel des souris des lots témoins et celles du lot traité au mélange de pesticides est présenté dans l'annexe N°2.

En ce qui concerne la comparaison des poids relatifs des organes, l'analyse statistique a montré que les résultats des deux groupes sont assez similaires (Figure 9A, B, C, E et F), mis à part les poumons des animaux du lot contrôle qui se sont avérés être significativement d'un poids plus élevé que ceux des animaux traités ($p < 0.05$) (Figure 9D).

Le tableau représentant la variation du poids relatif des organes vitaux des souris témoins et traitées au mélange de pesticides se trouve dans l'annexe N°2.

Ces résultats montrent que la dose et les pesticides utilisés dans le traitement n'affectent pas le poids corporel ainsi que le poids des organes des souris excepté celui des poumons.

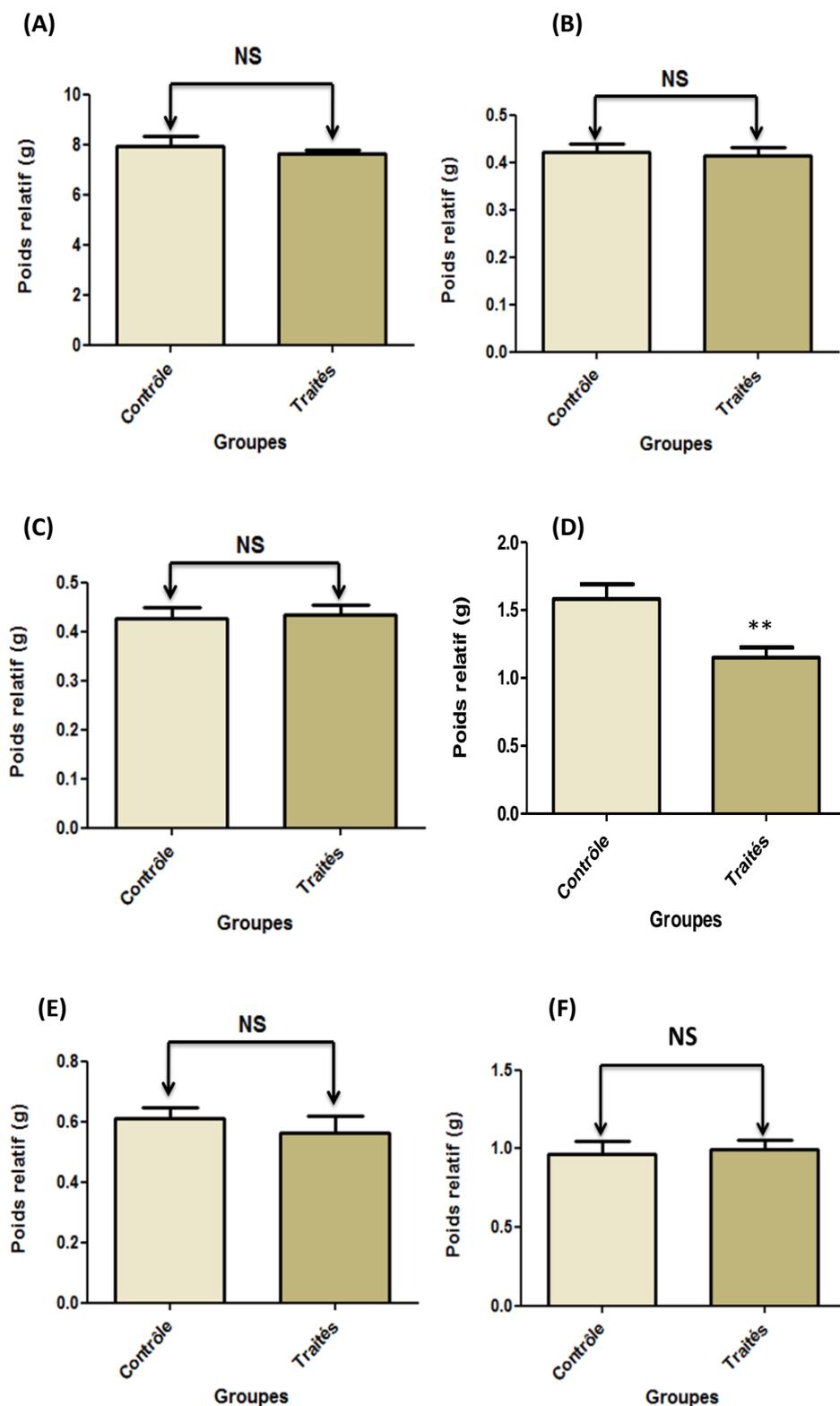


Figure 9 : Histogramme représentant la comparaison des valeurs de la masse relative des organes des animaux du groupe contrôle et du groupe traité. Foie (A) ; Testicules droit (B) ; Testicules gauche (C) ; Poumons (D) ; Cœurs (E) ; Reins (F). Les valeurs sont exprimées par la moyenne \pm SEM (N = 6).

******, ($p < 0.01$) Significativement différents par rapport au témoin (test Mann-Whitney). **NS**, Non Significatif.

I-4- Résultats de l'étude histologique

Les coupes histologiques des foies et des testicules colorés à l'hématoxyline éosine (H&E) des animaux du groupe témoin et ceux du groupe traité au mélange de pesticides ont été observées dans le but de mettre en évidence les éventuelles altérations tissulaires provoquées par ce traitement.

➤ Le foie

L'observation microscopique du foie des souris témoins a révélé une architecture normale du tissu hépatique contenant des veines Centro-lobulaire, des hépatocytes de forme habituelle, ainsi que quelques cellules Kupffer dans les sinusoides éparpillés dans tous les tissus (Figure 10).

L'observation microscopique du foie des souris traitées a montré une dilatation et une congestion des veines Centro-lobulaires (dVC et cVC) et des sinusoides (DS), des débuts de nécrose, le gonflement d'une partie du tissu, une infiltration de cellules immunitaires, une augmentation du nombre de cellules Kupffer et la présence de quelques cellules binucléées (Figure 11).

Ces observations indiquent que la dose utilisée pour le mélange de pesticides provoque l'apparition de diverses lésions dans le tissu hépatique.

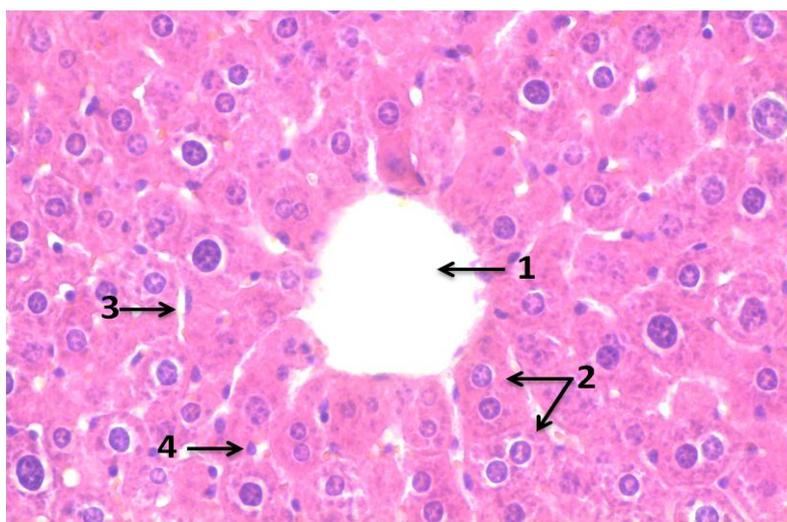


Figure 10 : Photographie originale représentant la coupe histologique transversale du foie d'une souris témoin ayant reçu de l'eau physiologique. (1) : Veine Centro-lobulaire ; (2) : Hépatocytes ; (3) : Sinusoïde ; (4) : Cellules de Kupffer. Coloration à l'H&E (Gr X20).

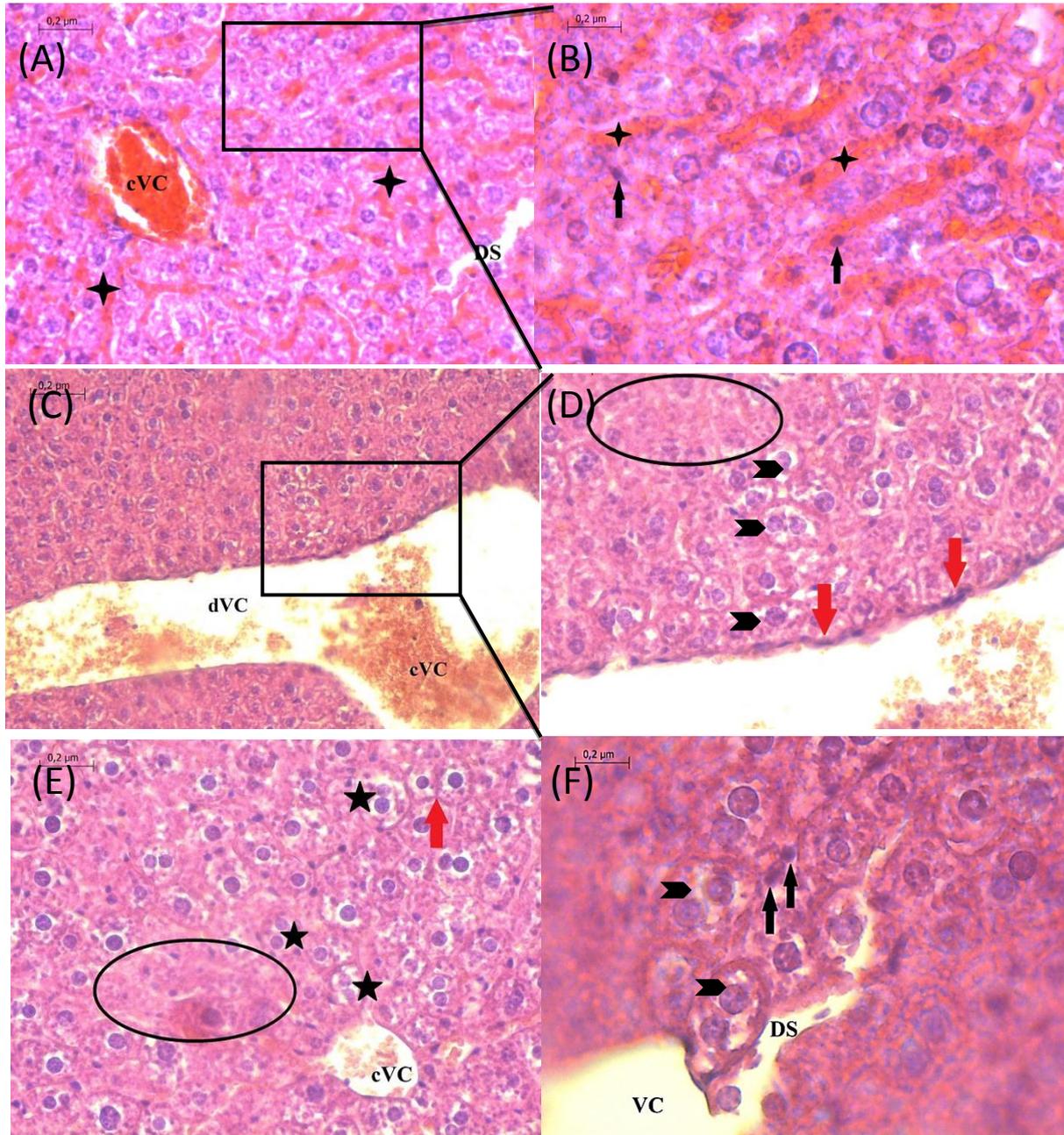


Figure 11 : Photographie originale représentant les coupes histologiques des foies de souris traitées. **A :** Montre une cVC et des DS (Gr X20). **B :** Est un zoom de la A, elle montre des congestions et des cellules Kupffer (Gr X40). **C :** Représente une dVC (Gr X10). **D :** Est un zoom de la C, elle montre des cellules apoptotiques, une Infiltration lymphocytaire et un gonflement des hépatocytes (cellules nécrotiques) (Gr X20). **E :** Montre des doubles noyaux (Gr X20). **F :** Montre des cellules nécrotiques et DS (Gr X40). Congestion de la Veine Centro-lobulaire (cVC); Sinusoïdes dilatés (DS); congestions (étoile à quatre branches) ; cellules Kupffer (flèche noire) ; dilatation d'une Veine Centro-lobulaire (dVC) ; cellules apoptotiques (Cercle) ; Infiltration lymphocytaire (Flèche rouge) ; gonflement des hépatocytes (cellules nécrotiques) (Chevrons) ; doubles noyaux (Etoile à cinq branches); Coloration à l'H&E.

➤ **Le testicule**

L'observation microscopique des testicules des souris témoins a révélé des tubes séminifères de forme arrondie et allongée contenant des cellules germinales à différents stades de développement d'aspect normal et une lumière remplie de spermatozoïdes (Figure 12).

L'observation microscopique des testicules des souris traitées a montré qu'environ 34% des tubes séminifères sont de forme très allongée contre 8% pour le groupe contrôle, certains tubes séminifères fusionnent en deux. En plus, on observe de grands espaces interstitiels, des lumières de diamètre réduit, quelques vacuoles lipidiques ainsi qu'une perturbation du processus spermatique (Figure 13).

Ces observations indiquent que la dose de pesticides utilisée dans le traitement provoque diverses lésions dans le tissu testiculaire.

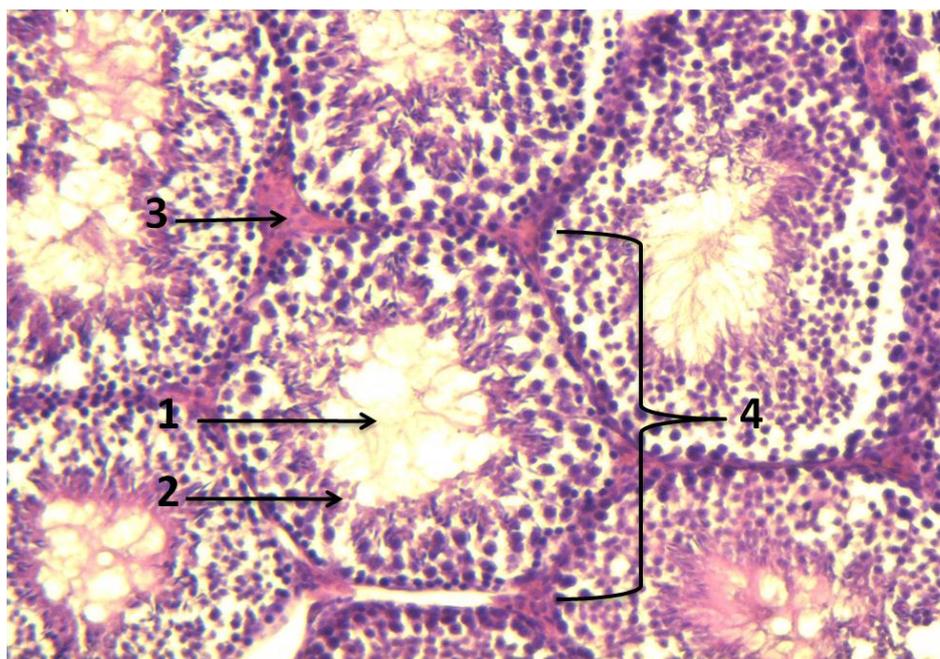


Figure 12 : Photographie originale représentant la coupe histologique transversale du testicule d'une souris témoin ayant reçu de l'eau physiologique. (1) : Lumière du tube séminifère ; (2) : Cellules reproductrices ; (3) : Espace interstitiel contenant les cellules Leydig ; (4) : Tube séminifères. Coloration à l'H&E (Gr X10).

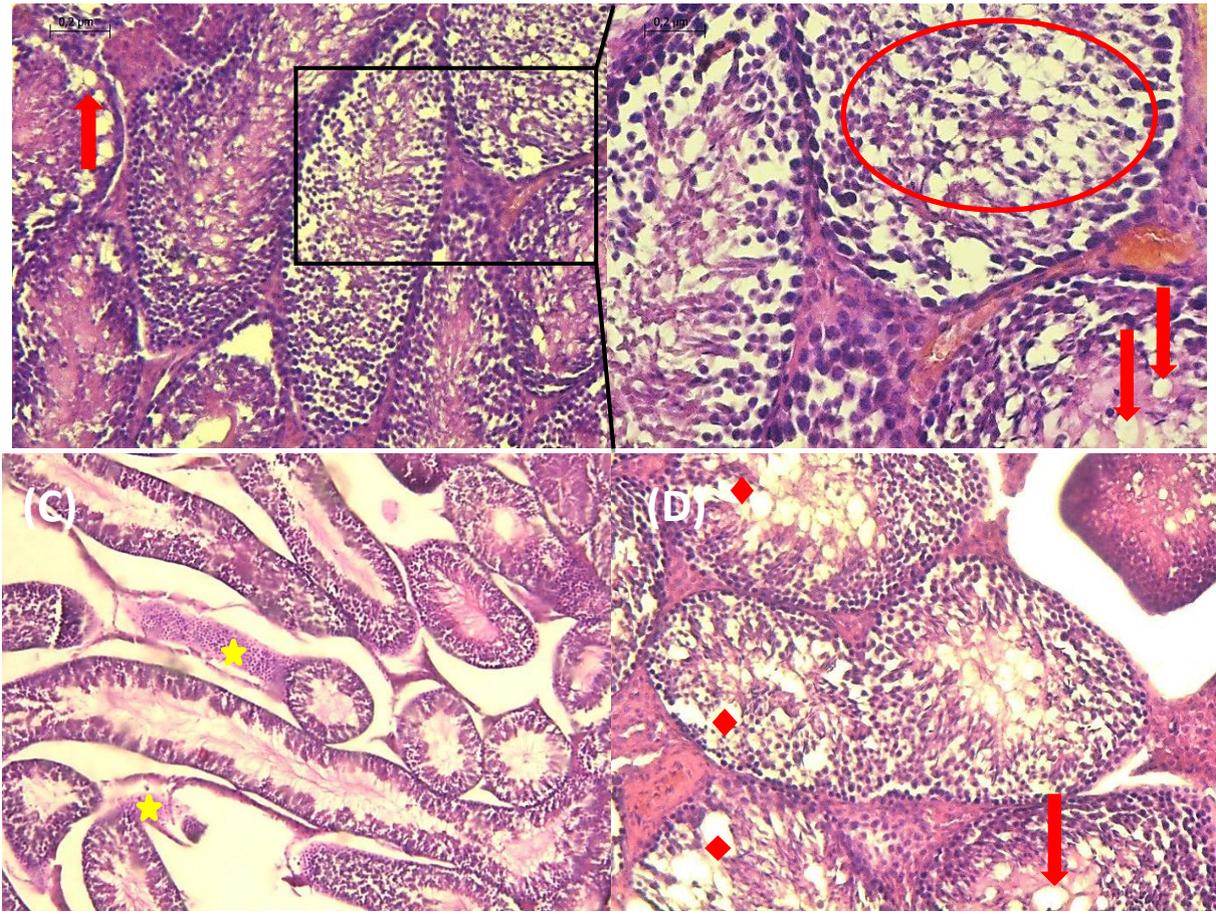


Figure 13 : Photographie originale représentant la coupe histologique transversale des testicules des souris traitées par le mélange de pesticides. A : Montre des vacuoles lipidiques vers la périphérie des tubes séminifères ainsi que des lumières de diamètre réduit, (Gr X10). **B :** Est un zoom de la figure A, elle représente une perturbation du processus de spermatogénèse, (Gr X20). **C :** Montre un élargissement de l'espace interstitiel et des tubes séminifères très allongés et dégénérés, (Gr X04). **D :** Montre une diminution du nombre de cellules germinales, (Gr X20). Vacuoles lipidiques (flèche) ; perturbation du processus de spermatogénèse (cercle rouge) ; élargissement de l'espace interstitiel (étoile jaune) ; diminution du nombre de cellules germinales (losange rouge) Coloration à l'H&E.

II- Discussion

les souris appartenant au groupe d'animaux traités avec le mélange de pesticides contenant une dose de 32 mg/kg de poids corporel (1/6 DL50) de Chlorpyrifos et une dose de 21.66 mg/kg de pc (1/6 DL50) de Glyphosate pendant six semaines avaient une consommation de nourriture et d'eau normale. En effet, diverses études effectuées sur des animaux traités par des pesticides n'ont également constaté aucun changement dans la consommation alimentaire (**Caglar et Kolankaya, 2008 ; Nishi et Hundal, 2013**).

Les zones décolorées blanchâtres observées macroscopiquement au niveau des foies des souris traitées ont aussi été observées par l'étude chronique de **Séralini et al., (2012)** après avoir nourri des rats avec une faible dose de GLP et du maïs génétiquement modifié. Ce résultat, comme l'a expliqué l'auteur précédent, est évocateur de lésions hépatiques tel que la présence de nécroses.

Le suivi du poids des animaux pendant six semaines et la mesure du poids corporel des organes vitaux n'a montré aucune différence significative entre les souris du lot contrôle et celles du lot traité avec le mélange de pesticide. Ces résultats sont similaires à ceux de **Caglar et Kolankaya (2008)** qui ont déduit qu'un traitement oral des rats à une faible dose (56 mg/kg de pc) et à une forte dose (560 mg/kg de pc) de glyphosate ne provoquait aucune différence entre le poids corporel des animaux traités et ceux du groupe contrôle, et cela va de même pour le poids relatif du foie. Une autre étude, de **Cassault-Meyer et al., (2014)**, a constaté que ce même herbicide utilisé sur le même modèle animal ne provoquait pas de changement au niveau du poids corporel et du poids relatif des testicules. En ce qui concerne le Chlorpyrifos, **McCollister et al, (1974)** ont montré qu'un traitement chronique de faible dose n'affecte pas le poids corporel et le poids relatif des organes des rats.

En ce qui concerne le poids relatif des poumons des animaux traités, qui étaient plus faible que ceux du groupe contrôle, l'étude effectuée par l'équipe de **Karnam (2014)** avait aussi constaté une différence significative entre le poids des organes des rats traités pendant six semaines avec 50, 200 et 600 mg/kg de pc de biocide Bisphenol-A et ceux du groupe négatif.

Cependant, d'autres études faites sur le Chlorpyrifos vont à l'encontre de nos résultats. En effet, elles montrent que ce produit chimique, utilisé à forte dose, provoque une diminution significative du poids des animaux et des changements de poids des organes, tels que

l'augmentation du poids relatif du foie observé par **Heikal et al., (2012)** après avoir gavé pendant 28 jours des rats mâles avec 13.5 mg/kg pc de chlorpyrifos; et la diminution de celui des testicules comme l'ont démontré **ElMazoudy et al., (2011)** après avoir traité par voie orale des rats mâles avec 9 mg/kg pc du même insecticide pendant 70 jours. Cela peut s'expliquer par l'utilisation des pesticides sous forme de mélange, ce qui a pu provoquer un phénomène contraire à celui escompté lors de leur utilisation individuelle.

Les résultats de l'étude histologique ont révélé l'existence de diverses lésions au niveau du foie des animaux traités. Elles se présentent sous forme de dilatations et de congestion des sinusoides et des veines Centro-lobulaires, de nécrose (gonflements de cellules) dans certaines régions du foie, de quelques cellules binucléées, d'un nombre important de cellules Kupffer et d'infiltrats de cellules immunitaires. Des résultats comparables ont été répertoriés par divers auteurs tel que **Caglar et Kolankaya (2008)** qui ont observé une infiltration de cellules mononucléaires, des nécroses focales, des congestions ainsi que des gonflements des hépatocytes chez les foies des rats ayant reçu par voie orale, un traitement subaiguë et subchronique de 56 et 560 mg/kg pc de Glyphosate (Roundup). **Benedetti et al., (2004)** ont remarqué une augmentation du nombre de cellules Kupffer dans les sinusoides hépatiques des rats traités par voie orale avec 487 mg / kg du même herbicide pendant 75 jours.

Des études faites sur l'insecticide Chlorpyrifos ont montré des résultats similaires aux nôtres. En effet, l'étude effectuée par l'équipe d'**Heikal (2012)** a révélé des infiltrats de cellules inflammatoires, ainsi que des congestions des veines portes et une prolifération de cellules Kupffer entourant des hépatocytes dégénérées chez des rats mâles gavés au Chlorpyrifos avec la dose de 1/10 de la DL50 (13.5 mg/kg pc) pendant 28 jours.

Les résultats de la présente étude montrent une toxicité du mélange des deux pesticides sur le foie. Cela s'explique par le rôle de cet organe dans la désintoxication et le métabolisme des xénobiotiques qui en fait une cible de choix pour ces substances exogènes (**Benedetti et al., 2004**).

Dans la littérature, les espèces réactives d'oxygène (ROS), produites par les pesticides, sont souvent incriminées dans l'apparition de dommages oxydatifs dans le tissu hépatique. **Heikal et al., (2012)** ont montré que le Chlorpyrifos, en plus d'augmenter le taux de ROS, produit une diminution de l'activité antioxydante des enzymes superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT) et glutathion peroxydase (GPx) provoquant des lésions hépatiques. **Astiz et al, (2009b)**

expliquent que le traitement de rats par injection intra-péritonéale avec un mélange de pesticides composé des organophosphorés Glyphosate, Diméthoate et du carbamate Zineb, pendant cinq semaines, peut provoquer une baisse des mécanismes de défenses du stress oxydatif, tel que le glutathion, produisant ainsi une augmentation des ROS.

Notre étude a révélé que les testicules des souris traitées possédaient de larges espaces interstitiels et des tubes séminifères dégénérés, de forme très allongée, contenant quelques vacuoles lipidiques vers leurs extrémités, un nombre de cellules germinales réduit, et des perturbations de la spermatogenèse. La plupart de ces lésions sont couramment retrouvées dans les travaux réalisés avec le Glyphosate comme le montre l'équipe de **Romano (2010)** qui a observé, dans le tissu testiculaire, une augmentation du diamètre de la lumière accompagnée d'une réduction du nombre de cellules germinales chez les rats mâles traités avec 5, 50 et 250 mg/kg pc de Roundup (480g/l de Glyphosate) par gavage pendant quatre semaines.

Le Chlorpyrifos a également été incriminé dans l'apparition de dommages au niveau des gonades masculines. En effet, l'équipe de **ElMazoudy, (2011)** a retrouvé une diminution de la spermatogenèse, une dégénérescence des tubes séminifères possédant une architecture générale désorganisée et des vacuoles cytoplasmiques après avoir traité, par voie orale, des rats mâles avec 9 mg / kg / jour de CPF et ce pendant 70 jours. D'autres résultats ont été répertoriés par **Zidan, (2009)** qui, après avoir administré à des rats mâles un mélange d'organophosphorés (Chlorpyrifos methyl, Diazinon et Profenofos) avec les doses de 5 et 50 mg/kg pc par voie orale pendant 65 jours, a observé une congestion des tubes séminifères.

Romano et al., (2010) ont expliqué l'apparition de ces lésions histologiques par la diminution du taux de testostérone. **Zidan, (2009)** explique ce phénomène par la perturbation de l'enzyme AChE par les pesticides (mélange d'organophosphorés), ce qui a pour résultat l'augmentation du taux d'ACh dans le cerveau. Cette dernière provoquerait une réduction du taux des hormones LH et FSH et ainsi réduirait la sécrétion de testostérone (**Zidan, 2009**). On émet l'hypothèse que cette diminution de testostérone soit aussi liée à la perturbation de la protéine StAR car **Walsh et al., (2000)** expliquent que la formulation commerciale du GLP (Roundup) perturbe la stéroïdogénèse en réduisant le taux de protéines StAR qui, au niveau des cellules de Leydig, ne permet plus la production de testostérone.

Nos résultats histologiques peuvent potentiellement être expliqués par la production de ROS et la perturbation endocrinienne produite par l'effet toxique des deux composants du mélange de pesticides, à savoir le Glyphosate et le Chlorpyrifos, au niveau des organes des souris.

PARTIE IV
CONCLUSION ET
PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le but de notre travail était d'évaluer l'effet d'un mélange de deux pesticides (Glyphosate et Chlorpyrifos) sur le tissu hépatique et testiculaire des souris albinos mâles traitées par voie intra-péritonéale pendant six semaines. La comparaison du poids corporel et du poids relatif des organes des souris des deux lots n'a révélé aucune différence statistiquement significative.

Les résultats de l'étude histologique ont montré la présence de divers dommages dans les foies des souris du groupe traité par rapport à ceux des animaux du groupe contrôle tels qu'une dilatation et une congestion des veines centrolobulaires et sinusoidales, des débuts de nécroses, une infiltration de cellules immunitaires accompagné d'une augmentation du nombre de cellules Kupffer et de cellules binucléées. Quant aux testicules, l'observation microscopique a révélé l'existence de plusieurs atteintes chez les animaux traités aux pesticides tels que des tubes séminifères dégénérés de forme très allongée, fusionnés pour certains, contenant une perturbation du processus spermatique et de larges espaces interstitiels. A moindre mesure, des lumières de diamètre réduit et des vacuoles lipidiques vers les bords des tubes ont également été constatées.

Ceci prouve que la combinaison de ces deux organophosphorés provoque des lésions au niveau du foie et des gonades masculines, affectant la fonction de ces deux organes chez les souris. A l'issue de ces résultats, nous concluons donc que l'exposition à ces deux produits chimiques peut conduire à l'apparition de dérèglements tissulaires au niveau du foie telles que des nécroses, qui peuvent être à l'origine de l'apparition de pathologies hépatiques, ainsi que des troubles de la reproduction masculine telle que de l'infertilité consécutive à la baisse du taux de spermatozoïdes, faisant de ce mélange, par extrapolation, un réel danger pour la santé humaine.

L'étude histologique est une bonne technique pour évaluer l'effet toxique des xénobiotiques sur les organes. Toutefois elle n'apporte pas assez d'éléments de réponses quant à leurs modes d'action et leurs effets biochimiques. C'est pourquoi, des études complémentaires sont nécessaires afin de mieux connaître l'impact de notre mélange de pesticides sur le foie et les testicules, notamment :

- Faire des analyses quantitatives de l'activité sérique des enzymes hépatiques ALT et AST pour connaître le degré de dommages hépatiques
- Réaliser une mesure du taux d'hormones masculines

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

- Effectuer une mesure de l'activité de SOD, CAT et GPx car l'inhibition de ces enzymes antioxydants est responsables de l'apparition d'un stress oxydatif, et donc de lésions dans les organes.
- Réaliser des études chroniques sur le mélange pour observer ses effets à long terme.
- Effectuer des études sur ce mélange de pesticides en utilisant des doses supérieures pour savoir s'il a un impact sur le poids corporel et le poids relatif des organes.
- Effectuer des études sur les deux pesticides séparément afin d'évaluer leur toxicité individuelle.

REFERENCES

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Alavanja, M.C.R., Hoppin, J.A., and Kamel, F. (2004).** Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. *Public Health*, 25 : 155–97.
- **Alturkistani, H. A., Tashkandi, F. M. and Mohammedsaleh, Z.M. (2016).** Histological Stains: A Literature Review and Case Study. *Global Journal of Health Science*, 8 (3) : 72–79.
- **Astiz, M., de Alaniz, M.J.T. and Marra, C.A. (2009a).** Effect of pesticides on cell survival in liver and brain rat tissues. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72 (7) : 2025-2032.
- **Astiz, M., de Alaniz, M.J.T. and Marra, C.A. (2009b).** Antioxidant defense system in rats simultaneously intoxicated with agrochemicals. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28 (3) : 465–473.
- **Ayad Mokhtari, N. (2012).** *Identification et dosage des pesticides dans l'agriculture et les problèmes d'environnement liés*. Mémoire pour l'obtention du diplôme de magister, option chimie organique, Université d'Oran, 1-86.
- **Baldi, I., Cordier, S., Coumoul, X., Elbaz, A., Gamet-Payraastre, L., Lebailly, P., Multigner, L., Rahmani, R., Spinosi, J. and Maele-Fabry, G.V. (2013).** *Pesticides - Effets sur la santé*. Paris : Institut national de la santé et de la recherche médical (Inserm). 1-146.
- **Beane-freeman, L. (2014).** *Expositions professionnelles aux pesticides enjeux pour la recherche, l'évaluation et la prévention*. France : Agence national de sécurité sanitaire (Anses). 1-30.
- **Benedetti, A.L., Vituri, C.L., Trentin, A.G., Domingues, M.A.C. and Alvarez-Silva, M. (2004).** The effects of sub-chronic exposure of Wistar rats to the herbicide Glyphosate-Biocarb. *Toxicology Letters*, 153 (2) : 227–232.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Boland, J., Koomen, I., Lidth de Jeude, J.V., Geude, D.E. and Oudegans, J. (2004).** *Les pesticides compositions, utilisation et risques*. 1^{ère} édition. Wageningen : Fondation Agromisa. 1-124.
- **Caglar, S. and Kolankaya, D. (2008).** The effect of sub-acute and sub-chronic exposure of rats to the Glyphosate-based herbicide Roundup. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 25 (1) : 57–62.
- **Cassault-Meyer, E., Gress, S., Séralini, G. E. and Galeraud-Denis, I. (2014).** An acute exposure to Glyphosate-based herbicide alters aromatase levels in testis and sperm nuclear quality. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 38 (1) : 131-40.
- **Cavalli, V.L.O., Cattani, D., Rieg, C.E.H., Pierozan, P., Zanatta L., Parisotto E.B., Filho, D.W., Silva, F.G.M.B, Pessoa-Pureur, R. and al. (2013).** Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 65 : 335–346.
- **Chan, P.C. and Mahler, J.F. (1992).** NTP Technical report on toxicity studies of Glyphosate administered in dosed feed to F344/N Rats and B6C3F1 mice. *National Toxicology Program*, (16) : 1-39.
- **Chebab, S., Belli, N., Leghouchi, E. and Lahouel, M. (2009).** Stress oxydatif induit par deux pesticides: l'Endosulfan et le Chlorpyrifos. *Environnement, Risques & Santé*, 8 (5) : 425-432.
- **Costa, L.G. (2006).** Current issues in organophosphate toxicology. *Clinica Chimica Acta*, 366 (1-2) : 1-13.
- **Djoudad-Kadji, H., Benslimane, S., Chevalier, C., Kadji, B., Exbrayat, J-M., and Iguer-Ouada, M. (2011).** Visualisation des coupes histologiques des follicules ovariens de *barbus callensis* variation de fixateurs et de colorants. *Revue Française d'Histotechnologie*, 24 (1) : 21-28.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Elelaimy, I.A., Ibrahim, H.M., Abdel Ghaffar, F.R. and Alawthan, Y.S. (2012).** Evaluation of sub-chronic Chlorpyrifos poisoning on immunological and biochemical changes in rats and protective effect of eugenol. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2 (6) : 51-61.
- **ElMazoudy, R.H., Attia, A.A. and El-Shenawy, N.S. (2011).** Protective role of propolis against reproductive toxicity of Chlorpyrifos in male rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 101 : 175-181.
- **Elsharkawy, E.E., Yahia, D. and El-Nisr, N.A. (2012).** Chlorpyrifos induced testicular damage in rats: ameliorative effect of glutathione antioxidant. *Environmental Toxicology*, 29 (9) : 1011-1019.
- **Foubert, A. (2012).** *Biodiversité : victime silencieuse des pesticides*. Paris : Formerly World Wildlife Fund, 1-81.
- **Gamet-Payraastre, L. (2011).** Effets physiopathologiques des mélanges de pesticides. *Elsevier Masson SAS*, 46 (2) : 82-85.
- **Garcia, F.P., Cortés Ascencio, S.Y., Gaytan Oyarzun, J.C., Hernandez, A.C. and Alavarado, P.V. (2012).** Alejandra. Pesticides: classification, uses and toxicity. Measures of exposure and genotoxic risks. *Journal of Research in Environmental Science and Toxicology*, 1 (11) : 279-293.
- **Heikal, T.M., El-Sherbiny, M., Hassan, S.A., Arafa, A., and Ghanem, H.Z. (2012).** Antioxidant effect of selenium on hepatotoxicity induced by Chlorpyrifos in male rats. *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 4 (4) : 603-609.
- **Hurst, P. and Kirby, P. (2004).** *Health, Safety and Environment: A Series of Trade Union Education Manuals for Agricultural Workers*. Geneva : International Labour Organization, 1-327.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Joshi, S.C., Mathur, R. and Gulati, N. (2007).** Testicular toxicity of Chlorpyrifos (an organophosphate pesticide) in albino rat. *Toxicology and Industrial Health*, 23 (7) : 439-444.
- **Karanth, S. and Pope, C. (2000).** Carboxylesterase and A-Esterase activities during maturation and aging: relationship to the toxicity of Chlorpyrifos and Parathion in rats. *Toxicological Sciences*, 58 (2) : 282-289.
- **Karnam, S.S., Ghosh, R.C. and Mondal, S. (2014).** Effect on body weight and feed consumption of Bisphenol - A induced subacute toxicity in rats. *Exploratory Animal and Medical Research*, 4 (2) : 228-234.
- **Kenfack, A., Watcho, P., Ngoula, F., Tchoumboué, J. and Kamtchouing, P. (2007).** Influence du Chlorpyriphos-Ethyl sur quelques paramètres de reproduction chez le rat mâle albinos exposé pendant le développement post-natal. *International journal of biological and chemical science*, 1(3) : 237-243.
- **Kierszenbaum, L.A. (2006).** *Histologie et biologie cellulaire, une introduction à l'anatomie pathologique*. Bruxelles : De Boeck. 1-618.
- **Lanoix, N. and Roy, M. L. (1976).** *Manuel du technicien sanitaire*, Genève : Organisation Mondiale de la Santé (OMS). 1-193.
- **Laure, B., Valentina, B., Franck, B. and Camilo, D.R. (2012).** *Etude du Glyphosate (Roundup)*. Grenoble : Production & Environnement. 1-38.
- **McCollister, S.B., Kociba, R.J., Humiston, C.G., McCollister, D.D. and Gehring, P.J. (1974).** Studies of the acute and long-term oral toxicity of Chlorpyrifos (O,O-diethyl-O-(3,5,6-trichloro-2-pyridyl) phosphorothioate). *Food and Cosmetics Toxicology*, 12 (1) : 45-61.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Mesnage, R., Defarge, N., Spiroux de Vendômois, J.S. and Séralini, G. E. (2015).** Potential toxic effects of Glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *International journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 84 : 133-53.
- **Mokhtari, M. and Mouhouche, F. (2016).** Determination of Bifenthrin levels in tomato and strawberry products in the region of Algiers (Algeria). *Advances in Environmental Biology*, 10 (10) : 62-69.
- **Ncibi, S., Ben Othman, M., Akacha, A., Krifi, M.N. and Zourgui, L. (2008).** *Opuntia ficus indica* extract protects against Chlorpyrifos-induced damage on mice liver, *Food and Chemical Toxicology*, 46 (2) : 797–802.
- **Nishi, K. and Hundal, S.S. (2013).** Chlorpyrifos induced toxicity in reproductive organs of female Wistar Rats. *Food and Chemical Toxicology*, 62 : 732–738.
- **Noworyta-Glowacka, J., Bańkowski, R., Siennicka, J., Wiadrowska, B., Beresinska, M. and Ludwicki, J.K. (2012).** Influence of Chlorpyrifos on the profile of subpopulations of immunoactive cells and their phagocytic activity in an experimental *in vivo* model. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 19 (3) : 483-485.
- **Samuel, O. (2001).** *Risques liés à l'utilisation du Roundup pour le contrôle des plantations de cocaïne en Colombie*. Institut nationale de la santé publique. Québec. 1-15.
- **Periquet, A., Boisset, M., Casse, F., Catteau, M., Lecer, J.M., Leguille, C., Laville, J. and Barnat, S. (2004).** *Pesticides, risques et sécurité alimentaire*. France : Comité Sécurité Alimentaire d'Aprifel. 1-216.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Programme régional santé environnement (PRSE). (2010).** *Pesticides et santé état des connaissances sur les effets chroniques en 2009*. Direction Régionale des Affaires Sanitaires et Sociales de Bretagne. 1-119.
- **René, H. (1984).** *Technique d'histopathologie et de cytopathologie*, 1^{ère} édition Montréal : Décarie ; Paris, 400p.
- **Romano, R.M., Romano, M.A., Bernardi, M.M., Furtado, P.V. and Oliveira, C.A. (2010).** Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide Glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. *Archives of Toxicology*, 84 (4) : 309-317.
- **Salameh, P., Waked, M., Baldi, I., Brochard, P., and Abi Saleh, B. (2006).** Respiratory diseases and pesticide exposure: a case-control study in Lebanon. *Epidemiol Community Health*, 60 : 256–261.
- **Samsel, A. and Seneff, S. (2015).** Glyphosate, pathways to modern diseases IV: cancer and related pathologies. *Journal of Biological Physics and Chemistry*, 15 : 121–159.
- **Séralini, G.E., Clair, E., Mesnage, R., Gress, S., Defarge, N., Malatesta, M., Hennequin, D. and Vendômois, J.S. (2012).** Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. *Food and Chemical Toxicology*, 50 : 4221–4231.
- **Sultatos, L.G., Costa, L.G. and Murphy, S.D. (1982).** Factors involved in the differential acute toxicity of the insecticides Chlorpyrifos and Methyl Chlorpyrifos in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 65 (1) : 144-152.
- **Testud, F. and Grillet, J. P. (2007).** *Insecticides organophosphorés, carbamates, pyrèthrinoïdes de synthèse et divers*. Paris : Toxicologie - Pathologie professionnelle, 1-24.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Ting, D. (2007).** *Public Glyphosate in drinking water california public health goal.* California : Pesticide and Environmental Toxicology Branch Office of Environmental Health Hazard Assessment California Environmental Protection Agency. 1-30.
- **Tron, I., Piquet, O. and Cohuet, S. (2001).** *Effets chroniques des pesticides sur la sante : Etat actuel des connaissances.* Bretagne : Observatoire Régional de Santé (ORS) de Bretagne. 1-88.
- **Viswanath, G., Chatterjee, S., Dabral, S., Nanguneri, S.R., Divya, G. and Roy, P. (2010).** Anti-androgenic endocrine disrupting activities of Chlorpyrifos and Piperophos. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 120 (1) : 22-29.
- **Walsh, L.P., McCormick, C., Martin, C. and Stoccol, D.M. (2000).** Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. *Environmental Health Perspectives*, 108 (8) : 769-776.
- **Watts, M. (2012).** *Chlorpyrifos as a Possible Global Persistent Organic Pollutant.* Oakland : Pesticide Action Network North America. 1-34.
- **Watts, M. (2013).** *Chlorpyrifos.* Malaysia : Pesticide Action Network Asia and the Pacific (PAN AP). 1-67.
- **Watts, M., Clausing, P., Lyssimachou, A., Schütte, G., Guadagnini, R. and Marquez, E. (2016).** *Glyphosate.* Malaysia : Pesticide Action Network International (PAN) Asia Pacific. 1-95.
- **World Health Organization (OMS). (2005).** Glyphosate and AMPA in Drinking-water. 1-11.
- **Zidan, N.A. (2009).** Evaluation of the reproductive toxicity of Chlorpyrifos Methyl, Diazinon and Profenofos pesticides in male rats. *International Journal of Pharmacology*, 5 (1) : 51-57.

REFERENCES
ELECTRONIQUES

REFERENCES ELECTRONIQUES

- **Bouziati, M. (2007).** L'usage immodéré des pesticides : De graves conséquences sanitaires, le guide de la médecine et de la santé en Algérie [En ligne]. <http://www.santetropicale.com/santemag/algerie/poivue51.htm>.
- **Ho, M.W. (2014).** *Glyphosate/Roundup & Human Male Infertility, Institute of Science in Society Report (ISIS)* [En ligne]. [http://www.issis.org.uk/Glyphosate Roundup and Human Male Infertility.php](http://www.issis.org.uk/Glyphosate_Roundup_and_Human_Male_Infertility.php).

ANNEXES

ANNEXES

Annexes N°1

Matériel utilisé pour le traitement des souris

- Eau physiologique (500 ml)
- Roundup (450 g/l de glyphosate)
- Pyrycal (480 g/l de chlorpyrifos)
- Bêchers
- Seringues
- Seringue à insuline (1 ml)
- Tubes en verre
- Micropipettes
- Embouts de pipettes
- Balance

Matériel utilisé pour le sacrifice des animaux et l'observation macroscopique

- Boite contenant l'agent anesthésiant (chloroforme)
- Pince fine
- Sonde cannelée
- Ciseaux fins
- Boite à épingles
- Microscope de dissection (Leica DM650).
- Microbalance
- Boîtes de prélèvements

ANNEXES

Annexes N°2

Graph représentant les courbes de variation du poids corporel des souris des lots témoins et celles du lot traité aux mélange de pesticide (Glyphosate et Chlorpyrifos)

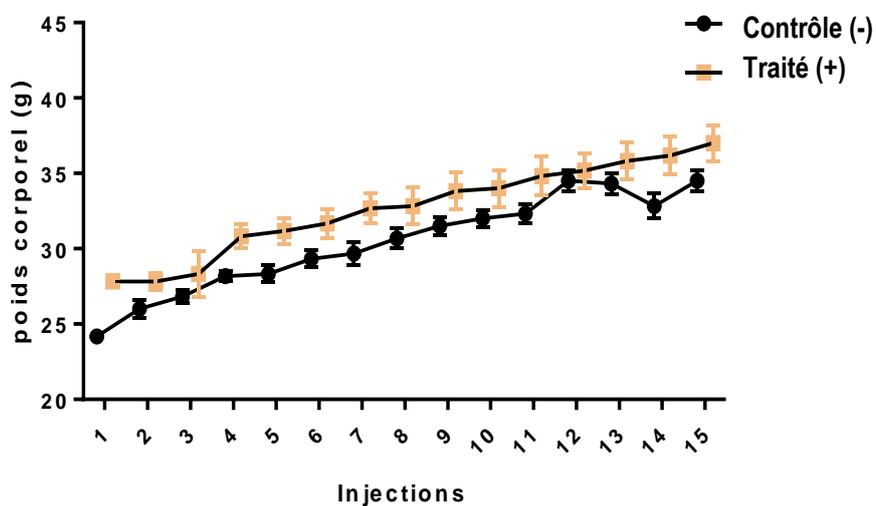


Tableau représentant la variation du poids relatifs des organes vitaux des souris témoins et traités aux pesticides après six semaines de traitement.

| Groupes \ PR(g) | PR(g) | | | | | |
|-----------------|-----------|-----------------|------------------|-------------|-----------|------------|
| | Foie | Testicule droit | Testicule gauche | Poumons | Cœur | Rein |
| Contrôle | 7.95±0,37 | 0.42± 0,02 | 0.43±0,02 | 0.61±0,11** | 1.58±0.04 | 0.97±0.08 |
| Traité | 7.66±0,13 | 0.41±0,02 | 0.43±0,02 | 0.56±0.07 | 1.15±0.06 | 0,1 ± 0.06 |

Les valeurs sont exprimées par la moyenne ± SEM (N = 6). PR, Poids relatifs

** , ($p < 0.01$) en comparaison avec le groupe témoin.

ANNEXES

Annexe N°3

Détermination du profil toxicologique de la substance active

- **Métabolisme mammifère (rat) :** absorption, distribution, métabolisme, excrétion
- **Toxicité aiguë* :** orale, cutanée, inhalation, irritation, sensibilisation (idem / formulation)
- **Toxicité subchronique orale :**
 - 3 mois (chien – rat)
 - éventuellement 12 mois (chien)
- **Génotoxicité* :** mutagenèse* *in vitro*, *in vivo* : 5 tests
- **Toxicité à long terme / cancérogenèse :**
 - 2 ans (rat)
 - 18 mois (souris)
- **Toxicité sur la reproduction :**
 - Rat (au moins 2 générations)
 - Tératogénèse* (rat et lapin)
- **Éventuellement :**
 - Subchronique cutanée, inhalation, neurotoxicité différée
 - Etudes mécanistiques

ANNEXES

Annexes N°4

Élément et exemples de toxicité des insecticides organophosphorés

Cinétique

- **Absorption par toutes les voies** (respiratoires – percutanée)
- **Biotransformation hépatique par les enzymes liées au cytochrome P450**
→ Métabolites hydrosolubles

Toxicité

- **Mécanisme**
 - Nerveux anti acétylcholinestérasique
 - Réversible puis irréversible
 - Effets muscariniques (parasymptatique)
 - Effets nicotiniques (plaque motrice)
 - Effets centraux
 - Tests de contrôle (acétylcholinestérase des globules rouges)
(DIAGNOSTIC) (pseudo cholinestérase)(seul test qui existe)
- **3 catégories de toxicité aiguë**
 - Très toxiques DL50 < 50 mg/kg (azinphos-méthyl, chlorfenvinphos...)
 - Toxiques DL50 à 500 mg/kg (chlorpyriphos-éthyl, dichlorvos)
 - Peu toxiques DL50 > 500 mg/kg (acéphate, malathion)
- **VME 0,1 et 0,2 mg/m³**

Accidents aigus

- **Projection oculaire**
 - Troubles locaux de la vision
- **Inhalation d'aérosols**
 - Dyspnée, asthme (contact cutané et/ou inhalation)
 - Symptomatologie
 - 1 h après inhalation
 - 2-3 h par voie cutanée
 - Maximum 6-8 h
- **Les formes modérées**
 - Des troubles digestifs constants : nausées, vomissements, douleurs abdominales, diarrhée.
 - Une hypersécrétion muqueuse diffuse : hypersalivation, larmoiement, sueurs profuses, encombrement bronchique avec dyspnée.

ANNEXES

- Des signes neuromusculaires avec céphalées, confusion mentale, altération de la vision et myosis, crampes et fasciculations musculaires.
- Une bradycardie modérée avec hypotension.
- **Les formes graves (en plus des signes précédents)**
 - Un coma, myoclonique ou convulsif, parfois aréflexique rarement en mydriase.
 - Une hypoxie majeure avec cyanose due à l'oedème alvéolaire, au bronchospasme et aux fasciculations des muscles respiratoires.
 - Des troubles métaboliques : hypokaliémie, hyperglycémie et acidose, dues à un hyperadrénergisme par accumulation de l'acétylcholine au niveau des ganglions sympathiques et des surrénales.
 - Des troubles cardiovasculaires avec bradycardie profonde, blocs auriculo-ventriculaires et troubles de l'excitabilité myocardique (extrasystoles et fibrillation ventriculaires), collapsus.
 - Une pancréatite oedémateuse.
- **Syndrome neurotoxique retardé (2 à 3 semaines)**

Intoxication chronique

- **Système nerveux**
 - Psychosyndrome organique : asthénie, céphalée, fonctions cognitives perturbées, troubles psychiatriques et psychomoteurs, anomalies de L'EEG.
 - Neuropathie périphérique motrice, fatigabilité, paresthésie, amyotrophie, EMG perturbé.
- **Peau**
 - Dermites, eczémas (oedèmes, érythèmes, prurit, ...)
- **Cœur**
 - ECG perturbé (rare)
- **Cancérogenèse**
 - Difficile à évaluer
 - Etudes expérimentales – épidémiologie : peu de données
- **Grossesse**
 - Intoxication mère ® foetus
 - Non tératogènes chez les Mammifères
 - Déformations squelettiques parfois
 - Pas de données épidémiologiques

GLOSSAIRE

GLOSSAIRE

- **Alanine aminotransférase (ALT ou ALAT)** : acronyme d'alanine amino transférase, c'est une enzyme transaminase surtout présente au niveau du foie, ce qui en fait un indicateur fiable d'inflammation hépatique dans le cas où elle est retrouvée en grande quantité dans la circulation sanguine.
- **Aspartate aminotransférase (AST ou ASAT)** : c'est une enzyme transférase, retrouvée dans divers organes dont le rôle est la création de nouveaux acides aminés. L'augmentation de son taux dans le sang fait soupçonner une atteinte de certains organes tels que le foie.
- **Auxine** : il s'agit d'une hormone qui contribue à la croissance des plantes en allongeant et en multipliant des cellules végétales.
- **Carbamylation** : il s'agit de l'ancienne appellation du terme carbamoylation qui désigne le transfert d'un carbamoyl d'une molécule qui en contient vers un accepteur tel qu'un groupe amine.
- **Carboxylestérases** : synonyme de « carboxylic-ester hydrolase », c'est une enzyme estérase qui désintoxifie les xenobiotiques et hydrolyse les esters et les amides. Exemple : estérase a.
- **Cellules de kupffer** : ce sont des macrophages propres au foie retrouvés surtout au niveau de la paroi des vaisseaux capillaires sinusoides qui irriguent l'organe. Leur rôle est d'éliminer les hématies mortes et les débris.
- **Congestion** : c'est l'augmentation subite suivie de l'accumulation anormale d'une grande quantité de sang contenue dans les vaisseaux d'un organe ou d'un tissu.
- **Dégénérescence** : il s'agit de la détérioration complète ou partielle d'une cellule ou d'un tissu de l'organisme.

- **Désulfuration oxydative** : c'est une variante de la désulfuration qui est l'action d'enlever un soufre ou des sulfures d'un produit qui en contient, tout en le combinant à un atome d'oxygène.
- **Lactate déshydrogénase (LDH)** : il s'agit d'une enzyme entrant dans le métabolisme du glucose (glycolyse). Elle transforme le lactate des muscles squelettiques en pyruvate au cours d'un effort ou lors du jeun.
- **Maladies cryptogamiques** : maladies touchant les végétaux dues à un champignon qui absorbe la sève de la plante jusqu'à ce qu'elle dépérisse et meurt.
- **Phosphatase alcaline (ALP)** : comme pour l'AST, il s'agit d'une enzyme dont le taux élevé dans le sang, en dehors d'une période de grossesse ou de croissance, peut être révélateur de l'existence de certaines maladies telles que des maladies hépatiques.
- **Propriété électrophysiologique** : aussi appelé « bioélectrique » ou encore « électrophysiologique », il s'agit de la propriété électrique que possèdent certains tissus tel que le tissu musculaire et le tissu nerveux.
- **Succinate déshydrogénase** : il s'agit du nom d'une enzyme retrouvée au niveau de la membrane interne des mitochondries qui catalyse l'un des composés du cycle de Krebs.
- **Surfactant** : agent chimique mouillant ayant la capacité d'abaisser la tension de surface d'un liquide.
- **Tensioactif** : substance ayant la capacité d'abaisser la tension superficielle existante entre deux surfaces, utilisée comme détergent, agent moussant et autres.
- **Voie shikimique** : c'est une voie, n'existant que chez les végétaux, qui assure la biosynthèse de plusieurs substances telle que la lignine.

Résumé :

L'utilisation des pesticides dans l'agriculture ne cesse d'augmenter au point d'avoir atteint au cours de l'année 2013 une quantité équivalente à 4 mille tonnes en Algérie. Ces produits chimiques sont connus pour être la cause de nombreuses intoxications pouvant conduire à l'apparition de graves maladies. L'objectif de notre étude était de déterminer l'effet d'un mélange de deux pesticides (le Glyphosate et le Chlorpyrifos) sur l'histologie du foie et des testicules des souris males BALB/C. Pour ce faire, les animaux ont reçus, par voie intra-péritonéale, une dose de 1/6 de la DL50 de ces deux produits pendant six semaines. Par la suite, le poids des souris ainsi que celui de leurs organes ont été répertoriés pour une comparaison statistique. Le foie ainsi que les gonades masculines, après avoir passé les différentes étapes de préparation pour l'étude histologique, ont été observés sous microscope optique. Les résultats montrent que le traitement n'a pas eu d'effets sur le poids corporel et le poids relatif des organes. Toutefois, un impact sur l'histologie des deux organes étudiés a été observé. En effet, l'existence de dilatations et de congestions des veines centro-lobulaires et des sinusoides (DS) et de débuts de nécrose a été observé au niveau du foie des souris traitées. En ce qui concerne le tissu testiculaire, des tubes séminifères dégénérés et la présence de grands espaces interstitiels ont été observés ainsi que quelques vacuoles du côté basal des tubes. De ces résultats, nous pouvons conclure que l'herbicide Glyphosate combiné avec l'insecticide Chlorpyrifos provoquent des dommages hépatique et testiculaire, ce qui indique une dangerosité de ces produits chimiques sur la santé humaine.

Mots clés : Pesticide, Chlorpyrifos, Glyphosate, Histologie, Foie, Testicule.

Abstract:

The use of pesticides in agriculture is constantly increasing to an extent equivalent to 4000 tons in Algeria during the year 2013. These chemical products are known to be the cause of many poisonings that can lead to the appearance of serious diseases. The objective of our study was to determine the effect of a mixture of two pesticides (Glyphosate and Chlorpyrifos) on the histology of the liver and testes of BALB / C male mice. In order to do this, the animals received, intraperitoneally, a dose of 1/6 of the LD 50 of these two products for six weeks. Subsequently, the weights of the mice as well as their organs are listed for a statistical comparison. The livers as well as the male gonads, after having passed the different steps of preparation for the histological study, were observed under light microscope. On one hand this allows us to see that the treatment has no effect on the body weight and the relative weight of the organs. But on the other hand, it has an impact on the histology of the two studied organs. Indeed, the existence of dilatations and congestions of the Centro-lobular veins and the sinusoids (DS) and of necrosis begin was observed in the liver of the treated mice. Concerning the testicular tissue, degenerated somniferous tubules and the presence of large interstitial spaces have been observed as well as some vacuoles on the basal side of the tubes. From these results, we can conclude that Glyphosate herbicide combined with Chlorpyrifos insecticide cause hepatic and testicular damage, which indicates the dangerousness of these chemicals to human health.

Key words: Pesticide, Chlorpyrifos, Glyphosate, Histology, Liver, Testicle.

ملخص:

استخدام المبيدات في مجال الزراعة يتزايد باستمرار إلى أن وصلت كمية استخدامه في الجزائر إلى ما يقارب 4000 طن سنة 2013، و من المعروف أن هذه المواد الكيميائية تكون سببا في العديد من حالات التسمم التي يمكن أن تؤدي إلى ظهور أمراض خطيرة. الهدف من هذه الدراسة كان تحديد تأثير خليط من المبيدات المتمثلة في الغليفوسات و الكلوربيريفوس على أنسجة الكبد و الخصيتين عند ذكور فئران التجارب البيضاء. و للقيام بذلك قمنا بحقن الفئران داخل الصفاق بجرعة مقدارها 6/1 من الجرعة المميتة لنسبة 50 بالمائة من هذه الحيوانات من كلتا المادتين الموجودتين في الخليط المراد دراسته لمدة ستة أسابيع. بعد ذلك قمنا بتحديد وزن كل من الفئران وأعضاؤها للقيام بمقارنة إحصائية، و قد حدد الكبد و الغدد التناسلية الذكرية لملاحظة نسيجها تحت المجهر الضوئي. النتائج توضح بأن الخليط ليس له تأثير على وزن الجسم و الوزن النسبي للأعضاء، و مع ذلك لوحظ أن له تأثير على الأنسجة في كلا العضوين المدروسين ومنها وجود توسع واحتقان الأوردة المركزية والجيوب وملاحظة بداية لنخر في الكبد. أما فيما يخص أنسجة الخصيتين فلوحظ وجود تلف و توسع في ضوء الأنابيب المنوية مع ظهور بعض الفجوات في الجانب القاعدي لها. من هذه النتائج نستخلص بأن مزج الغليفوسات مع الكلوربيريفوس تسبب تلف النسيج الكبدي و نسيج الخصيتين عند الفئران مما يثبت خطورته على صحة الإنسان.

الكلمات المفتاحية : مبيدات, كلوربيريفوس, غليفوسات, أنسجة, كبد, خصية.