

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA 1

Faculté des Sciences de la nature et la vie

Département des Sciences Alimentaires

THESE DE DOCTORAT

En Sciences Agronomiques

Spécialité : Nutrition et Transformation des Aliments

RECHERCHE DE L'EFFET COMBINE D'UN MELANGE DE
PESTICIDES ET ADDITIFS ALIMENTAIRES ET L'EFFET
PROTECTEUR DE L'ARGILE VERTE ET PSYLLIUM PAR VOIE
ORALE SUR LA PHYSIOLOGIE DU RAT WISTAR.

Par

Hicham BELLALA

Devant le jury proposé :

S. MEGATLI	Professeur	Université Blida 1	Président
H. KHALDOUN	MCA	Université Blida 1	Examineur
N. DAOUDI-ZERROUKI	Professeur	UMM. Tizi Ouzou	Examineur
M. LATATI	Professeur	E. N. S. A	Examineur
A. HADJ ZIANE	Professeur	Université Blida 1	Directrice de thèse
A. BITAM	Professeur	E. N. S. A	Co-directeur de thèse

Blida, Mai 2023

RÉSUMÉ

La consommation quotidienne des aliments qui contiennent des pesticides et des additifs alimentaires même à de faibles doses peut provoquer de graves problèmes sur la santé à long terme. Le recours à des substances naturelles telles que l'argile et le psyllium, peuvent être une alternative pour la préserver. Ce travail, a pour objectif d'évaluer la toxicité chronique d'un mélange de sept pesticides et/ou dix additifs alimentaires (DJA : dose journalière admissible et DJA×2) et l'étude de l'effet protecteur de l'argile verte et du psyllium par voie orale chez les rats de la souche Wistar.

Au bout de sept mois d'expérimentation, les rats du lot traité par mélange de pesticides et/ou additifs alimentaire sont présenté des signes de toxicité chronique même à la dose de DJA, qui se manifestent par une diminution du nombre de bactéries de le microbiote intestinale jusqu'à 73 %, diminution du temps de transit intestinal (7 %), perturbation du bilan hépatique et rénal des paramètres biochimiques du sang, anémie et diminution du taux d'hémoglobine, hématocrite et plaquettes sanguines, atteinte et inflammation de l'histologie hépatique et rénale, avec une diminution des poids absolu et relatif du foie (5 %), et l'apparition d'une tumeur maligne sous cutanée de type myosarcome.

Par contre chez les rats du lot traité par le mélange de pesticides et/ou additifs alimentaires associés a l'argile verte et /ou psyllium, nous avons constaté d'une façon globale une régression significative de la majorité des effets toxiques observés avec un effet protecteur et stimulant des bactéries du microbiote intestinal sur tous les Bactériodes jusqu'à 65% avec un effet laxatif très remarquable du psyllium sur le transite digestif, des rétablissements dans les paramètres biochimiques du foie : ASAT, ALAT, PAL, GGT, Bilirubine, protéines totales et albumine jusqu'à 47%, du bilan rénal sur tous l'urée et l'acide urique et du poids absolu et relatif du foie surtout en association psyllium - l'argile et enfin une diminution de la glycémie pour le lot nourri par le psyllium.

Mots clés : Pesticides, additifs alimentaires, toxicité, argile, psyllium, effet protecteur

ABSTRACT

The daily consumption of foods containing pesticides and food additives, even in small doses, can cause serious long-term health problems. The use of natural substances such as clay and psyllium can be as alternative to preserve it. The objective of this work is to evaluate the chronic toxicity of a mixture of seven pesticides and/or ten food additives (ADI: acceptable daily intake and ADI \times 2) and to study the protective effect of green clay and psyllium by the oral route in Wistar rats.

After seven months of experimentation, the rats of the batch treated with a mixture of pesticides and/or food additives showed signs of chronic toxicity even at the ADI dose, manifested by a decrease in the number of bacteria of the intestinal microbiota up to 73%, a decrease in intestinal transit time (7%) disturbance of the hepatic and renal balance of the biochemical parameters of the blood, anemia and decrease of the hemoglobin, hematocrit and blood platelets, damage and inflammation of the hepatic and renal histology, with a decrease of the absolute and relative weights of the liver (5 %), and the appearance of a malignant tumor under the skin of the myosarcoma type.

On the other hand, in the rats of the batch treated with the mixture of pesticides and/or food additives associated with green clay and/or psyllium, we noted a significant regression of the majority of the toxic effects observed with a protective and stimulating effect of the bacteria of the intestinal microbiota on all the bacteria up to 65% with a very remarkable laxative effect of psyllium on the digestive transit, restorations in the biochemical parameters of the liver: ASAT, ALAT, PAL, GGT, Bilirubin, total proteins and albumin up to 47%, of the renal balance on all urea and uric acid and of absolute and relative weight of the liver especially in association of psyllium with clay and finally a decrease of the glycemia for the batch fed by psyllium.

Key words: Pesticides, food additives, toxicity, clay, psyllium, protective effect.

ملخص

الاستهلاك اليومي للأطعمة التي تحتوي على مبيدات حشرية ومضافات غذائية حتى بجرعات منخفضة يمكن أن يسبب مشاكل صحية خطيرة على المدى الطويل. ويمكن أن يكون استخدام المواد الطبيعية مثل الطين والسيليوم بديلاً للحفاظ على الصحة. يهدف هذا العمل إلى تقييم السمية المزمنة لمزيج من سبعة مبيدات و/أو عشرة إضافات غذائية (DJA: جرعة يومية مقبولة و $2 \times DJA$) ودراسة التأثير الوقائي للطين الأخضر والسيليوم عن طريق الفم في جرذان من سلالة Wistar.

بعد سبعة أشهر من التجارب ، أظهرت فئران الدفعة المعالجة بمزيج المبيدات الحشرية و/أو المضافات الغذائية علامات سمية مزمنة حتى عند تناول جرعة DJA ، والتي تجلت من خلال انخفاض عدد البكتيريا في القولون إلى 73% ، انخفاض في زمن العبور المعوي (7%) ، اضطراب في التوازن الكبدى والكلى والتحاليل البيوكيميائية للدم ، فقر الدم ونقص في الهيموجلوبين ، الهيماتوكريت والصفائح الدموية ، تلف والتهاب الأنسجة الكبدية والكلى ، مع انخفاض في الأوزان الكبدية المطلقة والنسبية (5%) ، وظهور ورم خبيث تحت الجلد من نوع الساركوما العضلية.

من ناحية أخرى ، فئران الدفعة المعالجة بمزيج من المبيدات الحشرية و/أو المضافات الغذائية وبالطين الأخضر و/أو السيليوم ، لاحظنا بشكل عام تراجعاً كبيراً في غالبية التأثيرات السامة التي لوحظت مع تأثير وقائي و تحفيز البكتيريا من الجراثيم المعوية حتى 65% مع تأثير ملين ملحوظ للغاية من السيليوم على العبور الهضمي ، و تحسن في المعلمات الكيميائية الحيوية للكبد: ALAT ، ASAT ، GGT ، PAL ، البيليروبين ، البروتينات والألبومين حتى 47% ، توازن كلوي على كل من اليوريا وحمض البوليك والوزن المطلق والنسبي للكبد خاصةً مع السيليوم والطين وأخيراً انخفاض نسبة السكر في الدم للجرعة التي يتم تغذيتها بواسطة السيليوم.

الكلمات المفتاحية: المبيدات الحشرية ، المضافات الغذائية ، السمية ، الطين ، السيليوم ، المفعول الوقائي.

REMERCIEMENTS

D'abord, je remercie le **Bon DIEU ALLAH** qui m'a accordé le courage, la patience et la volonté de pouvoir verser cette goutte dans l'océan de la science.

Un grand merci à ma directrice de thèse Mme HADJ-ZIANE- Zafour A. Professeur à Université Blida 1 et mon co-directeur de thèse Mr BITAM A. Professeur à l'école nationale supérieure d'agronomie d'Alger, pour m'avoir encadré et pour avoir dirigé ce travail. Je les remercie pour leurs conseils et orientations, qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

Mes sincères remerciements et ma profonde gratitude à tous les membres du Jury

Mr MEGATLI S. Professeur à l'université Blida 1, pour l'honneur de présider cet imminent Jury

Mme DAOUDI- ZERROUKI. N, Professeur à l'université Mouloud Mameri de Tizi Ouzou, Mr LATATI M. Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie d'Alger et Mme KHALDOUN. H, Maître de Conférences A à l'université Blida 1, pour leur présence et pour avoir accepté de juger mon modeste travail

Un merci spécial pour deux personnes très exceptionnelles, à mon ami et collègue BOUZAR Chihab et Mr ALLEL Dahmen pour leurs présence, affection et générosité inestimables. Ils m'ont aidé et poussé vers l'avant par leurs conseils, leur précieux soutien moral pendant les périodes difficiles.

Mes vifs remerciements à tous mes amis et collègues au travail à la direction du commerce et toute la promotion de Mars 2011 : Kahina, Kawtar, Naziha, Amina, Fati, Naima, Belkacem, El-hadj et Nourre dine.

Je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail sans oublier :

Tous les responsables des laboratoires universitaires et tout le personnel du département de sciences alimentaires, et Génie Des Procédés de l'université Blida 1 et le laboratoire de biochimie à E.N.S.A.

Mr le responsable du laboratoire de l'ADE à Chiffa, ainsi que toute son équipe pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Toute l'équipe du laboratoire de physicochimie à l'ITELV –Baba Ali Alger.

Mr Adel le responsable de la station d'expérimentation animale de la faculté des Sciences de la nature et la vie de l'université Blida 1 et tous les travailleurs de la station.

Pr AMIR le chef de service de l'histologie pathologique à l'hôpital Mustapha Bacha pour ses conseils et orientations.

Mr RIDA et DJAMEL du laboratoire d'analyses médicales à l'hôpital civil de Hadjout et toute l'équipe du laboratoire.

Mr le chef service du laboratoire d'analyse médicale du centre d'hémodialyse de Hadjout et tout le personnel du laboratoire.

Mr ABD ELSLEM chef de service du laboratoire d'hygiène de la Wilaya-de Tipaza et son équipe du laboratoire d'analyse médicale.

Mr KHADOUR le technicien du laboratoire d'anatomie pathologique de l'ENV d'El Harrach Alger pour sa générosité et orientations.

Toute l'équipe de l'agence Hespro DZ à Alger et l'association Nutrition et santé à Oran.

Et à tous ceux et celles que j'aurais pu oublier involontairement, Merci !

DEDICACES

*Je dédie cet humble travail à ma plus belle source d'inspiration,
Le plus beau cadeau que le Bon Dieu m'a offert
Et à qui je dois tant, Mes parents,*

*A mes sœurs Naima, Amina, Asma, Houda, et mes beaux frères,
A mes frères Mourad, Brahim, et Halim et mes belles sœurs,
Ma grand-mère, mes tantes et mes oncles,*

A Toute ma famille

*A celle qui m'a partagé les pénibles moments d'achèvement de ce travail, ma
chère épouse **SARAH**,*

*Et sans oublier ma petite fille **ANWAR**,*

A tous mes ami(e)s les proches ainsi que les lointains...

Hichem

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	1
REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIÈRES	7
LISTES DES ILLUSTRATIONS, GRAPHYQUES ET TABLEAUX	15
INTRODUCTION	21
CHAPITRE 1 : LES PESTICIDES	24
1.1. Définition	24
1.2. Composition et formulation	24
1.3. Classification des pesticides	25
1.3.1. Classification chimique	25
1.3.2. Classification biologique	27
1.4. Résidus et indices toxicologiques	28
1.4.1. Délai avant récolte	28
1.4.2. Résidus de pesticides	28
1.4.3. La limite maximale de résidus (LMR)	28
1.4.4. Détermination de la dose létale 50 (DL50)	29
1.4.5. Détermination de la dose sans effet observable (DSEO)	29
1.4.6. Etablissement de la dose journalière admissible (DJA)	29
1.5. Caractéristiques toxicologiques des pesticides	30
1.6. Les voies d'exposition aux pesticides	32
1.6.1. L'exposition professionnelle aux pesticides	32
1.6.2. Présence de pesticides dans l'environnement et l'alimentation	32
1.7. Réglementation des pesticides	33
1.7.1. Réglementation international	33
1.7.2. Réglementation Algérienne	34
1.8. Effets des pesticides sur la sante	36
1.8.1. Toxicité aiguë (ou à court terme)	36
1.8.2. La toxicité chronique	36

CHAPITRE 2 : LES ADDITIFS ALIMENTAIRES	38
2.1. Définitions	38
2.1.1. Les additifs alimentaires	38
2.1.2. Les auxiliaires technologiques	38
2.1.3. Les arômes	38
2.2. Classification	39
2.2.1. Selon l'origine	39
2.2.1.1. Les additifs alimentaires naturels	39
2.2.1.2. Les additifs obtenus par modification de produits naturels	39
2.2.1.3. Les additifs alimentaires synthétique	39
2.2.2. Selon la technologie	39
2.2.2.1. Selon la Communauté Européenne	39
2.2.2.2. Selon le Codex Alimentarius	39
2.2.2.3. Selon la réglementation algérienne	39
2.3. Intérêt des additifs alimentaires dans les industries agroalimentaires	41
2.3.1. Intérêt technologique	41
2.3.2. Amélioration de la conservation	42
2.3.3. Rôle d'améliorer ou de maintenir la qualité organoleptique	42
2.3.4. Amélioration de la valeur nutritionnelle	42
2.3.5. Rôle hygiénique ou sanitaire	42
2.3.6. Rôle économique	42
2.4. Indices toxicologiques des additifs alimentaires	42
2.4.1. Limites maximales d'utilisation pour les additifs alimentaires	42
2.4.2. Bonnes pratiques de fabrication (BPF)	43
2.5. Réglementation des additifs alimentaires	43
2.5.1. Réglementation international	43
2.5.1.1. Réglementation de l'Union Européenne	43
2.5.1.2. Réglementation du Codex Alimentarius	44
2.5.2. Réglementation Algérienne	44
2.6. Toxicité des additifs alimentaires	45
2.6.1. Evaluation des risques liés aux additifs alimentaires	45
2.6.2. Toxicité et effet cocktail des additifs alimentaires	46

CHAPITRE 3 :L'ARGILE ET PSYLLIUM	48
3.1.L'argile	48
3.1.1. Définition et structure	48
3.1.1.1. Définition minéralogique	48
3.1.1.2. Définition granulométrique	48
3.1.2. Classification des argiles	49
3.1.2.1.Selon de type d'empilement des couches	49
3.1.2.2.Selon la distance basal (A°)	50
3.1.2.3.Selon le groupe de minéraux	50
3.1.2.4. Selon la couleur	52
3.1.3. Propriétés des argiles	52
3.1.3.1.Absorption	52
3.1.3.2.Adsorption et capacité d'échange cationique (CEC)	53
3.1.3.3.Hydratation et gonflement des argiles	53
3.1.3.4. Surface spécifique	54
3.1.4. Usage interne de l'argile et bienfait sur la santé humaine	54
3.1.4.1.En agroalimentaire	54
3.1.4.2.En tant qu'anti-poison	55
3.1.4.3.En association à certains médicaments	55
3.1.4.4. En association à certaines molécules	55
3.2. Le psyllium oulspaghul	56
3.2.1. Définition	56
3.2.2. Classification et description botanique	56
3.2.3. Composants bioactifs du psyllium	58
3.2.4. Propriétés thérapeutiques du psyllium	59
3.2.4.1.Constipation	60
3.2.4.2.Hypercholestérolémie	60
3.2.4.3.Effet antitoxique	60
3.2.4.4.Syndrome de l'intestin irritable et de la colite ulcéreuse	61
3.2.4.5.Diabète	61

CHAPITRE 4 :MATÉRIEL ET METHODES

1. Matériel	63
1.1. Matériel biologique	63
1.1.1. L'eau	63
1.1.2. Aliment destiné aux rats	63
1.1.3. Les animaux de l'expérimentation	65
1.2. Additifs alimentaires	66
1.2.1. Tartrazine (Sin 102)	67
1.2.2. Jane orangé S (Sin 110)	67
1.2.3. Rouge ponceau 4R (Sin 124)	68
1.2.4. Rouge allura AC (Sin 129)	69
1.2.5. Bleu brillant FCF (Sin 133)	69
1.2.6. Sorbate de potassium (Sin 202)	70
1.2.7. Benzoate de sodium (Sin 211)	70
1.2.8. Acesulfame K (Sin 950)	70
1.2.9. Aspartame (Sin 951)	71
1.2.10. Acide ascorbique (Sin 300)	71
1.3. Pesticide	72
1.3.1. Chloroperiphos-méthyl	72
1.3.2. Deltamethrine	73
1.3.3. Methidathion	73
1.3.4. Cyperméthrine	74
1.3.5. Acétamipride	74
1.3.6. Abamectine	74
2. Méthodes analytiques	75
2.1. Analyses physicochimiques de l'eau	76
2.1.1. Détermination de la conductivité électrique	76
2.1.2. Détermination du pH	77
2.1.3. Dosage du Calcium Ca^{2+} et Magnésium Mg^{2+}	77
2.1.4. Dosage des chlorures	79
2.1.5. Dosage du sodium Na^{+} et potassium	79
2.1.6. Dosage du Nitrate (NO_3^-)	80
2.1.7. Dosage du Nitrite (NO_2^-)	81

2.2. Analyses physicochimiques de l'aliment des rats	82
2.2.1. Détermination du taux de protéines	82
2.2.2. Dosage de la matière grasse	84
2.2.3. Dosage du calcium	85
2.2.4. Dosage du phosphore	86
2.3. Analyses de la qualité microbiologique de l'eau	88
2.3.1. Recherche et dénombrement des coliformes totaux	88
2.3.2. Recherche des coliformes fécaux	89
2.3.3. Recherche <i>Escherichia-coli</i>	89
2.3.4. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux	89
2.3.5. Recherche et dénombrement des clostridium sulfite réducteur	90
2.4. Analyses microbiologique de l'aliment, argile vert, poudre de psyllium	91
2.4.1. Préparation des échantillons	91
2.4.2. Dénombrement des germes aérobie mésophile totaux à 30 °C	91
2.4.3. Dénombrement des coliformes totaux et fécaux	92
2.4.4. Dénombrement des <i>Staphylococcus aureus</i>	93
2.4.5. Recherche de <i>Salmonella</i>	93
2.4.6. Dénombrement des levures et moisissures	94
2.5. Expérimentation animale	95
2.5.1. Période d'acclimatation et administration des doses	95
2.5.2. Sacrifice des rats et prélèvement du sang et des organes	102
2.6. Isolement et dénombrement des espèces de microbiote intestinal	104
2.6.1. Isolement des espèces aérobies et aéroanaérobies facultatives	104
2.6.1.1. <i>Escherichia coli</i> et <i>Enterococcus spp</i>	104
2.6.1.2. <i>Lactobacillus spp.</i>	106
2.6.2. Isolement et dénombrement des espèces anaérobies strictes	107
2.6.2.1. Les Bifidobactéries	107
2.6.2.2. <i>Clostridium spp</i>	109
2.6.2.3. <i>Bacteroides spp</i>	110
2.7. Détermination de temps de transit digestif	111
2.8. Analyses biochimiques du sang	111
2.8.1. Dosage de glycémie	111
2.8.2. Dosage de l'urée	112

2.8.3. Dosage de la créatinine	113
2.8.4. Dosage de l'acide urique	114
2.8.5. Dosage du cholestérol total	115
2.8.6. Dosage des triglycérides	115
2.8.7. Dosage de ASAT	116
2.8.8. Dosage de ALAT	117
2.8.9. Dosage de PAL (Phosphatase Alcaline)	118
2.8.10. Dosage de GGT (Gamma Glutamyl Transférase)	119
2.8.11. Dosage de Bilirubine totale	120
2.8.12. Dosage de Protéines totales	121
2.8.13. Dosage de Albumine	121
2.8.14. Dosage de Fer	122
2.8.15. Dosage de Calcium	123
2.8.16. Dosage de Sodium	123
2.8.17. Dosage de Potassium	124
2.9. Analyses hématologiques du sang	125
2.9.1. Détermination de la formule de numération sanguine FNS	125
2.10. Etude histopathologique	126
2.10.1. Examen macroscopique des organes de rats	126
2.10.2. Examen microscopique des organes de rats	126
2.11. Etude statistique	129

CHAPITRE 5 : RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Résultats de l'enquête sur les pesticides	130
1.1. Résultats de classification des pesticides	130
1.2. Résultats de classification des légumes selon l'utilisation de pesticides	131
1.3. Résultats de classification des fruits selon l'utilisation des pesticides	132
2. Résultats des analyses physico-chimiques	133
2.1. Résultats des analyses physico-chimiques de l'eau	133
2.2. Résultats des analyses physico-chimiques de l'aliment des rats	134
3. Résultats des analyses microbiologiques de l'eau et l'aliment destiné aux rats	135
3.1. Résultats des analyses microbiologiques de l'eau	135
3.2. Résultats des analyses microbiologiques de l'aliment	136

4. Résultats de l'expérimentation animale	137
4.1. Résultats de suivi du poids corporel des rats	137
4.2. Résultats des analyses microbiologiques du microbiote intestinal des rats	141
4.2.1. Résultats de l'effet des additifs alimentaires sur le microbiote intestinal	141
4.2.1.1. Résultats de l'effet des additifs sur la flore aérobie	141
4.2.1.2. Résultats de l'effet des additifs sur le microbiote anaérobie	141
4.2.2. Résultats de l'effet des pesticides sur le microbiote intestinal	144
4.2.2.1. Résultats de l'effet des pesticides sur le microbiote aérobie	144
4.2.2.2. Résultats de l'effet des pesticides sur le microbiote anaérobie	144
4.2.3. Résultats de l'effet de mélange AA/pesticides sur le microbiote intestinal	147
4.2.3.1. Résultats de l'effet de mélange AA/pesti sur le microbiote aérobie	147
4.2.3.2. Résultats de l'effet de mélange AA/pest sur le microbiote anaérobi	148
4.2.4. Résultats de l'effet de Psyllium et l'argile contre la toxicité de mélange AA et pesticides sur la flore intestinale des rats	149
4.2.4.1. Résultats de l'effet de Psyllium et l'argile contre la toxicité de mélange additifs alimentaires et pesticides sur la flore aérobie	149
4.2.4.2. Résultats de l'effet de Psyllium et l'argile contre la toxicité de mélange additifs alimentaires et pesticides sur le microbiote anaérobie	150
4.3. Résultats l'analyse de temps de transite gastro-intestinale des rats	155
4.4. Résultats des analyses biochimiques et hématologiques du sang	158
4.4.1. Résultats de l'effet des AA sur les paramètres biochimiques	158
4.4.2. Résultats de l'effet des AA sur les paramètres hématologiques	164
4.4.3. Résultats de l'effet des pesticides sur les paramètres biochimiques	162
4.4.4. Résultats de l'effet des pesticides sur les paramètres hématologique	164
4.4.5. Résultats de l'effet de mélange AA/pesticides sur les paramètres biochimiques du sang	167
4.4.6. Résultats de l'effet mélange AA/ pesticides sur les paramètres hématologiques du sang	169
4.4.7. Résultats de l'effet de Psyllium et l'argile contre la toxicité de mélange additifs alimentaires et pesticides sur les paramètres biochimiques	171
4.4.8. Résultats de l'effet de Psyllium et l'argile contre la toxicité de mélange additifs alimentaires et pesticides sur les paramètres hématologiques	173

4.5. Résultats de l'étude Histopathologique des organes de rats	176
4.5.1. Résultats de l'examen macroscopique des organes de rats	176
4.5.2. Résultats de poids absolu et relatif du foie	178
4.5.3. Résultats de l'examen microscopique (coupes histologiques de foie et des reins)	179
4.5.3.1. Résultats des coupes histologiques de lot témoin	179
4.5.3.2. Résultats de l'effet des additifs alimentaires sur l'histologie de foie et des reins	181
4.5.3.3. Résultats de l'effet des pesticides sur l'histologie de foie et des reins	186
4.5.3.4. Résultats de l'effet de mélange AA/pesticides sur l'histologie de foie et des reins	191
4.5.3.5. Résultats de l'effet de Psyllium et l'argile contre la toxicité de mélange additifs alimentaires et pesticides sur l'histologie de foie et des reins	198
CONCLUSION	204
APPENDICES	208
LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATION	226
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	228

LISTES DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1	Variation de facteur de sécurité entre les espèces et les individus	29
Figure 1.2	Effets toxique et mode d'action des pesticides sur la cellule.	37
Figure 3.1	Représentation schématique d'un feuillet de phyllosilicate 2 :1.	49
Figure 3.2	Disposition des éléments en couches tétraédrique et octaédrique.	49
Figure 3.3	L'appareil végétal du Plantago L.	56
Figure 3.4	Plante et graines du Psyllium.	57
Figure 4.1	Aliment de rats.	63
Figure 4.2	Poudre de Psyllium blond (Plantagoovata).	64
Figure 4.3	Argile verte en poudre.	65
Figure 4.4	Rats femelles Rattusnorvegicus de la souche «Wistar».	66
Figure 4.5	Schéma général de l'étude expérimentale.	99
Figure 4.6	Dissection de rat après décapitation.	103
Figure 4.7	Prélèvement des organes : foie et reins.	103
Figure 4.8	Inclusion et mise en bloc des organes dans la paraffine.	127
Figure 4.9	Coupes histologiques colorées et fixées sur des lames.	129
Figure 5.1	Evaluation pondérale des rats traités par le mélange des additifs alimentaires pendant la durée de l'expérimentation.	137
Figure 5.2	Evaluation pondérale des rats traités par le mélange des pesticides pendant la durée de l'expérimentation.	138
Figure 5.3	Evaluation pondérale des rats traités par le mélange de pesticides et additifs alimentaires pendant la durée de l'expérimentation.	138
Figure 5.4	Evaluation pondérale des rats traités par le mélange des pesticides et additifs alimentaires associe à l'argile verte et psyllium pendant la durée de l'expérimentation.	139
Figure 5.5	La courbe d'évaluation pondérale du rat Wistar mâle et femelle.	139
Figure 5.6	Effet des additifs alimentaires sur la microflore aérobie des rats.	141
Figure 5.7	Effet des additifs alimentaires sur la microflore anaérobie des rats.	141
Figure 5.8	Effet des pesticides sur la microflore aérobie des rats.	144

Figure 5.9	Effet des pesticides sur la microflore anaérobie des rats.	144
Figure 5.10	Effet de mélange additifs alimentaires et pesticides sur la microflore aérobie des rats.	147
Figure 5.11	Effet de mélange additifs alimentaires et pesticides sur la microflore anaérobie des rats.	148
Figure 5.12	Effet de Psyllium et l'argile contre la toxicité de mélange additifs alimentaires et pesticides sur la microflore aérobie des rats.	149
Figure 5.13	Effet de Psyllium et l'argile contre la toxicité de mélange additifs alimentaires et pesticides sur la microflore aérobie des rats.	150
Figure 5.14	Les colonies de Clostridium et Bactériodes sur gélose au sang (Photo originale).	152
Figure 5.15	Les colonies de <i>Bifidobacterium spp</i> sur gélose MRS cystéiné (Photo originale).	153
Figure 5.16	Les colonies de Lactobacillus spp sur gélose MRS (Photo originale).	153
Figure 5.17	Les colonies d' <i>Escherichia coli</i> sur gélose EMB (Photo originale).	154
Figure 5.18	Les colonies d' <i>Enterococcus spp</i> sur gélose Slanetz et Bartley (Photo originale).	154
Figure 5.19	Effet de Psyllium et l'argile contre la toxicité de mélange additifs alimentaires et pesticides sur le temps de transit digestif.	155
Figure 5.20	Résultats des analyses biochimiques de l'effet des additifs alimentaires sur les paramètres biochimiques des rats.	158
Figure 5.21	Résultats des analyses biochimiques de l'effet des additifs alimentaires sur les paramètres biochimiques des rats.	158
Figure 5.22	Résultats des analyses biochimiques de l'effet des pesticides sur les paramètres biochimiques des rats.	162
Figure 5.23	Résultats des analyses biochimiques de l'effet des pesticides sur les paramètres biochimiques des rats.	162
Figure 5.24	Résultats des analyses biochimiques de l'effet de mélange additifs alimentaires et pesticides sur les paramètres biochimiques des rats.	167
Figure 5.25	Résultats des analyses biochimiques de l'effet de mélange additifs alimentaires et pesticides sur les paramètres biochimiques des rats.	167

Figure 5.26	Résultats des analyses biochimiques de l'effet de Psyllium et l'argile contre la toxicité de mélange additifs alimentaires et pesticides sur les paramètres biochimiques des rats.	171
Figure 5.27	Résultats des analyses biochimiques de l'effet de Psyllium et l'argile contre la toxicité de mélange additifs alimentaires et pesticides sur les paramètres biochimiques des rats.	171
Figure 5.28	Apparition d'une tumeur maline sous cutané chez un rat de lot pesticides+ additifs alimentaires (Photo originale).	177
Figure 5.29	Histologie du parenchyme hépatique d'un rat femelle témoin (photo originale). Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).	179
Figure 5.30	Histologie du parenchyme rénal d'un rat femelle témoin (photo originale).Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).	180
Figure 5.31	Histologie du parenchyme hépatique d'un rat femelle du lot traité par les additifs alimentaires DJA (photo originale). Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).	181
Figure 5.32	Histologie du parenchyme hépatique d'un rat femelle du lot traité par les additifs alimentaires DJAx2 (photo originale). Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).	182
Figure 5.33	Histologie du parenchyme rénal d'un rat femelle du lot traité par les additifs alimentaires DJA (photo originale). Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).	184
Figure 5.34	Histologie du parenchyme rénal d'un rat femelle du lot traité par les additifs alimentaires DJAx2 (photo originale). Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).	185
Figure 5.35	Histologie du parenchyme hépatique d'un rat femelle du lot traité par les pesticides DJA (photo originale). Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).	186
Figure 5.36	Histologie du parenchyme hépatique d'un rat femelle du lot traité par les pesticides DJAx2 (photo originale). Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).	187
Figure 5.37	Histologie du parenchyme rénal d'un rat femelle du lot traité par les pesticides DJA (photo originale). Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).	188

Figure 5.38	Histologie du parenchyme rénal d'un rat femelle du lot traité par les pesticides DJAx2 (photo originale). Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).	189
Figure 5.39	Histologie du parenchyme hépatique d'un rat femelle du lot traité par le mélange des additifs alimentaires et pesticides DJA (photo originale).Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).	191
Figure 5.40	Histologie du parenchyme hépatique d'un rat femelle du lot traité par le mélange des additifs alimentaires et pesticides DJAx2 (photo originale).Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).	192
Figure 5.41	Histologie du parenchyme rénal d'un rat femelle du lot traité par le mélange des additifs alimentaires et pesticides DJA (photo originale).Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).	194
Figure 5.42	Histologie du parenchyme rénal d'un rat femelle du lot traité par el mélange des additifs alimentaires et pesticides DJAx2 (photo originale).Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).	195
Figure 5.43	Histologie du parenchyme de la tumeur apparu chez un rat de lot traité par le mélange de pesticides et additifs alimentaires DJAx2 (photo originale). Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).	197
Figure 5.44	Histologie du parenchyme hépatique d'un rat femelle du lot traité par el mélange des additifs alimentaires et pesticides DJAx2 associée au psyllium (photo originale). Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).	198
Figure 5.45	Histologie du parenchyme hépatique d'un rat femelle du lot traité par el mélange des additifs alimentaires et pesticides DJAx2 associe à l'argile verte (photo originale).Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).	199
Figure 5.46	Histologie du parenchyme hépatique d'un rat femelle du lot traité par el mélange des additifs alimentaires et pesticides DJAx2 associées au psyllium et l'argile verte (photo originale). Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).	200
Figure 5.47	Histologie du parenchyme rénal d'un rat femelle du lot traité par le mélange des additifs alimentaires et pesticides DJAx2 associée au psyllium (photo originale).	201

	Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).	
Figure 5.48	Histologie du parenchyme rénal d'un rat femelle du lot traité par le mélange des additifs alimentaires et pesticides DJAx2 associée à l'argile verte (photo originale).	202
	Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).	
Figure 5.49	Histologie du parenchyme rénal d'un rat femelle du lot traité par le mélange des additifs alimentaires et pesticides DJAx2 associées au psyllium et l'argile verte (photo originale).	203
	Coloration: HE ; Gr: X 10 (a) ; X 40 (b).	
Tableau 1.1	Catégories de menace présentée par un produit selon l'OMS.	30
Tableau 1.2	Groupes de classification des cancérigènes par le CIRC.	31
Tableau 1.3	Classes de toxicité établies par l'INERIS.	31
Tableau 1.4	Classes de toxicité établies par l'US EPA .	32
Tableau 2.1	Catégories d'additifs alimentaires.	40
Tableau 4.1	Les additifs alimentaires administrés sur rats dans notre étude.	66
Tableau 4.2	Les pesticides administrés sur les rats dans notre étude.	72
Tableau 4.3	Les différents lots de rats utilisés dans l'expérimentation animale et le type d'aliments adapté pour chaque lot.	96
Tableau 4.4	Doses des additifs alimentaires administrées sur les rats pendant les 7 mois d'expérimentation. (La dose change avec le changement du poids des rats et la quantité de l'eau consommée)	101
Tableau 4.5	Doses des pesticides administrées sur les rats pendant les 7 mois d'expérimentation.	101
Tableau 4.6	Les caractères donnés par les galeries biochimiques pour l'identification d' <i>E. coli</i> et d' <i>Enterococcus spp.</i>	105
Tableau 4.7	Caractères d'identification des Lactobacilles.	106
Tableau 4.8	Tests d'identification des Bifidobactéries.	107
Tableau 4.9	Tests biochimiques caractéristiques de <i>Clostridium spp.</i>	109
Tableau 5.1	Classement des pesticides largement utilisés dans le traitement des fruits et légumes et selon leur degré de toxicité de la région de Mitidja.	130

Tableau 5.2	Classement des légumes largement consommé par la population algérienne selon le degré d'utilisation des pesticides.	131
Tableau 5.3	Classement des fruits largement consommé par la population algérienne selon le degré d'utilisation des pesticides.	132
Tableau 5.4	Résultats des analyses physicochimiques de l'eau de robinet destinée aux rats.	133
Tableau 5.5	Composition en nutriments essentiels de l'aliment destiné aux rats.	134
Tableau 5.6	Recommandations alimentaires chez le rat aux différents stades physiologiques.	134
Tableau 5.7	Résultats des analyses microbiologiques de l'eau de robinet destinée aux rats.	135
Tableau 5.8	Résultats des analyses microbiologiques de l'aliment destiné aux rats.	136
Tableau 5.9	Résultats des analyses hématologiques de l'effet des pesticides sur la formule hématologique du sang des rats.	161
Tableau 5.10	Résultats des analyses hématologiques de l'effet des pesticides sur la formule hématologique du sang des rats.	164
Tableau 5.11	Résultats des analyses hématologiques de l'effet de mélange additifs alimentaires et pesticides sur la formule hématologique du sang des rats.	169
Tableau 5.12	Résultats des analyses hématologiques de l'effet de Psyllium et l'argile contre la toxicité de mélange additifs alimentaires et pesticides sur la formule hématologique du sang des rats.	173
Tableau 5.13	Résultats de l'examen macroscopique des organes de rats.	176
Tableau 5.14	Résultats du poids absolu et relatif du foie et des reins.	178

INTRODUCTION

Depuis toujours l'alimentation joue un rôle très important dans le maintien et l'amélioration de la santé. La présence de certaines substances toxiques d'origine chimique ou biologique dans l'alimentation peut causer des perturbations des fonctions physiologiques et engendrer des problèmes graves sur la santé humaine. Parmi les substances chimiques hautement toxiques pour l'Homme ; les pesticides et les additifs alimentaires. C'est ainsi que La consommation d'aliments contaminés par ces derniers est nocive et plusieurs pays ont imposé des normes pour limiter leur présence dans les aliments [1].

La toxicité des pesticides et des additifs alimentaires peut entraîner des dommages sur le système nerveux central et perturber la composition du sang et par conséquent les poumons, les reins, le foie et d'autres organes vitaux seront dysfonctionnées [2].

La DJA est la quantité maximale de substance toxique qui peut être ingérée par un individu quotidiennement, pendant toute sa vie, sans provoquer de troubles physiologiques. Des organismes nationaux et internationaux comme le comité international mixte FAO-OMS, JECFA, AESA, AFSSA.....ont été spécialisés dans l'évaluation de l'innocuité des additifs alimentaires et des contaminants notamment les pesticides présents dans les aliments, et la fixation des doses de sécurité (DJA) d'une façon individuelle pour chaque substance, suite à des tests in-vivo sur des animaux [3].

Aujourd'hui, et avec le développement de la science et l'agriculture et aussi la technologie alimentaire, un grand nombre de pesticides et d'additifs alimentaires sont utilisés pour la culture et la transformation des aliments aux différents stades jusqu'à se retrouver à la fin dans l'assiette du consommateur. Ces substances peuvent être très toxiques à court, moyen et le plus souvent à long terme s'ils sont présents à des doses inférieures à la DJA [3].

La toxicité est chronique si elle réitérée pendant plus de 90 jours. Dans le cas d'une intoxication chronique, les expositions sont répétées sur de longues périodes, la manifestation de l'intoxication dépend des substances qui s'accumulent, et les interactions toxicologiques possibles entre ces substances : effet additif, potentialisation, synergie, action coactive et antagonisme [4].

Le psyllium est composé de minuscules graines, contenant des fibres solubles de type mucilage, ce sont des substances végétales qui gonflent au contact de l'eau en donnant un liquide visqueux. Le psyllium présente des vertus médicinales de par ses propriétés absorbantes et laxatifs dans le traitement de la constipation, la diarrhée, les maladies inflammatoires des intestins, la réduction des taux de cholestérol et de glucose sanguins et la prévention de la maladie coronarienne, il peut aussi absorber les substances toxiques présents dans le tube digestif [5].

Aussi, l'argile est considérée comme une particule minérale présentant des propriétés apaisantes et cicatrisantes. Elle dispose de nombreux bienfaits pour la santé. Elle a été utilisée pour la purification du sang, le traitement du cancer, des troubles cardio-vasculaires, de la constipation, de la désintoxication, la diarrhée, la dysenterie. L'argile possède entre autres une propriété intéressante : l'échange d'ions qui lui permet d'absorber des substances toxiques, l'argile par cette propriété capte les toxines et les rendant indisponibles pour l'absorption intestinale [6].

Sur ce dernier aspect, il est intéressant de constater les puissantes capacités du psyllium et l'argile à protéger les organes vitaux contre les agressions des molécules chimiques qui contaminent les aliments notamment les pesticides et additifs alimentaires

C'est dans ce contexte précis que s'inscrit la problématique liée à cette thèse qui consiste à étudier l'effet de certains contaminants sur la santé par évaluation des paramètres physico-chimiques et la toxicité potentielle par des tests in-vivo. Nous nous sommes intéressés à inscrire notre expérimentation dans un contexte visant à mieux connaître les différentes formes de la toxicité orale d'un mélange de pesticides et/ou additifs alimentaires en dose de DJA et DJAx2 et aussi de rechercher les effets protecteurs de psyllium et argile verte.

Par la suite, nous nous sommes attelés à :

- ✓ Contrôler et vérifier l'effet de la dose DJA de chaque pesticide et additif alimentaire et dans le cas de consommation chronique et en mélange avec d'autres pesticides et/ou additifs alimentaires.
- ✓ Evaluer et observer les différentes formes de toxicité chronique des pesticides et/ou additifs alimentaires et leur impact sur :
 - Le comportement et le développement du poids corporel des rats.
 - La microflore intestinale et le temps de transit digestif des rats.
 - Les paramètres biochimiques du sang des rats et les fonctions physiologiques des organes vitaux (foie et reins).
 - Les paramètres hématologiques et les éléments figurés du sang.
 - La structure histologique des organes vitaux des rats (foie, reins).
- ✓ Prouver que le psyllium et l'argile verte et même l'association argile-psyllium est dotée d'un pouvoir antitoxique et d'un effet protecteur envers la toxicité chronique des pesticides et/ou additifs alimentaires.

Ainsi ce manuscrit a été structuré comme suit :

En premier lieu, une synthèse bibliographique permettant de placer les connaissances de base et le contexte de ce présent travail.

Ensuite le matériel utilisé ainsi que les méthodes d'analyses adoptées ont été décrits.

Enfin, les résultats sont présentés suivis d'une conclusion générale et des perspectives pour la continuité dans cet axe de recherche.

CHAPITRE 1

LES PESTICIDES

1.1. Définition d'un pesticide

Selon le Code de conduite de la FAO sur la distribution et l'utilisation des pesticides (Version novembre 2002), « un pesticide est une substance ou association de substances destinées à repousser, détruire ou combattre les ravageurs, y compris les vecteurs de maladies humaines et animales, et les espèces indésirables de plantes ou d'animaux ».

D'un point de vue réglementaire, nous distinguons les pesticides utilisés principalement pour la protection des végétaux que nous appelons produits phytopharmaceutiques ou plus communément produits phytosanitaires [7].

De manière plus concise, les produits phytosanitaires, sont définis comme des substances dont les propriétés chimiques contribuent à la protection des plantes cultivées et des produits récoltés, ils améliorent ainsi à la fois la quantité et la qualité des denrées alimentaires. Leur composition et leur structure sont très variées, de sorte que leurs propriétés physiques, chimiques et biologiques le sont aussi, ce qui explique leurs multiples usages, leurs dangers, ainsi que les difficultés rencontrées pour décrire et prévoir leur devenir dans les sols [8].

1.2. Composition et formulation

Les produits phytosanitaires contiennent une ou plusieurs substances chimiques minérales ou organiques, synthétiques ou naturelles. Ceux utilisés aujourd'hui sont, la plupart, de nature organique dont un petit nombre est extrait ou dérivé des plantes. Les formulations sont généralement composées d'une ou plusieurs substances actives et d'un ou plusieurs adjuvants. La substance active exerce une action générale ou spécifique sur les organismes nuisibles ou sur les végétaux; c'est elle qui confère au produit l'effet désiré. L'adjuvant quant à lui est une substance dépourvue d'activité biologique jugée suffisante dans la pratique, mais capable de modifier des propriétés physiques, chimiques ou biologiques des produits phytosanitaires. Il renforce l'efficacité, la sécurité du produit et sa facilité d'utilisation [9].

La formulation correspond, aussi, à la forme physique sous laquelle le produit phytopharmaceutique est mis sur le marché. Obtenue par le mélange des

matières actives et des adjuvants, elle se présente sous une multitude de formes, solides ou liquides. La teneur en matière active s'exprime en g/l pour les formulations liquides et en pourcentage (%) pour les formulations solides. La dose d'emploi en produit commercial s'exprime en L/ha pour des formulations liquides et en kg/ha (ou parfois en g/ha) pour les formulations solides. La dose d'emploi en matière active s'exprime toujours en g/ha [10].

1.3. Classification des pesticides

Les pesticides disponibles aujourd'hui sur le marché sont caractérisés par une variété de structures chimiques, de groupes fonctionnels et d'activités biologiques qui rend leur classification complexe. D'une manière générale, les pesticides peuvent être classés de deux façons : selon les organismes vivants visés et selon leurs caractéristiques chimiques [11].

1.3.1. Classification chimique

Il existe trois catégories de pesticides :

- Les pesticides organiques

Il existe actuellement plus de 80 familles ou classes chimiques mais leurs appellations sont par fois arbitraires. Les principales familles chimiques de pesticides identifiés par des groupes d'atomes constituant une fonction chimique particulière sont : les acides carboxyliques, les amines, les carbamates, les thiocarbamates, les hétérocycles azotés, les azoles, les organophosphorés, les pyréthrinoides, les urées substituées, les sulfonilurées, les uraciles et les diphényleséther :

- A. Les organochlorés

Les organochlorés ont été les premiers insecticides organiques utilisés. Issus de l'industrie du chlore, ce sont pour la plupart des POPs (Polluants Organiques Persistants). Certains de ces produits, comme l'aldrine, le dieldrine et l'endrine, font partie des substances interdites par la Convention de Stockholm (22 mai 2001, cf. réglementation) [11].

Le DDT est le plus ancien organochloré commercialisé. Il a joué un rôle très important dans la lutte contre les vecteurs du typhus, de la malaria et du choléra. Il a cependant été interdit du fait de sa toxicité et de sa rémanence.

Le lindane, interdit en agriculture, est susceptible d'être transporté par les courants atmosphériques. On l'a ainsi retrouvé dans les glaces des régions arctiques. De plus, il s'accumule dans les graisses et y reste stocké pendant des années.

Pourtant, le lindane est toujours présent dans les rayons droguerie et les pharmacies (lotions antipoux, insecticides à usages ménagers) [12].

B. Les pyréthriinoïdes de synthèse

Les pyréthriinoïdes sont les insecticides les plus courants en usage domestique. Ce sont des molécules de synthèse copiées sur les principes actifs de la fleur de pyrèthre. Ils ont l'avantage d'être peu rémanents et peu toxiques pour les mammifères. C'est un groupe varié qui comprend des composés assez photolabiles (alléthrine, tétraméthrine et resméthrine) et des halogénés plus stables et plus persistants (perméthrine, deltaméthrine, fenvalérate et cyperméthrine).

Très peu volatils et très lipophiles, ils sont quasiment insolubles dans l'eau. Ils sont actifs longtemps (de 3 à 4 semaines, voire plus), sauf ceux qui s'altèrent à la lumière et en présence d'oxygène [13].

C. Les organophosphorés

Les insecticides organophosphorés sont la 2ème famille la plus représentée. Ce sont des substances de la génération précédant les pyréthriinoïdes. On les trouve donc dans des produits présents sur le marché depuis plus long temps. Ils ont en général une toxicité aiguë plus élevée que les organochlorés mais ils se dégradent beaucoup plus rapidement. En effet, contrairement aux pyréthriinoïdes, la plupart des composés sont peu rémanents dans l'environnement car ils sont hydrolysés rapidement (dégradation en quelques heures à quelques jours). Cependant, les aromatiques et les dérivés soufrés sont plus persistants. Ils ne s'accumulent pas dans les organismes vivants. Ils sont en général peu volatils, sauf le chlorpyrifos, le dichlorvos et le fenthion, et très lipophiles. Comme les organochlorés, ce sont des neurotoxiques [13].

D. Les carbamates

Les carbamates, et plus particulièrement les N-méthyl carbamates d'aryle, de formule générale $\text{CH}_3\text{-NH-CO-O-R}$ sont des insecticides puissants ; la première molécule, le dimétan, a été synthétisée par Ciba-Geigy en 1945, puis le carbaryl, toujours très utilisé, par Union Carbide en 1957. Les N-méthyl carbamates d'oxime, comme l'aldicarbe, sont également nématocides et miticides. La plupart

sont peu volatils et liposolubles (sauf le pirimicarbe, très hydrosoluble). Les principaux carbamates retrouvés dans les insecticides à usage domestique sont le carbaryl et le propoxur. Les carbamates sont principalement présents dans les aérosols anti-cafards et dans les colliers antiparasitaires pour chiens [13].

E. Les phénylpyrazolés (le fipronil)

Le fipronil est le principal membre de la famille des phénylpyrazolés. Il était utilisé en agriculture dans la protection des semences, mais sa probable toxicité pour les abeilles a conduit à son interdiction provisoire (suspension d'autorisation de commercialisation) en France depuis février 2004 pour les usages agricoles en vertu du principe de précaution. En revanche, il reste très utilisé pour la désinsectisation des locaux (lutte contre les cafards et blattes) et dans les produits antiparasitaires à usage vétérinaire [13].

▪ Les pesticides inorganiques

L'essentiel des pesticides inorganiques sont des fongicides à base de soufre et de cuivre [11]. Un seul herbicide est encore employé, aujourd'hui, comme désherbant total, le chlorate de sodium.

▪ Les pesticides organo-métalliques

Ce sont des fongicides dont la molécule est constituée par un complexe d'un métal tel que le zinc et le manganèse et d'un anion organique dithiocarbamate. Des exemples de ces pesticides sont le mancozèbe (avec le zinc) et le manèbe (avec le manganèse) [11].

1.3.2. Classification biologique

Selon les organismes vivants visés, nous distinguons plusieurs catégories de pesticides dont les principales sont les insecticides, les fongicides et les herbicides

▪ Les herbicides

Les herbicides représentent les pesticides les plus utilisés dans le monde, toutes cultures confondues.

Ils sont destinés à éliminer les végétaux rentrant en concurrence avec les plantes à protéger en ralentissant leur croissance. Les herbicides possèdent différents modes d'action sur les plantes, ils peuvent être des perturbateurs de la régulation d'une hormone de croissance telle que l'auxine, de la photosynthèse, des inhibiteurs de la division cellulaire, de la synthèse des lipides, de la cellulose ou des acides aminés [14].

▪ Les fongicides

Les fongicides permettent quant à eux d'éliminer ou limiter le développement des champignons parasites des végétaux. Ils peuvent agir différemment sur ces organismes, soit en inhibant le système respiratoire ou la division cellulaire, soit en perturbant la biosynthèse des stérols, de l'ARN polymérase ou de l'adénosine désaminase [14].

▪ Les insecticides

Les insecticides sont utilisés pour la protection des plantes contre les insectes. Ils interviennent en les éliminant ou en empêchant leur reproduction, différents types existent : les neurotoxines, les insecticides agissant sur la respiration et les insecticides interférant sur la mise en place de la cuticule. Outre, ces trois familles mentionnées ci-dessus, d'autres peuvent être citées en exemple : les acaricides, contre les acariens ; les némantocides, contre les vers du groupe de nématodes ; les rodenticides, contre les rongeurs ; les taupicides, contre les taupes ; les molluscicides, contre les limaces et escargots ou encore les corvicides et corvifuges, respectivement contre les corbeaux et les autres oiseaux ravageurs de culture [15].

1.4. Résidus et indices toxicologiques

1.4.1. Délai avant récolte (DAR)

C'est la durée minimale qui doit séparer la date du traitement de la date de récolte. Elle est fixée par les décisions d'AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) [16].

1.4.2. Résidus de pesticides

Toute substance déterminée présente dans les aliments, les denrées agricoles ou les produits pour l'alimentation animale à la suite de l'utilisation d'un pesticide. Ce terme englobe tous les dérivés d'un pesticide, tels que les produits de conversion et de réaction, les métabolites et les impuretés que l'on considère comme ayant une importance sur le plan toxicologique [17].

1.4.3. La limite maximale de résidus (LMR)

La concentration maximale du résidu d'un pesticide (exprimée en mg/kg) autorisée dans ou sur des produits alimentaires ou des aliments pour animaux. Les limites maximales de résidus (LMR) sont fondées sur des données concernant les

bonnes pratiques agricoles (BPA), et les aliments obtenus à partir des produits qui répondent aux limites maximales de résidus applicables sont réputés acceptables sur le plan toxicologique [17].

1.4.4. Détermination de la dose létale 50 (DL₅₀)

La DL₅₀ est la dose qui donnée en une seule fois provoque dans un délai de 14 jours la mort de la moitié de la population animale (en mg/Kg de poids corporel) [18].

1.4.5. Détermination de la dose sans effet observable (DSEO)

La DSEO est la quantité maximale de substance toxique qui peut être ingérée par un animal quotidiennement, pendant toute sa vie, sans provoquer de troubles physiologiques (en mg/Kg de poids corporel) [18].

1.4.6. Etablissement de la dose journalière admissible (DJA)

Elle est calculée à partir de la DSEO.

DJA humaine = DSEO / 100 (en mg/Kg de poids corporel)

Un facteur x 10 = facteur spécifique : on suppose que l'espèce humaine est 10 fois plus sensible que l'espèce animale testée la plus sensible.

Un facteur x 10 = facteur de sécurité individuel : dans un groupe humain, tous les individus n'ont pas la même sensibilité; certains peuvent être 10 fois plus sensibles que la moyenne (enfants, femmes enceintes, personnes âgées,...) [1](Figure 1.1).

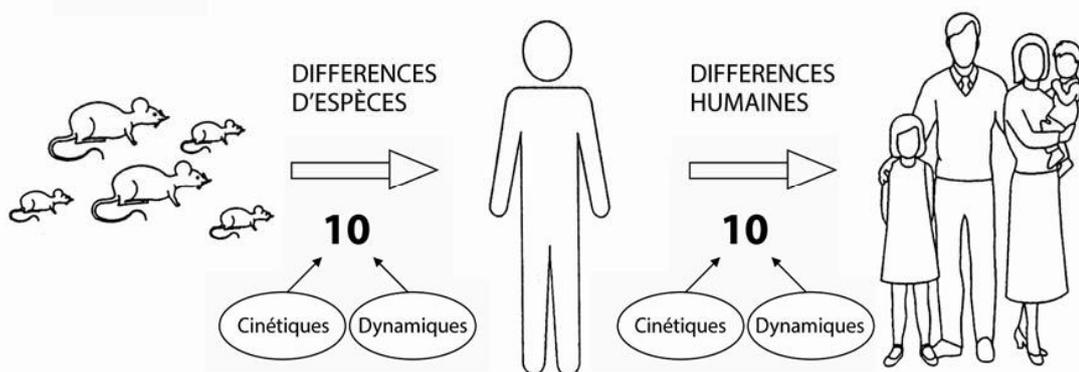


Figure 1.1 : Variations du facteur de sécurité entre les espèces et les individus [1].

1.5. Caractéristiques toxicologiques des pesticides

Aucun pesticide n'est spécifique d'un nuisible ou d'une adventice mais tous sont écotoxiques : leurs modes d'action très différents conduisent à des effets très variés sur l'environnement mais également chez les vertébrés dont la population humaine. Les classifications utilisées pour les produits chimiques s'appliquent aux pesticides. Ces classifications reposent sur les propriétés toxicologiques des produits concernés [19].

Les classifications présentées ci-après sont notamment celles de l'OMS et du CIRC (Centre international de recherche sur le cancer), de l'US EPA (United States Environmental Protection Agency), de l'Union Européenne, de l'INERIS (Institut national de l'environnement industriel et des risques), d'AGRITOX et du PAN (Pesticide action network).

La classification des produits chimiques, dont les pesticides, mise en place par l'OMS est présentée ci-dessous [19]. Cette classification repose sur les catégories de dangerosité toxique aiguë par voie orale et cutanée définies par le SGH (Système général harmonisé). Cette classification présente cinq niveaux de dangerosité, indiqués dans le tableau 1.1.

Tableau 1.1 : Catégories de menace présentée par un produit selon l'OMS [19].

Niveau de classification	Classement	DL ₅₀ pour le rat (mg/kg)	
		Voie orale	Voie cutanée
Ia	Extrêmement dangereux (ED)	< 5	< 50
Ib	Fortement dangereux (FD)	5 – 50	50 – 200
II	Modérément dangereux (MD)	50 – 2000	200 – 2 000
III	Légèrement dangereux (LD)	> 2000	
U	Non connu comme présentant Un danger aigu (ND)	5 000 ou plus	

Parmi les effets des pesticides sur la santé humaine suspectés figurent les cancers. A ce titre, le CIRC structure dépendant de l’OMS, a réalisé des monographies à partir des données de la littérature. Les différents niveaux de la classification établie par le CIRC des produits chimiques, dont les pesticides, selon leur cancérogénicité, sont présentés dans le tableau 1.2 suivant.

Tableau 1.2 : Groupes de classification des cancérigènes par le CIRC [20].

Groupe de classification	Intitulé du groupe
1A	Cancérogènes
2A	Probablement cancérogènes
2B	Possiblement cancérigènes
3	Inclassifiables
4	Probablement non cancérogènes

L’INERIS propose également une classification de la toxicité des produits chimiques, dont les pesticides, dans la base de données SIRIS (système d’intégration des risques par interaction des scores pour les pesticides) accessible sur Internet. Les cinq classes de toxicité proposées par l’INERIS sont présentées dans le tableau 1.3 suivant.

Tableau 1.3 : Classes de toxicité établies par l’INERIS [20].

Classes de toxicité	Limites de toxicité des classes selon la DJA (mg/kg)
A	DJA < 0,0001
B	0,0001 < DJA < 0,001
C	0,001 < DJA < 0,01
D	0,01 < DJA < 0,1
E	0,1 < DJA

La classe la plus toxique est notée A ; la classe la moins toxique est notée E.

L’US EPA propose une classification de la toxicité des produits chimiques, dont les pesticides, disponible en ligne. Les cinq classes de toxicité proposées par l’US EPA sont présentées dans le tableau 1.4 suivant.

Tableau 1.4 : Classes de toxicité établies par l'US EPA [20].

Classes	Caractère cancérigène
A	Cancérigène
B	Probablement cancérigène
C	Éléments de preuve suggérant la cancérigénicité mais insuffisants pour évaluer le potentiel carcinogène
D	Données insuffisantes pour évaluer le potentiel carcinogène
E	Probablement non cancérigène

1.6. Les voies d'exposition aux pesticides

1.6.1. L'exposition professionnelle aux pesticides

Les expositions professionnelles aux pesticides surviennent lors de la fabrication des pesticides, préparation et utilisation, notamment en aspersion.

Ainsi, une étude a permis de constater que l'emploi de tenues de protection n'évite pas la contamination cutanée des agriculteurs, notamment de leurs mains, en particulier lors de la préparation de la solution de pesticides aspersée [21].

Malgré les limites liées aux modalités de recueil des informations la constituant, la base de données européenne CAREX (carcinogen exposure) indique que 32 millions de travailleurs de 15 pays d'Europe, soit 23 % de l'ensemble des travailleurs, sont exposés à des carcinogènes, dont 6 millions en France, entre 1990 et 1993 [22].

1.6.2. Présence de pesticides dans l'environnement et l'alimentation

Les usages de pesticides sont multiples et variés. Principalement destinés à l'agriculture, les pesticides sont également utilisés pour le désherbage des accotements des voies de communication (routières et ferroviaires), des zones industrielles, l'entretien et le traitement des jardins et potagers individuels, des terrains de sport, des espaces verts, lors de soins vétérinaires d'animaux domestiques et d'élevage, mais également pour traiter le bois des exploitations forestières et des habitations, et, dans certains revêtements muraux et de sol, pour prévenir l'apparition de moisissures dans l'habitat [23,20].

Des caractéristiques physicochimiques variées, des modes et des conditions d'application divers, les pesticides et leurs résidus. Il s'agit donc de la substance initiale, de ses métabolites, des coformulants et adjuvants utilisés dans la formulation commercialisée.) Peuvent contaminer et polluer tous les milieux : l'eau, l'air (extérieur et intérieur), le sol, les aliments. Dans le cas de leur utilisation agricole, il est possible de considérer que les pesticides passent d'un compartiment à un autre selon le schéma dans la figure 1.1 suivante. L'exposition humaine passe donc par l'eau de consommation, les aliments, l'air extérieur, l'air intérieur, les poussières [20, 22, 24]. Selon les pesticides et les modalités de leur épandage, une fraction seulement des pesticides épandus par voie aérienne atteint leurs cibles agricoles. Entre 30 et 99 % des quantités utilisées contaminent ainsi l'eau, l'air ou le sol [25].

1.7. Réglementation des pesticides

1.7.1. Réglementation internationale

Les résidus de pesticides dans les denrées alimentaires sont régis par quatre directives du Conseil :

- Directive 76/895/CEE (concernant la fixation des teneurs maximales pour les résidus de pesticides sur et dans les fruits et légumes) ;
- Directive 86/362/CEE (concernant la fixation des teneurs maximales pour les résidus de pesticides sur et dans les céréales) ;
- Directive 86/363/CEE (concernant la fixation des teneurs maximales pour les résidus de pesticides sur ou dans les produits d'origine animale)
- Directive 90/642/CE (concernant la fixation des teneurs maximales pour les résidus de pesticides sur ou dans certains produits d'origine végétale, y compris les fruits et légumes).

Le 23 février 2005, le Parlement Européen et le Conseil ont adopté le règlement 396/2005 sur les limites maximales de résidus pour les produits phytosanitaires. Ce texte porte sur la mise en place d'un cadre de travail coordonné au niveau européen avec la fixation des LMR par l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (AESAs). Il est rentré en pleine application le 1er septembre 2008.

Ces teneurs sont définies au terme d'une évaluation des risques éventuels encourus par les consommateurs des différentes catégories d'âge et elles ne sont fixées que lorsqu'elles sont considérées comme sûres. Ces teneurs sont destinées

à faciliter les échanges ; il ne s'agit pas de limites toxicologiques. Le dépassement d'une teneur maximale dénote davantage une utilisation incorrecte d'un pesticide qu'un risque pour les consommateurs. Cependant, chaque dépassement fait l'objet d'une surveillance, d'une évaluation et d'une notification rigoureuse aux autorités des Etats membres par le biais du système d'alerte rapide pour les denrées alimentaires lorsqu'il existe un risque potentiel pour les consommateurs. Au niveau international, le code de la sante publique (CSP) édicte les dispositions réglementaires en matière d'eau potable, en application des directives européennes 98/83/CE et 75/440/CEE. Pour les pesticides, les limites de qualités sont fixées dans les eaux brutes et dans l'eau au robinet du consommateur. [26, 27].

1.7.2. Réglementation Algérienne

Au niveau national, les produits phytosanitaires à usage agricole sont régis par des lois et des décrets et notamment :

- Loi N° 87-17 du 1er Août 1987 relative à la protection phytosanitaire réglementant les activités de fabrication, d'importation, de commercialisation et d'utilisation des substances et préparations phytosanitaires (Art.33 à Art.52). Au terme de la loi, aucun produit phytosanitaire ne peut être commercialisé, importé ou fabriqué s'il n'a pas fait l'objet d'une homologation [16].
 - Décret exécutif N° 95 -405 du 2 décembre 1995 du J.O n° 75 du 06/12/1995 relatif au contrôle des produits phytosanitaires à usage agricole : Décrit les contrôles des produits phytosanitaires à usage agricole et les conditions d'homologation, de fabrication, de commercialisation, d'utilisation et de la commission des produits phytosanitaires [28].
 - Décret exécutif N° 99 -156 du 20 juillet 1999 modifiant et complétant le décret exécutif N° 95 -405 du 2 décembre 1995 [16].
 - Arrêté du 13 mars 2000 : Définit le contenu des mentions et indications d'emballage des produits phytosanitaires à usage agricole [16].
 - Décret exécutif N° 10-69 du 31/01/2010 fixant les mesures applicables lors de l'importation et l'exportation des produits phytosanitaires à usage agricole [16].
- L'encadrement des produits phytosanitaires au niveau national est complété par un recueil des matières actives homologuées en Algérie : L'index des produits phytosanitaires à usage agricole. Elaboré par le Ministère de l'agriculture, du

développement rural et de la pêche/Direction de la protection des végétaux et des contrôles techniques [16].

Environ 223 matières actives (insecticides, fongicides et herbicides) homologuées et commercialisées sous 686 spécialités commerciales. Le décret exécutif n°95-405 correspondant au 02/12/1995 relatif au contrôle des produits phytosanitaires à usage agricole et notamment dans son article n°23, stipule que les produits importés sont contrôlés par des analyses en vue de vérifier leur conformité aux spécifications pour lesquelles ils ont été homologués. L'homologation des produits phytosanitaires a été instituée en Algérie par ce décret exécutif [16].

Pour chaque matière active homologuée, sont indiquées : le nom de la spécialité commerciale, la concentration, le type de formulation, le nuisible ciblé, le type de culture pour lequel le produit est autorisé, les doses d'utilisation, le délai avant récolte.... [16].

- Décret exécutif n°05-67 du 30 janvier 2005 portant création du comité national du codex alimentarius et fixant ses missions et son organisation [29].

Il est important de souligner que les LMR relatives aux denrées alimentaires ne figurent pour aucune matière active.

- Décret exécutif n° 14-366 du 15 décembre 2014 fixant les conditions et les modalités applicables en matière de contaminants tolérés dans les denrées alimentaires (JORA N°74 du 25/12/2014) qui a pour objet de fixer les conditions et les modalités applicables en matière de contaminants tolérés dans les denrées alimentaires, mais il donne des notions générales et il ne fixe pas les types de pesticides ni les valeurs de LMR pour chaque groupe d'aliments car il n'y a pas jusqu'aujourd'hui l'arrêté ministériel qui fixe les LMR par le ministère du commerce [17].

- La qualité de l'eau de consommation humaine au niveau national, est encadrée par des textes et notamment le JORA n°13 du 9/03/2014 qui précise les valeurs limites des paramètres de qualité de l'eau de consommation humaine avec, pour les pesticides, des valeurs par substance individualisée et une valeur limite pour les pesticides totaux [30].

1.8. Effets des pesticides sur la santé

1.8.1. Toxicité aiguë (ou à court terme)

Elle se manifeste généralement immédiatement ou peu de temps (quelques minutes, heures ou jours) après une exposition unique ou de courte durée à un pesticide. Les cas d'intoxication aiguë par les pesticides représentent une morbidité et une mortalité conséquentes dans l'ensemble du monde. Les pays en développement sont particulièrement vulnérables en raison d'un manque de réglementation, de systèmes de surveillance, d'application des règles et de formation et d'une insuffisance de l'accès aux systèmes d'information. Des études antérieures ont mis en évidence une grande variabilité des taux d'incidence de ces intoxications aiguës. Le nombre d'empoisonnements par les pesticides est estimé à trois millions de cas tous les ans avec environ 220000 décès. 95% d'empoisonnements mortels par les pesticides se produisent dans les pays en voie de développement [31, 32].

1.8.2. La toxicité chronique

Survient suite à l'absorption répétée de faibles doses de pesticides. Le délai avant l'apparition de symptômes ou d'une maladie peut être très long. Dans certains cas, il peut être de plusieurs années. Les effets chroniques des pesticides sur la santé sont typiquement le cancer. D'autres effets ont été observés chez les mammifères tels que la perturbation du développement du fœtus et le dérèglement des systèmes reproducteurs, endocriniens, immunitaires et/ou nerveux central.

Des études épidémiologiques ont aussi soulevé la possibilité de problèmes hépatiques, rénaux, immunologiques, cardio-vasculaires, endocriniens, respiratoires, hématologiques, oculaires, gastro-intestinaux ainsi que des modifications du comportement. Ces effets sont observés après plusieurs mois ou plusieurs années d'exposition. Certaines études ont associé l'apparition de certaines formes de cancers (leucémie, lymphomes non-hodgkiniens et cancer des poumons) à l'utilisation des organophosphorés [33 - 35].

Les effets toxiques et les mécanismes d'actions des pesticides sur la cellule sont présentés dans la figure 1.2.

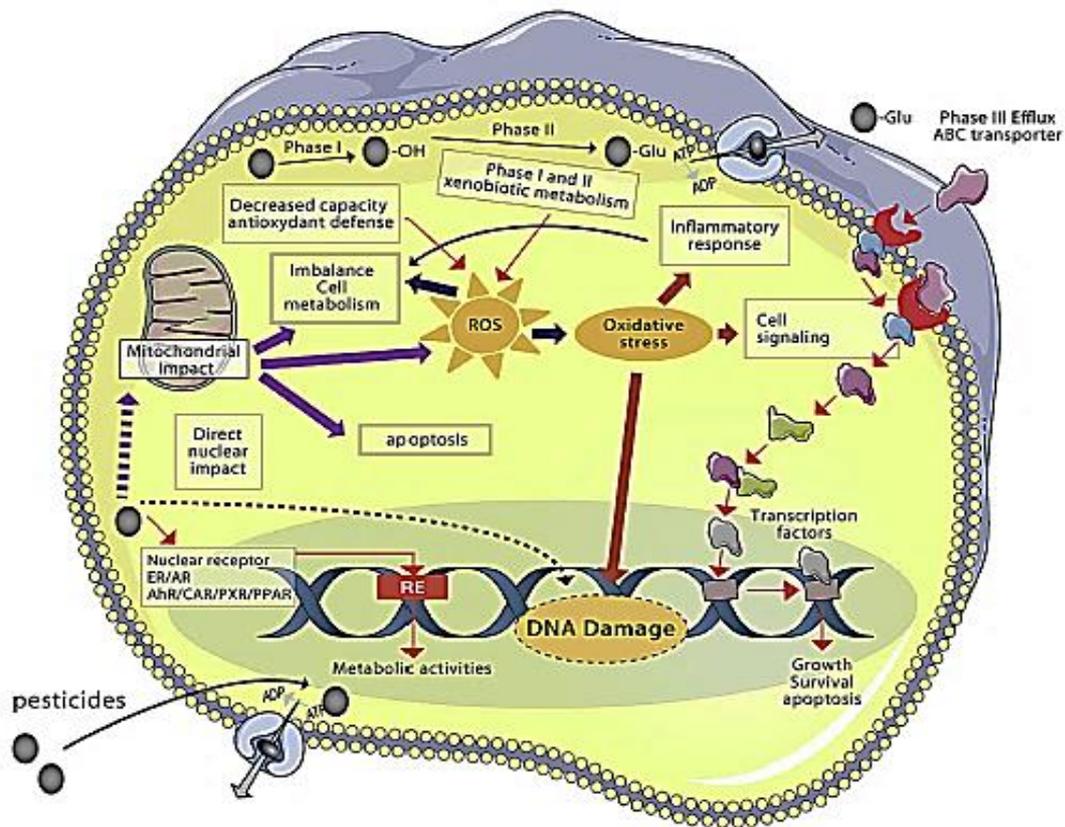


Figure 1.2 : Effets toxique et mode d'action des pesticides sur la cellule [36].

- Certains pesticides peuvent se lier à ou réguler l'activité des transporteurs ABC ou des enzymes d'efflux impliqué dans le métabolisme des xénobiotiques.
- Certains pesticides sont connus pour induire directement Dommages à l'ADN.
- Exercent des effets spécifiques sur certains processus cellulaires et/ou protéines clés impliquées dans la régulation du métabolisme général, la croissance cellulaire, différenciation et survie.
- En effet, les pesticides individuels peuvent interférer avec les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale ou altérer la phosphorylation oxydative et induire un dysfonctionnement mitochondrial, conduisant à l'apoptose.
- Les pesticides individuels sont également connus pour induire la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) en diminuant la capacité antioxydante
- De plus, certains pesticides sont connus pour se lier à ou activer des récepteurs nucléaires impliqués dans la régulation du métabolisme général ou énergétique [36].

CHAPITRE 2

LES ADDITIFS ALIMENTAIRES

2.1. Définitions

2.1.1. Les Additifs alimentaires

Selon le codex Alimentarius, un additif alimentaire est toute substance (naturelle ou synthétique) qui n'est pas normalement consommée en tant que denrée alimentaire, ni ingrédient d'une denrée alimentaire. Il est ajouté aux aliments dans un but technologique ou organoleptique aux différentes étapes de la fabrication, transformation, préparation, traitement, conditionnement et emballage. Cette expression ne s'applique ni aux contaminants, ni aux substances ajoutées aux denrées alimentaires pour en préserver ou en améliorer les propriétés nutritionnelles [37].

2.1.2. Les auxiliaires technologiques

Ce sont des substances utilisées par l'industrie agro-alimentaire dans le processus de la préparation ou la transformation d'aliments. Utilisés pour permettre, faciliter ou optimiser une étape de la fabrication d'un aliment, ils n'en constituent pas un ingrédient. Ils peuvent rester des résidus techniquement inévitables. Comme : Agents décolorants, Résine échangeuse d'ions, Agents de congélation par contact (azote liquide), Enzymes, Solvants d'extraction des huiles.....[37].

2.1.3. Les arômes

Les arômes ne sont pas classés parmi les additifs alimentaires. Ce sont des substances aromatisantes naturelles (végétale, animale), ou synthétiques, et ne sont pas consommés en tant que tels, mais sont introduits dans les aliments de manière à leur conférer une odeur et/ou un goût particulier [37].

2.2. Classification des additifs alimentaire

2.2.1. Selon l'origine

Les additifs alimentaires ont des origines variées, on distingue :

2.2.1.1. Les additifs alimentaires naturels : Ce sont des extraits de substances animales ou végétales existant dans la nature (extraits d'arbres, d'algue, de graines, de fruits, de légumes, etc...). Ainsi le Curcumine (E100), un colorant naturel de couleur jaune orangé extrait de racines de *Curcuma longa* et utilisé pour colorer les aliments (glaces, yaourts et produits de confiserie) [38].

2.2.1.2. Les additifs alimentaires obtenus par modification de produits naturels :

Ce sont des additifs obtenus par modification chimique d'un extrait naturel d'une substance animale ou végétale dans le but d'améliorer ses propriétés comme l'amidon modifié [38].

2.2.1.3. Les additifs alimentaires synthétiques : lorsque l'extraction des substances naturelles est coûteuse, ces dernières peuvent être reconstituées par synthèse chimique on distingue aussi les additifs artificiels identiques aux naturels [38].

2.2.2. Selon la technologie

Les numéros E et SIN sont des codes numériques pour les additifs alimentaires. Les additifs sont classés théoriquement selon leur catégorie, si bien que de plus en plus d'additifs se retrouvent classés dans une catégorie qui ne reflète pas leur première fonction.

2.2.2.1. Selon la Communauté Européenne : Il a été établi par la directive européenne 89/107/CEE avec 25 catégories et un code a été utilisé au niveau européen, il se compose de la lettre (E) suivie d'un numéro permettant d'identifier facilement la catégorie (Exxx) allant de E100 à E1520 Directive du parlement européen [39].

2.2.2.2. Selon le Codex Alimentarius : il s'agit du Système International de Numérotation (SIN ou INS); il a été mis au point par (Codex Comite of Food Additive CCFA) en vue de fournir un système numérique, internationalement reconnu, permettant l'identification des additifs alimentaires et entre autres, les colorants alimentaires dans la liste d'ingrédients [40].

2.2.2.3. Selon la réglementation Algérienne : la liste Algérienne des additifs alimentaires, fixée par l'arrête interministériel du 14 février 2012 paru au journal

officiel Algérien N°31, est plus restreinte par rapport à celle de la CEE ou du codex. Elle ne contient que 13 catégories : colorants, conservateurs, anti oxygènes, épaississants-gélifiants, épaississants-émulsifiants, acidifiants, correcteurs d'acidité, stabilisants, antiagglomérants, exhausteurs de goût, agents d'enrobage, sels de fonte, poudres pour lever et l'édulcorants [41].

La Classification des additifs alimentaires selon leurs catégories, fonctionnement dans l'aliment et leurs codes (SIN) est représenté dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1 : Catégories d'additifs alimentaires [41].

Code	Catégorie	Fonctionnement
De SIN 100 à SIN180	Colorants	Intensifier ou donner une couleur.
De SIN 200 à SIN 285	Conservateur	Allonger la durée de conservation en inhibant le développement des bactéries ou des moisissures.
De SIN 300 à SIN 321	Antioxydants	Limiter les phénomènes d'oxydation (rancissement des graisses ou brunissement des fruits et légumes coupés).
De SIN 325 à SIN 380	Acidifiants	Agir sur le degré d'acidité.
De SIN 400 à SIN 495	Agents de texture :(épaississant, stabilisant, émulsifiant, gélifiant, Moussant, Antiagglomérant)	Donner une consistance particulière.
De SIN 500 à SIN 585	Comprenant des poudres à lever, l'acide chlorhydrique, sulfurique, des phosphates....	Remplir des rôles variés.
De SIN 620 à SIN 650	Exhausteurs de goût	Renforcer ou améliorer le goût d'un aliment par une action sur l'intensité de notre perception gustative.
De SIN 900àSIN914	Agents d'enrobage	Donner un aspect externe particulier) aspect brillant ou couche protectrice).
De SIN 938 à SIN 949	Gaz d'emballage /gaz propulseurs	Allonger la durée de conservation des aliments.
De SIN 950 à SIN 968	Édulcorants	Conférer une saveur sucrée.
De SIN 1100 à SIN1105	Enzymes alimentaires	Faciliter la fabrication de certains produits alimentaire.

2.3. Intérêt des additifs alimentaires dans les industries agroalimentaires

Les additifs sont des « ingrédients à but technologique » c'est à dire qu'ils jouent un rôle dans la recette pour une quantité d'additif spécifique.

Pour pouvoir être utilisés, les additifs doivent avoir déjà démontré leur innocuité et leur utilisation doit être loyalement communiquée aux consommateurs. Mais en plus, les additifs doivent démontrer un effet technologique suffisant « ne pouvant être obtenu par d'autres méthodes économiquement utilisables » [37].

Le besoin technologique peut être de plusieurs ordres :

- ✓ La conservation de la qualité nutritive de l'aliment.
- ✓ L'amélioration de ses qualités organoleptiques (texture, goût, etc.).
- ✓ L'aide à la préparation de la denrée industrielle.

2.3.1. Intérêt technologique

La grande diversité des additifs alimentaires présente un double intérêt : le premier est d'avoir un choix pour une même fonctionnalité, en fonction des paramètres tels que pH, activité de l'eau, etc. le seconde est de pouvoir utiliser différents additifs en synergie, et donc, de n'utiliser que la quantité optimale [37].

2.3.2. Amélioration de la conservation

Les aliments sont tous d'origine biologique et donc, fragilisés à la fois par des phénomènes extérieurs (température, oxygène, contaminations microbiennes....) ou interne (actions des enzymes, etc.) un des plus grand risques est la contamination microbiologique suivie d'une production de toxines très dangereuse, comme la toxine botulique induisant le botulisme, comme l'aflatoxine ou la patuline, etc.

Les aliments vont devenir peu à peu impropres à la consommation humaine si ces phénomènes ne sont pas empêchés ou inhibés. L'amélioration de la conservation inclut trois propriétés des aliments qui doivent être préservées : la qualité sanitaire, nutritionnelle et organoleptique (texture, odeur, saveur, couleur) [37].

2.3.3. Rôle d'améliorer ou de maintenir la qualité organoleptique

Le monde des additifs est aujourd'hui considéré comme des denrées très précieuses et onéreuses permettant de maintenir ou améliorer les qualités sensorielles des aliments : la consistance, la texture, la couleur,etc [42].

2.3.4. Amélioration de la valeur nutritionnelle

La connaissance de la composition nutritionnelle des aliments et préparations alimentaires a permis de développer des solutions pour améliorer le statut des produits proposés aux consommateurs : nutriments, micronutriments, substances à intérêt nutritionnel peuvent être ajoutés aux aliments, soit dans le but d'une restauration, soit d'un enrichissement. Réglementairement, ces additions de nutriments ne sont pas considérées dans les additifs.

En effet, certains nutriments sont très fragiles et sensibles à la température, à la lumière, à l'action d'oxydants. Ils nécessitent des agents protecteurs spécifiques, ou une conservation afin que le produit final puisse avoir les mêmes caractéristiques nutritionnelles que l'aliment source [37].

2.3.5. Rôle hygiénique ou sanitaire :

L'amélioration de la conservation des aliments se fait généralement par l'emploi des conservateurs et antioxydants qui sont très importants pour empêcher la prolifération des bactéries ou des moisissures qui peuvent être à l'origine de contamination par des substances toxiques et même cancérigènes [43].

2.3.6. Rôle économique :

Afin de prévenir les détériorations des aliments ou de faciliter ou de prolonger le transport [43].

2.4. Indices toxicologiques des additifs alimentaires

Les doses de références et les indices toxicologiques essentiels pour les additifs alimentaires sont la dose sans effet observable (DSEO) et la dose journalière admissible (DJA) qui a été déjà expliqués dans le chapitre 1, et en plus nous pouvons citer :

1.4.1. Limites maximales d'utilisation pour les additifs alimentaires

L'établissement de limites maximales pour les additifs alimentaires dans les différents groupes d'aliments vise essentiellement à garantir que la quantité d'additifs ingérés, toutes sources confondues, ne dépasse pas la dose journalière admissible (DJA). Les additifs alimentaires visés par la présente norme et les limites maximales correspondantes sont fondés en partie sur les dispositions relatives aux additifs alimentaires de normes Codex des produits établies antérieurement ou sur les résultats d'une analyse effectuée à la demande des

gouvernements visant à vérifier qu'une limite maximale d'utilisation proposée est compatible avec la DJA [44].

2.4.2. Bonnes pratiques de fabrication (BPF)

Tous les additifs alimentaires visés par les dispositions de la présente norme doivent être utilisés conformément aux bonnes pratiques de fabrication, ce qui signifie que :

- ✓ La quantité d'additif ajoutée à l'aliment ne dépasse pas celle raisonnablement nécessaire pour obtenir l'effet désiré dans l'aliment.
- ✓ La quantité d'un additif qui, par la suite de son utilisation au cours des opérations de fabrication, de transformation ou d'emballage, devient un constituant de l'aliment et qui n'est pas destiné à produire un effet physique ou tout autre effet technologique dans l'aliment lui-même, est réduite dans toute la mesure raisonnablement possible.
- ✓ L'additif est de qualité alimentaire appropriée et il est préparé et manipulé comme un ingrédient alimentaire [45].

2.5. Réglementation des additifs alimentaires

2.5.1. Réglementation internationale

2.5.1.1. Réglementation de l'Union Européenne

- ✓ La directive 95/31/CE de la Commission du 5 juillet 1995 établissant des critères de pureté spécifiques pour les édulcorants pouvant être utilisés dans les denrées alimentaires [46].
- ✓ La directive 95/45/CE de la Commission du 26 juillet 1995 établissant des critères de pureté spécifiques pour les colorants pouvant être utilisés dans les denrées alimentaires [47].
- ✓ La directive 96/77/CE de la Commission du 2 décembre 1996 portant établissement de critères de pureté spécifiques pour les additifs alimentaires autres que les colorants et les édulcorants [48].
- ✓ le règlement (CE) N° 1331/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 établissant une procédure d'autorisation uniforme pour les additifs, enzymes et arômes alimentaires et les conditions d'utilisation des

additifs alimentaires dans les denrées alimentaires, y compris les additifs alimentaires et les enzymes alimentaires, visées par le règlement (CE) N° 1332/2008 et les arômes alimentaires visés par le règlement (CE) N° 1334/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif aux arômes alimentaires et à certains ingrédients alimentaires possédant des propriétés aromatisants qui sont destinés à être utilisés dans et sur les denrées alimentaires [49].

- ✓ le règlement (CE) N°1332/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 sur les enzymes alimentaires relatif aux règles concernant l'étiquetage des additifs alimentaires commercialisés en tant que tels [49].
- ✓ Le règlement (CE) N°1333/2008 du parlement européen et du conseil du 16 décembre 2008 sur les additifs alimentaires (Journal officiel de l'Union européenne) [49].

2.5.1.2. Réglementation du Codex Alimentarius

- ✓ Codex Alimentarius : FAO/ OMS, Norme générale pour les additifs alimentaires, CODEX STAN 192-1995, adopté en 1995. Révision 1997, 1999, 2001, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019[50].
- ✓ Codex Alimentarius : FAO/ OMS, norme générale codex pour l'étiquetage des additifs alimentaires vendus en tant que tels, CODEX STAN 107-1981[51].

2.5.2. Réglementation Algérienne

Le décret exécutif N°12-214 du 15 Mai 2012 ; fixe les conditions d'utilisation des additifs alimentaires, en 20 articles et 3 annexes, sont fondés sur la directive du codex alimentaire relative aux additifs alimentaires :

- Annexe I : liste des additifs autorisés dans les denrées alimentaires ;
- Annexe II : liste des catégories d'aliments ;
- Annexe III : liste des additifs pouvant être incorporés dans les denrées alimentaires ainsi que leurs limites maximales autorisées.

Les conditions d'utilisation des additifs alimentaires, en plus de celles mentionnées par la commission du codex alimentaires s'ajoutent : seuls les

additifs alimentaires Halal peuvent être incorporés dans les denrées alimentaires [41].

Le consommateur est informé via l'emballage du produit alimentaire, de l'emploi éventuel d'un additif alimentaire avec indication de son nom et de sa fonction principale dans le produit fini. Le nom spécifique et/ou son numéro du système international de numérotation (SIN) et sa fonction technologique par exemple : La curcumine (SIN 100), ou la curcumine (colorant), lorsque deux additifs alimentaires ou plus sont présents, ils seront énumérés par ordre décroissant selon leur masse par rapport au contenu total de l'aliment.

Les mentions suivantes doivent figurer sur les emballages : « produit édulcoré sans sucres ajoutés » ou « produit édulcoré partiellement sucré » à la suite de la dénomination de vente du produit « déconseillé aux enfants » dans le cas d'utilisation des édulcorants « déconseillé aux individus allergiques et/ou présentant une intolérance aux additifs alimentaires » [41].

2.6. Toxicité des additifs alimentaires

2.6.1. Evaluation des risques liés aux additifs alimentaires

Toutes les molécules introduites intentionnellement dans un aliment sont soumises à une autorisation par les gestionnaires du risque. Elles font l'objet au préalable d'une évaluation du risque toxicologique qui se divise en quatre étapes : identification du danger, sa caractérisation, évaluation de l'exposition du consommateur, et caractérisation du risque. Les additifs alimentaires présentent en tant que risques alimentaires :

- 1) Le « screening » des additifs alimentaires par la méthode de budget réalisé par le comité du Codex sur les additifs alimentaires et les contaminants (CCFAC) a permis d'identifier un certain nombre d'additifs alimentaires pouvant constituer des risques alimentaires potentiels et par la suite nécessitent une évaluation plus détaillée de l'exposition. L'inclusion des estimations nationales de la proportion d'aliments qui pourraient contenir les additifs identifiés dans les calculs réalisés par la méthode de budget a résulté en la même conclusion.
- 2) Les résultats des évaluations nationales de l'exposition étaient variables pour un même additif en fonction de la nature du comportement alimentaire des

groupes de populations étudiés et des taux d'additifs alimentaires utilisés dans ces évaluations.

- 3) Des dépassements des Doses Journalières Admissibles (DJA) établies par les comités internationaux ont été observés lorsque les additifs alimentaires ont été assumés (ou trouvés) d'être présents à des taux élevés [1].
- 4) Le potentiel de dépassement des DJA établies pour les additifs alimentaires existe pour un certain groupe de consommateurs tels que les forts consommateurs. Cependant les données disponibles étaient insuffisantes pour estimer la nature (enfants, adultes....) et le nombre de ces consommateurs ni l'intensité et la durée des expositions dépassant les DJA.
- 5) Les aliments qui sont les contributeurs majeurs des expositions aux additifs alimentaires sont connus d'être variables entre les populations [1].

2.6.2. Toxicité et effet cocktail des additifs alimentaires

Ce que l'on appelle "effet cocktail des additifs", n'est autre que les risques potentiels liés à l'ingestion simultanée d'additifs dans notre organisme. Plusieurs dizaines d'additifs différents, présents dans les aliments transformés industriellement mais aussi dans des produits bruts comme le beurre, le lait cru ou le pain.

Les effets combinés de ces substances ingérées simultanément sont encore méconnus, si bien que la réglementation actuelle n'en tient pas compte pour fixer les doses maximales de leur incorporation dans les produits alimentaires. Certains additifs peuvent être inoffensifs lorsqu'ils sont consommés isolément, et toxiques lorsqu'ils sont combinés à d'autres molécules [52, 53].

C'est ainsi que les effets néfastes des combinaisons d'une catégorie de conservateurs (E210 à E213, benzoates) avec six colorants de synthèse (E102, E104, E11, E122, E124, E129) sur le comportement des enfants ont été démontrés. Ces combinaisons sont susceptibles de provoquer des troubles de déficit de l'attention chez les enfants et hyperactivité et cytotoxicité [54].

Les E200, E201, E202 et E203 (sorbate) conservateurs très utilisés en industrie agroalimentaire, sont susceptibles de réagir avec d'autres additifs, ils pourraient réagir avec les E249 à E252 (nitrite et nitrates), la combinaison de ces molécules perturbe les systèmes enzymatiques et peut aboutir à la formation de composés mutagènes (risque d'altération de L'ADN). Des spécialistes mettent en garde les

femmes enceintes car cette association pourrait provoquer des malformations congénitales [54].

Des études portant sur les interactions de quatre additifs alimentaires. Ils ont d'abord étudié les effets isolés du E951 (aspartame), du E621 (glutamates de sodium) et de deux colorants, les E104(jaune de quinoléine) et le E133 (bleu brillant), puis les effets des combinaisons du glutamate avec le bleu brillant et ceux de l'aspartame avec le jaune de quinoléine sur les cellules nerveuses de souris de laboratoire.

Les résultats ont montré que ces quatre additifs sont de puissants inhibiteurs de la croissance des cellules nerveuses mais surtout, que ces substances, une fois combinées, décuplent leur toxicité sur les cellules nerveuses : E133+E1621 : toxicité multipliée par 4 et E104+E451 : toxicité multipliée par sept. Ces études sont montrées que la toxicité des substances combinées n'est pas simplement le résultat de la somme additionnelle des toxicités individuelles des molécules, mais bien une multiplication des toxicités, Ces quatre additifs se retrouvent dans un grand nombre de produits alimentaires et l'inquiétude porte encore une fois sur les enfants dont les cellules du cerveau sont en pleine croissance [55-57].

D'autres recherches avancent que le mélange E952/E954 est probablement cancérigène, endommage l'ADN, et neurotoxique. L'E952, acide cyclamique, est autorisé en France dans les boissons, les bonbons et chewing-gums sans sucre. L'E954, saccharine, est présent dans certains édulcorants de table, mais aussi dans des complexes de multivitaminés, et autres produits d'hygiène buccale, et bien sûr, dans les produits light (sodas, confiseries, et autres) [58, 59].

CHAPITRE 3

L'ARGILE ET PSYLLIUM

3.1. L'ARGILE

3.1.1. Définition et structure

Les argiles sont des matériaux naturels répandus sur tous les sols des continents et utilisés depuis l'antiquité. Le terme, « argile » est couramment utilisé pour désigner différentes roches sédimentaires, cristaux de taille granulométrique de l'ordre du μm , présentant une forte teneur en minéraux. Il n'existe pas une mais des argiles. Selon leurs compositions et concentrations en minéraux, les différentes argiles ont des structures et des propriétés différentes [60]. Plusieurs définitions ont été proposées, variables selon les critères choisis, mais souvent difficiles à élaborer. Nous n'en retiendrons ici que les définitions minéralogique et granulométrique.

3.1.1.1. Définition minéralogique

Les minéraux argileux appartiennent à la famille des phyllosilicates et sont constitués par une couche tétraédrique bidimensionnelle de composition T_2O_5 , T pouvant être Si^{4+} , Al^{3+} ou Fe^{3+} . Ces tétraèdres sont liés dans un même plan par trois de leurs sommets, le quatrième étant orienté dans une autre direction. Les couches tétraédriques sont liées dans la structure à des couches octaédriques ou à des groupes de cations ordonnés ou indépendants (Figure 3.1) [61]. Les structures phyllosilicatées constituent une classe privilégiée tenant de leur aptitude à donner naissance, par des techniques relativement simples, à des matériaux microporeux, voir même mésoporeux [62].

3.1.1.2. Définition granulométrique

Une argile, au sens granulométrique du terme, est la fraction minérale d'un sol dont les particules ont des dimensions inférieures à $2 \mu\text{m}$. L'argile brute est constituée généralement d'un composant minéral de base (kaolinite, montmorillonite, etc...) et de certaines impuretés secondaires tels que, le quartz, la calcite et les matières organiques [63].

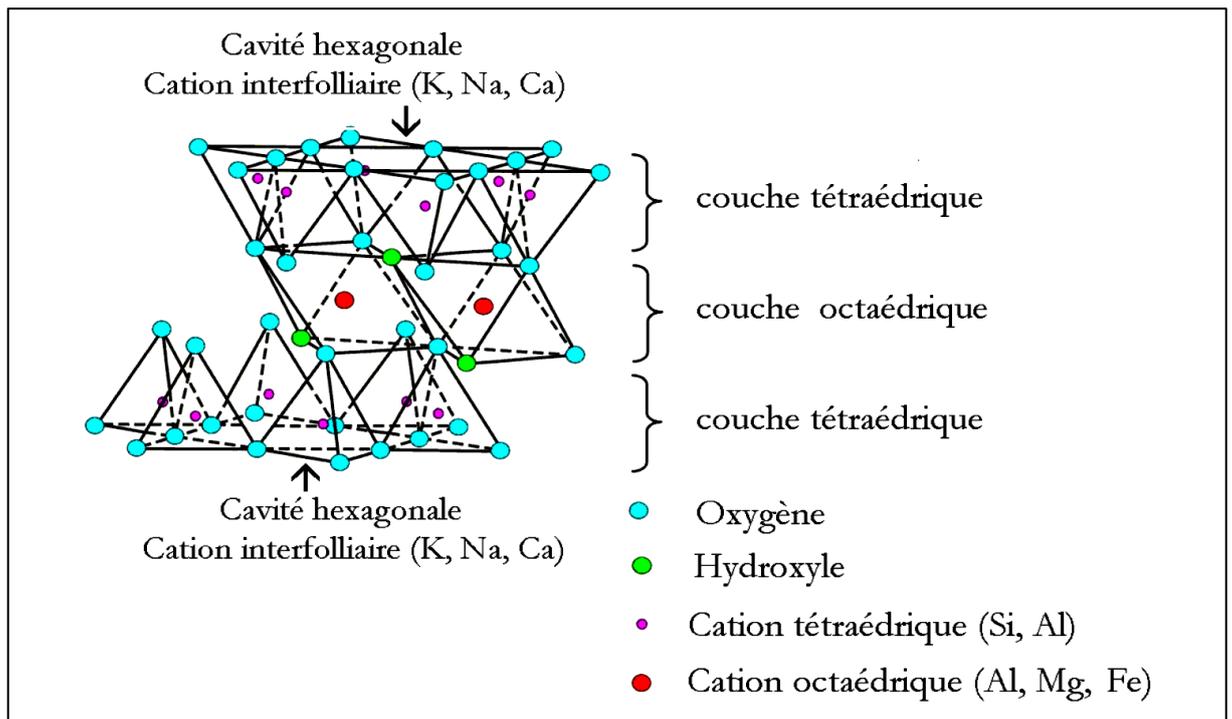


Figure. 3.1 : Représentation schématique d'un feuillet de phyllosilicate 2:1 [64].

3.1.2. Classification des argiles

Il existe différentes classifications des argiles, selon les critères de classification on distingue 4 classifications :

3.1.2.1. Selon de type d'empilement des couches

Les minéraux argileux forment deux grandes familles caractérisées par le type d'empilements des couches octaédriques et des couches tétraédriques (figure 3.2)

[65]: 1) Les phyllosilicates 1:1 ou T:O (tétraèdre : octaèdre)

2) Les phyllosilicates 2:1 ou T:O:T (tétraèdre : octaèdre : tétraèdre)

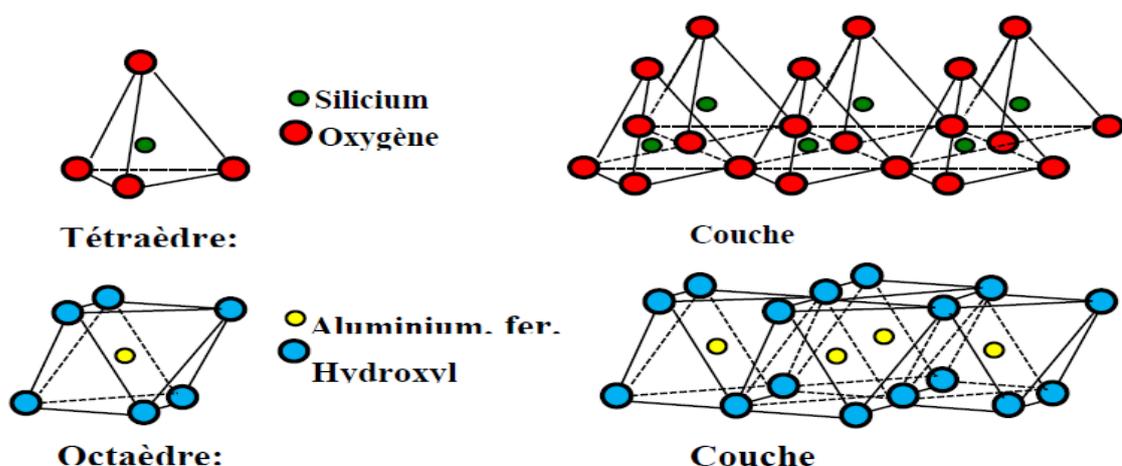


Figure. 3.2 : Disposition des éléments en couches tétraédrique et octaédrique [65].

3.1.2.2. Selon la distance basale (A°)

On distingue ainsi quatre groupes [66]:

- 1) Minéraux à 7 A° : Le feuillet est constitué d'une couche tétraédrique et d'une couche octaédrique. Il est qualifié de T:O ou de type 1:1. Son épaisseur est d'environ 7 A°.
- 2) Minéraux à 10 A° : Le feuillet est constitué de deux couches tétraédriques et d'une couche octaédrique. Il est qualifié de T:O:T ou de type 2:1. Son épaisseur est d'environ 10 A°.
- 3) Minéraux à 14 A° : Le feuillet est constitué de l'alternance de feuillets T:O:T et de couches octaédriques interfoliaires,
- 4) Minéraux interstratifiés : L'épaisseur du feuillet est variable. Ces minéraux résultent du mélange régulier ou irrégulier d'argiles appartenant aux groupes ci-dessus.

3.1.2.3. Selon le groupe de minéraux

3.1.2.3.1. Kaolinite

On appelle la roche kaolin et le minéral argileux kaolinite. Cette argile blanche, douce, friable, réfractaire, contient autant d'aluminium que de silice. Riche en silice et peu concentrée en sels minéraux, elle est utilisée pour la fabrication de porcelaine et de céramique. C'est une des rares argiles inertes chimiquement. Cette caractéristique en fait un composant idéal pour le papier, en tant que liant dans les peintures, dans les plastiques, ainsi que dans les médicaments [67].

3.1.2.3.2. Smectites

Ces différentes argiles sont connues pour leur capacité à piéger les molécules d'eau. Elles sont appelées argiles gonflantes. Sous l'action de l'eau, elles peuvent augmenter leur volume jusqu'à 30%. En piégeant l'eau, elles fixent aussi des cations permettant les échanges par adsorption. Elles prennent une texture de type gel, pouvant transporter des ions ou des molécules actives, cette propriété est à la base des technologies de pansements pour le tube digestif [68].

3.1.2.3.3. Montmorillonite

Argile la plus communément récoltée, elle est généralement vendue verte mais peut-être trouvée sous d'autres coloris : gris, blanc, bleuté. Elle détient une forte concentration en silice, en minéraux, dont de la potasse, des oxydes de

magnésium, de fer, de manganèse, d'aluminium, de la soude,...c'est l'argile la plus commune à la vente [69].

3.1.2.3.4. Attapulqite ou Bentonite

Elles présentent un fort pouvoir absorbant être trouvées dans la composition de pansements gastriques, dans le traitement d'ulcère de l'estomac, constipation, diarrhée, reflux gastrique..., dotées d'un fort pouvoir absorbant, jusqu'à 80 fois leur poids en eau.

La bentonite a une origine volcanique et hydrothermale. Certaines bentonites sont riches en sodium, d'autres en calcium, potassium ou magnésium. Les bentonites à base de sodium sont dotées de très grandes capacités d'absorption des liquides et susceptibles de se transformer en gel à partir d'une certaine concentration. Ayant la faculté de favoriser la pénétration des principes actifs à travers la peau, elle est incorporée aux cosmétiques naturels. Appelée également terre à Foulon, la bentonite est aussi capable d'absorber les protéines et de réduire l'activité des enzymes. Ce sont les bentonites riches en calcium qui sont utilisées au niveau de la sphère digestive [70].

3.1.2.3.5. Illites

Son nom fait référence à l'Illinois, aux États-Unis où elle a été étudiée. Sa composition est riche en calcium (14%), en fer (9%) et pauvre en magnésium. Elle présente un bon pouvoir d'absorption environ 25 % de son poids et un faible pouvoir d'adsorption. Malgré sa composition, elle est tout de même de qualité inférieure à la Montmorillonite. Elle se révèle néanmoins avoir un pouvoir d'absorption important. On l'utilise en tant que cataplasme épais, ou encore pour absorber des impuretés (déchets organiques, micro-organismes,...) [71].

3.1.2.3.6. Vermiculites

Les vermiculites sont des argiles ayant une origine volcanique, riches en magnésium. Elles sont formées par hydratation de minéraux basaltiques. Lorsqu'elle est chauffée, elle éprouve un phénomène de dilatation, la rendant particulièrement utile comme isolant thermique pour les constructions, ce matériau ayant une faible masse, une incapacité à brûler et étant imputrescible et inaltérable [72].

3.1.2.3.7. Chlorites

Les chlorites de couleur jaune, rouge ou blanche sont également retrouvés. De structure similaire aux illites et smectites, l'espace entre leurs feuillets abrite une couche supplémentaire d'hydroxyde de magnésium, de fer ou d'aluminium,...[73].

3.1.2.4. Selon la couleur

Les argiles ne sont pas identifiées par leur couleur. Cette dernière peut être attribuée à plusieurs types d'argiles, la couleur verte par exemple est retrouvée chez lamontmorillonite, l'illite ou encore la chlorite,... La variation de couleur constatée est fonction de la concentration en oxyde de fer [74].

3.1.2.4.1. Verte

Les argiles vertes présentent une faible teneur en fer, ce sont généralement les montmorillonites, les illites et les smectites [74].

3.1.2.4.2. Blanche

Ces argiles ne contiennent aucune substance colorée. Leur formation n'a donc pas été perturbée, elle a été uniforme. On retrouve le plus souvent des kaolinites mais également des smectites [67].

3.1.2.4.3. Rose

Ces roches argileuses ne sont pas retrouvées au naturel, telles quelles. Il s'agit d'un mélange d'argile rouge et d'argile blanche. Ce mélange a pour but d'augmenter la concentration en oligo-éléments de l'argile blanche tout en diminuant la concentration en fer de l'argile rouge [75].

3.1.2.4.4. Rouge

Généralement des illites, ces argiles sont riches en oxyde de fer. Très reminéralisantes, elles sont idéales en usage externe pour les peaux irritées, fatiguées ou ternes qu'elles adoucissent et purifient [75].

3.1.2.4.5. Jaune

Ces illites riches en oxyde de fer et magnésie, vont apaiser de nombreuses douleurs (articulaires, musculaires) et tonifier la peau. Appliquées en masques, la peau et les cheveux normaux l'apprécient tout particulièrement [75].

3.1.3. Propriétés des argiles

3.1.3.1. Absorption

L'absorption correspond à l'internalisation d'un liquide ou d'un gaz. L'exemple typique est celui de l'éponge s'imbibant de liquide. Au niveau de l'argile ce phénomène est passif, il se produit par capillarité, contrairement à l'absorption au

niveau du tube digestif. Les argiles les plus absorbantes ne sont pas conseillées en usage interne. Le risque de constipation est trop important. Elles sont généralement utilisées comme capteurs de liquides et d'odeur [76].

3.1.3.2. Adsorption et capacité d'échange cationique (CEC)

L'adsorption est une autre qualité des argiles. Contrairement au phénomène d'absorption qui internalise les molécules (à l'état liquide ou gazeux), l'adsorption correspond à la fixation de molécules en surface. Cette fixation peut être ionique, électrostatique ou encore relative aux tensions superficielles [76].

Deux types d'adsorptions sont identifiés. Le premier est physique, par la formation de complexes avec des molécules organiques, les liens électrostatiques entre les feuillets et les cations interfoliaires étant très faibles (liaisons de Van der Waals). Le second l'adsorption chimique, qui relève des liaisons ioniques, est la majeure partie du pouvoir adsorbant. Les argiles étant chargées négativement à l'intérieur et positivement en surface. L'adsorption est mesurable par les échanges ioniques, par la méthode CEC (capacité d'échange de cations). C'est une méthode colorimétrique à l'aide de bleu de méthylène exprimée en milliéquivalents de colorant adsorbé pour 100 g d'argile [76].

3.1.3.3. Hydratation et gonflement des argiles

Le gonflement des argiles est dû à l'hydratation des surfaces externes et à la pénétration plus ou moins importante des molécules d'eau dans l'espace entre les feuillets. Le gonflement est exprimé en $\text{cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$. La quantité d'eau fixée entre les feuillets est moins importante que celle fixée à l'extérieur des particules argileuses [77]. L'eau pénètre entre les feuillets si leurs écarts sont supérieurs aux dimensions de la molécule d'eau. Les attractions entre les feuillets affaiblies. Lorsque l'eau est en excès, l'argile passe du solide hydraté à un gel ensuite à une suspension hydrophile plus moins stable. L'hydratation extrême d'argile produit une dispersion colloïdale des particules d'argile dans l'eau [78].

Toutes les argiles ne sont pas gonflantes, seules celles qui une CEC non nulle possèdent cette propriété. Le gonflement dépend donc de la nature de l'argile, de sa capacité d'échange, ainsi que du nombre et de la nature des cations compensateurs [89].

3.1.3.4. Surface spécifique

La surface spécifique est une propriété essentielle dans la caractérisation des matériaux poreux, elle désigne l'ensemble des surfaces accessibles à des particules ioniques, elle est exprimée en m^2/g . On peut distinguer [80]:

- ✓ Les surfaces des plans extérieurs formant les bases des particules, ce sont les surfaces externes.
- ✓ Les surfaces cumulées de tous les plans des feuillets, qui limitent les espaces interfoliaires, appelées surfaces internes.
- ✓ Les surfaces qui marquent latéralement les limites des feuillets, ce sont les surfaces latérales.
- ✓ La mesure de la surface spécifique est basée sur la formation d'une monocouche de la substance adsorbée, connaissant les dimensions des molécules et leurs possibilités d'arrangements, en déterminant alors la quantité fixée, on peut évaluer la surface qui leur sert de support. Les corps adsorbables qui permettent d'obtenir des résultats satisfaisants sont : les gaz inertes (N_2), hydrocarbures aliphatiques ou des polyalcools simples comme le glycol ou glycérol.).

L'augmentation de la surface spécifique donne un pouvoir de gonflement plus important et par conséquent un potentiel de gonflement plus élevé [80].

3.1.4. Usage interne de l'argile et bienfait sur la santé humaine

L'argile prise par voie buccale est maintenant bien acceptée et ne suscite plus, certaines argiles sont commercialisées sous formes de comprimés, gélules, poudre ultraventilée en sachets ou l'eau argileuse en vue d'être administrées en interne. Ces formes sont destinées à soulager les troubles de la sphère digestive : ballonnements, météorisme, pesanteur digestive, dyspepsies,...ou pour une cure de détoxification du tube digestif et tous le corps parce qu'elle agit sur tous les organes, dans tout l'organisme [81].

3.1.4.1. En agroalimentaire

L'argile capte et élimine 81% des microcystine-LR hépatotoxines (pouvant provoquer une nécrose hépatique) présentes dans l'eau à l'état naturel. Elle peut donc être utilisée pour filtrer l'eau dans le but d'un approvisionnement en eau potable. L'alimentation des animaux d'élevage est enrichie d'argile pour absorber les aflatoxines (molécules cancérigènes) synthétisées par une mycobactérie retrouvée dans les arachides [82, 83]. Une étude prouve la non toxicité de la

consommation d'argile à court terme [84, 85]. Des essais cliniques ont été réalisés pour assurer que l'argile offre une réelle protection chez l'Homme contre une exposition aux aflatoxines [86- 89].

3.1.4.2. En tant qu'anti-poison

La smectite, en tant qu'anti-poison comme les pesticides, est particulièrement efficace pour adsorber le paraquat, puissant herbicide. Cette adsorption se réalise dans la lumière intestinale, dans le cas du paraquat qui subit le cycle entéro-hépatique, il peut être adsorbé lors de son retour dans le tube digestif et donc sa réabsorption intestinale sera bloquée. La smectite s'est prouvée efficace pendant dix heures après sa prise sur l'adsorption intestinale du paraquat. L'argile est également efficace contre lastrychnine (1g de kaolinite peut adsorber jusqu'à 480mg de ce poison retrouvé dans la "mort aux rats"). L'argile absorbe également les métaux lourds, toxiques pour l'organisme, tels que le plomb ou le chlorure de mercure [90, 91, 92].

3.1.4.3. En association à certains médicaments

L'argile, par ses pouvoirs absorbant et adsorbant, interagit avec les minéraux, oligoéléments, des principes actifs médicamenteux dans la lumière intestinale. Une administration concomitante de cimétidine et d'argile entraîne une fixation de la cimétidine sur les feuillets empêchant son absorption [93].

3.1.4.4. En association à certaines molécules

La biodisponibilité de certains minéraux comme le fer, le magnésium ou encore le calcium peut être modifiée par la présence d'argile dans la lumière intestinale. Echangeuse d'ions, l'argile interfère avec le fer qu'elle va fixer dans le tube digestif, sous forme de complexes insolubles et libérer du calcium ou du magnésium. Cela peut entraîner l'apparition d'une carence en fer et une augmentation des taux de magnésium et calcium. Une étude prouve que l'absorption de fer est diminuée par une fixation de la molécule sur l'argile. Une administration d'argile modifie la kaliémie pouvant entraîner l'apparition d'une hypokaliémie par fixation du potassium dans la lumière intestinale, empêchant son absorption [94, 95].

3.2. Psyllium ou Ispaghul

3.2.1. Définition

Le psyllium (*Plantago*) également appelé Ispaghul appartient à la famille des plantaginacées et est originaire d'Inde et d'Iran. Cette plante traditionnelle de la médecine ayurvédique contient des graines qui sont enveloppées d'une enveloppe appelée tégument, que l'on utilise pour sa richesse en fibres solubles. Chaque plante peut produire jusqu'à 15 000 graines qui sont d'ailleurs minuscules. Les Égyptiens utilisaient déjà le psyllium 10 siècles avant J-C comme remède naturel, notamment pour ses vertus laxatives. C'est notamment grâce au mucilage, une substance végétale qu'il contient que le psyllium possède des vertus médicinales [96].

Tégument de la graine d'ispaghul est le nom commun de l'enveloppe de la graine de la plante *Plantago ovata* Forsk. La plante est cultivée ou cueillie pour en récolter la graine en vue d'un usage médical. Le tégument de la graine d'ispaghul est utilisé sans autre transformation ou sous la forme de préparations obtenues en réduisant les enveloppes des graines en poudre. Les médicaments à base de plantes contenant du tégument de la graine d'ispaghul sont en général disponibles sous la forme de produits solides à prendre par voie orale. L'ispaghul de la pharmacopée française désigne la graine ou le tégument de la graine [97].

3.2.2. Classification et description botanique

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Embranchement : *Spermatophyta*

Sous-embranchement : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous-classe : *Asteridae*

Ordre : *Plantaginales*

Famille : *Plantaginaceae*

Genre : *Plantago* L.



Figure. 3.3 : L'appareil végétal du *Plantago* L. [99].

Espèce : *Plantagoovata* (à graines blondes) originaire de l'Inde

Plantago afra (à graines brunes) originaire de l'Afrique

Plantago indica (à graines noires) du bassin méditerranéen [98].

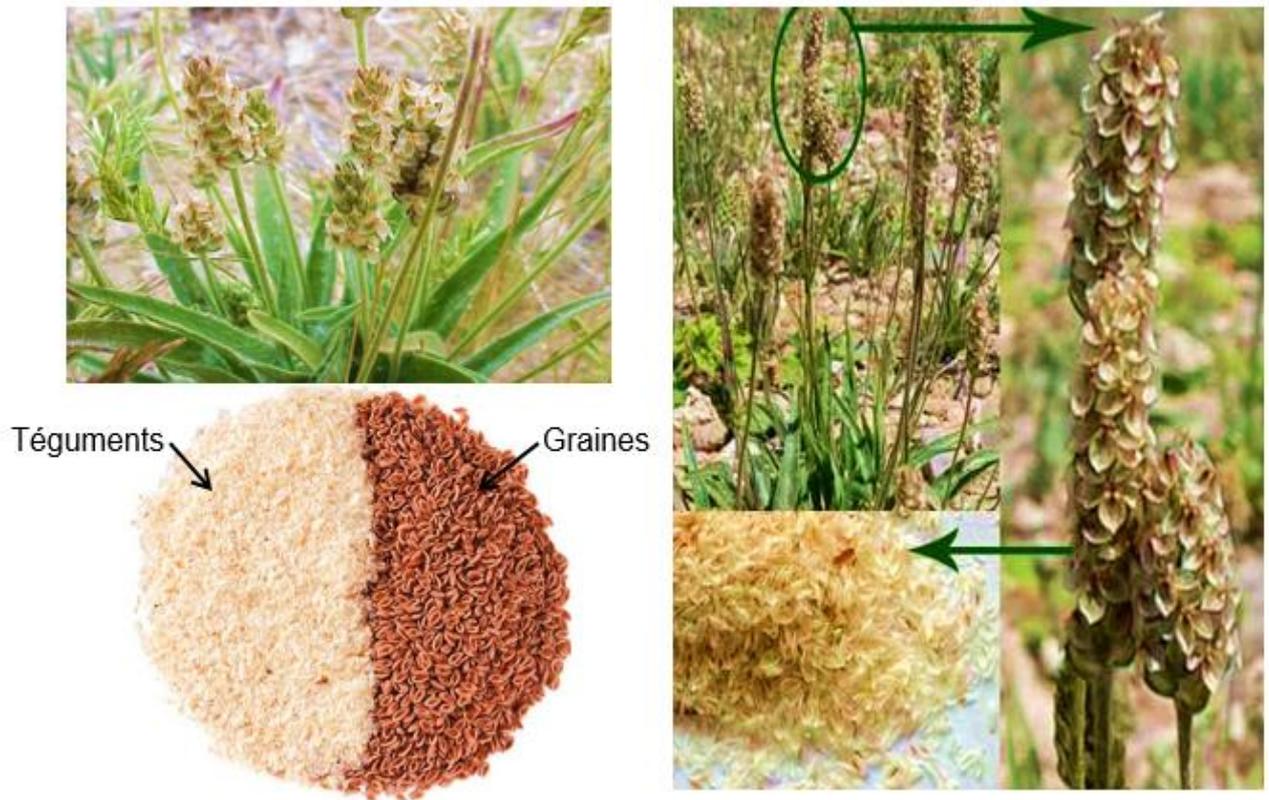


Figure. 3.4 : Plante et graines du Psyllium [99].

Le terme “psyllium”, à l'origine, concerne trois espèces distinctes : *Plantago afra*, *Plantago indica* et *Plantago ovata*.

Ispaghul est une herbe annuelle molle ou laineuse sans tige ou sub-caulescente qui atteint une hauteur de 30-45 cm. Feuilles étroitement linéaires ou filiformes apparaissant verticales en raison de la courte tige tétrébrante. Les épis ont une longueur de 1,2-4 cm et une largeur d'environ 0,5 cm, de forme cylindrique à ovoïde et portent entre 45-70 fleurs. Les fleurs sont bisexuées, tétramères, anémophiles et protogynes. En tant que telles, elles favorisent le croisement. Les fruits sont des capsules ellipsoïdes, d'environ 8mm de long, obtus, membraneux, glabres, la moitié supérieure se détachant comme un couvercle conique émoussé.

Conique émoussé et les graines sont ovoïdes-oblongues, en forme de bateau, lisses, blanc rosé, concaves d'un côté et convexes de l'autre. Le côté concave de la graine est recouvert d'une fine membrane blanche produite par la fusion de la couche externe de l'ovule avec l'épiderme interne, formant ainsi l'enveloppe de la graine [99].

3.2.3. Composants bioactifs du psyllium

L'enveloppe de l'Isphaghul contient de grandes quantités de mucilage, d'huile grasse fixe et de matières albuminiques. La présence dans les graines d'Isphaghul d'un glucoside appelé aucubine en quantités dans les graines d'Isphaghul est confirmée par le Col. Chopra [100]. Les graines contiennent une huile grasse, de l'albumine et du mucilage en grande quantité. Un glycoside nommé aucubin a été isolé des graines [101]. Le mucilage, huile grasse fixe et matière albuminée, est une nature glucosidique d'un composé Aucubin contenant des composés fumariques, benzoïques, cinnamiques, syringiques, etc, cinnamique, syringique, vanillique, P-hydroxyben-zoïque, férulique, P-coumarique, gentiosique, salicylique, pectique, Tyrosol β -(P-hydroxyphényl) éthanol et esters des acides 3, 4-dihydroxy cinnamiques et loliolide [102].

La graine est constituée de 35% de polysaccharides solubles et 65% de polysaccharides insolubles. L'Isphaghul est classée comme une fibre mucilagineuse en raison de sa puissante capacité à former un gel dans l'eau [103]. L'enveloppe de l'Isphaghul contient une forte proportion d'hémicellulose, composée d'un squelette de xylane lié à des unités d'arabinose, de rhamnose et d'acide galacturonique. L'étude phytochimique des espèces de *Plantago* a révélé un potentiel élevé de production d'un large éventail de métabolites secondaires bioactifs, à savoir secondaires bioactifs, c'est-à-dire des iridoïdes, des phénols, des polysaccharides, des stérols, des alcaloïdes et des cumatines. Alcaloïdes et des cumatines qui ont des utilités en tant qu'aliment complémentaire et en tant que médicament pour traiter les maladies humaines [104].

Les graines d'Isphaghula contiennent plus de 30% de polysaccharide hydrocolloïdal (Mucilage) dans l'enveloppe externe de la graine des huiles fixes, du tanin, des glycosides d'aucubine (iridoïdes), des sucres, des stérols et des protéines. Ce mucilage est de nature colloïdale et sa composition varie selon les conditions de

préparation [105]. Il est principalement composé de xylose, d'arabinose et d'acide galacturonique avec du rhamnose et du galactose.

Deux fractions polysaccharidiques ont été séparées du mucilage. L'une d'elles est soluble dans l'eau froide et donne par hydrolyse du D-xylose (46%), un acide aldobiouronique (40%), du L-arabinose (7%) et un résidu insoluble (2%) ; l'autre fraction est soluble dans l'eau chaude et forme une solution très visqueuse qui se transforme en gel en refroidissant et donne par hydrolyse du D-xylose (80%), du L-arabinose (14%), de l'acide aldobiouronique (0,3%) et des traces de D-galactose [106]. De nombreux éléments ont été identifiés dans la graine qui comprennent des protéines, des lipides, des stérols, des triterpènes et de l'aucubin glycoside. Le taux de mucilage est d'environ 30 %. Le principal constituant du mucilage est constitué à 85 % d'une fraction polysaccharide soluble dominée par le D-xylose.

Le mucilage des graines d'Ispaghul contient 22,6 % d'arabinose, 74,65 % de xylose et des traces d'autres sucres, et 35% de résidus terminaux non réducteurs [107].

Les graines contiennent des mucilages (uniquement dans l'épiderme de l'enveloppe de la graine, 10-12%) principalement des arabinoxylanes ; des iridoïdes - Aucubine (0,14%) ; Alcaloïdes pyridiniques - Boschniakines, y compris plantagonine, indicaine, indicainine ; substances protéiques et huile grasse [108].

3.2.4. Propriétés thérapeutiques du psyllium

L'Ispaghul ou psyllium est très populaire dans le monde entier pour ses propriétés médicinales polyvalentes. Depuis des temps immémoriaux, elle est utilisée comme remède sûr et efficace pour le traitement de la constipation, de la diarrhée, de la dysenterie, des hémorroïdes et de nombreux autres problèmes de santé courants ou complexes. Des études scientifiques récentes confirment que les plantes sont également bénéfiques pour les patients souffrant de diabète, d'hypertension, d'hypercholestérolémie, d'hyperlipidémie, de maladies du foie et de rhumatismes.

3.2.4.1. Constipation

Le psyllium est un laxatif de lest. Les substances mucilagineuses qu'il contient absorbent l'eau des aliments. Dans les intestins, elles forment alors un « gel » qui augmente le poids des selles, améliore leur consistance et accélère leur transit. Le psyllium est très utilisé pour combattre la constipation, en particulier lorsqu'elle est chronique. Comparé aux autres laxatifs de lest, le psyllium se révèle plus efficace que le polycarbophile de calcium, la méthylcellulose ou le son de blé. Il provoque aussi moins de ballonnements et de flatulences que les autres fibres végétales. Cependant, selon les spécialistes en gastroentérologie, son efficacité reste modérée. Chez les patients atteints de maladies neurologiques, qui ont un risque plus élevé de souffrir de constipation, les résultats obtenus avec le psyllium sont encourageants, mais pas encore assez concluants pour suggérer un protocole de traitement [109-111].

3.2.4.2. Hypercholestérolémie

C'est un produit efficace contre l'hypercholestérolémie. La prise quotidienne de suppléments de psyllium contribue à diminuer le taux de cholestérol et de triglycérides des personnes sujettes à l'hypercholestérolémie légère ou modérée. La réduction du cholestérol total et du mauvais cholestérol (LDL) s'observerait à partir de 5 g de psyllium par jour et augmenterait avec la dose³⁵. Le suivi simultané d'un régime faible en gras, s'il n'est pas indispensable, augmente l'efficacité des suppléments. Par ailleurs, l'effet du psyllium s'exerce même chez les personnes qui contrôlent leur hypercholestérolémie avec des médicaments à base de statines. Il est à noter que le psyllium n'aurait pas d'effet chez les personnes ayant un taux de cholestérol proche de la normale [104,108, 112].

3.2.4.3. Effet antitoxique

Ces dernières années, plusieurs études ont porté sur la synthèse d'hydrogels à base d'ispaghul et sur leur utilisation dans de nombreuses applications telles que l'administration de médicaments, l'élimination des ions métalliques toxiques et les floculants. L'efficacité des hydrogels d'ispaghul pour la délivrance durable de différentes molécules médicamenteuses (à savoir, anticancéreuses, antiviraux, anti-inflammatoires, antimicrobiens et antihypertenseurs) [113, 114].

3.2.4.4. Syndrome de l'intestin irritable et de la colite ulcéreuse

À l'instar de tous les phénomènes inflammatoires qui touchent le tube digestif, le syndrome de l'intestin irritable comporte une importante part d'effets psychosomatiques et par conséquent, l'effet placebo peut être très important dans ce trouble. Il est donc plutôt difficile d'apporter les preuves cliniques de l'efficacité de l'un ou l'autre des traitements destinés à en soulager les symptômes. Malgré tout, les prébiotiques, et plus précisément les fibres solubles, peuvent jouer un rôle important dans la prévention et le traitement des maladies inflammatoires des intestins. En modifiant la composition de la flore intestinale, ces fibres créent des conditions bénéfiques pour l'intestin. Le psyllium, en particulier, permet d'atténuer les symptômes du syndrome de l'intestin irritable, à l'exception de la douleur pour laquelle il reste inefficace. Des recherches cliniques ont établi que les doses optimales se situaient entre 20 g et 30 g de psyllium par jour [115-117].

3.2.4.5. Diabète

En étudiant les effets du psyllium sur des patients atteints de diabète de type 2, des chercheurs ont constaté qu'il contribuait non seulement à normaliser le taux de lipides dans le sang, mais aussi à faire baisser la glycémie. Pour tirer le meilleur parti de cet effet, il semble préférable de consommer le psyllium à l'heure des repas, mélangé aux aliments, plutôt que de le prendre entre les repas sous forme de supplément. En modifiant la structure, la texture et la viscosité des aliments dans l'intestin, il diminue l'index glycémique du repas. Le psyllium engendre également un sentiment de satiété qui peut contribuer à réduire la prise alimentaire et par conséquent à contrôler le poids. Les enfants et les adolescents obèses et diabétiques pourraient bénéficier d'une diète enrichie en psyllium. Cependant, il précise que d'autres essais seront nécessaires pour confirmer un réel effet à long terme [118, 119].

CHAPITRE 4

MATERIEL ET MÉTHODES

Cette partie présente l'ensemble du matériel, des réactifs, et des méthodes analytiques utilisés pour la réalisation de notre étude.

Notre expérimentation s'est déroulée au niveau de plusieurs laboratoires :

- Enquête sur le terrain pour la mise au point de l'état d'utilisation des pesticides dans la région de la Mitidja, et le classement des fruits et légumes selon le degré d'utilisation des pesticides.
- Les analyses physicochimiques de l'eau ont été réalisées au niveau des laboratoires de l'ADE (Algérienne Des Eaux) –Chiffa dans la wilaya de Blida.
- Les analyses physicochimiques de l'aliment destiné à l'alimentation des rats ont été réalisées au niveau du laboratoire de l'ITELV (Institut Technique des Élevages) –Baba Ali, Alger.
- Les analyses microbiologiques de l'aliment et l'eau destinée à la boisson des rats ont été réalisées au niveau du laboratoire d'hygiène de la Wilaya de Tipaza.
- L'élevage des rats et l'expérimentation animale ont été réalisés au niveau de la station d'expérimentation animale de la faculté des Sciences de la nature et la vie de l'université Blida 1.
- Les analyses microbiologiques de la flore intestinale des rats ont été réalisées au niveau du laboratoire d'hygiène de Wilaya-Tipaza.
- Les analyses biochimiques et hématologiques du sang des rats ont été faites au niveau du laboratoire médical central de l'hôpital civil de Hadjout, Tipaza
- Les coupes histologiques des organes des rats ont été réalisées au niveau du laboratoire de l'anatomie pathologique du CHU Mustapha Bacha, Alger.

1. Matériel

1.1. Matériel biologique

1.1.1. L'eau

L'eau utilisée pour l'alimentation des rats pendant toute l'expérimentation est une eau de robinet potable, nous avons utilisé uniquement l'eau de robinet de la commune Ouled Yaich -Blida pendant toute l'expérimentation.

1.1.2. Aliment destiné aux rats

Dans notre étude expérimentale, nous avons utilisé quatre types de régimes alimentaires :

➤ Régime normal (témoin)

Les rats ont été nourris avec un aliment équilibré sous forme de tourteaux agglomérés ou bouchons (figure 4.1). C'est un mélange de maïs, son, remoulage, soja, CMV (Complexe Multi-vitaminique), fabriqué par une société à responsabilité limitée (SARL) « la production locale » Bouzaréah-Alger, (date de fabrication le 20/03/2016).



Figure 4.1 : Aliment de rats (photo originale).

➤ Régime enrichi en Psyllium

Les rats ont été aussi nourris par le même aliment cité ci-dessus, auquel est ajouté 2% de l'enveloppe de graine de psyllium sèche en poudre (2 g de psyllium pour chaque 98 g d'aliment) (figure 4.2). La poudre de psyllium utilisée a été délivrée par un fabricant RIFA.SANTE, le nom du produit « Raha plus » boîte de 100 g, pays d'origine Inde, importé par SRL SAIDANI-Tipaza et conditionné par la société cospray-Beni Tamou, date de fabrication 20/11/2105, l'enrichissement de l'aliment par le psyllium a été réalisée par le fabricant de l'aliment selon le même processus technologique.



Figure 4.2 : Poudre de Psyllium (photo originale).

1.1.3. Régime enrichi en Argile

Les rats ont été nourris par le même aliment cité auparavant, auquel est ajouté 2% de l'argile verte en poudre (1 g d'argile pour chaque 99 g d'aliment) (figure 4.3), l'argile verte utilisée est obtenue en vrac par un livreur à Blida, cette argile est originaire de la région de Ghardaïa.



Figure 4.3 : Argile verte (photo originale).

1.1.3. Régime enrichi en Psyllium et Argile

Les rats ont été nourris par le même aliment préalablement cité, auquel est ajouté 1,5% de l'argile verte en poudre et 1,5% de l'enveloppe de la graine de psyllium sèche en poudre.

1.1.4. Les animaux de l'expérimentation

Toutes les expériences de cette étude ont été réalisées sur des rats femelles adultes *Rattus norvegicus* de la souche «Wistar» (figure 4.4) ayant les caractéristiques suivantes :

- Nombre : 60 rats femelles.
- Age : 2 mois (08 semaines).
- Poids : poids corporel moyen : 152,2 g.
- Flore intestinale : c'est des rats haloxéniques, dont la flore intestinale est normale non modifiée.
- Origine : obtenue à partir de l'animalerie de l'institut Pasteur de Kouba –Alger où se réalisent l'élevage et l'accouplement selon des normes internationales.

Ce sont des rats de laboratoire sains et normalisés, le rat Wistar est un modèle très intéressant pour les études de la toxicité.

- Alimentation : L'alimentation et l'eau ont été fournies de telle sorte que les animaux avaient libre accès à l'eau et à l'aliment.
- Les cages : Durant toute la période d'expérimentation, les rats ont été gardés dans des cages en plastique de 40/25 cm, munies d'un couvercle en grillage métallique sur lequel sont déposés l'aliment et l'eau.



Figure 4.4 : Rats femelles (*Rattus norvegicus*) de la souche «Wistar»
(photo originale).

1.2. Additifs alimentaires

Les Additifs alimentaires utilisés dans cette étude ont été sélectionnés selon leurs fréquences d'utilisation dans les industries agro-alimentaires ainsi leurs fréquences de consommation quotidienne dans nos repas et aussi selon leurs degrés de toxicité. Pour cela nous avons choisi 11 additifs pour l'administration orale aux rats. Ces produits sont obtenus à partir d'un fournisseur des produits chimiques destinés aux industries agro-alimentaires à la zone industrielle de Dar El-Beida - Alger :

Tableau 4.1 : Les additifs alimentaires administrés sur rats dans notre étude [50].

N°	Code	Nom	Rôle	DJA*
1	Sin ou E 102	Tartrazine (jaune)	Colorant	7,5 mg/kg
2	Sin ou E 110	Jane orangé S	Colorant	2,5 mg/kg
3	Sin ou E 124	Rouge ponceau 4R	Colorant	0,75 mg/kg
4	Sin ou E 129	Rouge Allura AC	Colorant	7 mg/kg
5	Sin ou E 133	Bleu Brillant FCF	Colorant	6 mg/kg
6	Sin ou E 202	Sorbate de potassium	Conservateur	25 mg/kg
7	Sin ou E 211	Benzoate de sodium	Conservateur	5 mg/kg
8	Sin ou E 950	Acesulfame K	Édulcorant	9 mg/kg
9	Sin ou E 951	Aspartam	Édulcorant	40 mg/kg
10	Sin ou E 300	Acide ascorbique (vit C)	Anti-oxydant	80 mg/kg

* Norme Codex Alimentarius 2006.

1.2.1. Tartrazine (Sin 102)

C'est un colorant chimique artificiel, de la famille des colorants azoïques de couleur jaune, sous forme de poudre orange clair fine très soluble dans l'eau, forme avec l'eau des solutions jaunes homogènes et très stables.

- Numéro d'indice de couleur (C. I.) : 19140
- Nom chimique: Hydroxy-5-(sulfo-4-phényl)-1-(sulfo-4-phénylazo)-4-H-pyrazole-carboxylate-3 trisodique.
- Formule chimique : $C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$
- Spectrométrie : Absorption maximale dans l'eau à environ 426 nm.

La tartrazine est élaborée à partir d'acide amino-4-benzène sulfonique diazoté au moyen d'acide chlorhydrique et de nitrite de sodium. Le dérivé diazoté est ensuite couplé à l'acide 4,5-dihydro-5-oxo-1-(4 sulphophényl)-1H-pyrazole-3-carboxylique ou à l'ester de méthyl ou d'éthyl ou encore à un sel de cet acide carboxylique. La teinture ainsi obtenue est purifiée et isolée sous la forme de sel de sodium. La tartrazine est essentiellement constituée de sel trisodique d'hydroxy-5-(sulfo-4-phényl)-1-(sulfo-4-phénylazo)-4-H-pyrazole-carboxylate-3 et de matières colorantes accessoires associées à des composants non colorés, principalement du chlorure de sodium et/ou du sulfate de sodium [37].

Nous avons utilisé un flacon de 1kg de la tartrazine en poudre, fabriqué par SAYONA COLORS - INDE.

1.2.2. Jaune orangé S (Sin 110)

Jaune orangé S ou Jaune soleil FCF est un colorant chimique artificiel, de la famille des colorants azoïques et dérivé du naphthalène de couleur jaune, sous forme de poudre rouge orangé fine très soluble dans l'eau, forme avec l'eau une solution jaune orangé homogène et très stable.

- Numéro d'indice de couleur (C. I.) : 15985.
- Nom chimique : Sel disodique de l'acide hydroxy-2-(sulfo-4-phénylazo)-1-naphthalènesulfonique-6.
- Formule chimique : $C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$.

- Spectrométrie : Absorption maximale à environ 485 nm dans de l'eau de pH 7.

Le jaune orangé S est essentiellement constitué de sel disodique de l'acide hydroxy-2-(sulfo-4-phénylazo)-1-naphtalènesulfonique-6 et de matières colorantes accessoires associées à des composants non colorés, principalement du chlorure de sodium et/ou du sulfate de sodium. Le jaune orangé S est fabriqué à partir d'acide amino-4-benzènesulfonique diazoté au moyen d'acide chlorhydrique ou sulfurique et de nitrite de sodium. Le dérivé diazoté est couplé à l'acide hydroxy-6-naphtalènesulfonique-2. La teinture est isolée sous la forme de sel de sodium et séchée. Le jaune orangé S décrit est le sel de sodium. Les sels de calcium et de potassium sont également autorisés [37].

Nous avons utilisé un flacon de 1 kg de jaune orangé S en poudre, fabriqué par SAYONA COLORS - INDE.

1.2.3. Rouge ponceau 4R (Sin 124)

Ponceau 4R, Rouge cochenille A est un colorant chimique artificiel, de la famille des colorants azoïques et dérivé du naphtalène de couleur rouge, sous forme de poudre rouge foncé très soluble dans l'eau, forme avec l'eau une solution homogène et très stable.

- Numéro d'indice de couleur (C. I.) : 16255.
- Nom chimique : Sel trisodique de l'acide hydroxy-2-(sulfo-4-naphtylazo-1)-1-naphtalènedisulfonique-6,8.
- Formule chimique : $C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$.
- Spectrométrie : Absorption maximale dans l'eau à environ 505 nm.

Le rouge Ponceau 4R est essentiellement constitué de sel trisodique de l'acide hydroxy-2-(sulfo-4-naphtylazo-1)-1-naphtalènedisulfonique-6,8 et de matières colorantes accessoires associées à des composants non colorés, principalement du chlorure de sodium et/ou du sulfate de sodium. Le rouge Ponceau 4R est fabriqué par copulation de l'acide naphthioniquediazoté et d'acide G (acide naphthol-2-disulfonique-6,8), puis conversion du produit de copulation en sel trisodique.

Le rouge ponceau 4R décrit est le sel de sodium. Les sels de calcium et de potassium sont également autorisés [37].

Nous avons utilisé un flacon de 1 kg de rouge ponceau 4R en poudre, fabriqué par SAYONA COLORS - INDE.

1.2.4. Rouge allura AC (Sin 129)

C'est un colorant chimique artificiel, de la famille des colorants azoïques de couleur rouge foncé, sous forme de poudre rouge foncé très soluble dans l'eau, forme avec l'eau une solution rouge foncé homogène et très stable.

Le rouge allura AC est essentiellement constitué de sel disodique de l'acide hydroxy-2-(méthoxy-2-méthyl-5-sulfo-4-phénylazo)-naphthalènesulfonique-6 et de matières colorantes accessoires associées à des composants non colorés, principalement du chlorure de sodium et/ou du sulfate de sodium. Le rouge allura AC est fabriqué par copulation d'acide amino-5-méthoxy-4-toluènesulfonique-2 diazoté et d'acide hydroxy-6-naphthalènesulfonique-2 [37].

Nous avons utilisé un flacon de 1 kg de la tartrazine en poudre, fabriqué par SAYONA COLORS - INDE.

1.2.5. Bleu brillant FCF (Sin 133)

C'est un colorant chimique artificiel, dérivé du goudron de houille de couleur bleu, sous forme de poudre bleu foncé soluble dans l'eau, forme avec l'eau une solution bleu homogène et très stable.

- Numéro d'indice de couleur (C. I.) : 42090.
- Nom chimique : Sel disodique de l'acide α -[(N-éthyl-sulfo-3-benzylamino)-4-phényl]- α -(N-éthyl-sulfo-3-benzylamino-4)-cyclohexadiène-2,5-ylidène) toluènesulfonique-2
Formule chimique : $C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_3$.
- Spectrométrie : Absorption maximale dans l'eau à environ 630 nm.

Le bleu brillant FCF est essentiellement constitué de sel disodique de l'acide α -[(N-éthyl-sulfo-3-benzylamino)-4-phényl]- α -(N-éthyl-sulfo-3-benzylamino-4)-cyclohexadiène-2,5-ylidène) toluènesulfonique-2 et de son isomère, ainsi que de

matières colorantes accessoires associées à des composants non colorés, principalement du chlorure de sodium et/ou du sulfate de sodium [37].

Nous avons utilisé un flacon de 1 kg de bleu brillant en poudre, fabriqué en INDE par SAYONA COLORS.

1.2.6. Sorbate de potassium (Sin 202)

C'est un conservateur chimique synthétique, très soluble, forme avec l'eau des solutions homogènes et très stables.

- Nom chimique : Sorbate de potassium ; (E, E)-hexa-2,4,-diénoate de potassium; Sel de potassium de l'acide *trans*, *trans*-hexa-2,4,-diénoïque-toluènesulfonique-2.
- Formule chimique : $C_6H_7O_2K$ [37].

La quantité utilisée pour notre étude a été prélevée d'un sachet de 25 kg de sorbate de potassium sous forme de vermicelle jaunâtre soluble dans l'eau, fabriqué par WUXI R and D CHEMICAL CO. LTD- CHINE.

1.2.7. Benzoate de sodium (Sin 211)

C'est un conservateur chimique de synthèse, forme avec l'eau des solutions homogènes et très stables.

- Nom chimique : sel de sodium de l'acide benzène carboxylique; sel de sodium de l'acide phényl carboxylique
- Formule chimique : $C_7H_5O_2Na$ [37].

La quantité utilisée pour notre étude a été prélevée d'un sachet de 25 kg de sorbate de potassium sous forme de granulés blancs solubles dans l'eau, fabriqués par WUXI R and D CHEMICAL CO. LTD- CHINE.

1.2.8. Acesulfame K (Sin 950)

C'est un édulcorant chimique de synthèse, environ 200 fois plus sucré que le saccharose, stable à la chaleur. Pouvant avoir un arrière-goût amer, il est souvent utilisé avec l'aspartame.

- Nom chimique : Sel de potassium de 2,2-dioxyde de 6-méthyl-1,2,3-oxathiazine-4(3H)-one.
- Formule chimique : $C_4H_4KNO_4S$ [37].

Dans la préparation des doses de notre étude, nous avons utilisé un sac de 1 kg d'Acesulfame K sous forme de poudre cristalline blanche très soluble dans l'eau, fabriquée par GREENWAY- CHINE.

1.2.9. Aspartame (Sin 951)

L'aspartame est un édulcorant artificiel découvert en 1965. C'est un dipeptide composé de deux acides aminés naturels, l'acide L-aspartique et la L-phénylalanine, a un pouvoir sucrant environ 200 fois supérieur à celui du saccharose, la différence de l'acésulfame-K, l'aspartame n'a pas de composante ou d'arrière-goût amer. L'aspartame est souvent utilisé en mélange avec d'autres édulcorants intenses (acésulfame-K) pour pallier la diminution de la saveur sucrée.

- Nom chimique : Ester N-méthylrique de N-L- α -aspartyl-L-phénylalanine Ester N-méthylrique de l'acide 3-amino- N-(α -carbométhoxy-éthoxyphényl) succinamique.
- Formule chimique : $C_{14}H_{18}N_2O_5$ [37].

Nous avons utilisé un sac de 1 kg d'Aspartame sous forme de poudre blanche faiblement soluble dans l'eau, fabriqué par SHEERHERB - CHINE.

1.2.10. Acide ascorbique (Sin 300)

C'est la vitamine C, un acide organique chimique de synthèse ayant des propriétés antioxydantes, utilisé dans l'industrie agroalimentaire en tant qu'antioxydant. Sa fonction principale est d'empêcher la prolifération de bactéries qui pourraient dégrader le produit [70].

- Nom chimique : 5-(1,2-dihydroxyéthyl)-3,4-dihydroxyfuran-2-one.
- Formule chimique : $C_6H_8O_6$ [37].

La quantité utilisée pour notre étude a été prélevée d'un sachet de 25 kg de l'acide ascorbique (Vitamine C) sous forme de poudre blanche soluble dans l'eau, fabriqué par SHANGHAI BEST FOOD - CHINE.

1.3. Pesticides

Les pesticides utilisés pour notre étude ont été sélectionnés suite à une enquête sur le terrain chez 15 vendeurs des produits phytosanitaires et 10 agriculteurs (voire les fiches d'enquêtes appendice F et G) selon leur fréquence d'utilisation par les agriculteurs de la région de la Mitidja (Tipaza et Blida) et leurs degrés de toxicité. En plus nous avons classé les 11 fruits et 11 légumes largement consommés en Algérie selon leur degré de d'utilisation de pesticides (nombre et fréquence). Pour cela nous avons choisi 06 pesticides pour l'administration orale aux rats, ces produits ont été obtenus à partir d'un magasin des produits phytosanitaires à Tipaza. Les DJA des différents pesticides sont mentionnés sur le tableau ci-dessous :

Tableau 4.2 : Les pesticides administrés sur les rats dans notre étude [26].

N°	Pesticides	Classe	DJA*
1	Chlorpyrifos-méthyl	Insecticide	0,01 mg/kg
2	Deltaméthrine	Insecticide	0,01 mg/kg
3	Methidathion	Insecticide	0,001 mg/kg
4	Cyperméthrine	Insecticide	0,05 mg/kg
5	Acétamipride	Insecticide	0,07 mg/kg
6	Abamectine	Acaricide	0,0025 mg/kg

* Norme Codex Alimentarius 2000.

1.3.1. Chlorpyrifos-méthyl

La Chlorpyrifos-méthyl est la substance active du pesticide, qui présente un effet insecticide, et qui appartient à la famille chimique des organophosphorés.

- ✓ Formule brute : $C_7H_7Cl_3NO_3PS$.
- ✓ Thiophosphate de O,O-diméthyle et de O-3,5,6-trichloro-2-pyridyle
- ✓ Durée de demi-vie : sa vitesse de dégradation dans le sol est de 18 jours.
- ✓ DL50 : 1 828 mg kg⁻¹ pour le rat par voie orale [120].

Nous avons utilisé un pesticide liquide à partir d'un flacon de 1 Litre de la marque RELDAN 40 EC, 400 g/L, matière active : Chloroperiphos-methyl, fabriqué par Dow AgroScience, Grande-Bretagne.

1.3.2. Deltamethrine

La deltaméthrine est la matière active des pesticides de la famille des pyréthriinoïdes, utilisée principalement comme insecticide et acaricide en raison de ses propriétés neurotoxiques.

- ✓ Formule brute : $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$.
- ✓ Nom chimique : (1R,3R)-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-diméthyl-cyclopropane carboxylate de(S)- α -cyano-3-phénoxybenzyle1.
- ✓ Durée de demi-vie : sa vitesse de dégradation dans le sol est de 20-72 jours.
- ✓ DL50 : 4000 mg kg en suspension aqueuse pour le rat par voie oral [121].

Nous avons utilisé un pesticide liquide à partir d'un flacon de 250mL de la marque decis 25 EC, 25 g/L, matière active : Deltamethrine, fabriqué par Bayer Crop Science, Valence, Espagne.

1.3.3. Methidathion

Le méthidathion est un composé thiophosphate organique synthétique et un inhibiteur organophosphate de l'acétylcholinestérase utilisé comme insecticide.

- ✓ Formule brute : $C_6H_{11}N_2O_4PS_3$
- ✓ Nom chimique : 3-(diméthoxyphosphinothioylsulfanylméthyl)-5-méthoxy-1,3,4-thiadiazol-2-one.
- ✓ DL50 : 25-54 mg kg pour le rat par voie oral [121].

Nous avons utilisé un pesticide liquide à partir d'un flacon de 1 Litre de la marque LIMACIDE 40, 400 g/L, matière active : Methidation, fabriqué par GEORGE-DARAS S.A, Marseille, France.

1.3.4. Cyperméthrine

La cyperméthrine est une substance active de pesticide, qui présente un effet insecticide, et qui appartient à la famille chimique des pyréthriinoïdes de synthèse.

- ✓ Formule brute : $C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$
- ✓ Nom chimique : (RS)-alpha-cyano-3-phenoxybenzyl (1RS,3RS;1RS,3SR)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate
- ✓ Durée de demi-vie : sa vitesse de dégradation dans le sol est de 30 jours.
- ✓ DL50 : 250-4150 mg kg pour le rat par voie oral [121].

Nous avons utilisé un pesticide liquide à partir d'un flacon de 1 Litre de la marque Cyatrin 10 EC, 100 g/L, matière active : Cypermethrine, fabriqué par Golden Field, Amane, Jordanie.

1.3.5. Acétamipride

L'acétamipride est un composé organochloré. C'est un insecticide inodore de la famille des néonicotinoïdes. Il est systémique et est destiné à lutter contre les insectes suceurs dans les cultures de végétaux.

- ✓ Formule brute : $C_{10}H_{11}ClN_4$.
- ✓ Nom chimique : (1E)-N-[(6-chloro-3-pyridyl)méthyl]-N'-cyano-N-méthylacétamidine.
- ✓ Durée de demi-vie : sa vitesse de dégradation dans le sol est de 3 jours et 14 jours dans les tissus végétaux.
- ✓ DL50 : 1 828 mg kg (rat oral) [121].

Nous avons utilisé un pesticide liquide à partir d'un flacon de 250mL de la marque PICADOR 20%, 200 g/L, matière active : Acetamipride, fabriqué par Vitagro, chine.

1.3.6. Abamectine

L'abamectine est une substance active de pesticide, qui présente un effet insecticide, acaricide et nématicide. C'est un mélange de plusieurs substances

chimiques de la famille des avermectines (Avermectine B1a et Avermectine B1b). Peu soluble dans l'eau. Soluble dans les solvants organiques.

- ✓ Formule brute : $C_{48}H_{72}O_{14}$ et $C_{47}H_{70}O_{14}$
- ✓ Nom chimique : [(S)-secbutyl]-21,24-dihydroxy-5',11,13,22-tetraméthyl-2-oxo-3,7,19-trioxatétracyclo[15.6.1.14,8.020, 24]pentacosa-10,14,16,22-tétraène-6-spiro-2'-(5',6'-dihydro-2'H-pyran)-12-yl 2,6-didéoxy-4-O-(2,6-didéoxy-3-O-méthyl- α -L-arabinohexopyranosyl)-3-O-méthyl- α -L-arabinohexopyranoside.
- ✓ Durée de demi-vie : sa vitesse de dégradation dans le sol est de 30 jours.
- ✓ DL50 : 200 mg/kg en suspension aqueuse pour le rat par voie orale [121].

Nous avons utilisé un pesticide liquide à partir d'un flacon de 200mL de la marque VAPCOMIC EC, 18 g/L, matière active : Abamictine, fabriqué en par VAPCO, Amane, Jordanie.

2. Méthodes d'analyses

La réalisation de notre étude s'est déroulée en quatre étapes principales :

- 1- Enquête pour choisir les pesticides les plus utilisés et les plus dangereux avec une classification des fruits et légumes les plus contaminés par les pesticides dans la région de la Mitidja (fiches d'enquête : voir appendices F, G)
- 2- La caractérisation du régime alimentaire (aliment, argile, psyllium et l'eau) destiné aux rats et qui s'est axée sur la :
 - ✓ Caractérisation physicochimique de l'eau potable de robinet utilisée : conductivité, pH, taux de Calcium et Magnésium ; Ca et Mg, chlorure Cl^- , Sodium Na, potassium K, Nitrate (NO_3^-) et Nitrite (NO_2^-).
 - ✓ Caractérisation physicochimique de l'aliment : détermination des taux de protéines, la matière grasse, calcium et phosphore ;
 - ✓ Analyse de la qualité microbiologique de l'eau : *Coliformes totaux coliformes fécaux*, *Streptocoques*, *Clostridium*.
 - ✓ Analyses de la qualité microbiologique de l'aliment simple, Aliment+psyllium, Aliment+argile, Aliment+psyllium+argile, Argile verte, poudre de psyllium : Flore aérobie mésophile totale, Coliformes totaux, Coliformes fécaux, Staphylocoques, Salmonelle, moisissures.

3- La réalisation de l'expérimentation animale sur des rats Wistar femelles pour la détermination de l'effet des pesticides et des additifs alimentaires sur la physiologie des rats et l'effet anti-toxique de l'argile verte et psyllium par :

- ✓ Administration par voie *per os* (orale) des doses (DJA et DJA x2) de mélange de 6 pesticides et/ou un mélange de 10 additifs alimentaires sur 9 lots de rats et un lot témoin dont le régime alimentaire est avec ou sans argile et psyllium pendant une durée de 7 mois ;
- ✓ Mise en évidence de l'effet des pesticides, additifs, psyllium et argile sur la microflore intestinale et le temps de transit digestif des rats après 90 jours d'administration des doses par des analyses microbiologiques : *Enterobacter aerogenes*, *E.coli*, *Enterococcus spp*, *Lactobasillus spp*, *Bifidobacterium spp*, *Clostridium spp*, *Bacteroides spp* ;
- ✓ Suivi hebdomadaire ou tous les 15 jours du poids corporel des rats pendant les 7mois de l'expérimentation.

4- Sacrifice des rats après 7 mois d'expérimentation et l'évaluation de l'effet des pesticides, additifs alimentaires, psyllium et argile sur la physiologie des rats par :

- ✓ Dosage des paramètres biochimiques et hématologiques du sang des rats : glycémie, urée, créatinine, acide urique, cholestérol total, triglycérides, ASAT, ALAT, PAL, GGT, bilirubine totale, protéines totales, albumine, Fer, calcium, sodium, potassium;
- ✓ Réalisation des coupes histopathologiques dans les organes vitaux des rats au niveau du foie, des reins et l'observation microscopique des tissus.

2.1. Analyses physicochimiques de l'eau

2.1.1. Détermination de la conductivité électrique

➤ Principe

La conductivité mesure la capacité d'une solution à conduire le courant entre deux électrodes à 20°C. La plupart des matières dissoutes se trouvent sous forme d'ions chargés électriquement. La mesure de la conductivité permet donc d'apprécier la quantité de sels dissous dans les solutions [122].

➤ Mode opératoire

Pour la mesure de la conductivité électrique, il suffit de :

- Plonger la pointe de l'électrode du conductimètre électrique dans la solution à analyser.
- Lire directement sur l'écran la valeur de la température en °C et la conductivité électrique en $\mu\text{s}/\text{cm}$ ou ms/cm .

2.1.2. Détermination du pH (NF V 05-108, 1970).

➤ Principe

C'est la détermination en unité pH de la différence de potentiel d'hydrogène existant entre deux électrodes en verre plongées dans une solution aqueuse (l'eau)

➤ Mode opératoire

Pour la mesure du pH, il suffit de :

- Plonger l'électrode du pH-mètre dans la solution à analyser (l'eau).

➤ Expression des résultats

Lire directement sur l'écran la valeur de la température en °C et la valeur de pH sans unité.

2.1.3. Dosage du Calcium Ca^{2+} et Magnésium Mg^{2+}

➤ Principe

Le dosage se fait par complexométrie, le sel disodique de l'acide éthylènediamino Tétracétique (EDTA) cristallisé avec H_2O , appelé aussi compléxon ou versénate forme avec un nombre de cations des complexes dont la stabilité dépend essentiellement du pH [122].

➤ Mode opératoire

Titre de de l'acide Ethylène Diamino Tétracétique (EDTA)

- Le dosage de l'E.D.T.A s'impose à chaque fois que le remplissage du flacon doseur est fait.

- On prépare une solution de CaCO_3 à 1 g/L (attaque de 1 g de CaCO_3 par HCl dilué puis ajuster à 1 litre par de l'eau distillée. Le CaCO_3 doit être séché à l'étuve puis refroidi au dessiccateur. On prélève 10 mL qui seront dosés en même temps que les échantillons. Cette solution contient 20 mé/L de Ca^{2+} .

- Les PE ayant été placés dans des béchers de 50 mL on y ajoute systématiquement 2 mL de Tampon (Ca/Mg) et 2 mL de NaOH (Ca) et une pincée d'indicateur coloré; la solution prend une teinte rose (Ca/Mg) et rouge (Ca).

- La solution étalon de Ca^{2+} et les échantillons ainsi préparés sont alors traités de manière identique. L'E.D.T.A étant placé dans la burette, on verse jusqu'au virage du rose au bleu en maintenant une agitation dans le bécher. On notera soigneusement le volume V_1 d'E.D.T.A nécessaire pour faire virer la solution étalon de Ca^{2+} et les volumes V_2 d'E.D.T.A nécessaire pour faire virer les échantillons.

➤ Expression des résultats

1. Calcul de la normalité de l'E.D.T.A :

10 ml à 20 mé/L de Calcium ont été dosés par V_1 d'E.D.T.A

$$N(\text{E. D. T. A})\text{mé/L} = \frac{(20 \times 10)}{V_1} = \frac{200}{10} \quad (4.1) \quad N : \text{Le titre.}$$

2. Teneur en Calcium et Magnésium des échantillons :

$$(\text{Ca/Mg})\text{mé/L} = \frac{N(\text{E. D. T. A}) \times V_2}{PEmL} \quad (4.2)$$

$$(\text{Ca/Mg})\text{mg/L} = (\text{Ca/Mg})\text{mé/L} \times N(\text{E. D. T. A})\text{mé/L} \quad (4.3)$$

3. Teneur en Calcium des échantillons :

$$Ca\text{mé/L} = \frac{N(\text{E. D. T. A}) \times V_2}{PEmL} \quad (4.4)$$

$$Camg/L = Ca\text{mé/L} \times N(\text{E. D. T. A})\text{mé/L} \quad (4.5)$$

4. Teneur en Magnésium des échantillons :

$$Mgmé/L = (\text{Ca/Mg})\text{mé/L} - Ca\text{mé/L} \quad (4.6)$$

$$Mg\text{ mg/L} = (\text{Ca/Mg})\text{mg/L} - Camg/L \quad (4.7)$$

2.1.4. Dosage des chlorures

➤ Principe

Les chlorures, en présence du thiocyanate mercurique et de l'alun ferrique donnent en milieu acide nitrique un complexe coloré orange susceptible d'un dosage colorimétrique par un spectrophotomètre (à la longueur d'onde de 470 nm) [122].

➤ Mode opératoire

- On place les PE (prise d'essai) 5 ml dans des erlenmeyers de 50 mL.
- Les PE des solutions étalons, le témoin (H₂O) et les échantillons sont alors traités de manière identique à savoir :
 - On ajoute dans l'ordre 1 mL de la solution de thiocyanate mercurique préalablement diluée au 1/3 puis 1 mL de la solution nitrique d'alun ferrique également diluée au 1/6.
 - On agite vigoureusement les erlenmeyers pour uniformiser la coloration qui apparaît et on laisse au repos pendant ½ heure.
 - On effectue les lectures au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 470 nm en réglant le zéro avec le témoin.

➤ Expression des résultats

Lire directement sur l'écran la valeur de l'absorbance. La courbe d'étalonnage donne directement la teneur en chlorures en mg/L.

2.1.5. Dosage du sodium Na⁺ et potassium K⁺

➤ Principe

Le dosage se fait par photométrie de flamme, les ions en solution sont portés au moyen d'une flamme de température convenable à un niveau énergétique supérieur à la normale (on dit que les atomes sont excités par la flamme). Libérés de la flamme, ils restituent l'énergie acquise en émettant une radiation caractéristique de l'élément. On pulvérise donc au moyen d'un gicleur, la solution à doser dans une flamme de température déterminée par

l'élément que l'on recherche. On sélectionne la radiation attendue au moyen d'un filtre. L'intensité de la radiation est proportionnelle à la concentration de l'élément présent dans la solution. On établit donc une gamme étalon pour chaque élément dosé et l'on s'y réfère pour déterminer une concentration inconnue. Le sodium et le potassium sont dosés à partir de la même solution étalon à des sensibilités différentes du photomètre de flamme [122].

➤ Mode opératoire

-Préparer le plateau de l'échantillonneur et placer les tubes des échantillons d'eau à analyser et la gamme d'étalonnage.

- Allumer l'échantillonneur et l'auto analyseur, ouvrir la bouteille.

- Tremper le tuyau du nébulisateur dans de l'eau distillée pour rincer le système.

- Tremper le tuyau du réactif dans le Latium.

- Quand la coloration de la flamme devient rose, lancer l'analyse du blanc en appuyant sur le bouton set du photomètre.

- Quand le photomètre affiche cal et zéro on lance l'analyse par le logiciel : utilisation du logiciel : flow access.

- L'analyse se fait automatiquement par le système.

➤ Expression des résultats

La courbe d'étalonnage donne directement la teneur en sodium Na^+ et potassium K^+ en mg/L. Lire directement sur l'écran la valeur en mg/L.

2.1.6. Dosage du Nitrate (NO_3^-)

➤ Principe

Afin de déterminer les nitrates dans les eaux, on utilise la méthode de l'acide sulfocalicylique. Ce dernier agit sur les nitrates en donnant un dérivé : acide nitrosul fosalicylique de couleur jaune [122].

➤ Mode opératoire

On introduit dans une série de capsules de 60 ml successivement.

Numéro de capsule	T	1	2	3	4
Solution étalon d'azote nitrique à 5 ppm	0	1	2	5	10
Eau distillée	10	9	8	5	0
Correspondance en (mg/l) d'azote	0	0,5	1	2,5	5
Solution de salicylate de sodium	1	1	1	1	1

Pour l'échantillon on prend 10 ml d'eau à analyser +1ml de solution de salicylate de sodium. On évapore dans une étuve à 75°-80°c, puis on laisse refroidir, ensuite on reprend le résidu par 2 ml d'acide sulfurique concentré en prenant soin d'humecter soigneusement. On attend 10mn, puis on ajoute 15ml d'eau distillée et 15ml de la solution d'hydroxyde de sodium et de tartrate double de sodium et de potassium.

Enfin on effectue la lecture au spectromètre à $\lambda = 415 \text{ nm}$ (spécifique aux Nitrates)

➤ Expression des résultats :

La courbe d'étalonnage donne directement la teneur en Nitrate (NO_3^-) mg/L. Lire directement sur l'écran la valeur en mg/L [122].

2.1.7. Dosage du Nitrite(NO_2^-)

➤ Principe

Le principe du dosage est basé sur la réaction de Griess (diazotation d'une amine primaire aromatique en présence d'un nitrite en milieu acide puis copulation avec une autre amine aromatique):

1. Action du nitrite (NO_2^-) sur la sulfanilamide en milieu acide et formation d'un sel de diazonium.
2. Réaction du sel de diazonium sur le N-(1-Naphtyl) éthylènediamine (NED) en milieu chlorhydrique ($\text{pH} < 2$).

Le composé final est rose et peut donner lieu à un dosage colorimétrique [122].

➤ Mode opératoire

1. Etape 1 :

Sulfanilamide	$1,12 \times 10^{-3}$ mol/L
HCl	23×10^{-3} mol/L
pH	1,7
Durée	2 à 6 minutes

2. Etape 2 :

NED	$0,074 \times 10^{-3}$ mol/L
Durée	10-120 min

On effectue ensuite une colorimétrie à 540 nm.

➤ Expression des résultats

La courbe d'étalonnage donne directement la teneur en Nitrite (NO_2^-) mg/L. Lire directement sur l'écran la valeur en mg/L [122].

2.2. Analyses physico-chimiques de l'aliment des rats

Le contrôle de la qualité physico-chimique de l'aliment est réalisé par la mesure du : taux de protéines, la matière grasse, le calcium et le phosphore.

2.2.1. Détermination du taux des protéines (NA 652, 1994).

➤ Principe

C'est la détermination conventionnelle de la teneur en protéines brutes à partir de la teneur en azote, dosée selon KJELDAHL.

L'azote total est déterminé par titrimétrie. Après minéralisation et distillation, l'échantillon est minéralisé par voie humide, la solution acide est alcalisée par une solution d'hydroxyde de sodium. L'ammoniac libéré est entraîné par distillation et recueilli dans une quantité déterminée d'acide sulfurique, dont l'excès est titré par une solution d'hydroxyde de sodium NaOH.

➤ Mode opératoire

1. Prise d'essai : introduire dans les matras environ 0,5 à 1 g de l'échantillon suivant la teneur présumée en azote et le degré de l'homogénéisation du produit.

2. Minéralisation : placer les matras sur le dispositif de chauffage, après avoir ajouté environs 1 à 2 g de catalyseur et 12,5 mL d'acide sulfurique concentré, chauffer doucement en agitant de temps en temps. Augmenter la température progressivement jusqu'à ce que le liquide devient limpide et de coloration verte stable. Poursuivre le chauffage environ 2 heures et laisser refroidir les matras. Compléter en ajoutant 100 mL d'eau distillée.

3. Distillation : mettre les matras dans l'appareil à distillation. Alcaliser le milieu en introduisant lentement dans le matras environ 50 mL de solution NaOH (soude à 47%), il se produit un échauffement notable du produit, peser 333 g de NaOH puis ajouter de l'eau distillée préalablement refroidie, puis mélanger et mettre sur l'agitateur pour obtenir un mélange homogène dilué avec l'eau distillée.

L'entraînement de l'ammoniac commence peu après. Ce dernier libéré par l'alcalisation est distillé. Le distillat est recueilli dans un erlenmeyer contenant 20 ml de la solution absorbante (solution d'acide borique et l'indicateur : rouge de méthyle + vert de bromocrésol). Poursuivre la distillation jusqu'à récupération d'environ 100 mL de distillat.

4. Titrage : le titrage doit être effectué aussi rapidement après la distillation par une solution d'acide sulfurique à 0,1 N jusqu'à persistance du point de titrage. Un essai à blanc doit être inclus dans chaque série de dosage.

➤ Expression des résultats

La teneur en azote total exprimé en gramme d'azote pour 100 g d'échantillon est donnée par la formule suivante :

$$\text{Azot total \%} = \frac{(V_1 - V_0) \times 14}{m} \times 100 \quad (4.8)$$

Où :

V_1 : Volume en millilitre de la solution d' H_2SO_4 utilisée pour la prise d'essai.

V_0 : Volume en millilitre de la solution d' H_2SO_4 utilisée pour l'essai à blanc.

m : La masse en gramme de la prise d'essai. Le résultat de la détermination est exprimé en taux de protéines après multiplication de la teneur en azote total par un coefficient approprié correspondant à la position du produit 6,25.

2.2.2. Dosage de la matière grasse (NA 654, 1994)

➤ Principe

Le solvant organique (extracteur) est très peu polaire, il extrait les triglycérides et les acides gras libres à chaînes longues.

➤ Mode opératoire

A l'aide d'un appareil de dosage de la matière grasse (système Soxhlet), nous pesons 1 g de l'échantillon (P_0) dans une cartouche en cellulose et nous mettons 150 mL d'éther de pétrole dans un ballon préalablement lavé, séché et tiré (P_1).

La cartouche est placée dans le système Soxhlet, le ballon est placé dans le bain-marie qui est réglé à une température égale à celle du degré d'ébullition du solvant (95 °C).

L'extraction se fait par ébullition du solvant et condensation de ses vapeurs par un réfrigérant, le système de siphonage assure le passage des gouttelettes de la matière grasse vers le ballon.

Cette extraction dure environ 6 heures, et l'éther peut être récupéré avant la fin de l'opération.

Après les 6 heures, les ballons sont retirés et mis dans une étuve réglée à la même température de celle du bain-marie afin d'évaporer l'excès d'éther.

Le ballon est ensuite refroidi jusqu'à poids constant dans un dessiccateur et pesé de nouveau (P_2).

➤ Expression des résultats

Le pourcentage de la matière grasse est calculé par différence de pesée du ballon :

$$\text{MGT}\% = \frac{(P_2 - P_1)}{P_0} \times 100 \quad (4.9)$$

Où :

P₀ : La prise d'essai de l'échantillon.

P₁ : Poids du ballon.

P₂ : Poids du ballon contenant l'extrait gras.

2.2.3. Dosage du calcium (NA 653, 1994)

➤ Principe

Incinération d'une prise d'essai, puis traitement de ces cendres à l'acide chlorhydrique et précipitation du calcium sous forme d'oxalate de calcium. Dissolution du précipité dans l'acide sulfurique et titrage par l'acide oxalique formé à l'aide d'une solution titrée de permanganate de potassium.

➤ Mode opératoire

Après l'incinération totale de la prise d'essai dans un four à moufle à $550\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 4 heures. Transférer les cendres dans un bécher ; ajouter 40 mL d'acide chlorhydrique et 60 mL d'eau distillée et quelques gouttes d'acide nitrique. Porter à ébullition et l'y maintenir 30 minutes. Refroidir et transvaser la solution dans une fiole de 250 mL, rincer et compléter au trait de jauge avec l'eau distillée. Prélever à l'aide d'une pipette une partie aliquote contenant de 20 à 40 mg de calcium, selon la teneur présumée en calcium et la verser dans un bécher de 250 mL. Ajouter 1 mL d'acide citrique et 5 ml de solution chlorure d'ammonium, diluer à environ 100 mL avec de l'eau portée à ébullition, ajouter quelques gouttes de solution de vert de bromocrésol et 30 mL de solution d'oxalate d'ammonium chaude. Neutraliser très lentement avec l'ammoniaque en agitant constamment, jusqu'à obtention d'un pH de 4,4 à 4,6, laisser décanter toute une nuit.

Filtrer dans un creuset filtrant de porosité 4, laver le bécher et le creuset à l'eau jusqu'à l'élimination complète de l'excès d'oxalate d'ammonium. Prendre 50 mL d' H_2SO_4 chaude et rincer le creuset pour récupérer le dépôt qui doit être mis dans l'erlenmeyer. Compléter le rinçage du creuset à l'eau chaude ensuite

compléter le volume à 100 mL. Amener la température de la solution à 70- 80°C, titrer la solution en utilisant le permanganate de potassium (0,1N) jusqu'à obtention d'une couleur rose.

➤ Expression des résultats

Où :

$$\text{Ca \%} = \frac{(V \times 2,004)}{P} \times 100 \quad (4.10)$$

V : Le volume de permanganate de potassium (0,1N).

P : La prise d'essai.

2.2.4. Dosage du phosphore (NA 657, 1994)

➤ Principe

L'échantillon est minéralisé, soit par voie sèche (pour les aliments organiques), soit par voie humide (pour les composés minéraux et les aliments liquides) et mis en solution acide. La solution est traitée par le réactif vanado-molybdique. La densité optique de la solution jaune ainsi formée est mesurée au spectrophotomètre à 430 nm.

➤ Mode opératoire

1) Préparation de la solution : selon la nature de l'échantillon, préparer une solution comme indiqué en 1.1 ou 1.2 :

1.1. Cas général : peser 1 g de l'échantillon. Introduire la prise d'essai dans un matras de Kjeldahl, ajouter 20 mL d'acide sulfurique, agiter pour imprégner complètement la matière d'acide et éviter qu'elle adhère aux parois du ballon, chauffer et maintenir pendant 10 minutes à ébullition. Laisser refroidir légèrement, ajouter 2 mL d'acide nitrique, chauffer doucement, laisser refroidir légèrement, ajouter de nouveau un peu d'acide nitrique et porter à ébullition. Répéter ces opérations jusqu'à obtention d'une solution incolore. Refroidir, ajouter un peu d'eau, transvaser le liquide dans un ballon jaugé de 500 mL en rinçant le matras à l'eau chaude. Laisser refroidir, compléter au volume avec de l'eau, homogénéiser et filtrer.

1.2. Échantillon contenant des matières organiques et exemptes de dihydrogénophosphates de calcium et de magnésium :

Peser 1 mg de l'échantillon dans un creuset à incinération. Mélanger vigoureusement la prise d'essai à 1 g de carbonate de calcium. Calciner au four à moufle à $550^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ jusqu'à l'obtention de cendres blanches ou grises. Transvaser les cendres dans un bécher de 250 mL. Ajouter 20 mL d'eau et de l'acide chlorhydrique jusqu'à cessation de l'effervescence. Ajouter ensuite 10 mL d'acide chlorhydrique en excès. Porter le bécher sur un bain de sable et évaporer à sec. Récupère le résidu par 10 mL d'acide nitrique et faire bouillir pendant 5 minutes sur le bain de sable, sans évaporer à sec. Transvaser le liquide dans un ballon jaugé de 500 mL en rinçant le bécher à plusieurs reprises à l'eau chaude. Laisser refroidir, compléter au volume avec de l'eau, homogénéiser et filtrer.

2) Développement de la coloration et mesure de la densité optique : Diluer une partie aliquote du filtrat obtenu en première étape pour obtenir une concentration en phosphore atteignant au maximum $40\ \mu\text{g/mL}$. Introduire 10 mL de cette solution dans un tube à essai et y ajouter 10 mL du réactif vanado-molybdique. Homogénéiser et laisser reposer 10 minutes au moins à la température de 20°C . Mesurer la densité optique au spectrophotomètre à 430 nm par comparaison avec une solution obtenue par addition de 10 mL du réactif vanado-molybdique à 10 mL d'eau.

3) Courbe d'étalonnage :

Tracer la courbe d'étalonnage en portant en ordonnée les valeurs de la densité optique et en abscisse les quantités correspondantes au phosphore. La courbe est linéaire pour les concentrations comprises entre 0 et $40\ \mu\text{g/mL}$.

➤ Expression des résultats

Déterminer la quantité de phosphore de la prise d'essai en se référant à la courbe d'étalonnage. Exprimer le résultat en pour cent de l'échantillon.

2.3. Analyses de la qualité microbiologique de l'eau :

2.3.1. Recherche et dénombrement des coliformes totaux (ISO 9308, 1990)

➤ Préparation de l'échantillon à l'analyse

Cette technique consiste à faire passer un liquide à travers un filtre dont les pores ont un diamètre de 0.45 μm , les micro-organismes sont trop gros pour passer et sont donc retenus par le filtre. Pour forcer ce liquide à traverses le filtre on utilise deux solutions :

- ✓ Mise sous pression du liquide par l'intermédiaire d'un piston.
- ✓ Aspiration du liquide en créant par exemple une enceinte dépressurisée de l'autre côté du filtre.

Dans certains cas le filtre ayant servi à stopper les micro-organismes peut être Déposé sur un milieu de culture solide afin de permettre la multiplication des germes, ceci dans le but de procéder à leur dénombrement et à leur identification.

➤ Principe

Après filtration de l'eau à analyser, la membrane est déposée sur un milieu gélosé approprié. Ceci permet aux colonies de se développer préférentiellement au cours d'une incubation de 18 à 24 heures, et sous un aspect suffisamment caractéristique pour autoriser un diagnostic présomptif. Celui-ci peut d'ailleurs être confirmé par des repiquages judicieux.

➤ Mode opératoire

- Mettre en marche la rompe à eau.
- Flamber la surface supérieure de la rampe de filtration ainsi que la plaque poreuse (en ouvrant le robinet pour aspirer la flamme) et le réservoir. Laisser refroidir.
- La poser sur la plaque poreuse de la rampe de filtration.
- Verser stérilement la quantité d'eau désirée (100ml pour une eau désinfectée).
- Ouvrir le robinet pour laisser l'eau s'écouler.
- Dès que la membrane paraît sèche enlever le réservoir et prélever la membrane avec une pince stérile en la saisissant par son extrême bord.
- Déposer la membrane sur le milieu sélectif (ENDO) en prêtant et de ne pas piéger de bulle d'air.
- Incuber à 37°C la boîte de pétri, le couvercle vers le bas.

➤ La lecture des résultats

Après 24 heures d'incubation. Toutes les colonies suspectes lactose positif sont comptées puis repiquer sur le milieu TSI pour confirmer l'utilisation du lactose et le dégagement de gaz caractéristique des coliformes.

Pour le milieu TSI, inoculer la colonie isolée à l'aide d'une pipette pasteur stérile à la fois en stries à la surface de l'agar (plan incliné) et par piqure centrale sur toute la profondeur du tube, Ensuite incuber à 37 C° pendant 24h.

Remarque : Les tubes de TSI présentant un virage au jaune + production de gaz sont considérés comme étant positifs c'est-à-dire présence de coliforme totaux.

2.3.2. Recherche des coliformes fécaux (ISO 9308, 1990)

Inoculer le contenu de chaque tube de TSI positif dans un tube de Schubert en versant le contenu de ce dernier dans le tube de TSI puis renverser l'inoculum dans le tube de Schubert. Incuber à 44°C pendant 24 heures.

➤ Lecture des résultats

Après 24 heures d'incubation, tous les tubes présentant une culture, du gaz dans la cloche et une sont considéré comme positifs, c'est-à-dire comme contenant des coliformes fécaux.

2.3.3. Recherche *Escherichia coli* (ISO 9305 ,1989)

Inoculer le contenu de chaque tube de Schubert positif, puis ajouter trois gouttes de réactif de kovacs.

➤ Lecture des résultats

Apparition d'un anneau rouge. C'est –à-dire présence d'*E-Coli*.

2.3.4. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux (ISO 7899, 2000)

➤ Principe

Après filtration sur la membrane de cellulose, celle-ci est appliquée sur un support nutritif contenant des substances inhibitrices qui laissent se développer préférentiellement les colonies de streptocoques fécaux.

➤ Mode opératoire

- On filtre les mêmes quantités d'eau que pour la colorimétrie selon la même technique.
- Le milieu utilisé dans ce cas est le milieu de Slanetz.

- Après filtration, les membranes sont disposées sur le milieu puis incubées à 37°C pendant 48 heures. (Test présomptif).
- Les colonies roses ou marron avec un diamètre de 0,5 à 2 mm seraient les streptocoques fécaux.
- Pour la confirmation (test confirmatif), transférer la membrane sur BEA, incubé à 44°C. La lecture se fait après 2 à 3 heures.
- La présence de noircissement implique la présence des streptocoques fécaux.
- Toutes ces colonies sont comptées puis consignée sur registre.

➤ Expression des résultats

Le résultat est donné en nombre de germes par 100 ml.

2.3.5. Recherche et dénombrement des Clostridium sulfito réducteur

➤ Principe

Après traitement de l'échantillon par la chaleur pour détruire les formes végétatives, la membrane est déposée sur un milieu sélectif (gélose contenant du sulfate de sodium et des sels de fer). Incuber dans des conditions permettant une croissance en anaérobiose, les colonies sulfito-réductrices sont reconnaissables par un halo noir.

➤ Mode opératoire

- Remplir 100 ml d'eau à analyser dans un flacon, le porter au bain Marie à 80°C pendant 10min, puis un refroidissement brutal sous l'eau de robinet (choc thermique qui a pour but d'éliminer la forme végétative et garder la forme sporulée des bactéries sulfito-réducteur.
- Retirer la membrane de 0,22 µm de porosité à l'aide d'une pince stérile Après filtration, puis la placer à l'inverse dans la boîte de pétri.
- Couler la gélose viande foie (VF) sur la membrane, après refroidissement couler la deuxième couche de la gélose.
- L'incubation se fait à 37C°pendant 48 heures.

➤ Lecture des résultats

Considérée comme résultant d'une spore de bactérie anaérobie sulfito-réductrice toute colonie noire entourée d'un halo noir.

2.4. Analyses de la qualité microbiologique de l'aliment, argile vert, poudre de psyllium :

2.4.1. Préparation des échantillons (NF 08 010, 1996)

- Les dilutions sont toujours effectuées dans des conditions aseptiques.
- Peser 25g de aliment/psyllium/argile.
- Transférer dans un flacon stérile contenant 225 mL de TSE (Tryptone Sel Eau) :
Obtention de la suspension mère.
- Prélever aseptiquement 1 mL de la suspension mère (10^{-1}), l'homogénéisation du prélèvement se fait après aspiration et refoulement 3 fois ou par l'utilisation d'un homogénéisateur.
- Transférer aseptiquement 1 mL prélevé dans le 1er tube (10^{-2}).
- A l'aide d'une 2ème pipette stérile de 1 ml, transférer 1mLde la dilution 10^{-2} dans un tube de 9 mL de TSE, c'est la dilution 10^{-3} .

2.4.2. Dénombrement des germes aérobie mésophile totaux à 30 °C (NF 08 05, 1991)

➤ Principe

Il s'agit d'une culture par un ensemencement en profondeur sur gélose PCA, les substances nutritives apportées par la Tryptone, les facteurs vitaminiques de l'extrait de levure et le glucose (source énergétique) favorisent la croissance de la plupart des bactéries à dénombrer. Le dénombrement se fait par comptage des colonies lenticulaires obtenues.

➤ Mode opératoire

À l'aide d'une pipette stérile, transférer 1 mL de la suspension mère dans une boîte de Pétri stérile et les différentes dilutions retenues pour le dénombrement. Environ 15 à 20 mL de gélose PCA à 45°C ont été coulés sur cet inoculât. L'inoculum a été mélangé soigneusement avec le milieu par rotation des boîtes 5 fois dans un sens inverse, puis 5 mouvements de va-et-vient, puis 5 autres perpendiculairement aux premiers. Puis laisser pour se solidifier.

Après solidification complète, porter les boîtes ainsi préparées à l'étuve à 30°C pendant 72 heures.

➤ Lecture et dénombrement

Après la période d'incubation prescrite, nous avons procédé à l'aide d'un compteur de colonies, au dénombrement des colonies lenticulaires pour chaque boîte

retenue. Les boîtes sont triées et on ne retient pour le comptage que les boîtes lisibles contenant si possible au moins de 30 et plus de 300 colonies.

Le nombre N des germes totaux dénombrés à 30°C en UFC (Unité Formant Colonie) est calculé selon l'équation suivante :

Avec :
$$N(\text{UFC}) = \Sigma C \times d \quad (4.11)$$

ΣC : Somme de colonies comptées sur chaque boîte retenue

d : inverse de la dilution

- Remarque : cette méthode de calcul du nombre des bactéries est applicable pour tous les types de bactéries dénombrées.

2.4.3. Dénombrement des coliformes totaux et fécaux (NF ISO 4832, 2006)

➤ Principe

Il s'agit d'une culture par un ensemencement en profondeur sur gélose VRBL et comptage des colonies violettes obtenues. La présence simultanée de cristal violet et de sels biliaires assure l'inhibition des bactéries à Gram positif et la fermentation du lactose qui se traduit par une acidification, révélée par le virage au rouge de l'indicateur pH (rouge neutre), et par la précipitation d'acides biliaires autour des colonies.

➤ Mode opératoire

A partir de chaque dilution décimale, 1 mL d'inoculum a été mis aseptiquement dans deux boîtes de Pétri stériles dont la première a servi à la recherche des coliformes totaux et la seconde à la recherche des coliformes fécaux (*E. coli*).

15 mL du milieu sélectif solide VRBL à 45 ± 0,5°C ont été coulés dans la boîte de Pétri contenant l'inoculum, et un mélange de ce dernier au milieu de culture a été effectué. Après solidification, environ 4 mL du milieu VRBL ont été coulés de nouveau et laissés se solidifier. Les boîtes ainsi préparées ont été retournées et incubées dans une étuve réglée à 37 °C pendant 24 ± 2 h.

Ce qui concerne les coliformes fécaux, le même mode opératoire a été à la différence de la température d'incubation qui sera de 44 ± 1 °C.

➤ Lecture et dénombrement

Le dénombrement des colonies caractéristiques violacées entourées d'un halo violet de 0,5 mm de diamètre ou plus a été réalisé sur les boîtes ne contenant pas plus de 300 colonies caractéristiques et non caractéristiques.

2.4.4. Dénombrement des *Staphylococcus aureus* (NF ISO 6888-1, 2004)

➤ Principe

La croissance des staphylocoques sur gélose Baird-Parker au jaune d'œuf et au tellurite de potassium est favorisée par le pyruvate de sodium et la glycine. La microflore secondaire est inhibée en présence de chlorure de lithium, de tellurite de potassium, ainsi que par la forte concentration en glycine. L'enrichissement au jaune d'œuf aide à l'identification en démontrant l'action de la lécithinase.

➤ Mode opératoire

- A la surface des boîtes ainsi préparées ou du milieu Baird-Parker pré-coulé au jaune d'œuf et au tellurite de potassium ramené préalablement à température ambiante, transférer 0,1 mL de l'échantillon à analyser et de ses dilutions décimales.

- Etaler l'inoculum en surface à l'aide d'un étaleur stérile.

- Incuber à 37 °C pendant 24 ± 2 heures et prolonger de 24 ± 2 heures supplémentaires.

➤ Lecture et dénombrement

Les colonies caractéristiques sont noires ou grises, brillantes et convexes de 1-1,5 mm et 1,5- 2,5 mm de diamètre après 48 h d'incubation et entouré d'un halo d'éclaircissement, sont visées lors du dénombrement.

2.4.5. Recherche de *Salmonella* (NF ISO 6579, 2007)

➤ Principe

Il s'agit d'une culture par un ensemencement en surface sur gélose Héктоène, l'inhibition de la flore à Gram positif est due à la présence des sels biliaires. La forte concentration en lactose favorise la visualisation des entérobactéries en évitant le problème des fermentations tardives. En présence de thiosulfate de sodium, les microorganismes producteurs de sulfure d'hydrogène réduisent le citrate ferrique ammoniacal et se manifestent par un noircissement dû à l'apparition de sulfure de fer au centre des colonies. Le système d'indicateurs

colorés, composé de bleu de bromothymol et de fuchsine acide permet de colorer en jaune orangé les entérobactéries lactose-positif et en bleu vert les lactose-négatif.

➤ Mode opératoire

La recherche des Salmonelles nécessite trois phases successives :

1) Pré-enrichissement en milieu non sélectif liquide : Une prise d'essai de 25 g d'échantillon étaitensemencée dans 225 mL de l'eau-peptonnée-tampon (EPT) à température ambiante, puis incubation à 27 °C (1 ± 1 °C) pendant 18 ± 2 h.

2) Enrichissement en milieu sélectif liquide : Un tube contenant 10 mL de bouillon SFB estensemencé avec 1mL de la culture de pré-enrichissement.

3) Isolement et identification : A la surface des boîtes contenant la gélose Héktoène ainsi préparées ramené préalablement à température ambiante,ensemencer en stries l'inoculum, à partir des milieux d'enrichissement, incuber à 37°C pendant 24 heures.

➤ Lecture et dénombrement

Le dénombrement des colonies caractéristiques de salmonella sont lisses de couleurs vertes à centre noir, qui deviennent entièrement noires en fin d'incubation.

2.4.6. Dénombrement des levures et moisissures (NF 08-059, 2002)

➤ Principe

La flore fongique a la faculté de se développer en milieu acide, à des températures relativement basses et les milieux de cultures utilisés pour leur mise en évidence doivent mettre en inhibition toutes les bactéries susceptibles de se développer et ceci est réalisé par la présence d'antibiotiques.

L'isolement des champignons est réalisé par l'emploi d'un milieu sélectif doté de propriétés antibactériennes : le milieu OGA à l'Oxytétracycline 0,1 mg/l.

➤ Mode opératoire

- A partir des dilutions décimales 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} .

- Disposer de façon aseptique et sur une plaque gélosée et sèche, 4 gouttes de chaque dilution décimale, ces derniers seront soigneusement étalés à l'aide d'un râteau stérile.

- Opérer de la même façon et dans les mêmes conditions, avec le diluant (TSE), et incuber telle quelle, une boîte du milieu OGA, ces derniers seront incubés dans

le même endroit et dans les mêmes conditions de température, il constitue le témoin diluant et le témoin du milieu.

- L'incubation se fait à 30°C pendant 5 jours et la lecture doit être faite sous forme d'un suivi journalier, jusqu'à la 5^{ème} journée, ou doivent être effectués séparément le dénombrement des levures par rapport à celui des moisissures en tenant compte du facteur de dilution et d'inoculum.

➤ Lecture et dénombrement

Au moment de la lecture on commence obligatoirement par les deux boîtes témoin milieu et diluant, si l'une d'entre elles est contaminée, l'analyse est à refaire.

Les colonies des levures sont brillantes, rondes et bombées alors que celles des moisissures ont un aspect filamenteux, velouté et sont plus grandes.

2.5. Expérimentation animale

Tous les travaux de l'expérimentation animale de cette étude ont été réalisés selon la directive 2010/63/EU relative aux principes d'éthique et directives pour l'expérimentation animale à des fins scientifiques et protection des animaux de laboratoire [138].

2.5.1. Période d'acclimatation et administration des doses

Avant toute expérimentation et dès leur arrivée à l'animalerie de la station d'expérimentation animale de la faculté des sciences de la nature et la vie de l'université de Blida le 27/03/2016, les rats ont été soumis à une période d'acclimatation pendant trois semaines (21 jours) à la température ambiante ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) et un cycle de lumière/obscurité alterné pour que les rats s'adaptent aux conditions de l'environnement et l'alimentation (Figure 4.5).

- La 1^{ère} semaine d'acclimatation : Tous les rats ont été divisés en lots et ont été soumis à un régime alimentaire normal.
- La 2^{ème} et 3^{ème} semaine d'acclimatation : Les 60 rats femelles sont divisés en 10 lots à raison de 6 rats par lot de façon à ce que tous les lots soient presque de même poids ± 10 g (152,2 g). Chaque lot est placé dans une cage à part 7 lots de rats sont nourris par un régime alimentaire normal et 3 lots sont nourris par un régime enrichi en psyllium et argile (tableau 4.3 et Figure 4.5).

- La quantité de l'eau consommée quotidiennement par chaque lot des rats est mesurée afin de calculer les doses administrées pour chaque lot.

- Le poids corporel moyen est enregistré pour chaque lot chaque semaine ou 15 jours pendant les 7 mois de l'expérimentation animale.

Tableau 4.3 : les différents lots de rats utilisés dans l'expérimentation animale et le type d'aliments adaptés pour chaque lot.

Lots	Additifs DJA	Additifs DJA x 2	Pesticides DJA	Pesticide DJA x 2	Psyllium	Argile
1 Témoin						
2	+					
3		+				
4			+			
5				+		
6	+		+			
7		+		+		
8		+		+	+	
9		+		+		+
10		+		+	+	+

- Le début d'expérimentation
- Lot 1 Témoin : les rats témoins sont nourris par un régime alimentaire normal sans psyllium ni argile et une eau de boisson normale sans aucune dose de pesticides ni additifs alimentaires pendant toute la durée de l'expérimentation (Figure 4.5).
- Lot 2 : Additifs alimentaires DJA : les 6 rats de ce lot sont nourris par un régime alimentaire normal sans psyllium ni argile et ils sont traités par des doses DJA d'un mélange de 10 additifs alimentaires sous forme d'une solution aqueuse selon le tableau 4.4, la solution est placée dans les bouteilles (biberon) de l'eau des animaux.
- Lot 3 : Additifs alimentaires DJA×2 : les 6 rats de ce lot sont nourris par un régime alimentaire normal sans psyllium ni argile et ils sont traités par des doses de DJA×2 d'un mélange de 10 additifs alimentaires sous forme d'une solution aqueuse selon le tableau 4.4, la solution est placée dans les bouteilles (biberon) de l'eau des animaux.
- Lot 4 : Pesticides DJA : les 6 rats de ce lot sont nourris par un régime alimentaire normal sans psyllium ni argile et ils sont traités par des doses de DJA d'un mélange de 6 pesticides sous forme d'une solution aqueuse selon le tableau 4.5, la solution est placée dans les bouteilles (biberon) de l'eau des animaux.
- Lot 5 : Pesticides DJA×2 : les rats de ce lot sont nourris par un régime alimentaire normal sans psyllium ni argile et ils sont traités par des doses de DJA×2 d'un mélange de 6 pesticides sous forme d'une solution aqueuse selon le tableau 4.5, la solution est placée dans les bouteilles (biberon) de l'eau des animaux.
- Lot 6 : Additifs alimentaires + pesticides DJA : les rats de ce lot sont nourris par un régime alimentaire normal sans psyllium ni argile et ils sont traités par des doses de DJA d'un mélange de 10 additifs alimentaires et 6 pesticides sous forme d'une solution aqueuse selon les tableaux 4.4 et 4.5, la solution est placée dans les bouteilles (biberon) de l'eau des animaux.

- **Lot 7 : Additifs alimentaires + pesticides DJAx2:** les rats de ce lot sont nourris par un régime alimentaire normal sans psyllium ni argile et ils sont traités par des doses de DJAx2 d'un mélange de 10 additifs alimentaires et 6 pesticides sous forme d'une solution aqueuse selon les tableaux 4.4 et 4.5, la solution est placée dans les bouteilles (biberon) de l'eau des animaux.
- **Lot 8 : Additifs alimentaires + pesticides DJAx2 + Psyllium** : les rats de ce lot sont nourris par un régime alimentaire enrichi de 2% de psyllium et ils sont traités par des doses de DJAx2 d'un mélange de 10 additifs alimentaires et 6 pesticides sous forme d'une solution aqueuse selon les tableaux 4.4 et 4.5, la solution est placée dans les bouteilles (biberon) de l'eau des animaux.
- **Lot 9 : Additifs alimentaires + pesticides DJAx2 + Argile** : les rats de ce lot sont nourris par un régime alimentaire enrichi de 2% de l'argile vert et ils sont traités par des doses de DJAx2 d'un mélange de 10 additifs alimentaires et 6 pesticides sous forme d'une solution aqueuse selon les tableaux 4.4 et 4.5, la solution est placée dans les bouteilles (biberon) de l'eau des animaux.
- **Lot 10 : Additifs alimentaires + pesticides DJAx2 + Psyllium+ Argile** : les rats de ce lot sont nourris par un régime alimentaire enrichi de 1,5% de psyllium et 1,5% de l'argile vert, ils sont traités par des doses de DJAx2 d'un mélange de 10 additifs alimentaires et 6 pesticides sous forme d'une solution aqueuse selon les tableaux 4.4 et 4.5, la solution est placée dans les bouteilles (biberon) de l'eau des animaux.

- Le diagramme suivant illustre d'une façon globale la démarche suivie pour la réalisation de l'expérimentation animale :

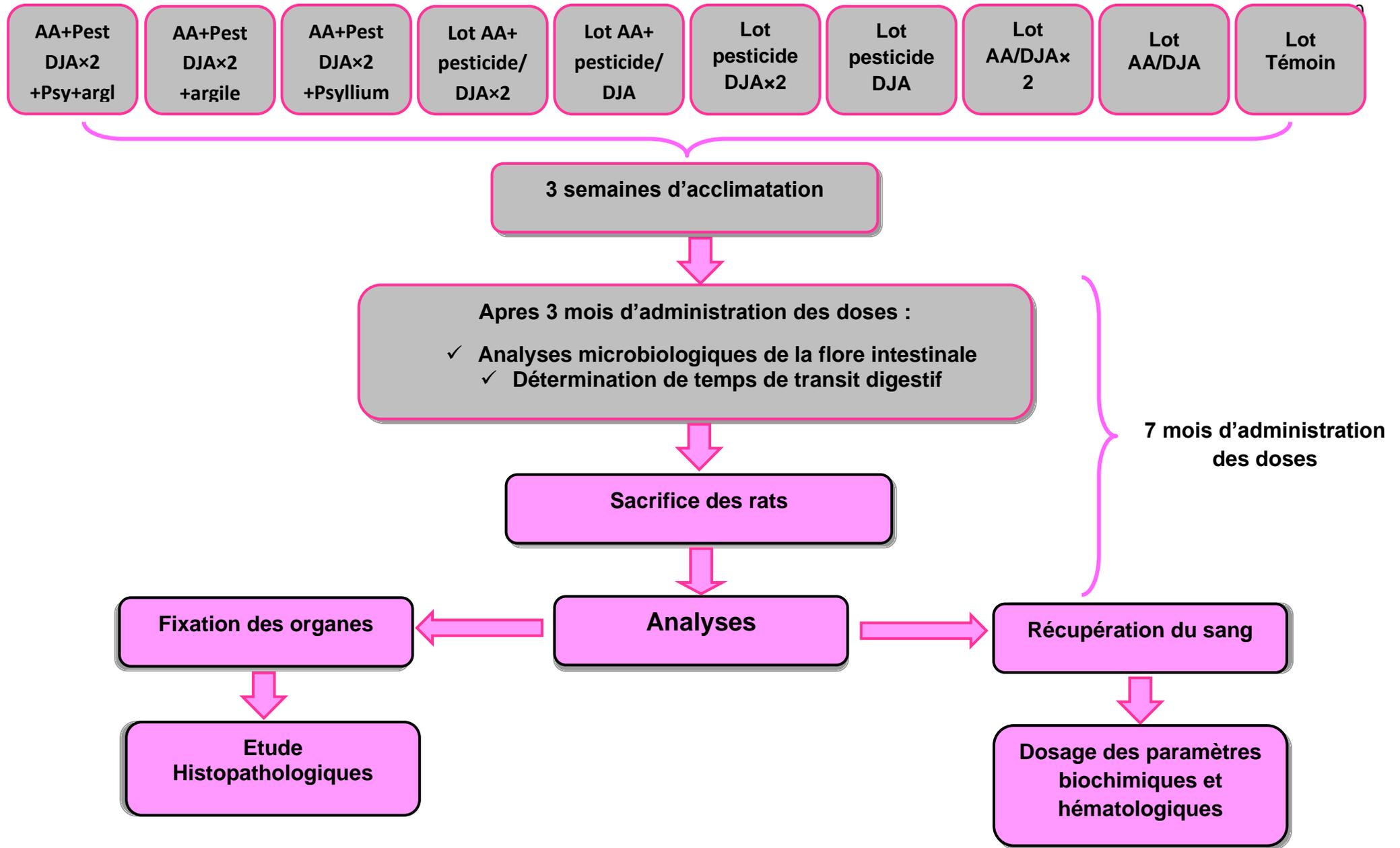


Figure 4.5 : Schéma général de l'étude expérimentale.

➤ Préparation des doses des additifs alimentaires et pesticides

1. Calcul des doses administrées

Le choix des doses de chaque additif alimentaire et pesticides est en fonction de la DJA exprimée en mg/kg de poids vif de rat, les doses sont administrées sous forme de mélange dessous dans l'eau de boisson placée dans les biberons, les doses administrées se changent selon le poids des rats et la quantité de l'eau consommée quotidiennement.

- Les doses administrées selon le poids corporel des rats sont calculées selon l'équation suivante :

$$D1 = \frac{(DJA \times P)}{1000} \quad (4.12)$$

Avec :

D1: Dose administrée sur les rats (mg/rat/jour).

DJA : Dose Journalière Admissible mg/kg.

P : Poids corporel de rat (g).

- Les doses administrées selon la quantité d'eau consommée /rat/Jour = 21mL sont calculées selon l'équation suivante :

$$D2 = \frac{(D1 \times 1000)}{Q} \quad (4.13)$$

Avec :

D2: Dose administrée sur les rats (mg/L) pour rat/jour.

D1 : Dose administrée sur les rats (mg/rat/jour).

Q : Quantité d'eau consommée /rat/Jour (mL).

Les tableaux 4.4 et 4.5 montrent les doses de pesticides et additifs alimentaires administrées sur les rats pendant les 7 mois d'expérimentation.

Tableau 4.4 : Doses des additifs alimentaires administrées sur les rats pendant les 7 mois d'expérimentation. (La dose change avec le changement du poids des rats et la quantité de l'eau consommée)

Additifs Alimentaires	DJA (mg/kg)	Dose (mg/rat)	DJAx2 mg/kg	Dose (mg/rat)
Sin 102 : Tartrazine (jaune)	7,5	1,14	15	2,28
Sin 110 : Jaune orangé S (FCF)	2,5	0,38	5	0,76
Sin 124 : Rouge ponceau 4R	0,75	0,11	1,5	0,22
Sin 129 : Rouge Allura AC	07	1,06	14	2,13
Sin 133 : Bleu Brillant FCF	06	0,91	12	1,82
Sin 202 : Sorbate de potassium	25	3,8	50	7,61
Sin 211 : Benzoate de sodium	05	0,67	10	1,52
Sin 950 : Acesulfame K	09	1,36	18	2,73
Sin 951 : Aspartam	40	6,08	80	12,17
Sin 300 : Acide ascorbique (vit C)	80	12,17	160	24,35

Tableau 4.5 : Doses des pesticides administrées sur les rats pendant les 7 mois d'expérimentation.

Pesticides	DJA (mg/kg)	Dose (mg/rat)	DJAx2(mg/kg)	Dose (mg/rat)
Chlorpyrifos-méthyl	0,01	0,0015	0,02	0,0030
Deltaméthrine	0,01	0,0015	0,02	0,0030
Methidation	0,001	0,00015	0,002	0,00030
Cyperméthrine	0,05	0,0015	0,1	0,0015
Acetamipride	0,07	0,0076	0,14	0,015
Abamectine	0,0025	0,00038	0,005	0,0007

2. Préparation des solutions de mélange des additifs alimentaires et pesticides

- Les additifs alimentaires, sont tous sous forme de poudre facilement dissous dans l'eau de robinet. Tout d'abord nous avons préparé préalablement des solutions mères concentrées dans des flacons de 1L pour chaque additif (10g/L ou 20g/L), à partir desquels nous avons préparé le mélange des doses administrées aux rats.
- Les pesticides, sont sous forme liquide concentré facilement dissous dans l'eau de robinet, d'abord nous avons préparé des solutions mères concentrées dans des flacons de 1L pour chaque pesticide (2 g/L), à partir desquels nous avons préparé les mélanges des doses administré aux rats.

2.5.2. Sacrifice des rats, prélèvement du sang et d'organes

Après 3 mois d'administration des doses, nous avons réalisé des analyses microbiologiques pour mettre en évidence l'effet des doses sur la microflore intestinale et le temps de transit intestinal.

Après les 7 mois d'administration des doses des additifs alimentaires et pesticides, les 10 lots de rats ont été sacrifiés par décapitation, et cette dernière a eu lieu la matinée de 9 h à 11h afin d'éviter les variations hormonales pendant la journée.

Le sang artério-veineux est recueilli dans des tubes héparinés contenant une substance anticoagulante héparinate de lithium pour les différents dosages biochimiques et des tubes EDTA contenant 10 % de l'acide éthylène diamine tétra-acétique pour les dosages hématologiques, les tubes sont conservés dans une glacière jusqu'au laboratoire. Le sérum est obtenu après une centrifugation à 5000 tours pendant 3 minutes dans la centrifugeuse.

Après la dissection (Figure 4.6), les organes vitaux (foie et reins) sont aussi rapidement prélevés, dégraissés, pesés et placés dans un liquide fixateur le formol a 10 % afin de les garder intacte et protéger de l'autolyse et des attaques bactériennes, pour chercher ultérieurement les altérations structurales sur les tissus des organes (Figure 4.7).

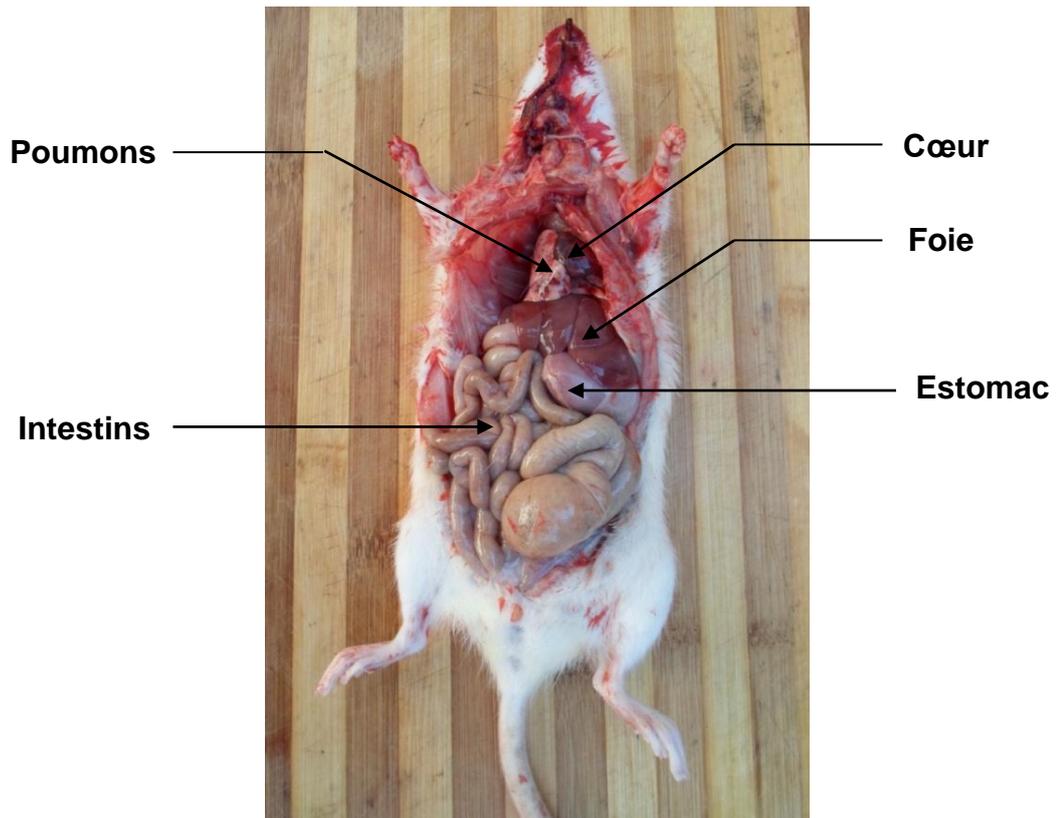


Figure 4.6 : Dissection de rat après décapitation (photo originale).

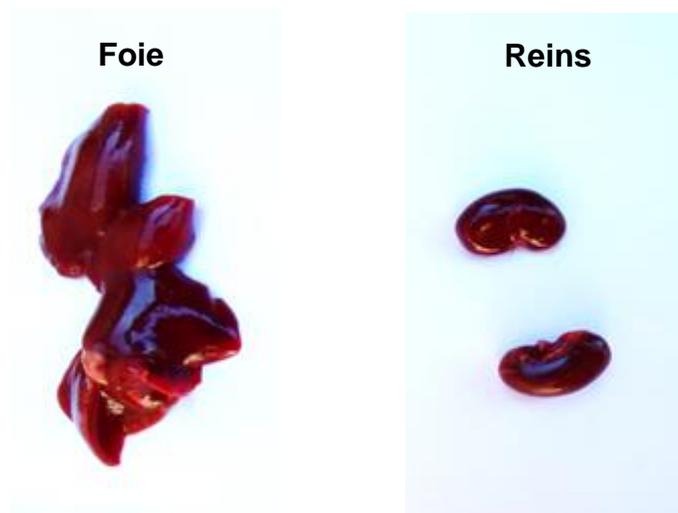


Figure 4.7 : Prélèvement des organes (foie et reins) (photo originale).

2.6. Isolement, identification et dénombrement d'espèces de microbiote intestinale

2.7.1. Isolement des espèces aérobies et aéroanaérobies facultatives

2.6.1.1. *Escherichia coli* et *Enterococcus spp*

L'isolement d' *E. coli* et d' *Enterococcus spp* , principale flore aérobie de l'intestin est facilement réalisable sur milieux ordinaires, compte tenu qu'il n'y a pas, à l'état normal, d'exigences particulières pour leur multiplication. La méthode d'isolement à partir des selles consiste, selon Bernard et Reynaud, (2003) [139] :

- Dissoudre 1g de selles fraîches prélevées stérilement dans 9 ml d'eau physiologique,
- Homogénéiser et filtrer la solution par un papier filtre stérile,
- Préparer plusieurs dilutions décimales (jusqu'à 10⁻⁶) à partir de cette solution,
- à partir de chaque dilution, ensemercer par stries le milieu EMB pour *E. coli* et le milieu Slanetz et Bartley pour les entérocoques,
- incubé à 37°C pendant 24 heures [139].

L'identification de ces deux espèces bactériennes repose sur l'étude des caractères culturels (aspect des colonies), morphologiques (examens microscopiques) et biochimiques à l'aide des galeries API 20E qui sont utilisées comme suit :

- Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide de la même pipette (pour éviter la formation de bulles au fond des tubes), poser la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation, vers l'avant,
- Pour les tests CIT, VP, et GEL, remplir tube et cupule,
- Pour les autres tests, remplir uniquement les tubes (non les cupules).

Pour les tests ADH, LDC, ODC, H₂S, UREE, créer une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de paraffine,

- Refermer la boîte d'incubation,
- Incuber à 37°C pendant 24 h.

Les caractères donnés par les galeries ainsi que la lecture des résultats sont mentionnés dans le tableau 4.6.

Tableau 4.6 : Les caractères donnés par les galeries biochimiques pour l'identification d' *E. coli* et d' *Enterococcus spp* [139].

Tests	Composants actifs	Quantité	Réactions/enzymes	Résultat Négatif	Résultat Positif
ONPG	2-nitrophénol.βD galactopyranosidase	0,223	B galactosidase (ortho nitro phénylβDgalactopyranosidase)	Incolore	Jaune
ADH	L- arginine	1,9	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/ orangé
LDC	L- lysine	1,9	Lysine décarboxylase	Jaune	Rouge/ orangé
ODC	L-ornithine	1,9	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/ orangé
CIT	Trisodium citrate	0,756	Utilisation du citrate	Vert pâle/ Jaune	Bleu vert/bleu
H ₂ S	Sodium thiosulfate	0,075	Production d' H ₂ S	Incolore/ Grisâtre	Dépôt noir/ fin liseré
URE	Urée	0,76	Uréase	Jaune	Rouge orangé
TDA	L-tryptophane	0,38	Tryptophane désaminase	Jaune	Marron rougeâtre
IND	L- tryptophane	0,19	Production d'indole	Incolore/vert pale	Rose
VP	Sodium pyruvate	0,6	Production d'acétoine (vogue proskauer)	Incolore	Rose/rouge
GEL	Gélatine (origine bovine)	1,9	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	D- glucose	1,9	Fermentation/oxydation du glucose	Bleu /bleu vert	Jaune/jaune gris
MAN	D-mannitol	1,9	Fermentation/oxydation du mannitol	Bleu /bleu vert	jaune
INO	Inositol	1,9	Fermentation/oxydation du inositol	Bleu /bleu vert	jaune
SOR	D- sorbitol	1,9	Fermentation/oxydation du sorbitol	Bleu /bleu vert	jaune
RHA	L- mannose	1,9	Fermentation/oxydation du mannose	Bleu /bleu vert	jaune
SAC	D- saccharose	1,9	Fermentation/oxydation du saccharose	Bleu /bleu vert	jaune
MEL	D- melibiose	1,9	Fermentation/oxydation du melibiose	Bleu /bleu vert	jaune
AMY	Amygdaline	0,57	Fermentation/oxydation du amygdaline	Bleu /bleu vert	jaune
ARA	L- arabinose	1,9	Fermentation/oxydation d'arabinose	Bleu /bleu vert	jaune

Le dénombrement *d'E. coli et d'Enterococcus spp* aura lieu par un ensemencement en masse du milieu EMB (colonie vert brillante), Slanetz et Bartley (petite colonie rose claire) respectivement par comptage des colonies [139].

2.6.1.2. *Lactobacillus spp.*

Les lactobacilles représentent la flore micro-aérophiles et leur isolement consiste à ensemercer en surface le milieu MRS à partir des dilutions décimales préparées précédemment. L'ensemencement est suivi d'une incubation de 48h à 37°C. L'étude des caractères culturels, morphologiques et biochimique se fait de la même façon résumée dans le tableau 4.7 [140].

Tableau 4.7 : Caractères d'identification des Lactobacilles [140].

Examen	Technique	Observation des Résultats positifs
Macroscopique	Examen direct des colonies bactériennes	Colonies blanchâtres légèrement allongées
Microscopique	Examen à l'état frais Coloration simple et coloration de GRAM	Bacilles Gram positif
Recherche de la catalase	Ajouter une goutte de H ₂ O ₂ sur une culture dans milieu solide	Effervescence
Oxydase	Ajouter un disque OX qui est imprégné de DPD à une culture bactérienne	Couleur rouge
Mobilité	Ensemencer le milieu mannitol mobilité par piqûre centrale à partir d'une culture bactérienne sur boîte de pétri	Envahissement du milieu
Production du gaz à partir du glucose	Ensemencer les bactéries dans un bouillon MRS contenant une cloche de Durham, recouvrir le tube par une couche d'huile de vaseline stérile et incuber à 37°C pendant 24 h	La cloche contient du gaz
Dégradation des sucres (glucose, raffinose, fructose, saccharose, galactose, mannose)	Additionner 4 gouttes de sucre recherché à une eau peptonée contenant le rouge de phénol puis ensemercer cette dernière à partir d'une culture bactérienne et incuber à 37°C pendant 24 h	Virage de la couleur rouge vers le jaune ou l'orange due à l'acidification du milieu

Le dénombrement des Lactobacilles se fait par un ensemencement en masse du milieu MRS par comptage des colonies blanches de tailles uniformes [140].

2.6.2. Isolement, identification et dénombrement des espèces anaérobies strictes

Les Bifidobactéries, les Clostridium et les Bactériodes sont des bactéries anaérobies strictes qui ne peuvent se cultiver qu'en absence de l'oxygène, ce qui nécessite l'utilisation des techniques bactériologiques inhabituelles, en absence d'oxygène aussi bien lors du prélèvement, du transport, de culture et d'isolement. Ces contraintes techniques peuvent expliquer les difficultés rencontrées lors de l'isolement de ces espèces [141].

2.6.2.1. Les Bifidobactéries

Les bifidobacteriums sont des espèces bactériennes anaérobies strictes et leur isolement nécessite une incubation dans des jarres d'anaérobiose.

- Dissoudre 1g de selles fraîches dans 9 ml d'eau physiologique,
- Filtrer la solution par utilisation de papier filtre stérile,
- Préparer des dilutions décimales (jusqu'à 10^{-9}) à partir de cette solution,
- Ensemencer par la technique de double couche 1 ml de chaque dilution dans une boîte de Pétri,
- Couler le milieu MRS cystéiné,
- Incuber en anaérobiose les boîtes ensemencées à 37°C pendant 48 h,
- Après 48 h d'incubation les examens portés dans le tableau 4.8 sont réalisés pour identifier les formes bactériennes obtenues [141].

Tableau 4.8 : Tests d'identification des Bifidobactéries [141].

Examen	Technique	Observation des Résultats positifs
Macroscopique	Examen direct des colonies.	Colonies lisses, punctiformes à contour irrégulier
Microscopique	Coloration simple. Coloration de Gram.	Bâtonnets incurvés en V ou en Y, Gram positif
Croissance en aérobiose	Incubation en aérobiose pendant 72 h du bouillon MRS cystéiné ensemencé par des colonies bactériennes.	Trouble

Catalase	Colonie + 1 goutte d'H ₂ O ₂ .	Effervescence
Mobilité	Ensemencement par piqûre centrale de milieu mannitol mobilité.	Envahissement du milieu
Production de gaz à partir du glucose	Ensemencement des bactéries dans le milieu MRS cystéiné + cloche du durham + une couche d'huile de vaseline stérile et incuber à 37°C pendant 48h.	La cloche contient remonte en surface
Production d'indole	1 ml de culture de bifidobactéries sur milieu MRS cystéiné est inoculé dans un tube d'eau peptonée exempte d'indole + huile de vaseline ; incuber en anaérobiose à 37°C /48h ; après incubation ajouter quelques gouttes de réactif dukovacs	Apparition d'un d'anneau rouge
Réduction des nitrates	Ensemencement des tubes de bouillon nitrate + une couche de vaseline ; incuber à 37°C/48h, après incubation, il faut ajouter les réactifs suivants (3 à 4 gouttes d'acide sulfanilique puis 3 à 4 gouttes d' α naphthylamine).	Apparition d'une couleur rose (réduction des nitrates)
Coagulation du lait cystéiné	1 ml de suspension épaisse de bifidobactéries est inoculé dans le lait cystéiné, incuber à 37°C /24h	Coagulation du lait
Tests de fermentation des sucres	10 ml de MRS cystéine (bouillon) est ensemencée avec une colonie de bifidobactérie ensuite incuber à 37°C pendant 48h. Après 48h d'incubation, centrifuger à 3000tr/min pendant 15mn - Récupérer le culot et le rincer 3 fois à l'eau physiologique - Ensemencer les tubes contenant le BCP par 1% d'une suspension bactérienne épaisse puis additionner 1ml d'une solution stérile de sucres à 10% (adonitol, glycérol et sorbose) puis ajouter une couche de vaseline stérile - incuber à 37°C pendant 48h	Changement de la couleur due à l'acidification du milieu

La charge des Bifidobactéries dans les selles est estimée par un ensemencement en masse du milieu MRS cystéiné par dénombrement des colonies brunes uniformes [141].

2.6.2.2. Clostridium spp

Les selles sont analysées rapidement de la même façon précédente mais exception faite, l'ensemencement se fait en surface dans le milieu gélose au sang de cheval et l'incubation dans des jarres d'anaérobiose pendant 120 heures.

Après incubation, l'identification proprement dite des espèces est réalisée par des tests de culture, microscopiques et biochimiques comme il est indiqué dans le tableau 4.9 [141].

Tableau 4.9 : Tests biochimiques caractéristiques de *Clostridium ssp.*[141].

Examen	technique	Observation des résultats +
Macroscopique	Etude direct des colonies.	
Microscopique	Examen direct et coloration de GRAM.	Bacilles Gram positif
Catalase	Ajouter une goutte de H ₂ O ₂ sur une culture dans milieu solide.	Effervescence
Oxydase	Ajouter un disque OX qui est imprégné de DPD à une culture bactérienne.	Couleur rouge
Production d'indole	Ensemencer en masse par piqûre centrale le milieu VF, après incubation pendant 24h ajouter quelques gouttes du réactif de kovacs.	Apparition de couleur rose
Recherche de la nitrate réductase	Ensemencer le milieu nitrate-mobilité par une piqûre centrale ensuite incuber en anaérobiose pendant 48h, après incubation additionner 5 gouttes du réactif nitrate réductase I et 5 gouttes du Réactif nitrate réductase II.	Couleur rouge (réduction du nitrate en nitrite)

Production hydrogène sulfureux	Ensemencer le milieu VF additionner de 0,2 g/l de sulfate ferreux et de 0,3 g/l d'hyposulfite de sodium ensuite incuber en Anaérobiose à 37°C pendant 48h.	La production d'hydrogène sulfureux provoque le noircissement du milieu
--------------------------------	--	---

Le dénombrement des *Clostridium spp* se fait par le dénombrement des colonies blanches avec un contour d'hémolyse clair sur gélose au sang [141].

2.6.2.3. Bacteroides spp

Après la préparation de la matière fécale, un ensemencement en surface du milieu gélose au sang est réalisé pour l'obtention des colonies de *Bacteroides ssp*. L'ensemencement est suivi par une incubation dans des jarres d'anaérobiose pendant 120 h à 37°C [141].

L'identification de genre bactérien est basée sur :

- L'étude des caractères microscopique et macroscopiques,
- La recherche de l'oxydase et de la catalase,
- Réduction des nitrates et hydrolyse de la gélatine (même méthode utilisée pour les *Clostridium*).
- Production d'hydrogène sulfureux : elle est mise en évidence par ensemencement du milieu sulfate du fer par une colonie de *Bifodobactérium*, la production d'H₂S se traduit après incubation à 37°C pendant 48 h par un noircissement au niveau de l'inoculation.
- Production d'indole : elle est mise en évidence en ensemencant une eau peptonée exempte d'indole par une colonie bactérienne. Le tube doit être recouvert par une couche d'huile de vaseline et l'incubation se fait en anaérobiose à 37°C pendant 48 h. L'ajout de réactif du Kovacs est nécessaire pour l'apparition de l'anneau rouge dans le cas des tests positifs [141].
- Fermentation de l'esculine : elle est mise en évidence par l'addition de 0,5% d'esculine au milieu de möeller. Ce dernier est ensemencé par piqûre centrale à partir d'une colonie bactérienne isolée sur boîte de Pétri. Après une incubation de 48 h à 37°C, le milieu vire vers le jaune si le résultat est positif.
- Croissance en présence de 20% de sels biliaires : ce test nécessite l'ajout de 20% de sels biliaires à une gélose au sang. Après ensemencement de ce milieu

en surface et incubation de 24 h à 37°C, le test est mentionné positif s'il y a croissance bactérienne.

Le dénombrement des *Bacteroides spp* se fait par un ensemencement en masse du milieu gélose au sang et le comptage des colonies grises sans contour clair d'hémolyse [141].

2.7. Détermination de temps de transit digestif

Pour déterminer le temps de transit digestif total ou le temps de la vidange gastrique chez les rats après l'administration des doses et le régime alimentaire adapté, nous allons procéder à la technique de rouge de Phénol.

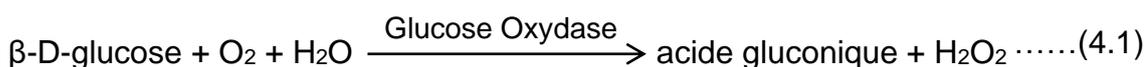
Cette technique consiste à introduire à l'aide d'une sonde œsophagienne après un jeûne de 12 heures, une solution liquide de rouge de phénol à 3% distribuée à raison de 11 ml par Kg de poids vif de l'animal, l'observation de l'apparition de coloration rouge dans les fèces permet également d'évaluer le temps de transit intestinal total, les résultats sont exprimés en minute [141].

2.8. Analyses biochimiques du sang

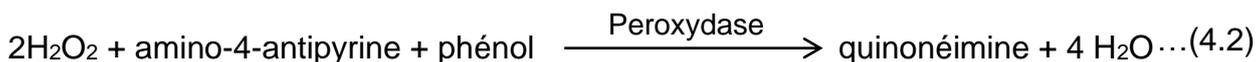
2.8.1. Dosage de glycémie

▪ Principe

Le glucose oxydase (GOD) catalyse l'oxydation du β -D-glucose en acide gluconique selon la réaction suivante :



Dans une deuxième réaction indicatrice, le peroxyde d'hydrogène formé réagit ensuite en présence de peroxydase (POD) avec un chromogène pour donner un produit coloré, la quinonéimine qui absorbe à 505 nm [143].



▪ Mode opératoire

- Préparation du réactif de travail : mélanger les réactifs 1 (tampon) et réactif 2 (enzymes) (Appendice C). Cette préparation reste stable pendant 8 mois entre 2°C et 8°C.
- Pipeter dans des tubes à essai :
- Le blanc qui contient 1 mL de solution de travail.

- Le standard qui est un mélange de 10 µL de standard et 1 mL du réactif de travail.
- L'échantillon qui contient 10 µL du sérum et 1 mL de la solution de travail.
- Après agitation, les 3 tubes sont incubés à 10 min à 37 °C ou 20 min 20-25 °C.

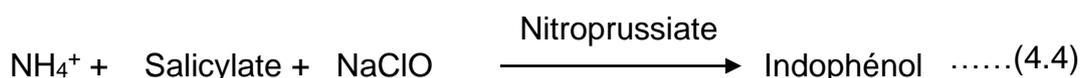
- Lecture

La lecture est réalisée après avoir régler le spectrophotomètre sur une longueur d'onde de 505 nm, sachant que l'épaisseur de la cuve est de 1 cm. Lire l'absorbance de la solution standard et de l'échantillon face au blanc, le résultat est exprimé en (g/L) [143].

2.8.2. Dosage de l'urée

- Principe

Le dosage de l'urée est réalisé par une méthode colorimétrique enzymatique. L'urée présente dans l'échantillon réagit avec le réactif de travail en formant un composé de couleur verte (le Dicarboxyindophénol) dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en urée [144]. La détermination enzymatique de l'urée suit les réactions suivantes [145] :



- Mode opératoire

- Préparation du réactif de travail : mélanger les réactifs A1 et A2 (Appendice C). Le mélange reste stable pendant 2 mois entre 2 et 8°C.
- Laisser tempérer les réactifs pendant quelques minutes à température ambiante.
- Pipeter dans des tubes à essai :
 - Le blanc qui contient 1 mL du réactif A.
 - Le standard est un mélange de 10 µL de l'étalon d'urée et 1 mL du réactif A.
 - L'échantillon est un mélange de 10 µL du sérum et 1 mL du réactif A.
- Bien agiter et incubé les tubes pendant 10 min à température ambiante (16-25°C).
- Pipeter dans chacun des tubes précédents 1 mL du réactif B (Appendice C)

- Agiter et incuber pendant 10 min à température ambiante (16-25°C)

▪ Lecture

La lecture est réalisée après avoir régler le spectrophotomètre sur une longueur d'onde de 600 nm, sachant que l'épaisseur de la cuve est de 1 cm. Lire l'absorbance de la solution standard et de l'échantillon face au blanc, le résultat est exprimé en (g/L).

2.8.3. Dosage de la créatinine

▪ Principe

Le dosage de la créatinine est réalisé par une méthode colorimétrique cinétique. La créatinine forme un complexe rouge-orange en présence de l'acide picrique au milieu alcalin. La vitesse de la formation de ce complexe est proportionnelle à la quantité de la créatinine présente dans l'échantillon [146].

▪ Mode opératoire

- Préparation du réactif de travail : mélanger à proportions égales, les réactifs 1 et 2 (Appendice C). Ce mélange reste stable pendant 10 jours à 15-25°C.

- Pipeter dans des tubes à essai :

- Le blanc qui contient 1 mL du réactif de travail.

- Le standard qui est un mélange de 100 µL de l'étalon de la créatinine et 1 mL du réactif de travail.

- L'échantillon qui contient 100 µL du sérum et 1 mL du réactif de travail.

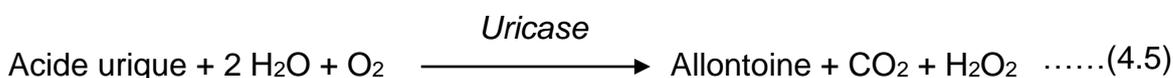
▪ Lecture

La lecture est réalisée par un spectrophotomètre avec une cuve de 1 cm d'épaisseur, une longueur d'onde de 505 nm et une température de 37°C. Faire une première lecture après 30 secondes et une deuxième lecture après 90 secondes après l'addition du réactif de travail, le résultat est exprimé en (g/L).

2.8.4. Dosage de l'acide urique

▪ Principe

Le dosage de l'acide urique est réalisé par une méthode colorimétrique enzymatique. L'acide urique présent dans l'échantillon réagit avec le réactif de travail en formant un composé de couleur rouge (Quinonéimine) dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en acide urique [147]. La détermination enzymatique de l'acide urique suit les réactions suivantes [148]:





4 AAP : Amino-4-Antipyrine.

DCPS: 2-4 dichlorophénol sulfonate.

▪ Mode opératoire

- Préparation du réactif de travail : mélanger le réactif 1 (tampon) et le réactif 2 (enzymes) (Appendice C). Bien agiter pour dissoudre les composants. Ce mélange reste stable pendant 1 mois à 2-8°C.

- Pipeter dans des tubes à essai :

- Le blanc qui contient 1 mL du réactif de travail.

- Le standard qui est un mélange de 1 mL du réactif de travail et 25 µL de l'étalon d'acide urique.

- L'échantillon qui contient 1 mL du réactif de travail et 25 µL du sérum.

- Mélanger et incuber pendant 10 min à température ambiante (15-25°C).

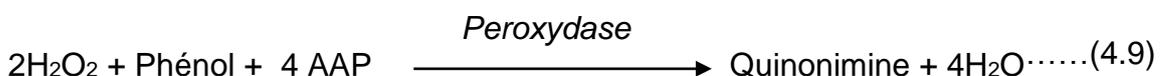
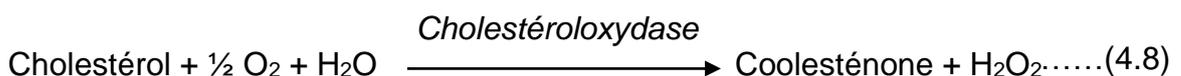
▪ Lecture

La lecture est réalisée après avoir réglé le spectrophotomètre sur une longueur d'onde de 520 nm, sachant que l'épaisseur de la cuve est de 1 cm. Lire l'absorbance de la solution standard et de l'échantillon face au blanc. La couleur reste stable pendant au moins 30 min, le résultat est exprimé en (g/L).

2.8.5. Dosage du cholestérol total

▪ Principe

Le cholestérol libre ainsi que le cholestérol estérifié présents dans l'échantillon donnent, selon les réactions couplées décrites ci-dessous un complexe coloré quantifiable par spectrophotométrie [149].



▪ Mode opératoire

- Le réactif est tempéré pendant quelques minutes à température ambiante.
- Pipeter dans des tubes à essai :
 - Le blanc contient 1 mL du réactif de travail.
 - Le standard est un mélange de 10 µL de l'étalon du cholestérol et 1 mL du réactif de travail.
 - L'échantillon est un mélange de 10 µL du sérum et 1 mL du réactif de travail.
- Agiter et placer les tubes à température ambiante pendant 10 min.

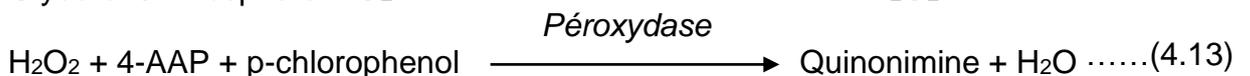
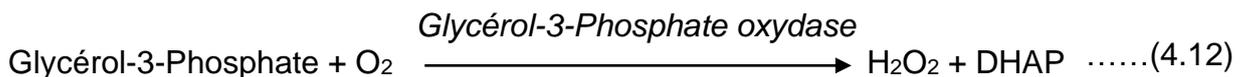
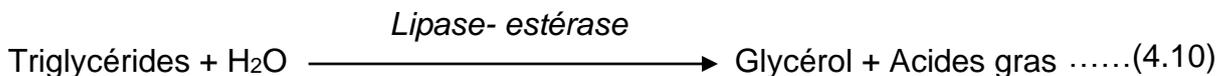
▪ Lecture

La lecture est réalisée par un spectrophotomètre avec une cuve de 1 cm d'épaisseur, une longueur d'onde de 500 nm et une température de 37°C. La coloration obtenue est stable au moins 2 heures, le résultat est exprimé en (g/L).

2.8.6. Dosage des triglycérides

▪ Principe

Les triglycérides sont hydrolysés par voie enzymatique en glycérol et acides gras. Ce glycérol rentre en réaction avec les différentes enzymes présentes dans le réactif de travail, entraînant la formation d'un dérivé coloré rouge. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de triglycérides de l'échantillon [150]. La détermination enzymatique des triglycérides suit les réactions suivantes [150] :



4 AAP : Amino-4-Antipyrine.

- Mode opératoire

- Préparation du réactif de travail : mélanger les réactifs 1 (tampon) et réactif 2 (enzymes) (Appendice C). Cette préparation reste stable pendant 6 semaines entre 2°C et 8°C.

- Pipeter dans des tubes à essai :

- Le blanc qui contient 1 mL de solution de travail.

- Le standard qui est un mélange de 10 µL de l'étalon de triglycéride et 1 mL du réactif de travail.

- L'échantillon qui contient 10 µL du sérum et 1 mL de la solution de travail.

- Après agitation, les 3 tubes sont incubés à 37°C pendant 5 minutes.

- Lecture

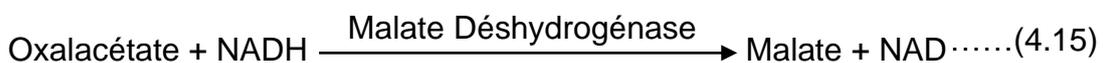
La lecture est réalisée par un spectrophotomètre avec une cuve de 1 cm d'épaisseur et une longueur d'onde de 505 nm, le résultat est exprimé en (g/L).

2.8.7. Dosage de ASAT

- Principe

La méthode est basée sur les travaux de Karmen. Cette procédure a été modifiée par la suite par H.U. Bergmeyer. Les réactifs AST sont formulés conformément aux recommandations de l'IFCC. La concentration en NADH est mesurée par son absorbance à 340/410 nm, le taux de diminution de l'absorbance étant proportionnel à l'activité AST. La réaction est déclenchée par l'ajout d'α-cétoglutarate en tant que second réactif.

Ce dosage utilise la méthode cinétique [151].



- Mode opératoire

- Reprendre le substrat R2 (substrat) par 3 ml ou 10 ml de tampon R1 (Appendice C). Reconstituer chaque R2 par un flacon R1 (L-aspartate), cette solution de travail est stable 7 jours à 2-8°C.

- L'échantillon est un sérum ou plasma héparine sans hémolyse.

- Ajuster le zéro du spectrophotomètre sur l'air ou l'eau distillée

Solution de travail	1 ml	3 ml
Préincuber à la température choisie (25, 30 ou 37°C)		
Echantillon	100 µl	300 µl
Mélanger et incuber 1 minute		
Mesurer la diminution de la densité optique par minute pendant 1 à 3 minutes.		

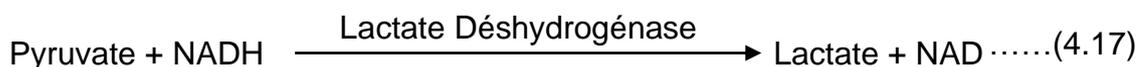
- Lecture

La lecture est réalisée par un spectrophotomètre, une cuve de 1 cm d'épaisseur et une longueur d'onde de 340 nm, le résultat est exprimé par (UI/L) [151].

2.8.8. Dosage de ALAT

- Principe

La méthode de dosage est basée sur les travaux de Wroblewski et La Due. Cette procédure a été modifiée par la suite par H.U. Bergmeyer. La réaction est initiée par l'ajout d' α -cétoglutarate en tant que second réactif. La concentration en NADH est mesurée par son absorption à 340/410 nm et le taux de diminution d'absorption est proportionnel à l'activité de l'alanine aminotransférase. Ce dosage utilise la méthode cinétique [152].



- Mode opératoire

-Reprendre le substrat R2 (substrat) par 3 ml ou 10 ml de tampon R1, reconstituer chaque R2 par un flacon R1 (alanine), cette solution de travail est stable 7 jours à 2-8°C.

-L'échantillon c'est un sérum ou plasma héparine sans hémolyse.

-Ajuster le zéro du spectrophotomètre sur l'air ou l'eau distillée

Solution de travail	1 ml	3 ml
Préincuber à la température choisie (25, 30 ou 37°C)		
Echantillon	100 µl	300 µl
Mélanger et incuber 1 minute		
Mesurer la diminution de la densité optique par minute pendant 1 à 3 minutes.		

- Lecture

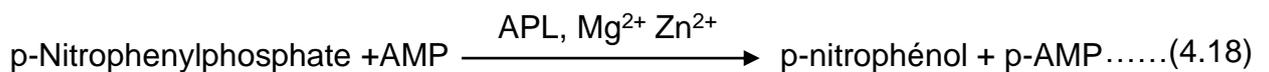
La lecture est réalisée par un spectrophotomètre avec une cuve de 1 cm d'épaisseur et une longueur d'onde de 340 nm, résultat est exprimé en (UI/L) [152].

2.8.9. Dosage de PAL (Phosphatase Alcaline)

- Principe

La méthode est basée sur les travaux de Tietz, et al. La phosphatase alcaline hydrolyse le substrat pNPP pour former du p-nitrophénol. La réaction est suivie par la mesure colorimétrique à 410/478 nm de la vitesse de formation du p-nitrophénol, qui est proportionnelle à l'activité de la phosphatase alcaline. Un tampon 2-amino-2-méthyl-1-propanol (AMP) est utilisé pour maintenir le pH de la réaction entre 10,3 et 10,4. Des ions magnésium et zinc sont ajoutés au tampon AMP pour activer et stabiliser l'enzyme.

Ce dosage utilise la méthode cinétique [153].



- Mode opératoire

- Préparation du réactif de travail : mélanger les réactifs 1 (tampon) et réactif 2 (substrat) (Appendice C).
- Pipeter dans un tube à essai 1 mL de solution de travail avec 20 μL du sérum.
- Après agitation, introduire dans une cuve thermostatée. Attendre 1 minute puis mesurer l'augmentation moyenne de la densité optique par minute pendant 1 à 3 minutes.

- Lecture

La lecture est réalisée après avoir régler le spectrophotomètre sur une longueur d'onde de 405 nm, sachant que l'épaisseur de la cuve est de 1 cm.

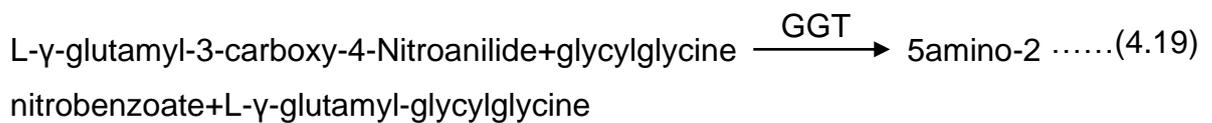
Lire l'absorbance de la solution, le résultat est exprimé en (UI/L) [153].

2.8.10. Dosage de GGT (Gamma Glutamyl Transférase)

▪ Principe

La méthode est basée sur la procédure décrite par L.M. Shaw, et al. Au cours d'une réaction avec un substrat synthétique, le (L- γ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide), la glycylglycine agit comme un accepteur vis-à-vis γ -glutamyl et le 5-amino-2-nitro-benzoate (ANB) est libéré. L'absorption maximale du produit libéré est proche de 400 nm. La vitesse de formation est mesurée par photométrie à 410-478 nm, la cinétique du dosage étant d'ordre zéro.

Ce dosage utilise la méthode cinétique [154].



▪ Mode opératoire

- Préparation du réactif de travail : mélanger les réactifs 1 (tampon) et réactif 2 (substrat) (Appendice C). Cette préparation reste stable pendant 1 mois entre 2°C et 8°C.
- Pipeter dans des tubes à essai :
 - Le blanc qui contient 1 mL de solution de travail.
 - Un mélange de 100 μ L d'échantillon et 1 mL du réactif de travail.
 - Pré incuber à la température choisie (25, 30 ou 37°C).
 - Un mélange de 300 μ L d'échantillon et 3 mL du réactif de travail.
- Mélanger et Incuber 1 minute. Mesurer l'augmentation de la densité optique par minute pendant 1 à 3 minutes.

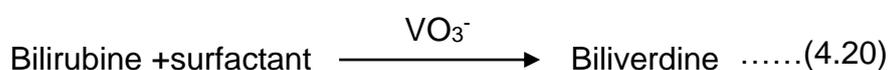
▪ Lecture

La lecture est réalisée après avoir régler le spectrophotomètre sur une longueur d'onde de 405 nm, sachant que l'épaisseur de la cuve est de 1 cm, le résultat est exprimé en (UI/L) [154].

2.8.11. Dosage de Bilirubine totale (mg/L)

▪ Principe

La méthode repose sur une technique d'oxydation chimique utilisant le vanadate comme agent oxydant. La bilirubine est oxydée par le vanadate en biliverdine à pH 2,9 environ. En présence de détergent et de vanadate, la bilirubine conjuguée (directe) et la bilirubine non conjuguée sont oxydées. Cette réaction d'oxydation entraîne une diminution de la densité optique de la coloration jaune, qui est propre à la bilirubine. La diminution de la densité optique à 451-545 nm est proportionnelle à la concentration en bilirubine totale dans l'échantillon. La concentration est mesurée au point de virage de la réaction. Ce dosage utilise la méthode point final [155].



▪ Mode opératoire

- Reconstituer le lyophilisat R4 avec exactement 3 ml d'eau distillée. Attendre 15 minutes. Compléter la dissolution du lyophilisat par retournements successifs du flacon. Les concentrations exactes sont indiquées sur chaque flacon. La stabilité à l'obscurité après reconstitution est : 4 jours à 2 - 8°C ;

Mélanger 20 Volumes R1 avec 1 volume R3 (Appendice C).

- le Sérum ou plasma recueilli sur EDTA héparine, citrate ou fluorure et conservé à l'abri de la lumière. Hémolyse gênante pour la Bilirubine.

	Standard		Echantillon	
	Blanc	Dosage	Blanc	Dosage
Standard R4	50 µl	50 µl	-	-
Echantillon	-	-	50 µl	50 µl
Réactif R2	1 ml	-	1 ml	-
Solution de travail (B.D)	-	1 ml	-	1 ml

Mélanger et incuber exactement 5 minutes à 37°C

▪ Lecture

La lecture est réalisée après avoir réglé le spectrophotomètre sur une longueur d'onde de 555 nm, sachant que l'épaisseur de la cuve est de 1 cm. Lire l'absorbance (A) du standard et les échantillons contre leurs blancs, le résultat est exprimé en (mg/L) [155].

2.8.12. Dosage des Protéines totales

▪ Principe

Méthode colorimétrique décrite par Gornall et al (1949). Les liaisons peptidiques des protéines réagissent avec le Cu^{2+} en solution alcaline pour former un complexe bleu-violet dont l'absorbance est proportionnelle à la concentration de protéines. Le réactif Biuret contient du sodium potassium tartrate qui complexe les ions cuivre et maintient leur solubilité dans le milieu alcalin [156].

▪ Mode opératoire

- Préparation du réactif de travail : Ajouter 3 ml de R2 à 1 flacon R1 (Appendice C). Cette préparation reste stable pendant 6 mois entre 2°C et 8°C.
- Pipeter dans des tubes à essai :
 - Le blanc qui contient 1 mL de solution de travail.
 - Le standard qui est un mélange de 20 μL de l'étalon de triglycéride et 1 mL du réactif de travail.
 - L'échantillon qui contient 20 μL du sérum et 1 mL de la solution de travail.
- Après agitation, les 3 tubes sont incubés à la température 5 minutes.

▪ Lecture

La lecture est réalisée après avoir régler le spectrophotomètre sur une longueur d'onde de 546 nm, sachant que l'épaisseur de la cuve est de 1 cm.

Lire l'absorbance de la solution standard et de l'échantillon face au blanc, le résultat est exprimé en (g/L) [156].

2.8.13. Dosage de l'Albumine

▪ Principe

A pH = 4.2, le vert de bromocrésol (BCG) se combine à l'albumine pour former un complexe coloré dont l'absorbance est proportionnelle à la concentration en albumine dans l'échantillon [157].

▪ Mode opératoire

- Les réactifs sont prêts à l'emploi. Ils doivent être ramenés à la température ambiante avant leur utilisation (Appendice C).
- Le Sérum, plasma hépariné non hémolysé.
- Pipeter dans des tubes à essai :

- Le blanc qui contient 2mL de solution de travail.
- Le standard qui est un mélange de 10 µL de standard et 2 mL du réactif de travail.
- L'échantillon qui contient 10 µL du sérum et 2mL de la solution de travail.
- Après agitation, les 3 tubes sont incubés pendant 5 minutes à 20 - 25°C, la coloration est stable durant les 30 minutes.

- Lecture

La lecture est réalisée après avoir régler le spectrophotomètre sur une longueur d'onde de 628 nm, sachant que l'épaisseur de la cuve est de 1 cm.

Lire l'absorbance de la solution standard et de l'échantillon face au blanc, le résultat est exprimé en (g/L) [157].

2.8.14. Dosage de Fer

- Principe

A pH 4,8 le fer Ferrique (Fe^{+++}) est libéré instantanément de la transferrine. L'acide ascorbique le réduit en fer ferreux (Fe^{++}). La ferrozine forme avec le fer ferreux, un complexe coloré soluble, mesurable de 560 à 580 nm. La présence de thiourée permet d'éliminer l'interférence des ions cuivreux [158].

- Mode opératoire

Dissoudre le contenu d'une spatule d'acide ascorbique (environ 250 mg) dans 50 ml de réactif 1 (réactif A). Ajouter 40 µl de ferrozine dans 1 ml de réactif A (réactif B). Le réactif B est préparé extemporanément (Appendice C).

	Blanc réactif	Standard	Blanc échantillon	Echantillon
Eau distillée	200 ul	-	-	-
Standard R4	-	200 ul	-	-
Echantillon	-	-	200 ul	200 ul
Réactif A	-	-	1 ml	-
Réactif B	1 ml	1 ml	-	1 ml

- Lecture

La lecture est réalisée par un spectrophotomètre avec une cuve de 1 cm d'épaisseur et une longueur d'onde de 340 nm, le résultat est exprimé en (µg/dL) [158].

2.8.15. Dosage de Calcium

▪ Principe

La mesure du calcium est fondée sur la méthode o-crésolphtaléinecomplexon (CPC). En milieu alcalin, le calcium forme avec l'o-crésolphtaléine, un complexe violet, dont l'intensité de la couleur est directement proportionnelle à la concentration du calcium de l'échantillon testé [159].

▪ Mode opératoire

Solution de travail : Mélanger 1 volume du réactif R1 avec 1 volume du réactif R2 (Appendice C).

Préparation des échantillons : sérum ou plasma hépariné.

- Pipeter dans des tubes à essai :

- Le blanc qui contient 1 mL de solution de travail.

- Le standard qui est un mélange de 20 µL de l'étalon et 1 mL du réactif de travail.

- L'échantillon qui contient 20 µL du sérum et 1 mL de la solution de travail.

- Après agitation, les 3 tubes sont incubés à la température ambiante pendant 5 minutes. La coloration est stable pendant 1 heure.

▪ Lecture

La lecture est réalisée après avoir régler le spectrophotomètre sur une longueur d'onde de 570 nm (550-590), sachant que l'épaisseur de la cuve est de 1 cm. Lire l'absorbance de la solution standard et de l'échantillon face au blanc, le résultat est exprimé en (mg/L) [159].

2.8.16. Dosage de Sodium

▪ Principe

Il existe des méthodes colorimétriques et enzymatiques qui permettent de mesurer la concentration de sodium à l'aide d'instruments de chimie clinique standard [15]. Dans la réaction enzymatique, la β -galactosidase est activée par le sodium de l'échantillon. L'enzyme activée catalyse la réaction o-nitrophényl- β -D-galactopyranoside (NPG) en nitrophénol et galactose [160].

▪ Mode opératoire

- Préparation du réactif de travail : les réactifs 1 et réactif 2 étant prêts à l'emploi (Appendice C). Cette préparation reste stable pendant 1 mois entre 2°C et 8°C.

- Pipeter dans des tubes à essai :

- Le blanc qui contient 40 µL de l'eau distillée, 900 µL de R1, mélanger, incubé pendant 5 min à +37 °C, ensuite ajouter 300 µL de R2.
- Le standard qui est un mélange de 10 µL de l'étalon de triglycérides et 1 mL du réactif de travail.
- L'échantillon qui contient 40 µL de sérum, 900 µL de R1, mélanger, incubé pendant 5 min à +37 °C, ensuite ajouter 300 µL de R2.
- Mélanger, incubé à +37 °C, puis lire l'absorbance A1 après 1 minute et démarrer le chronomètre. Lire l'absorbance A2 après 1 min. et l'absorbance A3 2 min à +37 °C

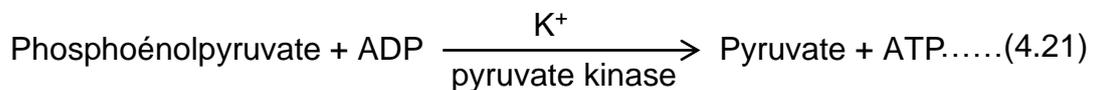
▪ Lecture

La lecture est réalisée après avoir réglé le spectrophotomètre sur une longueur d'onde de 405 nm, sachant que l'épaisseur de la cuve est de 1 cm. Lire l'absorbance de la solution standard et de l'échantillon face au blanc, le résultat est exprimé en (mmol/L) [160].

2.8.17. Dosage du Potassium

▪ Principe

Le dosage du potassium dans le sang est assuré soit par des méthodes spectrophotométriques sur les instruments d'étalonnage biologique, soit par une méthode enzymatique fondée sur l'activation du pyruvate kinase avec le potassium en utilisant le phosphoénolpyruvate comme substrat. Le pyruvate formé réagit avec le NADH en présence de LDH pour former Lactate et NAD et donne une excellente linéarité ainsi qu'une sensibilité négligeable aux substances endogènes [161].



▪ Mode opératoire

- Préparation du réactif de travail :

R1. Tampon / Enzyme-Substrat : Dissoudre le contenu d'un flacon de R1b (enzyme-substrat) avec une portion de tampon R1a ; transférer alors le contenu total dans le tampon R1a, en lavant plusieurs fois le flacon R1b.

R2. Enzyme/Diluant : Dissoudre le contenu d'un flacon de R2b avec une portion de tampon R2a ; transférer alors le contenu total dans le diluant R2a, en

avant plusieurs fois le flacon R2b. (Appendice C). Cette préparation reste stable pendant 4 jours à 2-8 °C.

- Pipeter dans des tubes à essai :
- Le standard qui est un mélange de 720 µL de R1, 290 µL de R2 et 20 µL de standard.
 - L'échantillon qui contient 20 µL de sérum et 720 µL de R1, et 290 µL de R2.
- Mélanger et lire l'absorbance après 120 s (A1) et 240 s (A2).

- Lecture

La lecture est réalisée après avoir réglé le spectrophotomètre sur une longueur d'onde de 340 nm, sachant que l'épaisseur de la cuve est de 1 cm. Lire l'absorbance de la solution standard et de l'échantillon face au blanc, le résultat est exprimé en (mmol/L) [161].

2.9. Analyses hématologiques du sang

2.9.1. Détermination de la formule de numération sanguine FNS

- Principe

Le dosage hématologique est réalisé à partir du sang entier (sans centrifugation) directement à l'arrivée des échantillons au laboratoire. La détermination quantitative des éléments figurés du sang est réalisée par la cyométrie en flux utilisée sur un automate d'hématologie. La fraction du faisceau lumineux que dévient ces éléments permet de les quantifier [162].

- Mode opératoire

Mettre l'échantillon sanguin contenu dans un tube EDTA au niveau de l'aiguille d'absorption de façon qu'elle y soit plongée. L'opération d'absorption peut prendre quelques secondes.

- Lecture

Le résultat est donné directement imprimé par l'automate précisant la quantification de chaque paramètre : Globules blancs, Lymphocytes, Monocytes, Granulocytes, Globules rouges, Hémoglobine, Hématocrite, et Plaquettes sanguines [162].

2.10. Etude histopathologique

2.10.1. Examen macroscopique des organes de rats

Il s'agit d'un constat visuel de l'apparence des organes (couleur, aspect), ainsi l'enregistrement de poids de chaque organe.

2.10.2. Examen microscopique des organes de rats

Il s'agit d'une observation microscopique des coupes histologiques au niveau des organes (foie et reins) réalisées sur des lames selon les étapes suivantes :

2.11.2.1. Fixation et rinçage

Cette étape a pour but d'immobiliser les structures en respectant dans la mesure du possible leur morphologie, de les conserver et de permettre la confection de préparation permanente. La fixation des organes est réalisée dans le formol à 10 % pendant 48 heures. Pour une meilleure fixation, les reins sont coupés en deux, après 6 heures au minimum, on prépare des tranches (pièces) à partir de chaque organe et leur mise dans des cassettes spéciales en plastique et les conserver toujours dans le formol à 10 % [163].

2.10.2.2. Déshydratation

Les cassettes sont imprégnées dans six bains d'alcool éthylique à concentration croissante pour réaliser une déshydratation en douceur et non brutale qui risque de rétracter les cellules d'alcool 70°, 90° et 100° successivement (deux bains de 1 heure chacun).

2.10.2.3. L'éclaircissement

L'alcool utilisé pour la déshydratation n'est pas miscible à la paraffine, pour cela il faut enlever l'alcool du tissu, ceci est effectué par deux bains de xylène pendant 5 minutes chacun [163].

2.10.2.4. Imprégnation

Dans une étuve réglée à 60°C, les cassettes sont imprégnées dans un bain de la paraffine pure liquide à 60°C pendant 12 heures.

2.10.2.5. Inclusion et mise en bloc

L'inclusion consiste à faire pénétrer la paraffine dans les tissus qui va donner la résistance mécanique nécessaire à la réalisation des coupes au microtome, l'inclusion est réalisée selon les étapes suivantes :

- Ecoulement de la paraffine dans des moules métalliques.
- Inclusion et orientation des pièces dans la paraffine (Figure 4.8).
- Placement des cassettes, sur lesquelles est inscrit l'état de l'organe de l'animal et son sexe.
- Refroidissement des blocs de paraffine sur une plaque métallique réfrigérée environ 7 minutes [163].



Figure 4.8 : Inclusion et mise en bloc des organes dans la paraffine (photo originale).

2.10.2.6. Confection des coupes

Les blocs obtenus sont coupés au microtome de type LEICA RM 2125 RT. Avec une épaisseur de 5 μm .

2.10.2.7. Collage des rubans des coupes et leur séchage

Les rubans des coupes sont étalés dans un bain d'eau thermostatée (37°C) puis récupérés et collés sur des lames ordinaires et ensuite séchées dans l'étuve à 37°C pendant 12 heures.

2.10.2.8. Déparaffinage et réhydratation

Le déparaffinage sert à enlever la paraffine du tissu pour que les colorants puissent le pénétrer. Les coupes sont passées dans deux bains de xylène pendant 2 minutes chacun. La réhydratation a pour but de retirer le xylène du tissu et le remplacer par l'eau. Les pièces sont passées dans quatre bains d'éthanol en concentrations décroissantes : 100° ; 90° ; 70° pendant une durée d'une minute chacun. Elles sont enfin lavées à l'eau courante [163].

2.11.2.9. Coloration

On procède à la coloration adoptée en anatomie pathologique, celle de l'hémalum-éosine (HE) effectuée grâce à l'hémalum qui colore en bleu-violet les noyaux et à l'éosine qui colore le cytoplasme en rose, les hématies en rouge claire à jaune et le collagène en jaune. La coloration hémalum-éosine est réalisée selon les étapes suivantes :

- Coloration des lames par une solution d'hémalum pendant 45 secondes.
- Rinçage à l'eau courante pour enlever l'excédent du colorant.
- Passage des lames par une solution de carbonate de lithium pendant 30 secondes.
- Rinçage à l'eau courante pour enlever le surplus de carbonate de lithium.
- Coloration des lames par d'éosine pendant 4 minutes.
- Rinçage par l'eau courante.
- Déshydratation : imprégner les lames dans des bains d'alcool éthylique aux concentrations croissantes pendant une durée de 30 secondes chacune.
- L'éclaircissement : on plonge les lames dans un bain de xylène pendant une durée de 5 minutes [163].

2.10.2.10. Montage et observation microscopique

Le montage est la dernière étape de la préparation des lames pour la lecture en microscopie. Il s'agit d'un collage de la lamelle à la lame d'une manière rapide et durable, en utilisant un milieu de montage permanent. Le but est l'obtention d'un degré de transparence et d'indice de réfraction élevé mais aussi pour protéger mécaniquement l'étalement qui ne supporte pas le dessèchement. Le milieu de montage idéal est l'Eukitt (figure 4.9) [163].

Les lames sont séchées sur papier absorbant, nettoyées au xylène, la lecture se fait à l'aide d'un microscope photonique doté d'un appareil à photo. On prend plusieurs photos de chaque observation réalisée sous différents grossissements (G× 10, G× 40 et G× 100).



Figure 4.9 : Coupes histologiques colorées et fixées sur des lames (photo originale).

2.11. Etude statistique

L'étude statistique a été réalisée à l'aide d'un logiciel de statistique Systat 7. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes \pm Ecart type. Une analyse de variance puis un test de Student sont effectués pour comparer les résultats des rats témoins et les résultats des rats traités. Les différences sont jugées significatives quand $p < 0,05$. Le poids relatif de l'organe (g %) est déterminé comme suit :

$$\frac{\text{Poids absolu de l'organe (g)}}{\text{Poids absolu (g)}} \times 100 \quad (4.14)$$

CHAPITRE 5

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Ce chapitre résume les résultats clés obtenus au cours de notre étude et qui s'articulent principalement sur :

- ✓ Choix des différents pesticides utilisés dans la partie expérimentale et par l'enquête menée préalablement
- ✓ Caractérisation physico-chimiques et microbiologique de l'aliment, l'eau, psyllium et l'argile destinés à l'alimentation des rats.
- ✓ Tests in-vivo : analyses microbiologiques, biochimiques, hématologiques, et histologiques.

1. Résultats de l'enquête sur les pesticides

1.1. Résultats de classification des pesticides

D'après l'enquête réalisée sur le terrain chez 15 vendeurs de produits phytosanitaires et 10 agriculteurs des régions de Tipaza et Blida, nous avons sélectionné 6 pesticides largement utilisés dans le traitement des fruits et légumes et soupçonnés par leur degré de toxicité, les résultats sont représentés dans le tableau 5.1 ci-dessous :

Tableau 5.1 : Classement des pesticides largement utilisés dans le traitement des fruits et légumes selon leur degré de toxicité de la région de Mitidja (Blida et Tipaza).

N°	Pesticides	Nature	Nombre de citation/25
1	Chlorpyrifos-méthyl	Insecticide	25
2	Deltamethrine	Insecticide	19
3	Methidation	Insecticide	16
4	Cypermithrine	Insecticide	14
5	Acetamipride	Insecticide	12
6	Abamectine	Acaricide	21

Les 6 pesticides obtenus par cette classification ont été utilisés dans l'administration des doses pour les rats pendant l'expérimentation animale. Et selon nos résultats, on constate que les insecticides sont le type de pesticides les plus utilisés en agriculture en Algérie et aussi sont les plus toxiques.

1.2. Résultats de la classification des légumes largement consommés en Algérie selon le degré d'utilisation des pesticides

D'après l'enquête réalisée sur le terrain, nous avons identifié et classé 11 légumes largement consommés par la population Algérienne selon le degré d'utilisation des pesticides (nombre et fréquence). Les résultats sont représentés dans le tableau 5.2 ci-dessous :

Tableau 5.2 : Classement des légumes largement consommés par la population Algérienne selon le degré d'utilisation des pesticides.

Classement	Légumes	Moyenne de classement
1	Tomate	1,66
2	Pomme de terre	2,43
3	Poivre vert	3,33
4	Salade verte	3,41
5	Haricot vert	5,83
6	Concombre	6,25
7	Courgette	6,58
8	Aubergine	7,83
9	Petit pois	8,25
10	Carotte	9,08
11	L'oignon	9,50

Ces résultats montrent que la tomate et pomme de terre sont les légumes les plus traités par les pesticides en nombre (plusieurs types de pesticides) et en fréquences (plusieurs fois dans la même saison) car ils sont très sensibles aux maladies et aussi pour la tomate, les agriculteurs réalisent le traitement par plusieurs types de pesticides 4 ou 5 fois dans la même saison car la tomate donne des fruits en plusieurs reprises. Alors nous avons ressencé : les tomates, pomme de terre, poivre vert et salade verte comme étant les légumes qui présentent un

risque plus élevé de résidus de pesticides, alors que le haricot vert, concombre, courgette, présentent un risque modéré, mais l'aubergine, petit pois, carotte et l'oignon ne présentent pas un risque sur le consommateur car sont peu ou pas traité du tout par les pesticides.

1.3. Résultats de la classification des fruits largement consommés en Algérie selon le degré d'utilisation des pesticides

D'après l'enquête réalisée sur le terrain, nous avons classé 11 fruits largement consommés par la population Algérienne selon le degré d'utilisation des pesticides (nombre et fréquence), les résultats sont représentés dans le tableau 5.3 ci-dessous :

Tableau 5.3 : Classement des fruits largement consommés par la population Algérienne selon le degré d'utilisation des pesticides.

Classement	Fruits	Moyenne de classement
1	Fraise	2,38
2	Raisin	2,84
3	Pastèque et melon	3,07
4	Orange, pomme et poire	4,07
5	Pêche	5,07
6	Abricot	6,07
7	Le néflier du Japon	6,61
8	Prune	7,38

Les résultats de notre enquête ont montré d'une façon générale que les fruits sont plus traités par les pesticides en termes de nombre et fréquence puisque les fruits sont plus riches en eau et en sucre par rapport aux légumes. La fraise est le fruit les plus traité par les pesticides en nombre (plusieurs types de pesticides) et en fréquences (plusieurs fois dans la même saison) comme la tomate. Et aussi nous avons le raisin, pastèque, melon, orange, pomme et poire, sont des fruits qui présentent un risque élevé de résidus de pesticides, alors que le néflier du Japon et prune ne présentent pas un risque sur le consommateur car sont peu ou pas traités du tout par les pesticides.

2. Résultats des analyses physico-chimiques

2.1. Résultats des analyses physico-chimiques de l'eau

Les résultats des analyses physicochimiques de l'eau du robinet destinée à la consommation par rats sont représentés dans le tableau 5.4 ci-dessous :

Tableau 5.4 : Résultats des analyses physicochimiques de l'eau de robinet destinée aux rats.

Paramètres	Résultats	Norme *
Conductivité	1016 $\mu\text{S/cm}$	2800 $\mu\text{S/cm}$
pH	7,9	6.5 - 8.5
Calcium (Ca)	190,57 mg/L	75 - 200 mg/L
Magnésium (Mg)	21,6 mg/L	150 mg/L
Sodium (Na)	99 mg/L	200 mg/L
Potassium (K)	9,7 mg/L	20 mg/L
Chlorure (Cl)	189,57 mg/L	200 - 500 mg/L
Nitrate (No^-_3)	10 mg/L	15 mg/L
Nitrite (No_2)	< 0,01 mg/L	0,02 mg/L

* Norme Algérienne selon Décret exécutif n°14-96 du 4 mars 2014 relatif à la qualité de l'eau de consommation humaine [164].

Les analyses physico-chimiques de l'eau de robinet destinée à l'alimentation des rats et pour la préparation des solutions de pesticides et additifs alimentaires a pour but de vérifier sa composition et sa qualité physico-chimique.

D'après les résultats du tableau 5.4 et selon la norme présentée dans l'arrêté ministériel du 26 Juillet 2000 relatif aux critères de qualité de l'eau potable, l'eau de robinet de la station d'expérimentation animale de la faculté des sciences vétérinaire à l'université Blida 1 est de bonne qualité physico-chimique, tous les paramètres physicochimiques recherchés sont dans l'intervalle des valeurs admissibles.

Notons que le taux de chlore ne doit pas être trop élevé car la vitamine C est dégradée par celui-ci [165]. Or le taux de chlorure dans notre eau est de

189,57 mg/L, ce qui est faible par rapport à la valeur maximale tolérée et qui est de 500 mg/L : ainsi la vitamine C dans l'alimentation des rats est bien préservée.

Il est à signaler que notre eau est riche en calcium et magnésium qui sont des éléments essentiels dans l'alimentation des rats. L'apport nutritionnel en ces deux éléments est intéressant surtout en cas de déficit en ces besoins.

Les rats boivent 140 millilitres d'eau par kilogramme de poids corporel par jour. Ils boivent en moyenne 2 ml d'eau pour chaque gramme de nourriture sèche [166]. Pour cela la qualité de l'eau est très importante pour la croissance normale et la santé des rats, ce qui pourrait influencer directement sur la fiabilité des résultats obtenus au cours de l'expérimentation animale.

2.2. Résultats des analyses physico-chimiques de l'aliment des rats

Les analyses physico-chimiques font ressortir la composition en nutriments essentiels suivante :

Tableau 5.5 : Composition en nutriments essentiels de l'aliment destiné aux rats

Nutriments (g / kg d'aliment)	Teneur (g / kg d'aliment)
Matière azotée totale	158,10
Matière grasse	54,40
Calcium	12,80
Phosphore	3,80

Tableau 5.6 : Recommandations alimentaires chez le rat aux différents stades physiologiques [167-169].

Nutriments (g / kg) d'aliment	Entretien	Croissance	Gestation	Lactation
Matière azotée totale	> 50 à 70	150	150	150
Matières grasses	50	50	50	50
Calcium	5	5	6,3	6,3
Phosphore	3	3	3,7	3,7

En comparant nos résultats avec les recommandations alimentaires chez le rat (tableau 5.6), les besoins sont couverts pour le stade d'entretien et croissance pour nos rats pendant toute la période d'expérimentation animale en matière de protéines, matière grasse, calcium et phosphore. A cet effet, toute probabilité d'anomalie physiologique issue d'une carence nutritionnelle est éliminée.

Même s'il y a une carence en d'autres nutriments, elle est peut être récupérée automatiquement à travers la quantité de l'aliment ingérée par les rats chaque jour. C'est d'ailleurs l'avantage de l'alimentation à volonté où le rat mange jusqu'à la couverture de tous ses besoins nutritionnels.

Aussi, les rats sont des animaux coprophages c'est-à-dire qu'ils ingèrent une partie de leurs fèces. Ce comportement leur permet de récupérer des vitamines du groupe B, de la vitamine K et d'autres nutriments synthétisés par la flore digestive pendant le transit et ainsi que certains acides aminés et certaines protéines, cela leur permet de couvrir une partie de leurs besoins nutritionnels [169, 170].

On ne considère que 50-65 % des matières fécales de rats nourris avec des régimes alimentaires adéquats qui peuvent être réingérées par coprophagie [171].

3. Résultats des analyses microbiologiques de l'eau et l'aliment destinés aux rats

3.1. Résultats des analyses microbiologiques de l'eau

Les résultats des analyses microbiologiques de l'eau du robinet destinée aux rats sont représentés dans le tableau 5.7 ci-dessous :

Tableau 5.7 : Résultats des analyses microbiologiques de l'eau de robinet destinée aux rats.

Bactéries	Résultats (UFC)	Norme *(UFC)
<i>Coliformes Totaux</i>	00	00
<i>Coliformes Fécaux</i>	00	00
<i>Streptocoques</i>	00	00
<i>Clostridium</i>	00	00

*Norme Algérienne selon Décret exécutif n°14-96 du 4 mars 2014 relatif à la qualité de l'eau de consommation humaine [164].

D'après les résultats des analyses microbiologiques représentés dans le tableau 5.7, l'eau de robinet destinée à l'alimentation des rats est de bonne qualité

microbiologique, alors elle ne présente aucun risque pour la santé des rats pendant notre expérimentation animale.

3.2. Résultats des analyses microbiologiques de l'aliment

Les résultats des analyses microbiologiques de l'aliment destiné aux rats sont représentés dans le tableau 5.8 ci-dessous :

Tableau 5.8 : Résultats des analyses microbiologiques de l'aliment destiné aux rats.

Aliment	<i>Flore T</i>	<i>Coliforme T</i>	<i>Coliforme F</i>	<i>Staph</i>	<i>Salmonelle</i>	<i>Moisissure</i>
Aliment simple	250	<10	<5	<50	Absence	<50
Aliment+psyllium	180	<10	<5	<50	Absence	<50
Aliment+argile	50	<10	<5	<10	Absence	<5
Aliment+psyl+argl	70	<10	<5	< 50	Absence	< 50
Argile verte	30	Absence	Absence	< 5	Absence	<5
Psyllium poudre	90	<10	<5	<50	Absence	<50
Norme* (UFC)	10 ⁴	10 ²	30	10 ³	Absence 25 g	10 ³

*Norme Algérienne selon le Journal Officiel Algérien arrêté interministériel du 4 octobre 2016 fixant les critères microbiologiques des denrées alimentaires [89].

Les résultats de l'analyse microbiologique de : Aliment simple, Argile verte, Poudre de psyllium, Aliment+psyllium, Aliment+argile, Aliment+psyllium+argile, montrent une qualité microbiologique satisfaisante, ce qui confirme que ces aliments sont sains et ne causent aucun risque ou contamination pour les rats pendant l'expérimentation.

Pour l'argile verte et l'aliment enrichi en argile verte, nous avons remarqué une faible présence de la flore *mésophile totale et des staphylocoques* ainsi les *moisissures* par rapport aux autres aliments et une absence des *coliformes totaux*, thermotolérants *et salmonelles*, cela peut être expliqué par le pouvoir antibactérien remarquable de l'argile verte sur certaines bactéries [172].

4. Résultats de l'expérimentation animale

Nous avons procédé à une expérimentation animale sur un groupe de rats femelles de souche Wistar pour évaluer la toxicité des additifs alimentaires ainsi les pesticides et apprécier les effets protecteurs et antitoxiques du psyllium et l'argile verte, nous avons réalisé le suivi de plusieurs paramètres.

4.1. Suivi du poids corporel des rats

Pendant toute la période de l'expérimentation animale, l'évaluation pondérale de chaque lot de rats a été suivie chaque semaine et les enregistrements des résultats sont résumés d'une façon générale et récapitulative sous forme des courbes dans les figures 5.1- 5.4

Le développement normal du poids corporel des rats de la souche Wistar est représenté dans la figure 5.5 conformément aux travaux de CREDO (1990) [173].

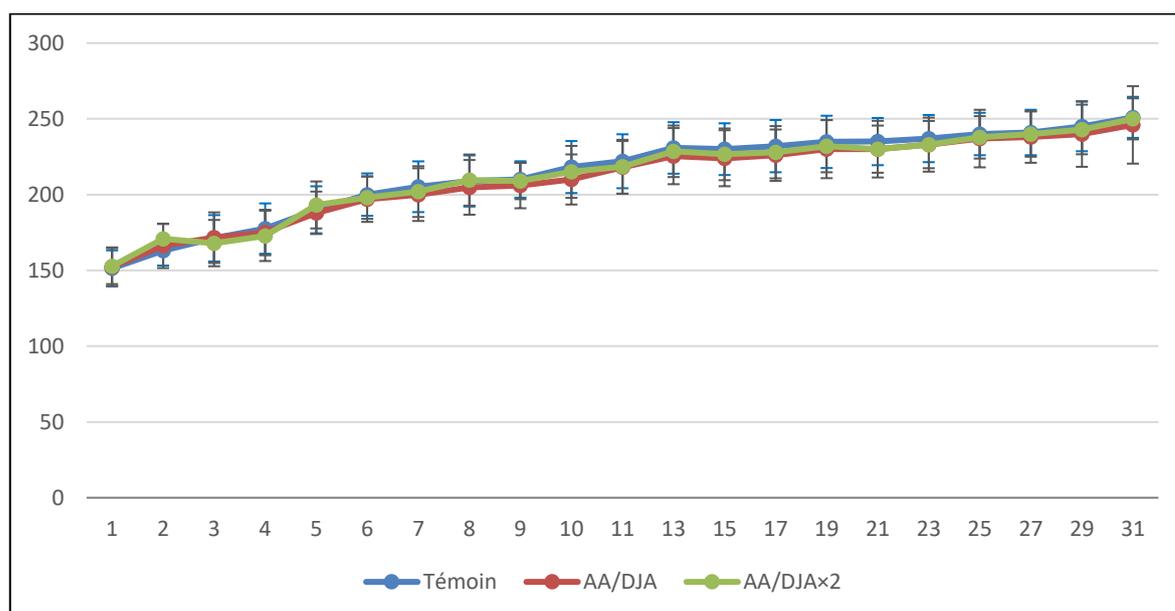


Figure 5.1 : Evaluation pondérale des rats traités par le mélange des additifs alimentaires pendant la durée de l'expérimentation.

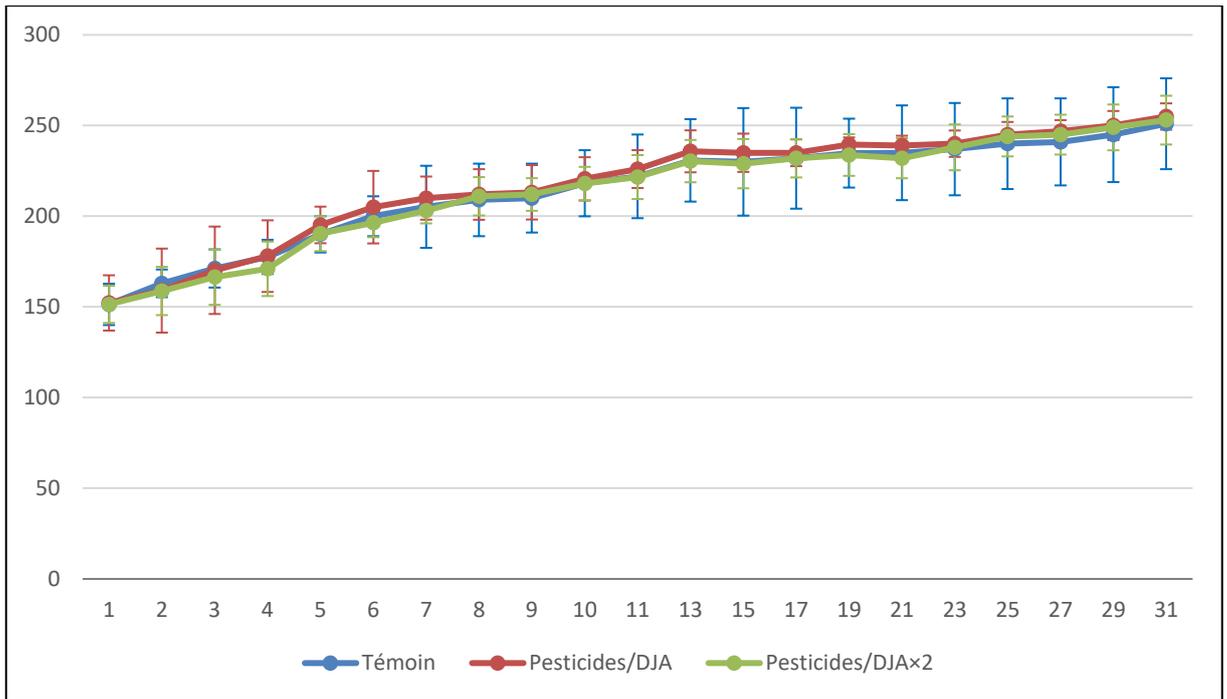


Figure 5.2 : Evaluation pondérale des rats traités par le mélange des pesticides pendant la durée de l'expérimentation.

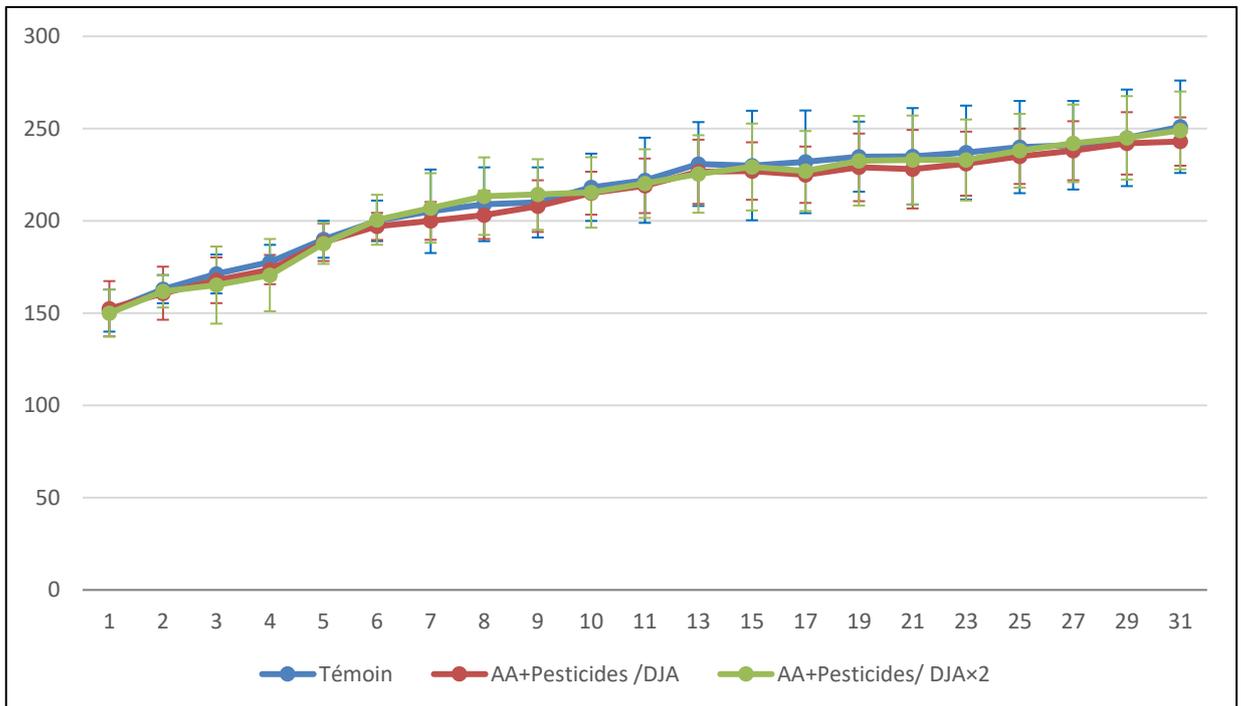


Figure 5.3 : Evaluation pondérale des rats traités par le mélange des pesticides et additifs alimentaires pendant la durée de l'expérimentation.

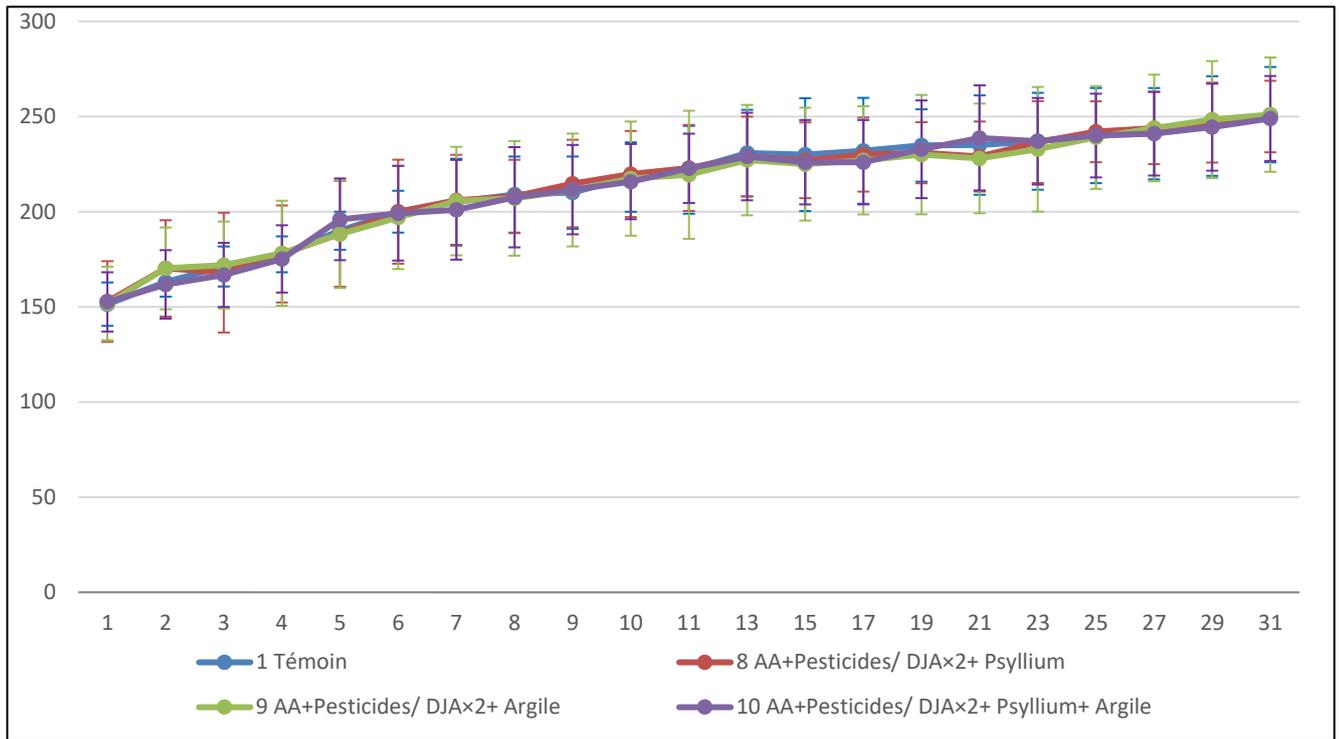


Figure 5.4 : Evaluation pondérale des rats traités par le mélange des pesticides et additifs alimentaires associé à l'argile verte et psyllium pendant la durée de l'expérimentation.

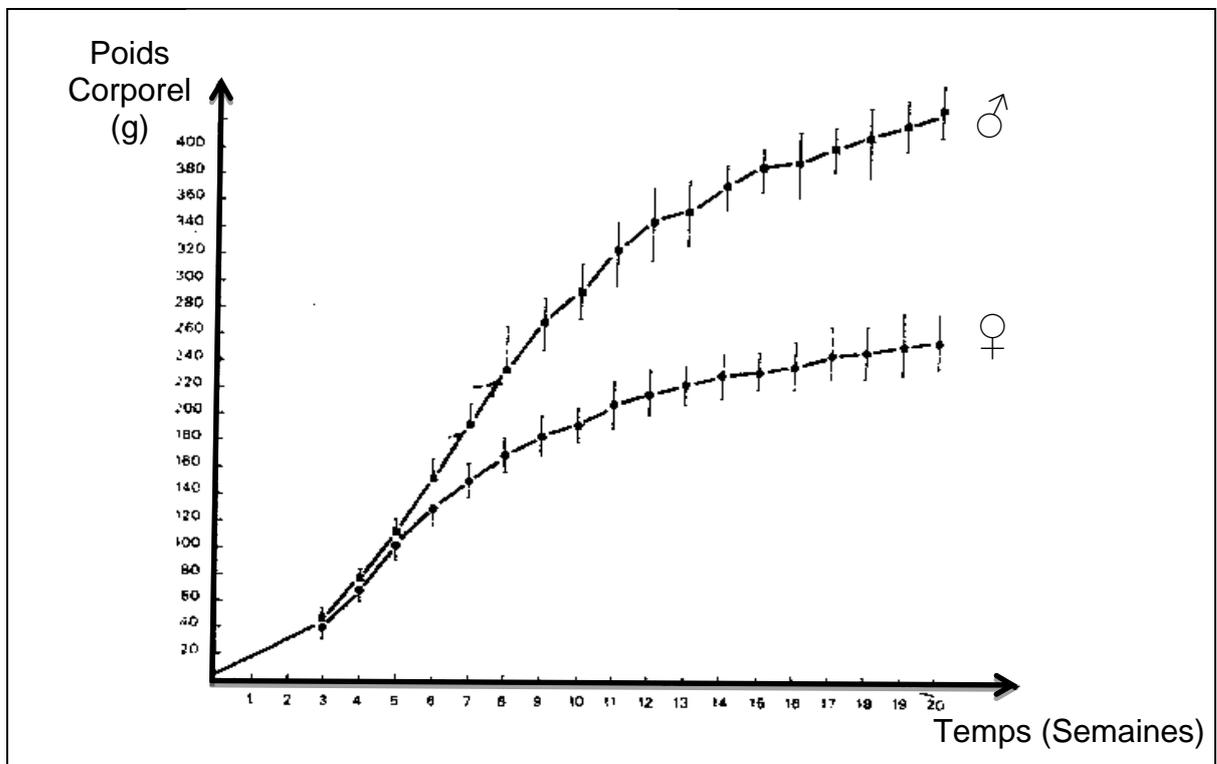


Figure 5.5 : Courbe d'évaluation pondérale du rat Wistar mâle et femelle [173].

D'après les résultats représentés sur les figures : 5.1 et 5.4, en comparant le poids moyen de nos rats témoins avec la courbe évolution pondérale de la figure 5.5, nous remarquons que le poids de nos rats sont dans les normes depuis le début de l'expérimentation à l'âge de 8 semaines qui correspond à 150 g jusqu'à la fin de notre expérimentation avec un poids moyen d'environ 250 g. Ainsi il apparait clairement que nos rats sont en bonne santé et bien portante, notre aliment a couvert leurs besoins nutritionnels et notre expérimentation animale s'est déroulée dans de bonnes conditions hygiéniques et sanitaires.

Selon les résultats présentés dans les figures 5.1- 5.4, et par rapport aux témoins, aucun changement significatif du poids corporel des rats traités par le mélange des dix additifs alimentaires et/ou six pesticides (DJA et DJA×2) n'a été enregistré pendant les 31 semaines de l'expérimentation animale, cela peut être expliqué par les très faibles doses d'additifs alimentaires et pesticides qui ne présentent pas un effet direct et observable sur la croissance et le développement corporel et morphologique des rats traités.

Aussi l'enrichissement de l'aliment par l'argile verte et/ou psyllium ne montre aucun changement dans le poids corporel et la croissance de ces rats. Ces résultats sont probablement dus à l'absence de nutriments énergétique et d'entretien dans l'argile et psyllium comme les glucides, lipides et protéines.

4.2. Résultats des analyses microbiologiques du microbiote intestinal des rats

4.2.1. Effets des additifs alimentaires sur le microbiote intestinal

4.2.1.1. Microbiote aérobie

Les résultats des analyses microbiologiques de l'effet des additifs alimentaires sur le microbiote aérobie des rats sont représentés dans la figure 5.6 ci-dessous :

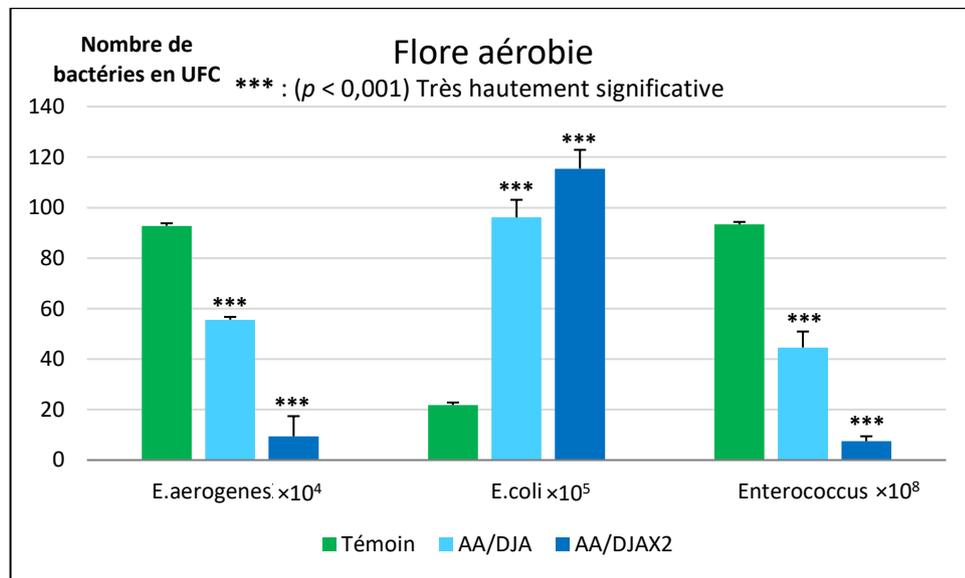


Figure 5.6 : Effet des additifs alimentaires sur le microbiote aérobie des rats

4.2.1.2. Microbiote anaérobie

Les résultats des analyses microbiologiques de l'effet des additifs alimentaires sur le microbiote anaérobie des rats sont regroupés dans la figure 5.7 ci-dessous :

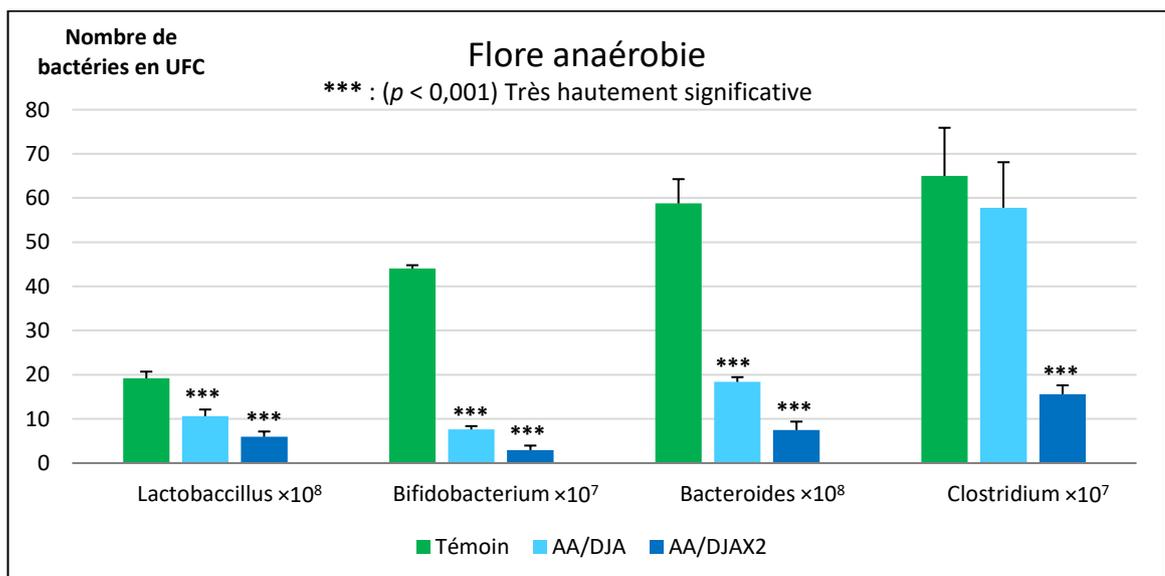


Figure 5.7 : Effet des additifs alimentaires sur le microbiote anaérobie des rats.

L'effet des différents traitements du mélange des additifs alimentaires sur le microbiote aérobie est représenté sur la figure 5.6 ci-dessus. Le mélange des 10 additifs alimentaires en dose de DJA et DJAx2 provoque une diminution très hautement significative pour la population bactérienne aérobie : *d'Enterobacter aerogenes*, et *Enterococcus spp* par rapport au groupe témoin. Par contre nous avons noté une augmentation très hautement significative pour l'espèce *Escherichia coli*.

L'effet du traitement par le mélange des additifs alimentaires sur le microbiote aéro-anaérobie facultative est présenté dans la Figure 5.7. Le mélange en dose de DJA et DJAx2 par rapport au groupe témoin, montre une grande diminution de manière très hautement significative de la population bactérienne de *Lactobacillus spp*.

L'impact du traitement par le mélange d'additifs alimentaires sur le microbiote anaérobie strict a été représenté dans la Figure 5.7. Ce mélange en dose de DJA et DJAx2 a enregistré des diminutions très hautement significatives en nombre globale de la population bactérienne de *Bifidobacterium spp*, *bacteroides spp* et *Clostridium spp* par rapport au nombre de bactéries du groupe témoin. Sauf la dose DJA qui a montré une diminution non significative pour les *Clostridium spp*.

Ces résultats peuvent être expliqués par l'effet toxique des 10 additifs alimentaires même à des doses faibles (DJA), cet effet et probablement provoqué par le phénomène d'addition ou synergie des effets toxiques, et selon les résultats d'autres auteurs qui ont émis l'hypothèse que l'exposition du microbiote intestinal humain à des additifs alimentaires et conservateurs, même à faibles doses, pourrait induire la dysbiose du microbiote intestinal, par contre les études individuelle d'un seul additif ne montre pas des effets en DJA [174]. Les *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus spp*, *Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium spp*, *bacteroides spp* et *Clostridium spp*, sont les bactéries les plus sensibles au mélange d'additifs alimentaires et nos résultats sont en accord avec les travaux de Bian et al., (2017) sur l'acésulfame de potassium [175], Frankenfeld et al., (2015) sur l'aspartam [176], Hrnčirova et al., (2019) sur Benzoate de sodium, sorbate de potassium [174].

Il est important de noter que les mécanismes exacts par lequel des additifs alimentaires ou des agents antimicrobiens, affectent la croissance microbienne, sont complexes et difficiles à déterminer. Certains des mécanismes d'action connus comprennent des changements dans la perméabilité de la membrane, interférence avec la membrane absorption et transport, inactivation des enzymes essentielles, interférence avec les mécanismes génétiques ou inhibition des protéines de synthèse. Malheureusement, seules quelques cibles de nourriture. Les additifs antimicrobiens ont été entièrement élucidés. Le mécanisme exact par lequel des agents antimicrobiens spécifiques inhibent le métabolisme et la prolifération semblent dépendre du type de micro-organismes, les substrats et les conditions environnementales [177].

La bactérie *Escherichia coli* est la souche la plus résistante au mélange d'additifs testés même en présence des conservateurs et aussi a montré une croissance plus importante que les témoins, ce résultat est expliqué probablement par les faibles doses des additifs alimentaires et le développement des systèmes de résistance de cette bactérie et l'utilisation de certains additifs comme source de carbone et d'azote pour la croissance.

Plusieurs mécanismes d'insensibilité microbienne aux antimicrobiens et agents susceptibles d'être impliqués ont été mis au point. Un mécanisme intrinsèque majeur chez les bactéries Gram-négatives est l'imperméabilité cellulaire [178]. Un autre mécanisme important est l'élimination des agents antimicrobiens, agents hors d'une cellule à l'aide de pompes à efflux, le mécanisme de la pompe est associé à la résistance d'*E. coli* à divers agents antimicrobiens [179]. Les mécanismes des bactéries Gram-positives comprennent l'efflux, l'adaptation phénotypique ou dégradation des biocides [177]. Ce fait intéressant, certaines souches d'*Enterococcus spp* sont complètement résistantes aux antibiotiques et présentent un problème important en clinique pratique [180].

4.2.2. Résultats de l'effet des pesticides sur le microbiote intestinal des rats

4.2.2.1. Microbiote aérobie

Les résultats des analyses microbiologiques de l'effet du mélange de pesticides sur le microbiote aérobie des rats sont représentés dans la figure 5.8 ci-dessous :

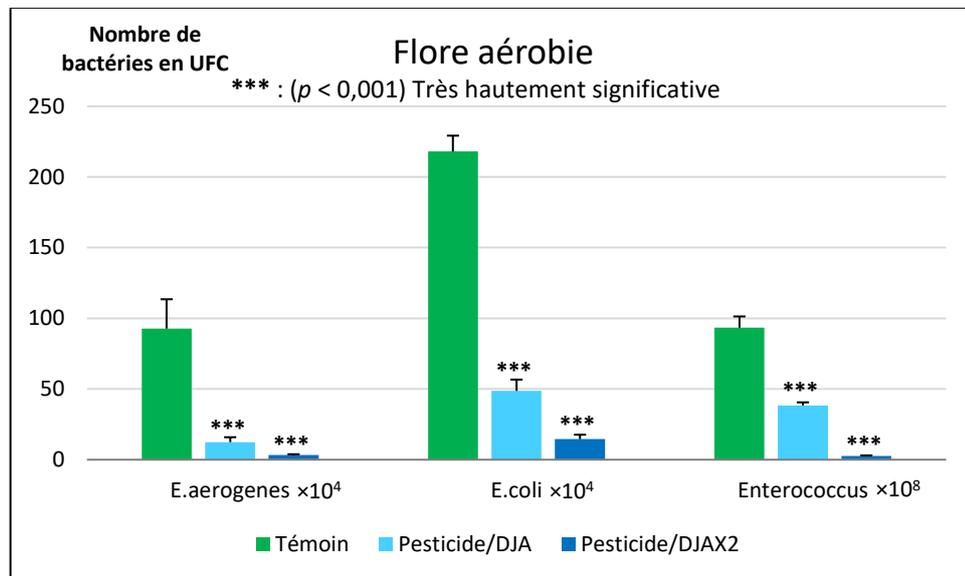


Figure 5.8 : Effet des pesticides sur le microbiote aérobie des rats.

4.2.2.2. Résultats de l'effet des pesticides sur le microbiote anaérobie

Les résultats des analyses microbiologiques de l'effet du mélange de pesticides sur le microbiote anaérobie des rats sont représentés dans la figure 5.9 ci-dessous :

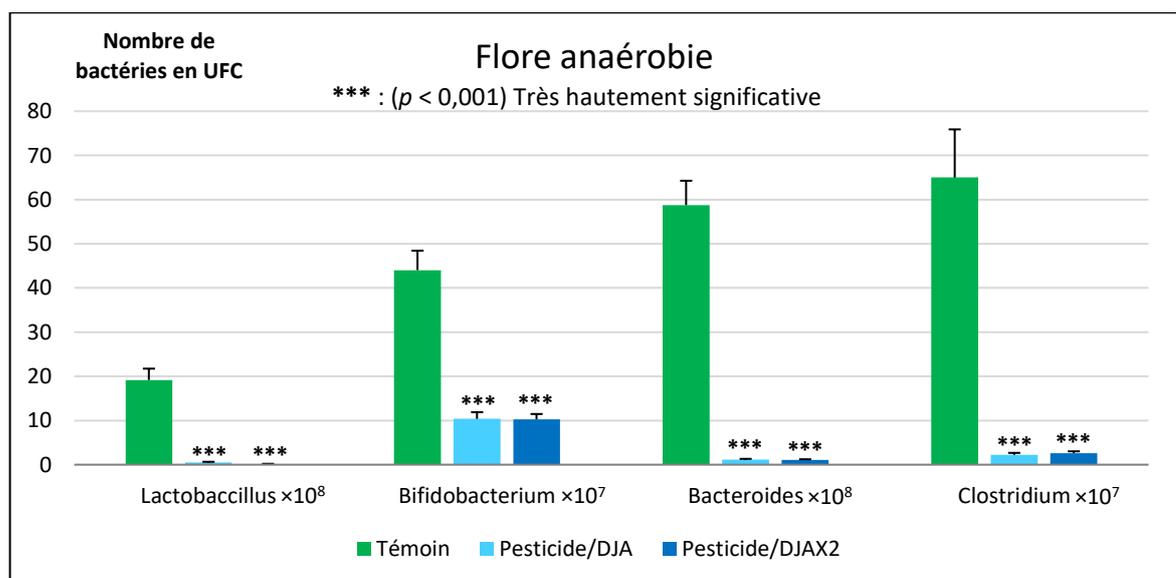


Figure 5.9 : Effet des pesticides sur le microbiote anaérobie des rats.

L'effet des différents traitements du mélange de pesticides sur le microbiote aérobie a été représenté dans la figure 5.8 ci-dessus. Le mélange des 6 pesticides en dose de DJA et DJA×2 a provoqué une diminution très hautement significative pour la population bactérienne aérobie : *d'Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, et *Enterococcus spp* par rapport au groupe témoin.

L'effet du traitement par le mélange de pesticides sur le microbiote aéro-anaérobie facultative est présenté sur la Figure 5.9. Le mélange en dose de DJA et DJA×2 par rapport au groupe témoin, montre une très grande diminution de manière très hautement significative de la population bactérienne totale de *Lactobacillus spp*.

L'impact du traitement par le mélange des 6 pesticides sur le microbiote anaérobie strict a été présenté sur la Figure 5.9. Ce mélange en dose de DJA et DJA×2 a enregistré des diminutions très hautement significatives en nombre global de la population bactérienne de *Bifidobacterium spp*, *bacteroides spp* et *Clostridium spp* par rapport au nombre de bactéries du groupe témoin.

Cet effet toxique prouve que le mélange des six pesticides est toxique pour le microbiote intestinal, même à faible dose et à la dose journalière admissible (DJA) qui est considérée comme dose de sécurité et sans effet toxique pour un seul type de pesticide [181].

La diminution du nombre de bactéries du microbiote intestinal peut être due à l'effet toxique du mélange de 6 pesticides soit par la destruction directe des cellules bactériennes, par la perturbation du mécanisme de division cellulaire ou par la perturbation du métabolisme biochimique des bactéries. Les pesticides organophosphorés provoquent des altérations des protéines membranaires cellulaires, ces protéines différentielles ont été identifiées comme étant des protéines membranaires et, en ce qui concerne les fonctions physiologiques, ces protéines sont impliquées dans le métabolisme cellulaire, les chaperons moléculaires, le système de cytosquelette, le Transfert des signaux, le transport et les récepteurs hormonaux [182].

Les pesticides sont responsables de la perturbation de la morphologie mitochondriale, de la diminution du potentiel membranaire mitochondrial et de la respiration oxydative [183, 184]. La toxicité des pesticides peut être représentée par le dosage de l'inhibition des enzymes, des dommages à l'ADN par les hydrocarbures aromatiques, de l'expression des gènes, du complexe transthyrétine-protéine de liaison au rétinol, des précurseurs des protéines de coagulation [185, 186].

D'autres études ont montré que certaines bactéries comme *Lactobacillus* sont capables de dégrader et de détoxifier les pesticides organophosphorés comme le chloropyrifos et d'autres pesticides en les utilisant comme source de carbone et de phosphore [187].

Par rapport à nos résultats, cette différence s'explique probablement par la différence de la nature et des types de bactéries étudiés et l'interaction naturelle entre eux dans le tractus gastro-intestinal. Elle peut également être due à la différence de temps d'exposition au mélange de pesticides et au type de mélange commercial de pesticides qui prend l'une des trois formes suivantes : indépendante, addition de dose ou interaction, et les additifs utilisés dans les formulations commerciales qui contribuent à la toxicité des pesticides ménagers modifiant la toxicocinétique du pesticide en raison de son activation ou de sa détoxification réduite, également les bactéries sont incapables de les dégrader [188, 189].

4.2.3. Résultats de l'effet de mélange additifs alimentaires et pesticides sur le microbiote intestinal des rats

4.2.3.1. Mélange d'additifs alimentaires et pesticides sur le microbiote aérobie

Les résultats des analyses microbiologiques de l'effet du mélange des additifs alimentaires et pesticides sur le microbiote intestinal aérobie des rats sont regroupés dans la figure 5.10 ci-dessous :

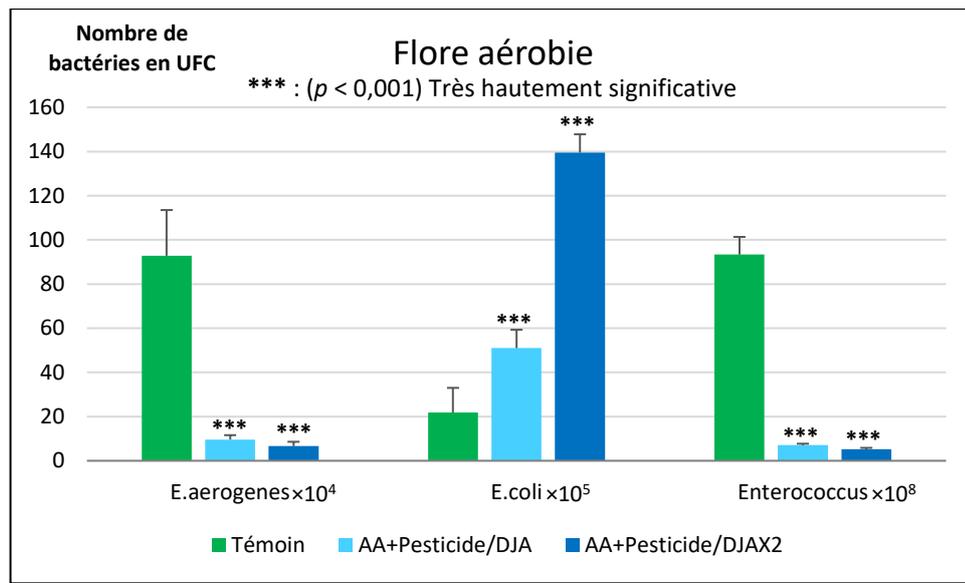


Figure 5.10 : Effet des mélanges additifs alimentaires et pesticides sur le microbiote aérobie des rats.

L'effet des différents traitements du mélange pesticides et additifs alimentaires sur le microbiote aérobie a été représenté dans la figure 5.10. Le mélange de 6 pesticides et 10 additifs alimentaires en dose de DJA et DJA $\times 2$ provoque une diminution très hautement significative pour la population bactérienne aérobie : *Enterobacter aerogenes*, et *Enterococcus spp* par rapport au groupe témoin. Sauf *Escherichia coli* nous avons enregistré une augmentation très hautement significative par rapport au témoin.

4.2.3.2. Résultats de l'effet de mélange additifs alimentaires et pesticides sur le microbiote anaérobie

Les résultats des analyses microbiologiques de l'effet du mélange des additifs alimentaires et pesticides sur le microbiote intestinal anaérobie des rats sont regroupés dans la figure 5.11 ci-dessous :

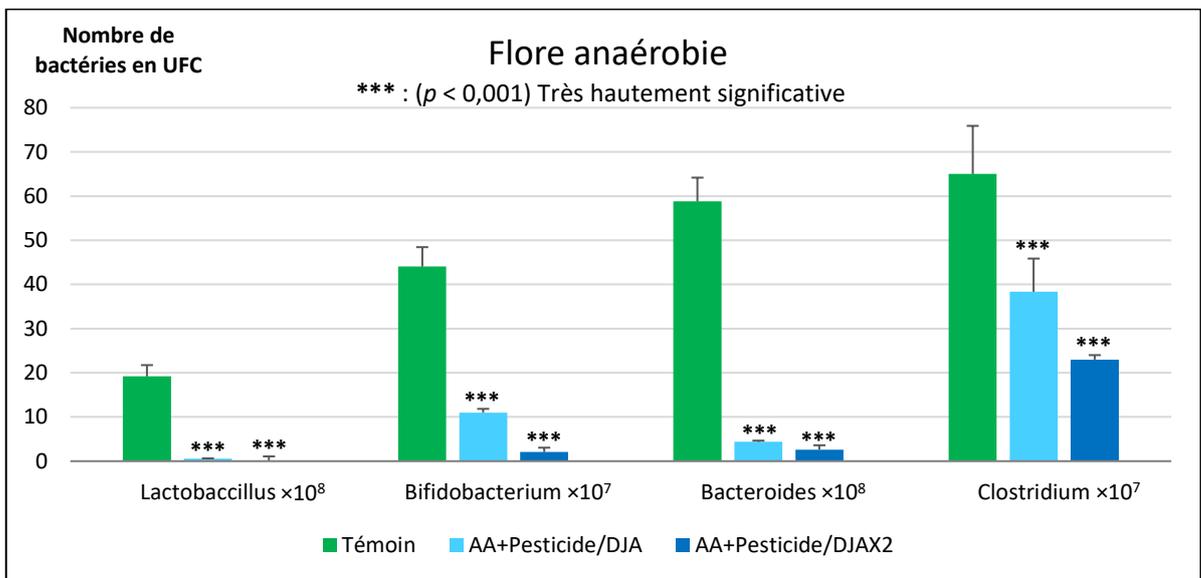


Figure 5.11 : Effets du mélange additifs alimentaires et pesticides sur le microbiote anaérobie des rats.

L'effet du traitement par le mélange de pesticides et additifs alimentaires sur le microbiote aéro-anaérobie facultatif est présenté sur la Figure 5.11. Le mélange en dose de DJA et DJAx2 par rapport au groupe témoin, montre une très grande diminution de manière très hautement significative de la population bactérienne totale de *Lactobacillus spp.*

L'impact de traitement par le mélange pesticide et additif alimentaire sur le microbiote anaérobie strict a été représenté sur la Figure 5.11. Ce mélange en dose de DJA et DJAx2 des diminutions très hautement significatives en nombre global de la population bactérienne de *Bifidobacterium spp.*, *bacteroides spp.* et *Clostridium spp.* par rapport au nombre de bactéries du groupe témoin.

Pour le lot psyllium + argile verte DJA et DJAx2, les effets toxiques observés sur les bactéries du microbiote intestinal sont aggravés par rapport aux lots

précédents (pesticides et additifs alimentaires), cet effet est probablement expliqué par l'effet cumulatif ou synergique entre les 6 pesticides et les 10 additifs alimentaires consommés par les rats à la fois.

Les résultats des effets toxiques observés dans ce cas peuvent être expliqués de la même façon que les lots précédents (pesticides et additifs alimentaires).

Pour la dose DJA, l'hypothèse de la toxicité à l'exposition du mélange de différentes substances même à de très faibles doses (DJA) est prouvée pour le mélange pesticide + additif alimentaire.

4.2.4. Résultats de l'effet protecteur de Psyllium et l'argile contre la toxicité du mélange additifs alimentaires et pesticides sur le microbiote intestinal des rats

4.2.4.1. Psyllium et l'argile contre la toxicité de mélange additifs alimentaires et pesticides sur le microbiote aérobie

Les résultats des analyses microbiologiques de l'effet protecteur du Psyllium et l'argile contre la toxicité du mélange d'additifs alimentaires et pesticides sur le microbiote aérobie des rats sont regroupés sur la figure 5.12 ci-dessous :

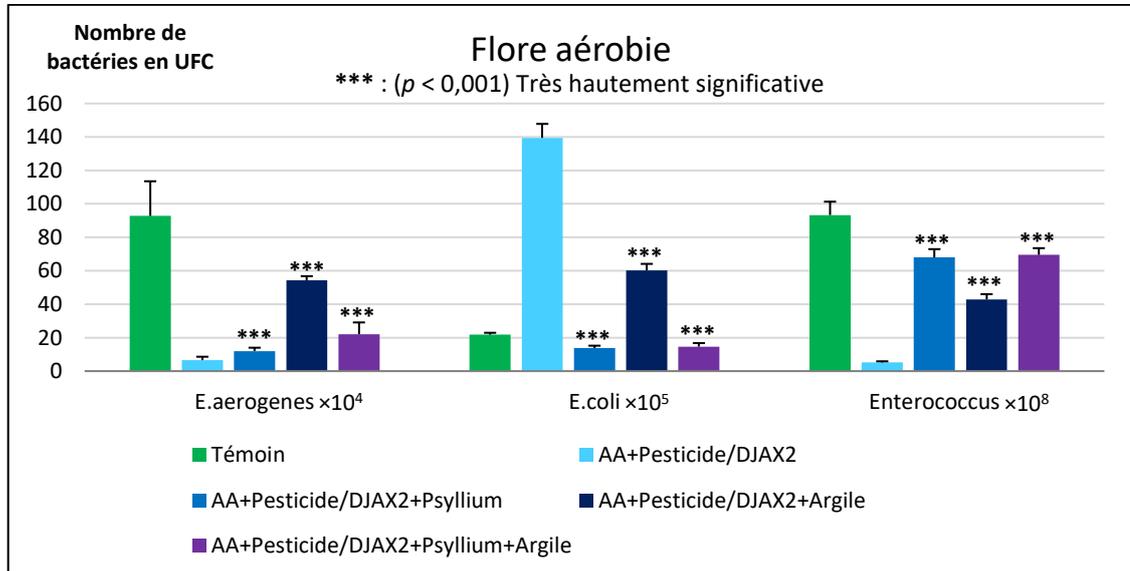


Figure 5.12 : Effet protecteur de Psyllium et l'argile contre la toxicité de mélanges additifs alimentaires et pesticides sur le microbiote aérobie des rats.

L'effet des différents traitements du psyllium et/ou argile verte sur le microbiote aérobie contre la toxicité du mélange de pesticides et additifs alimentaires DJAx2 a été démontré dans la figure 5.12. En comparant les résultats des lots témoin et pesticides/additifs alimentaires DJAx2 avec les lots traités par le psyllium et/ou argile, nous avons constaté une amélioration du microbiote intestinal par l'augmentation très hautement significative pour la population bactérienne aérobie : *d'Enterobacter aerogenes*, et *Enterococcus spp.* Pour les lots psyllium, argile verte, et psyllium + argile verte en dose de DJA et DJAx2, sauf pour *Escherichia coli*, nous avons enregistré une diminution très hautement significative. Par rapport au témoin c'est par contre un rétablissement du nombre qui s'approche au normal.

✓ 4.2.4.2. Psyllium et l'argile contre la toxicité de mélange additifs alimentaires et pesticides sur le microbiote anaérobie

Les résultats des analyses microbiologiques de l'effet protecteur du Psyllium et l'argile contre la toxicité du mélange d'additifs alimentaires et pesticides sur le microbiote intestinal anaérobie des rats sont regroupés dans la figure ci-dessous :

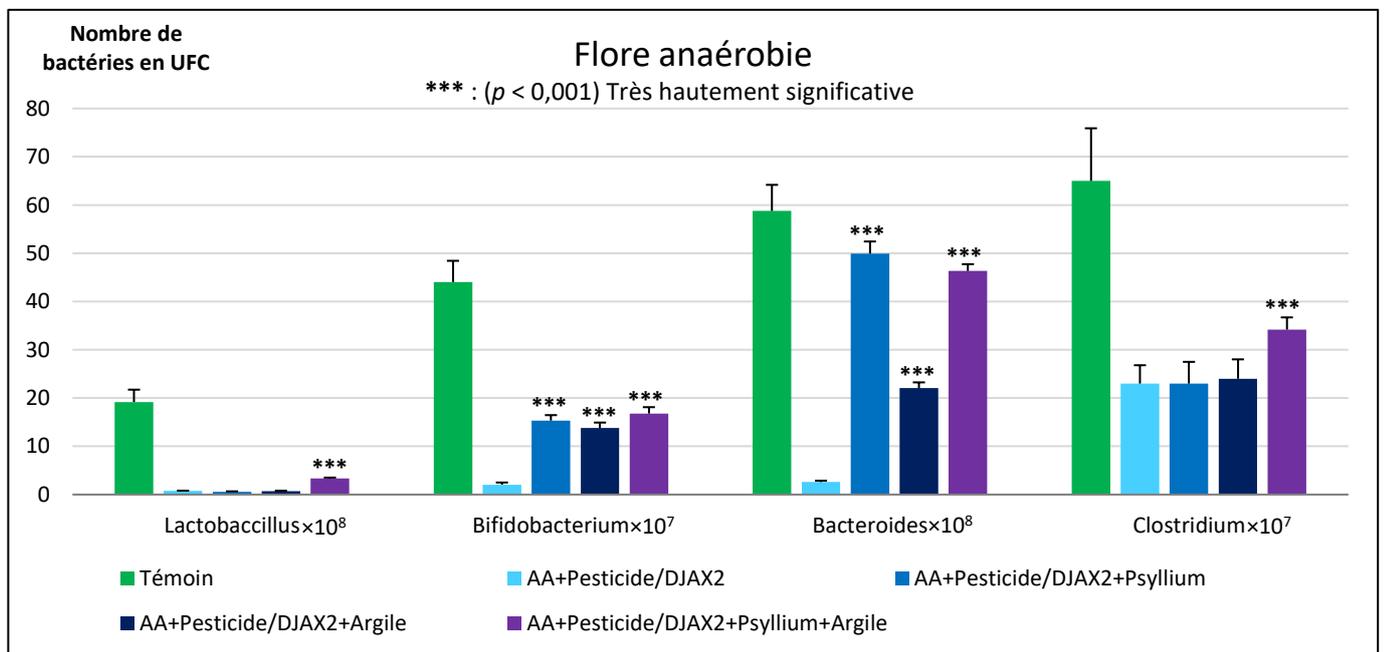


Figure 5.13 : Effet protecteur de Psyllium et l'argile contre la toxicité du mélange additif alimentaire et pesticide sur le microbiote aérobie des rats.

L'effet protecteur des différents traitements du psyllium et/ou argile verte sur le microbiote aéro-anaérobie facultatif et anaérobie stricte contre la toxicité du mélange pesticides et additifs alimentaires DJAx2 a été regroupé sur la figure 5.13. En comparant les résultats des lots témoin et lots pesticides et additifs alimentaires DJAx2 avec les lots traités par le psyllium et/ou argile, nous avons constaté une amélioration du microbiote intestinal par augmentation très hautement significative pour la population bactérienne anaérobie : *Bifidobacterium ssp*, *bacteroides ssp* et *Clostridium ssp* pour les lots psyllium, argile verte, et psyllium + argile verte, mais pour les *Lactobacillus ssp*, nous avons enregistré une augmentation non significative pour les lots psyllium et argile verte, mais pour le lot psyllium + argile verte, l'augmentation est très hautement significative.

Ces résultats peuvent être expliqués par l'effet protecteur du psyllium et l'argile contre les effets toxiques du mélange pesticides et/ou additifs alimentaires observés sur les différentes espèces bactériennes du microbiote intestinal des rats Wistar femelles, cet effet protecteur est probablement dû au pouvoir absorbant et adsorbant de l'argile des polluants organiques, des pesticides, des colorants et les métaux lourds, qui captent ces substances et protège le microbiote intestinal contre leurs effets toxiques [190].

Les minéraux argileux peuvent fixer et permettent d'expulser hors du corps les composés nocifs et diminuer les agents pathogènes et les entérotoxines. L'étude réalisée par Trckova*et al.*, (2009) sur l'effet de l'argile en alimentation chez des porcelets sevrés à l'âge de 28 jours, a montré que les minéraux argileux ont une capacité d'adsorption des entérotoxines par liaisons hydrogène causant ainsi une réduction de leur nombre dans le tractus intestinal. Aussi, l'argile ajoutée à un régime alimentaire pour les porcelets peut atténuer la diarrhée causée par des souches *Escherichia coli* entérotoxigéniques [191].

Naturellement, l'argile absorbe toutes les toxines, et l'on peut être utilisée comme remède contre les intoxications causées par les champignons, les acides chimiques ou autres poisons qu'elle peut neutraliser. C'est-à-dire tous les corps parasitaires ne peuvent pas proliférer [192].

Le psyllium forme avec l'eau un gel dans les intestins, cet effet est potentialisé par une absorption réduite des aliments au niveau intestinal, notamment des sucres, des graisses, des toxines et des polluants chimiques. Le psyllium va également calmer les inflammations intestinales en agissant de manière à protéger et optimiser le développement des bactéries bénéfiques de la flore intestinale [193]. Le complexe argile-psyllium renforce son pouvoir absorbant et adsorbant et la protection du microbiote intestinal selon nos résultats.

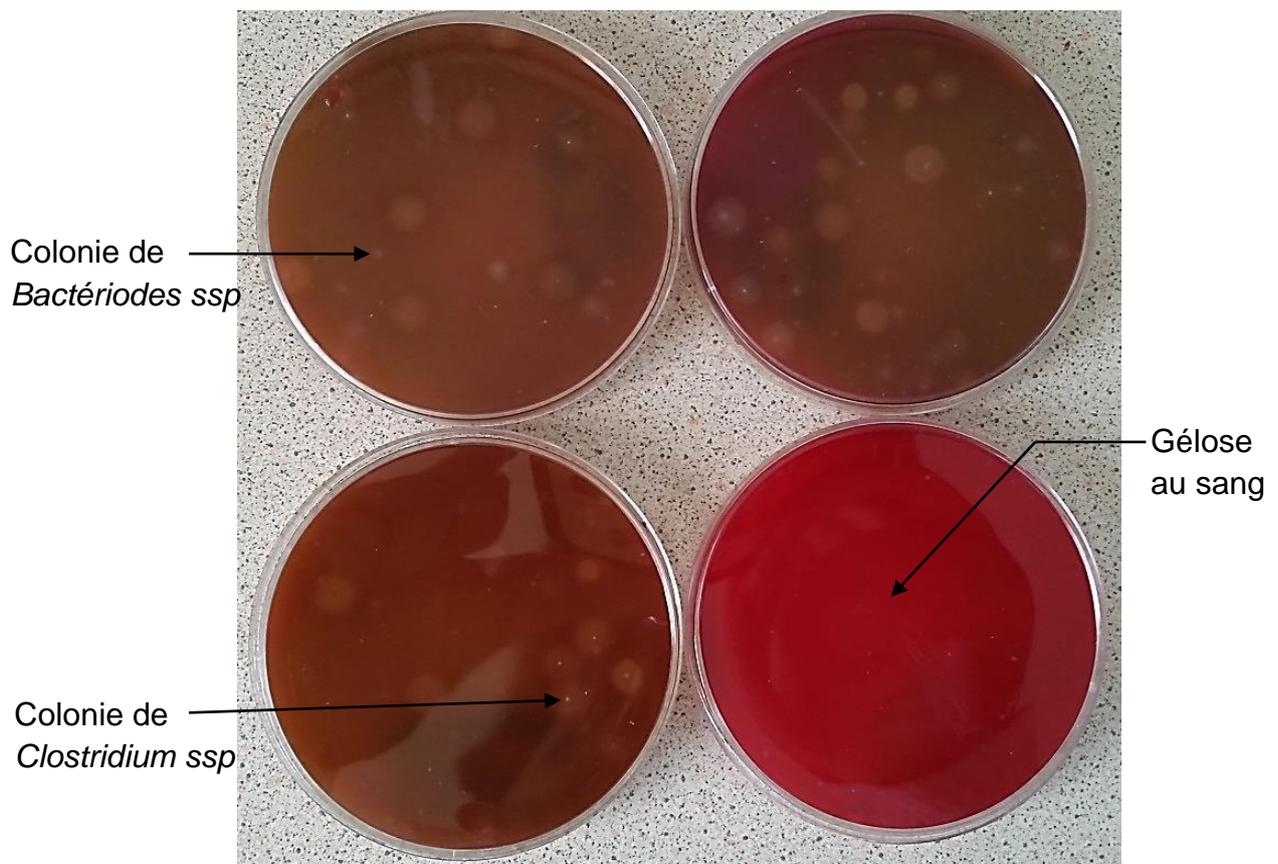


Figure 5.14 : Les colonies de *Clostridium ssp* et *Bactériodes ssp* sur gélose au sang (Photo originale).

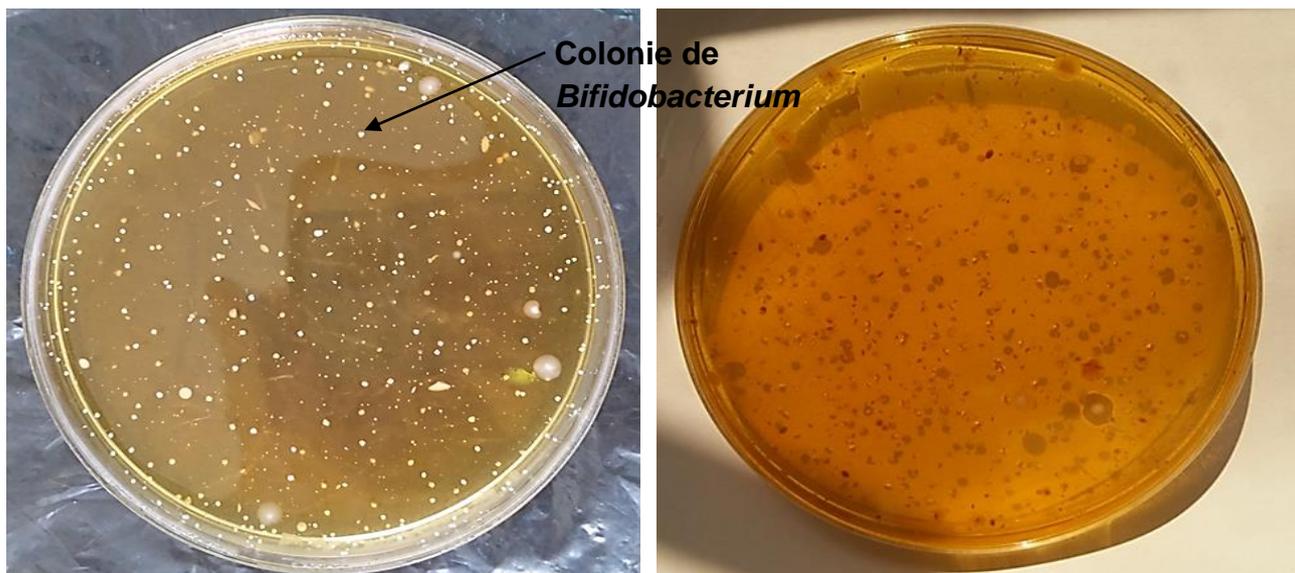


Figure 5.15 : Les colonies de *Bifidobacterium spp* sur gélose MRS cystéiné (Photo originale).

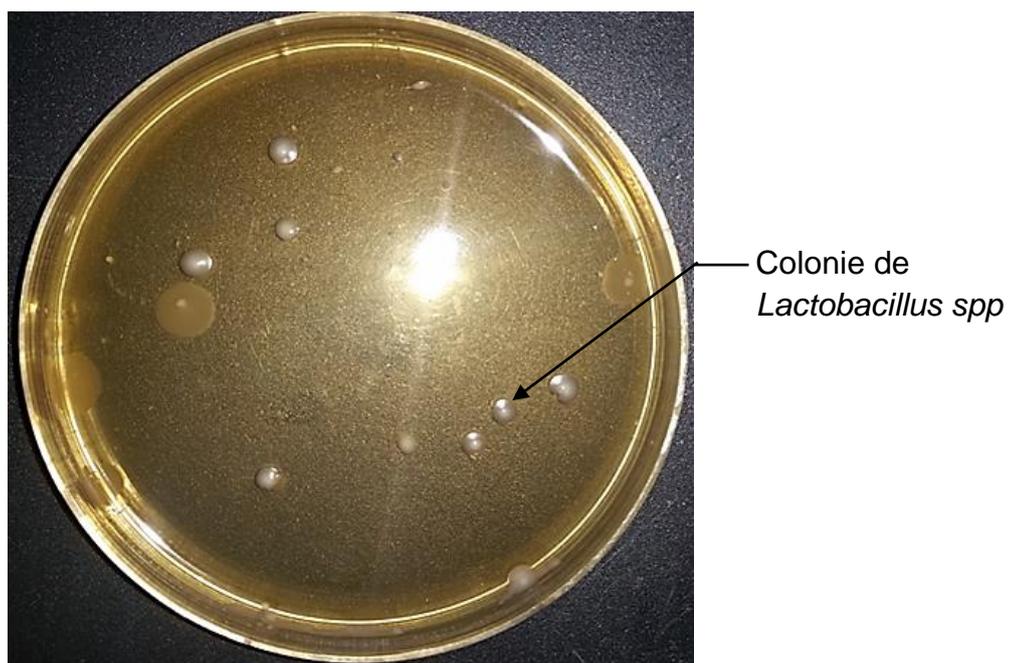


Figure 5.16 : Les colonies de *Lactobacillus spp* sur gélose MRS (Photo originale).

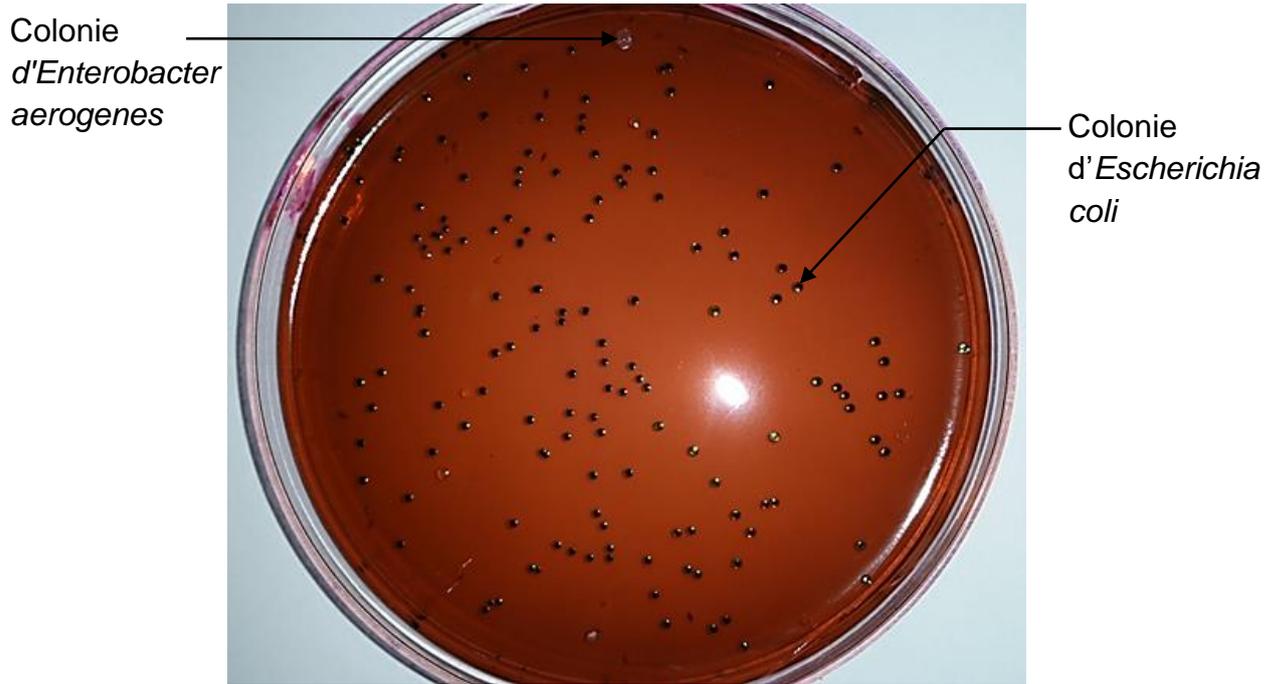


Figure 5.17 : Les colonies d'*Escherichia coli* sur gélose EMB (Photo originale).

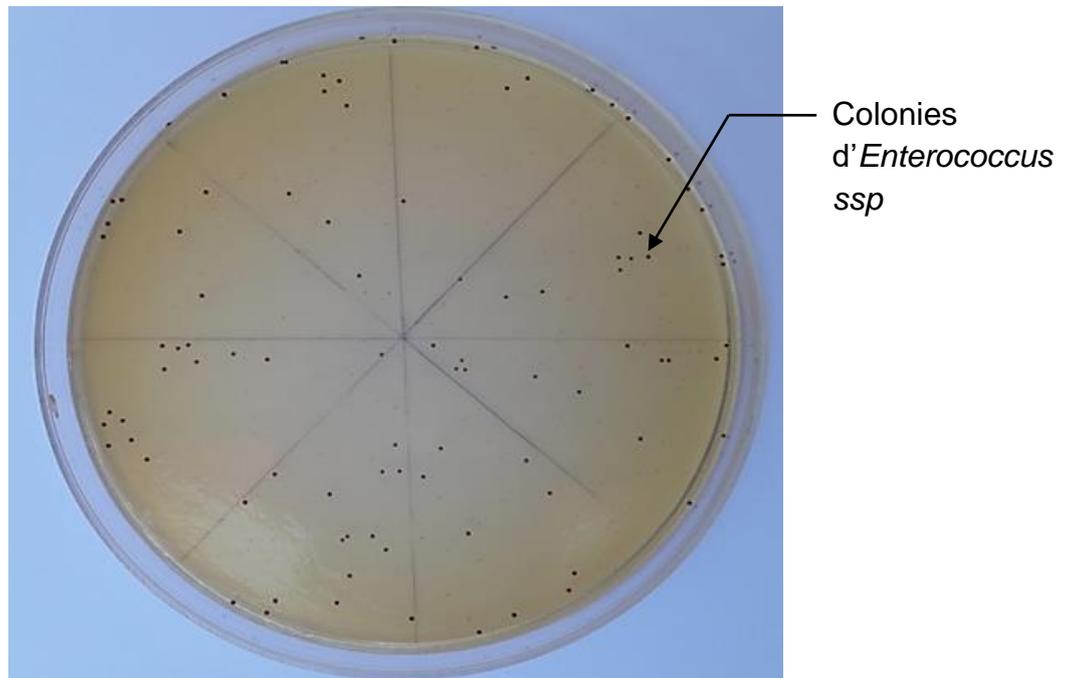


Figure 5.18 : Les colonies d'*Enterococcus ssp* sur gélose Slanetz et Bartley (Photo originale).

4.3. Résultats de l'analyse du temps de transit gastro-intestinale des rats

Les résultats de l'analyse du temps de transit gastro-intestinal des rats et l'effet du Psyllium et l'argile contre la toxicité du mélange additifs alimentaires et pesticides sur le transit digestif des rats sont regroupés sur la figure 5.19 ci-dessous :

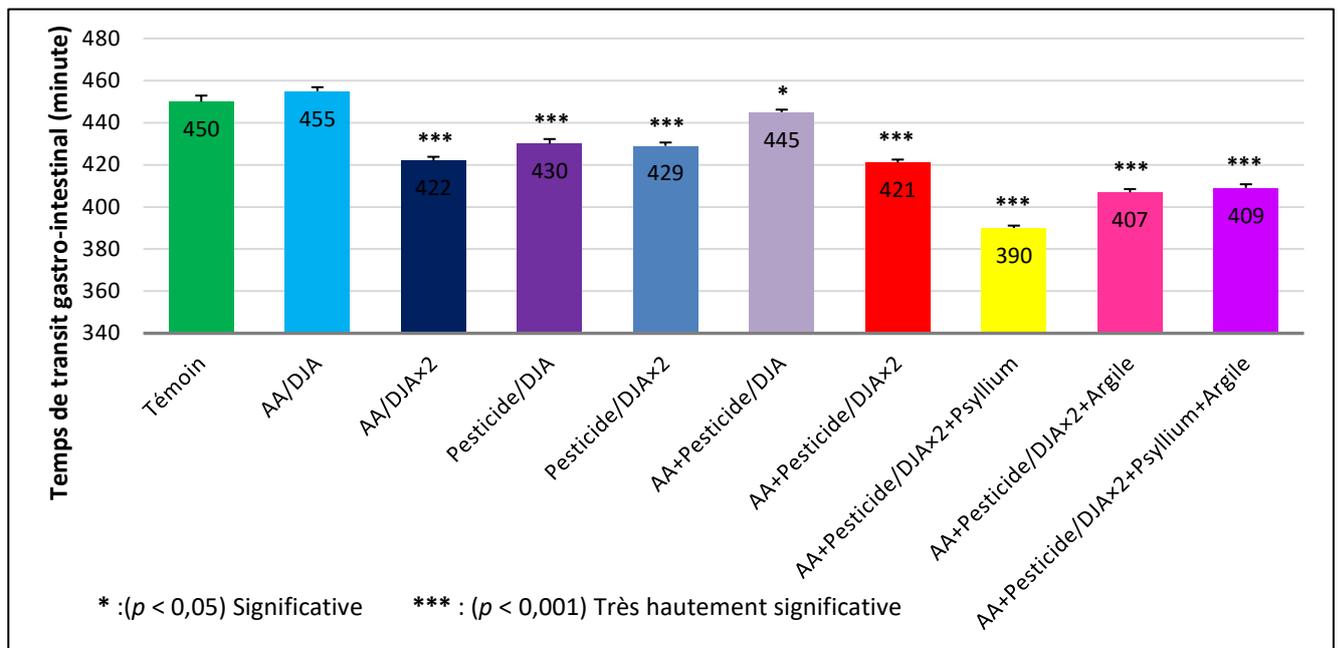


Figure 5.19 : Effet protecteur du Psyllium et l'argile contre la toxicité du mélange additif alimentaire et pesticide sur le temps de transit digestif.

Les résultats présentés sur la Figure 5.19, montrent que les 90 jours d'exposition orale des rats à un mélange de pesticides et additifs alimentaires à DJA et DJAx2 diminuent significativement le temps de transit gastro-intestinal. Ce dernier, pour des rats traités devient plus rapide et les fèces sont plus molles par rapport au groupe témoin sauf le lot additif, la DJA ne montre pas de changement, par contre les lots nourris par l'aliment enrichi en psyllium montrent un transit plus rapide que les autres lots, cela est dû au pouvoir laxatif remarquable du psyllium.

Ces résultats peuvent être expliqués aussi par l'effet toxique du mélange de pesticides et additifs alimentaires sur le tractus gastro-intestinal probablement en raison d'une perturbation du fonctionnement des cellules du tube digestif qui se

manifeste par la réduction de la digestion des aliments au niveau gastro-intestinal et altère l'absorption intestinale de l'eau. Un épithélium intestinal sain assure ses fonctions physiologiques normales [194]. La mauvaise digestibilité des nutriments pourrait être attribuée à la présence de niveaux élevés de fibres insolubles au détergent neutre, de fibres insolubles au détergent acide, et de polysaccharides non amylacés [195, 196].

En effet, la viscosité augmente dans l'intestin grêle et accélère le transit des ingestats. De manière générale, une augmentation de l'activité contractile du muscle lisse gastro-intestinal est responsable de l'accélération de la propulsion intestinale. Une autre explication possible de l'effet accélérateur des pesticides et additifs alimentaires sur le duodénum déclenche un réflexe qui accélère le transit intestinal pour évacuer les agents toxiques [197].

La diminution du nombre de bactéries intestinales présente probablement une relation directe avec la diminution du temps de transit gastro-intestinal. Un mécanisme possible est une faible production de méthane, qui se forme dans l'ensemble des fèces solides, cliniquement, ce gaz a été lié à la constipation qui est le produit de la fermentation bactérienne anaérobie par la réduction du CO_2 en CH_4 en utilisant H_2 [198]. Des données récentes ont montré que certaines espèces bactériennes intestinales produisent des métabolites protecteurs du tractus gastro-intestinal tels que les polyamines, les acides biliaires secondaires, les acides gras à chaînes courtes comme le butyrate [199].

Pour toutes les irritations, ulcérations ou même ulcère (voire cancer) des organes digestifs, l'argile constitue un pansement, non pas neutre comme les « plâtrages » habituels, mais d'une extrême activité, éliminant les cellules détruites et activant leur reconstitution. De plus, les propriétés colloïdales de l'argile agissent comme détersives et enlèvent toutes les substances nocives. La même action adoucissante, absorbante et cicatrisante se manifeste à l'égard des entérites, de la dysenterie, amibienne ou autres. Tout cela, c'est l'action directe et immédiate surtout pour le canal digestif, mais l'activité de l'argile, aussi intéressante, puissante et plus profonde. L'argile ne fait pas que guérir la constipation ou les diarrhées, elle agit sur tous les organes, dans tout l'organisme [192].

L'une des principales propriétés médicales du psyllium blond est de stimuler le transit intestinal. Sa forte teneur en mucilage lui permet d'agir comme un laxatif, ces derniers une fois au contact de l'eau se gonflent et forment un liquide visqueux qui permet de changer la consistance des selles et favoriser leur évacuation. Ce qui fait du psyllium blond un traitement de premier choix pour les sujets victimes de constipation chronique. Paradoxalement, grâce à son fort pouvoir absorbant, cette plante absorbe une grande partie de l'eau intestinale qui rend les selles trop liquides en cas de problèmes digestifs tels que la diarrhée. On recommande donc également cette plante pour venir à bout de l'incontinence fécale et de troubles diarrhéiques [193].

La viscosité élevée de ce gel en fait également une coupe faim naturelle très efficace. Cet effet est potentialisé par une absorption réduite des aliments au niveau intestinal, notamment des sucres, des graisses, des toxines et polluants chimiques. Le psyllium est riche en fibres solubles, calme également les inflammations intestinales [193].

4.4. Résultats des analyses biochimiques et hématologiques du sang des rats

4.4.1. Additifs alimentaires sur les paramètres biochimiques des rats

Les résultats des analyses biochimiques de l'effet des additifs alimentaires sur les paramètres biochimiques des rats sont présentés dans les figures ci-dessous :

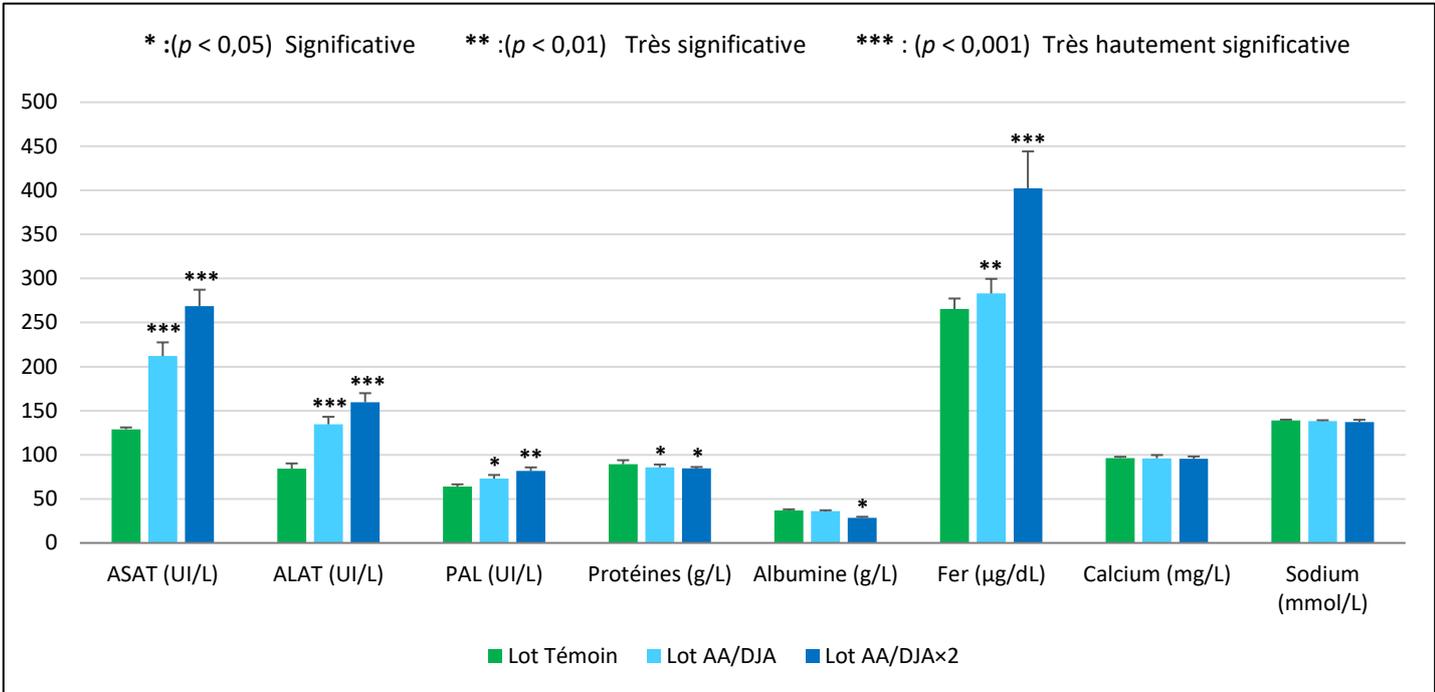


Figure 5.20 : Résultats des analyses biochimiques de l'effet des additifs alimentaires sur les paramètres biochimiques des rats.

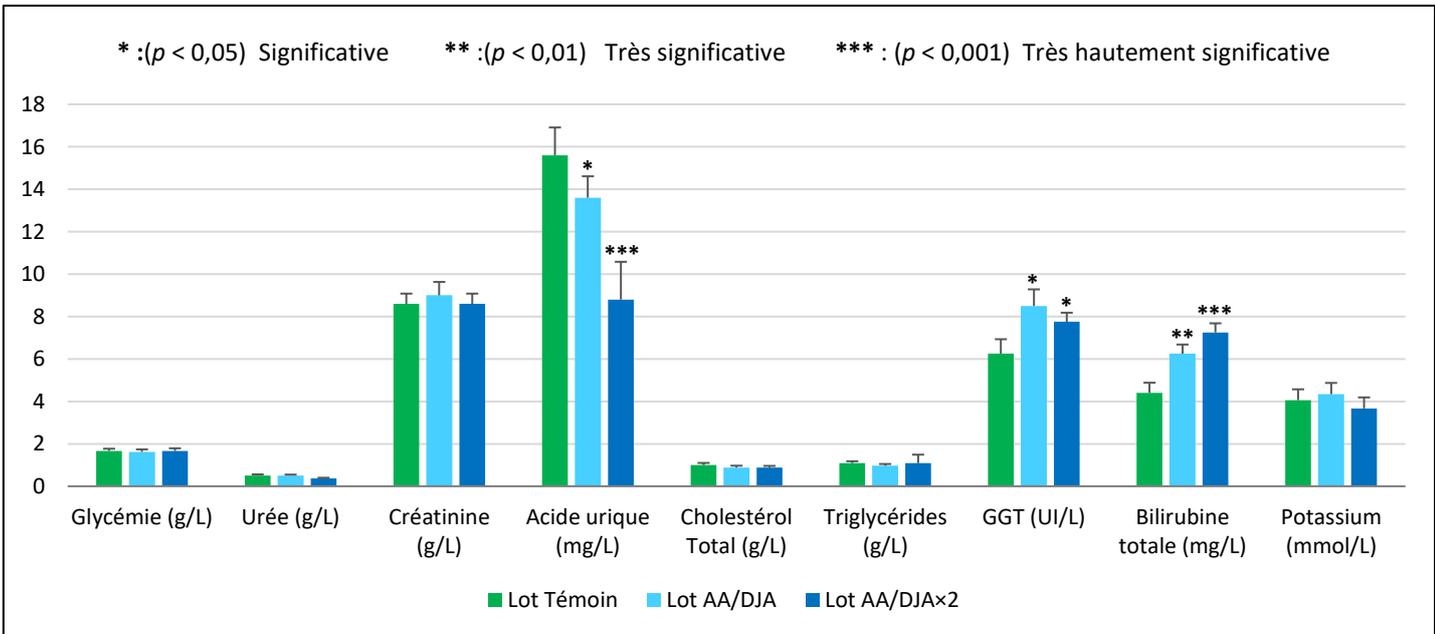


Figure 5.21 : Résultats des analyses biochimiques de l'effet des additifs alimentaires sur les paramètres biochimiques des rats.

Les paramètres biochimiques du plasma des rats femelles ayant reçu des mélanges d'additifs alimentaires sont présentés sur les figures 5.20 et 5.21. L'exposition aux 10 additifs alimentaires (DJA et DJAx2) ont montré qu'elle induisait des changements significatifs dans les niveaux d'activités des biomarqueurs hépatiques avec une augmentation significative du niveau sérique d'ALAT, ASAT, PAL, GGT, Bilirubine totale, et le fer sérique, et concernant les protéines totales et l'albumine, nous avons noté une diminution significative pour la DJA x2 et non significative pour l'albumine en dose DJA.

En ce qui concerne le bilan rénal, nous avons noté seulement une diminution significative de l'acide urique pour les deux doses, par contre aucun changement dans le taux de l'urée, créatinine, sodium, potassium et calcium. Même constatation pour la glycémie, triglycérides et cholestérol total, par rapport aux rats témoins.

Les résultats des analyse biochimiques a montré plusieurs modifications, ce sont probablement des signes des atteintes et dysfonctionnements des fonctions hépatique et rénale provoqué par le mélange des additifs alimentaires.

Le foie est la glande la plus importante dans l'organisme humain et chez la plupart des mammifères. Il exerce un grand nombre de fonctions primordiales, parmi les fonctions biochimiques essentielles à la synthèse du cholestérol, les lipoprotéines plasmatiques, les triglycérides et la bile [200].

Le foie joue un rôle important dans le métabolisme pour maintenir le niveau d'énergie et la stabilité structurelle de l'organisme. Il est également le site de la biotransformation par laquelle les composés toxiques sont transformés en produits moins nocifs afin de réduire la toxicité et l'élimination de bilirubine [201].

Cependant, un endommagement des cellules du foie par une hépatotoxicité, l'alanine aminotransférase (ALAT) et l'aspartate aminotransférase (ASAT) sont augmentés dans le foie et libérés dans la circulation sanguine, cette augmentation peut indiquer une atteinte ou un dysfonctionnement de cet organe. L'augmentation de l'activité des transaminases dans le foie est le signe de lésions hépatiques dues à la formation d'espèces réactives de l'oxygène et d'intermédiaires réactifs après l'exposition aux substances chimiques toxiques [202]. Le site de certaines enzymes intracellulaires suggère des dommages aux hépatocytes. Dans ce cas, les activités sériques de l'ALT et de l'AST ont souvent servi d'indice de l'atteinte et

lésion hépatique. De plus, l'ALP est une enzyme liée à la membrane. Son altération est susceptible d'affecter la perméabilité de la membrane [203].

La bilirubine est excrétée dans la bile et dégradée dans l'intestin grêle et le colon puis évacuée dans les selles. L'augmentation du taux de la bilirubine totale suggère l'établissement d'une hépatotoxicité importante. L'augmentation significative des GGT, Bilirubine totale et même PAL sont des signes de souffrance hépatique provoquée par le mélange des additifs alimentaires de cholestase et rétention biliaire causée par l'inflammation des canaux biliaires dans le foie [204].

L'augmentation significative du taux de fer sérique est due à la cytolysse des hépatocytes et perméabilité membranaire des hépatocytes et la libération du fer dans le sang [205].

Les modifications des valeurs de protéines totales sériques peuvent indiquer un dysfonctionnement hépatique, car le foie est le principal site de synthèse des protéines plasmatiques, principalement l'albumine [206].

Les reins exercent un grand nombre de fonctions essentielles dans l'organisme des mammifères, parmi la filtration du sang et la formation des urines par l'excrétion des produits de dégradation du métabolisme cellulaire tels que la créatinine, l'urée et l'acide urique [207]. En effet, ces derniers ont été utilisés comme biomarqueurs de la fonction rénale.

Les résultats de notre étude avec les additifs alimentaires n'ont pas montré des effets toxiques sur les reins (DJA et DJAx 2) avec des effets non significatifs du taux de la créatinine et l'urée et même le sodium et potassium. La seule diminution significative se situe au niveau de l'acide urique, qui est le produit terminal du catabolisme des bases azotées, formé par le foie et éliminé par les reins. Sa diminution dans le sang est liée au dysfonctionnement et perturbation de la fonction hépatique au métabolisme azoté et protéique et non pas à la fonction rénale [208].

Certaines études récentes sur la toxicité chronique et subchronique de mélanges des additifs alimentaires ont montré des effets toxiques des additifs même en faibles doses tels que les travaux de : Femi-Oloye et *al.*, [209, 210] ; Elghazaly et *al.*, [211] ; Abd-El hakim et *al.*, [212] ; Moeen et *al.*, [213] ; El-Ezaby et *al.*, [214].

4.4.2. Effets des additifs alimentaires sur les paramètres hématologiques des rats

Les résultats des analyses hématologiques de l'effet des pesticides sur la formule hématologique du sang des rats sont représentés dans le tableau 5.9 ci-dessous :

Tableau 5.9 : Analyses hématologiques de l'effet des pesticides sur la formule hématologique du sang des rats.

Paramètres	Lot Témoin	Lot AA/DJA	Lot AA/DJAx2
Erythrocytes ($10^6/\text{ul}$)	$7,34 \pm 0,29$	$6,97 \pm 0,21$	$7,29 \pm 0,24$
Hémoglobine (g/dl)	$14,4 \pm 0,27$	$14,34 \pm 0,8$	$14,14 \pm 0,33$
Hématocrite (%)	$37,2 \pm 1,76$	$38,1 \pm 1,18$	$37,32 \pm 1,09$
Leucocytes ($10^3/\text{ul}$)	$6,6 \pm 0,82$	$7,44 \pm 2,7$	$6,96 \pm 2,37$
Plaquettes ($10^3/\text{ul}$)	$1221,5 \pm 82,85$	$1140 \pm 163,19$	$1275 \pm 146,68$

Les effets des différentes expositions sur les paramètres hématologiques sont présentés dans le tableau 5.9 ci-dessus. Les paramètres hématologiques n'ont montré aucun changement significatif des additifs alimentaires DJA et DJAx2 par rapport au contrôle normal, ces résultats montrent que les additifs alimentaires ne présentent aucun effet toxique chronique observable sur les éléments figurés du sang des rats.

4.4.3. Effets des pesticides sur les paramètres biochimiques des rats

Les résultats des analyses biochimiques de l'effet des pesticides sur les paramètres biochimiques des rats sont représentés dans les figures ci-dessous :

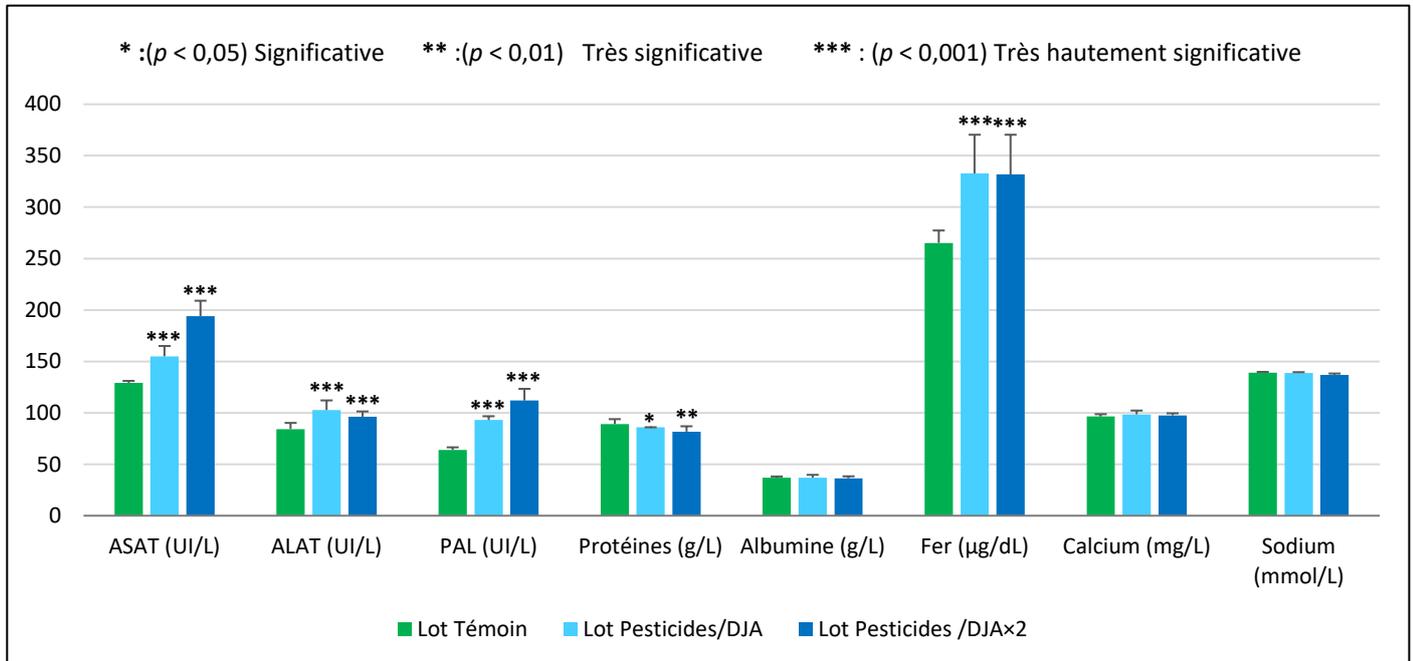


Figure 5.22 : Résultats des analyses biochimiques de l'effet des pesticides sur les paramètres biochimiques des rats.

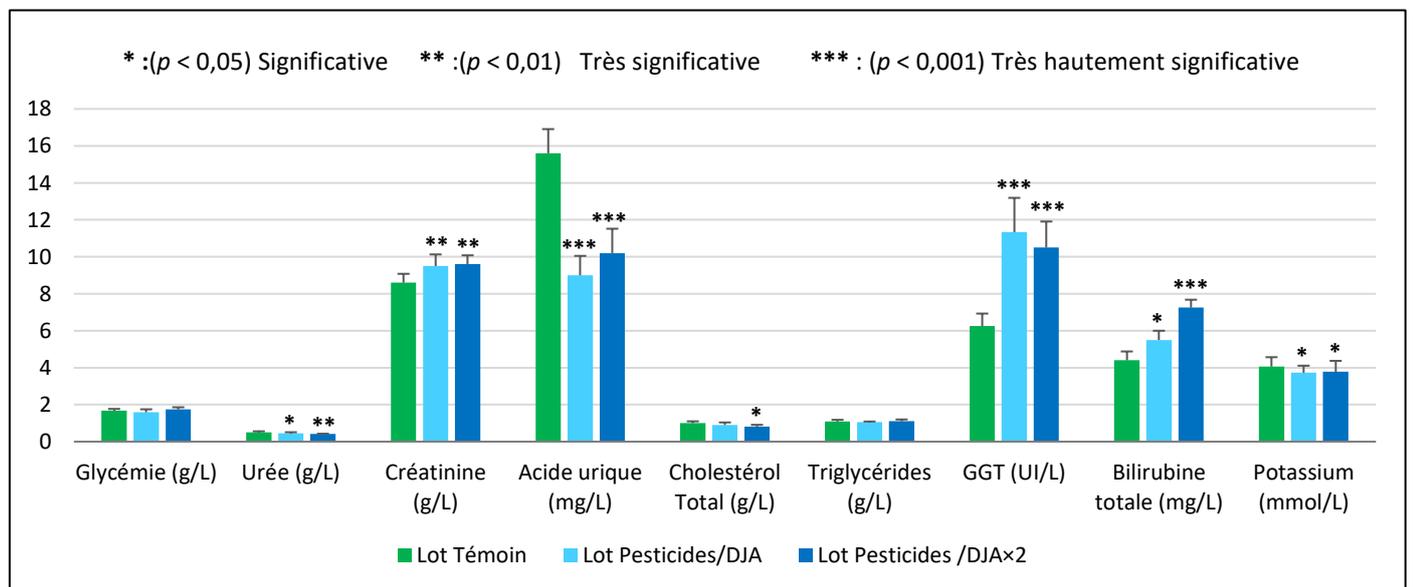


Figure 5.23 : Résultats des analyses biochimiques de l'effet des pesticides sur les paramètres biochimiques des rats.

Les paramètres biochimiques du plasma sanguin des rats femelles traités par le mélange des 6 pesticides sont représentés sur les figures 5.22 et 5.23. L'exposition chronique à ce mélange par dose DJA et DJAx2 a montré des changements significatifs dans les indicateurs biochimiques de la fonction hépatique avec une augmentation très hautement significative du niveau sérique d'ALAT, ASAT, PAL, GGT, Bilirubine totale, et le fer sérique, et concernant les protéines totales, nous avons noté une diminution très significative pour la DJA x2 et significative pour la DJA, par contre les résultats ne montrent aucun changement du taux de l'albumine en DJA et DJAx2.

En ce qui concerne le bilan biochimique rénal, nous avons noté une augmentation très significative pour certains biomarqueurs rénaux : créatinine pour la dose DJA et DJAx2, et une réduction très hautement significative en acide urique, et significative en potassium pour les deux doses, et une réduction significative pour l'urée en DJA et très significative en DJAx2. Par contre aucun changement dans le taux de sodium, calcium et la même chose pour la glycémie et triglycérides, par rapport aux rats témoins.

Pour le cholestérol total, nous avons enregistré une diminution significative dans le lot DJAx2, mais pas de changement dans le lot DJA.

Les résultats des analyses biochimiques montrent plusieurs modifications, ces résultats sont probablement des signes d'atteintes et dysfonctionnements des fonctions hépatiques et rénaux provoqués par le mélange de pesticides.

4.4.4. Effets des pesticides sur les paramètres hématologiques des rats

Les résultats des analyses hématologiques de l'effet des pesticides sur la formule hématologique du sang des rats sont représentés dans le tableau 5.10 ci-dessous :

Tableau 5.10 : Résultats des analyses hématologiques de l'effet des pesticides sur la formule hématologique du sang des rats.

Paramètres	Lot Témoin	Lot Pesticides/DJA	Lot Pesticides /DJAx2
Erythrocytes (10 ⁶ /ul)	7,34 ± 0,29	7,29 ± 0,25	7,17 ± 0,15
Hémoglobine (g/dl)	14,4 ± 0,27	14,32 ± 0,14	11.32 ± 0,31*
Hématocrite (%)	37,2 ± 1,76	38,15 ± 1,2	32,8 ± 1,17**
Leucocytes (10 ³ /ul)	6,6 ± 0,82	6,7 ± 0,91	6,7 ± 1,28
Plaquettes (10 ³ /ul)	1221,5 ± 82,85	1224,5 ± 51,98	1258,5 ± 56,57

** : (p < 0,01) Très significative.

Les effets des différents traitements des rats par le mélange de pesticides sur les paramètres hématologiques sont présentés sur le tableau 5.10. Les paramètres hématologiques ont montré une seule diminution significative de l'hématocrite et hémoglobine au DJAx2, tandis que les autres paramètres hématologiques n'ont montré aucun changement significatif par rapport au contrôle normal.

Les effets des pesticides sur l'activité cellulaire peuvent se manifester de plusieurs façons : induire directement des dommages à l'ADN avec un impact nucléaire direct, la perturbation de l'activité mitochondriale, la respiration oxydative et des protéines clés impliquées dans la régulation du métabolisme général. La différenciation cellulaire, la croissance, la survie, le déséquilibre du métabolisme cellulaire, le stress oxydatif, la diminution de la capacité de défense antioxydante, la perturbation du métabolisme xénobiotique, la mort cellulaire par nécrose et apoptose, la réponse inflammatoire et modifier l'activité des transporteurs ABC d'efflux ou des enzymes, les altérations de la membrane des protéines cellulaires [215, 216], [184-186].

L'ALAT, l'ASAT et l'ALP sont trois des indices conventionnels des tests de fonctions hépatiques, l'augmentation significative de ces trois paramètres considérés comme un témoin de l'hépatotoxicité et le dysfonctionnement

hépatique avec une lésion et cytolysse des hépatocytes. Chez les rats et les humains exposés aux pesticides, cette augmentation des enzymes hépatiques dans le plasma ou le sérum peut être due à des lésions tissulaires, en particulier dans le foie. Un degré élevé d'anomalies de la fonction hépatique chez les travailleurs peut indiquer des effets toxiques des pesticides et la présence de résidus de pesticides dans le sang [217].

Le foie est l'organe principal du métabolisme des protéines et principalement l'albumine, les diminutions significatives du niveau des protéines totales et l'albumine chez les rats traités avec les mélanges de pesticides pourraient être causées par des dommages de cet organe ; un dysfonctionnement, inflammation, lésion et une perturbation du métabolisme des protéines [218].

L'augmentation significative des GGT, Bilirubine totale et même PAL sont des signes de souffrance hépatique provoqués par le mélange de pesticides et témoin de cholestase et rétention biliaire causée par l'inflammation des canaux biliaires dans le foie [204].

Les diminutions significatives du taux de cholestérol total à la dose DJAx2 peuvent s'expliquer par le fait que les mélanges de pesticides présentent une interaction toxique avec les lipides des rats Wistar par lipoperoxydation [219]. Son mécanisme d'action est basé sur l'induction du système monooxygénase dépendant du cytochrome P450 qui est également responsable du métabolisme des acides gras, des vitamines et des stéroïdes [220]. L'augmentation significative du taux de fer sérique est due la cytolysse des hépatocytes, la libération du fer dans le sang et la diminution du taux de l'hématocrite et hémoglobine à la DJAx2 pour les groupes traités observés dans cette étude pourraient être dues à l'impact inhibiteur des pesticides sur de nombreux moyens de biosynthèse de l'hème et de la glycolyse chez le rat et sur la perméabilité de la membrane qui a été associée à des dommages cellulaires [221, 223].

En effet, la créatinine, urée et l'acide urique ont été utilisés comme biomarqueurs de la fonction rénale. Les résultats de notre étude avec les pesticides ont montré des effets toxiques sur les reins pour la DJA et DJAx 2 avec des effets significatifs du taux de la créatinine, l'urée et l'acide urique, même le potassium.

Les niveaux élevés de la créatinine sont des indicateurs de dysfonctionnement rénal et une installation d'insuffisance rénale transitoire, il s'agit d'un signe de la

néphrotoxicité. Cela peut être dû au stress oxydatif causé par le traitement aux mélanges de pesticides probablement provoqués par les modifications pathologiques du tissu rénal telles que la nécrose et la dégénérescence de l'épithélium tapissant les tubules rénaux [206].

L'acide urique est le produit terminal du catabolisme des bases azotées puriques, formé par le foie éliminé par les reins. Son augmentation dans le sang est généralement liée à une altération rénale [208].

La réduction significative au niveau de l'acide urique ; produit terminal du catabolisme des bases azotées. Son diminution dans le sang est liée au dysfonctionnement et la perturbation de la fonction hépatique au métabolisme azoté et protéique et non pas à la fonction rénale [208].

L'urée est la principale forme de la dégradation de l'ammoniaque issue des composés azotés non protéiques. Sa production se déroule essentiellement dans le foie et en faible quantité par les reins à partir de la citruline et la l'hydrolyse de l'arginine. Son augmentation sanguine est généralement liée à une altération rénale. Pour notre étude, la diminution de l'urée et l'acide urique dans le sang est liée probablement au dysfonctionnement et la perturbation de la fonction hépatique au métabolisme azoté et non pas à la fonction rénale [222, 223].

Nos résultats sont en accord avec plusieurs travaux scientifiques sur une variété de mélanges de pesticides réalisés par plusieurs chercheurs tels que : Takakura et al., 2013 [225] et Docea et al., 2018 [231].

4.4.5. Effets de mélanges additifs alimentaires et pesticides sur les paramètres biochimiques des rats

Les résultats des analyses biochimiques de l'effet de mélange d'additifs alimentaires et pesticides sur les paramètres biochimiques des rats sont représentés dans les figures 5.24 et 5.25 ci-dessous :

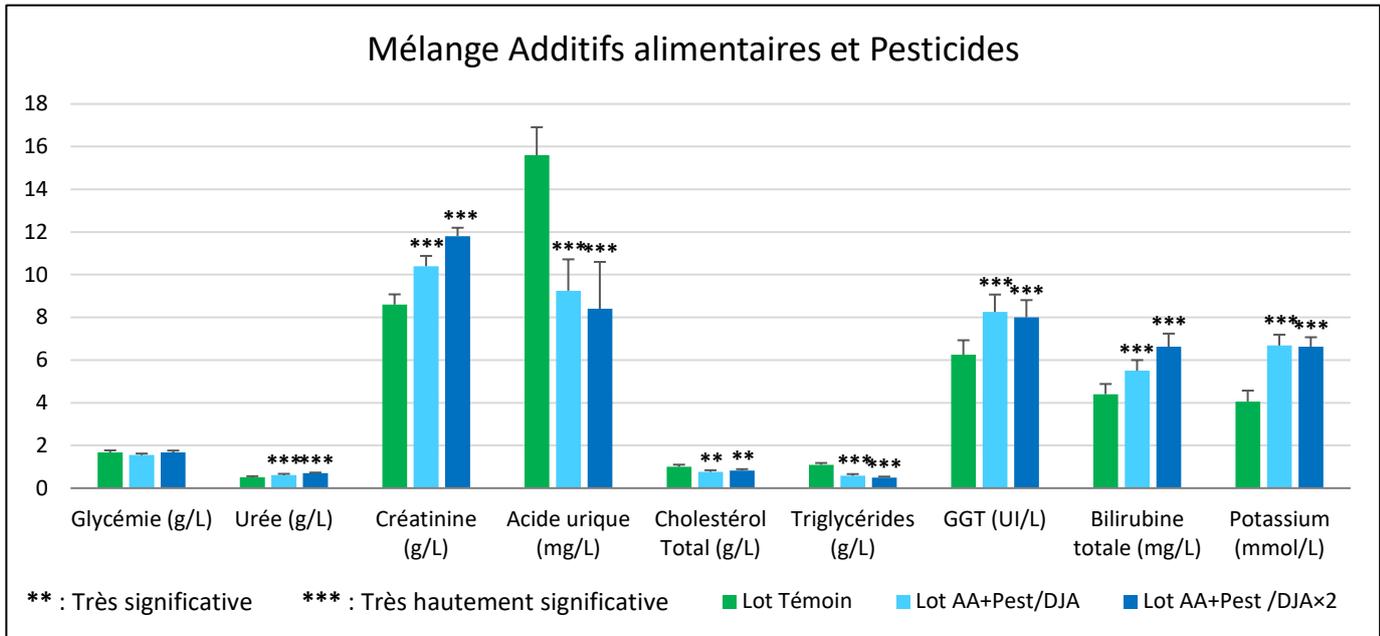


Figure 5.24 : Résultats des analyses biochimiques de l'effet de mélange additifs alimentaires et pesticides sur les paramètres biochimiques des rats.

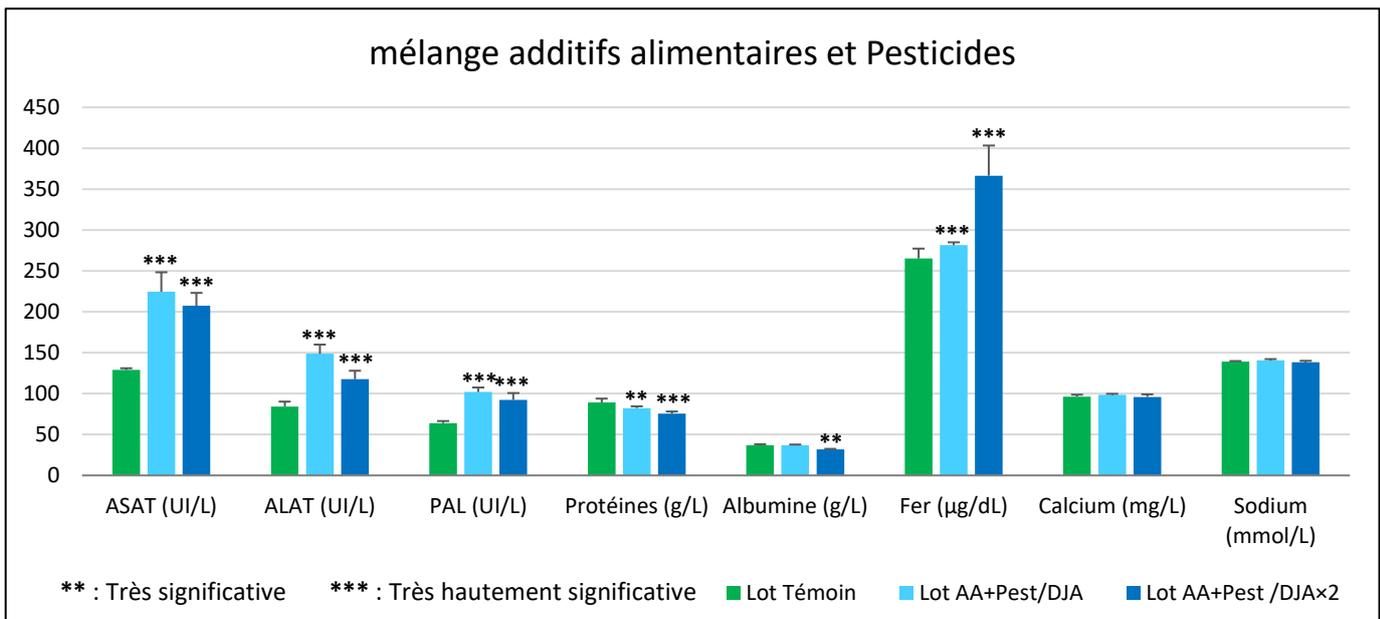


Figure 5.25 : Résultats des analyses biochimiques de l'effet de mélange additifs alimentaires et pesticides sur les paramètres biochimiques des rats.

Les résultats enregistrés après les analyses biochimiques du sang des rats femelles traitées par le mélange pesticides + d'additifs alimentaires sont représentés sous forme d'isothermes dans les figures 5.24 et 5.25. L'exposition chronique aux 6 pesticides + 10 additifs alimentaires (DJA et DJAx2) pendant 7 mois a montré des changements significatifs au niveau des biomarqueurs de la fonction hépatique avec une augmentation très hautement significative du niveau sérique d'ALAT, ASAT, PAL, GGT, Bilirubine totale et le fer sérique, et en parallèle les résultats des protéines totales montrent une diminution très significative en DJAx2 et significative en DJA, concernant l'albumine, nous avons marqué un changement très significatif pour DJAx2 et non significatif pour DJA.

En ce qui concerne le bilan biochimique rénal, nous avons noté une augmentation très hautement significative pour les biomarqueurs rénaux : urée, créatinine, et potassium pour les doses DJA et DJAx2, et une réduction très hautement significative en acide urique pour les deux doses, par contre aucun changement n'a été enregistré dans le taux de sodium, calcium et de la glycémie.

Concernant le bilan lipidique, notre mélange a provoqué un changement très hautement significatif pour les triglycérides et le cholestérol total en DJA et DJAx2, par rapport aux rats témoins.

Les résultats des analyses biochimiques ont montré plusieurs modifications qui sont probablement des signes d'atteintes et dysfonctionnements des fonctions hépatique et rénale provoqués par le mélange des pesticides.

L'explication et la discussion des résultats et changement sont les mêmes avec les parties précédentes. Cet effet toxique est le résultat de l'association des effets de mélange des 10 additifs alimentaires et le mélange des 6 pesticides, où nous avons enregistré un aggravement des effets toxiques suite aux interactions des substances chimiques soit par effet additif ou synergie même pour la dose DJA qui représente une dose de sécurité, des effets toxiques graves ont été signalés.

Peu d'études et recherches existent sur l'effet du mélange d'un grand nombre de substances comme des additifs alimentaires et les pesticides à la fois et à des faibles doses, la plus proche à notre étude a été réalisée par Tsatsakis et *al.*, en 2019 [56] et par Docea et *al.*, en 2018 [231].

4.4.6. Effets des mélanges additifs alimentaires et pesticides sur les paramètres hématologiques des rats

Les résultats des analyses hématologiques de l'effet du mélange additifs alimentaires et pesticides sur la formule hématologique du sang des rats sont représentés sur le tableau 5.11 ci-dessous :

Tableau 5.11 : Résultats des analyses hématologiques de l'effet du mélange additifs alimentaires et pesticides sur la formule hématologique du sang des rats.

Paramètres	Lot Témoin	Lot AA+Pest/DJA	Lot AA+Pest/DJAx2
Erythrocytes(10^6 /ul)	7,34 \pm 0,29	7,32 \pm 0,32	7,26 \pm 0,19
Hémoglobine(g/dl)	14,4 \pm 0,27	11,27 \pm 0,66**	10,58 \pm 0,59**
Hématocrite (%)	37,2 \pm 1,76	34,42 \pm 1,94**	36,42 \pm 1,53*
Leucocytes(10^3 /ul)	6,6 \pm 0,82	7,2 \pm 2,02*	7,88 \pm 1,73**
Plaquettes(10^3 /ul)	1221,5 \pm 82,85	969,25 \pm 70,31***	603,4 \pm 60,59***

* : Significative** : Très significative *** : Très hautement significative.

Les résultats de l'effet des doses DJA et DJAx2 des mélanges pesticides et additifs alimentaires sur les paramètres hématologiques sont présentés dans le tableau 5.11. L'analyse de ces paramètres a montré que pour :

- L'hémoglobine, une réduction très significative en DJA et DJAx2.
- L'hématocrite, une réduction très significative en DJA et significative en DJAx2.
- Les leucocytes, une augmentation significative ($p < 0,05$) en DJA et très significative ($p < 0,01$) en DJAx2.
- Les plaquettes sanguines, une réduction très hautement significative ($p < 0,001$) en DJA et DJAx2.

Tandis que les autres paramètres hématologiques n'ont montré aucun changement significatif par rapport au contrôle normal.

Les globules blancs sont responsables pour lutter contre les infections et certaines maladies. Un faible nombre de leucocytes peut indiquer que l'organisme est immunodéprimé. En même temps aussi un nombre élevé de globules blancs peut être une indication de nombreuses maladies soulignées ou l'introduction d'un corps étranger [232].

L'augmentation du nombre de leucocytes dans les lots DJA et DJAx2 du mélange par rapport au groupe de contrôle a indiqué que le mélange AA + pesticides était reconnue comme une entité étrangère et a poussé l'organisme à augmenter le potentiel de synthèse des leucocytes. L'augmentation du nombre de globules blancs chez les rats traités par le mélange peut être due à la réponse inflammatoire induite comme mécanisme de défense [233].

L'hématocrite est le volume occupé par les globules rouges qui circulent dans le sang. La diminution de taux de l'hématocrite et hémoglobine chez les rats est un indice d'une anémie microcytaire. Des résultats similaires ont été rapportés par Al-Hamdany et *al.*, 2010, qui ont suggéré qu'une augmentation significative du nombre de leucocytes et une diminution de l'hématocrite et hémoglobine chez les rats exposés à des xénobiotiques en raison d'une inflammation qui a probablement provoquée une anémie [234].

La numération plaquettaire a montré statistiquement une diminution significative par rapport au témoin. Généralement, la réduction de la numération plaquettaire chez le rat pourrait être associée à une thrombocytopénie ou les plaquettes peuvent être piégées dans la rate lorsque celle-ci augmente de taille, comme dans la cirrhose du foie et atteinte hépatique, ou pourraient être due à la rupture du brin d'ADN dans ces cellules induite par le stress oxydatif associé au mélange toxique. De plus, il semble avoir lieu d'une part une suppression de la moelle osseuse avec une sélective dépression mégacaryocytaire ou d'autre part, le mélange des additifs alimentaires et pesticides présentant un effet néfaste direct sur les plaquettes [235].

4.4.7. Effets du Psyllium et l'argile contre la toxicité de mélange additifs alimentaires et pesticides sur les paramètres biochimiques des rats

Les résultats des analyses biochimiques de l'effet de Psyllium et l'argile contre la toxicité du mélange AA et pesticides sont représentés sur les figures ci-dessous :

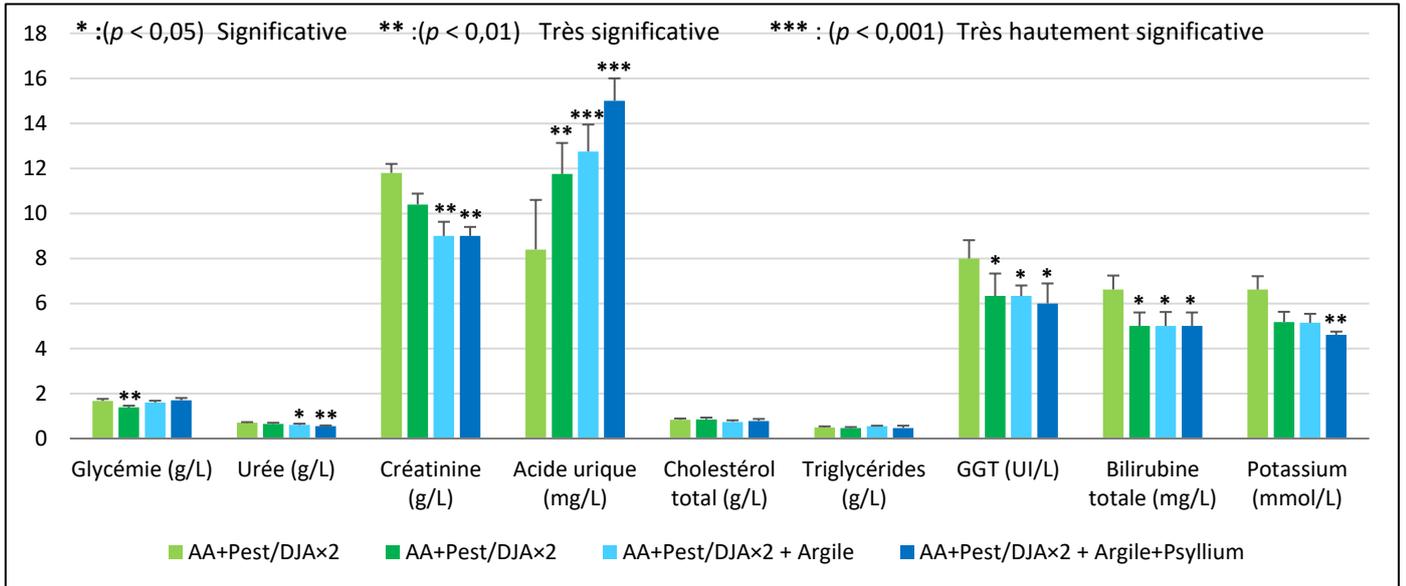


Figure 5.26 : Résultats des analyses biochimiques de l'effet de Psyllium et l'argile contre la toxicité de mélange additifs alimentaires et pesticides sur les paramètres biochimiques des rats.

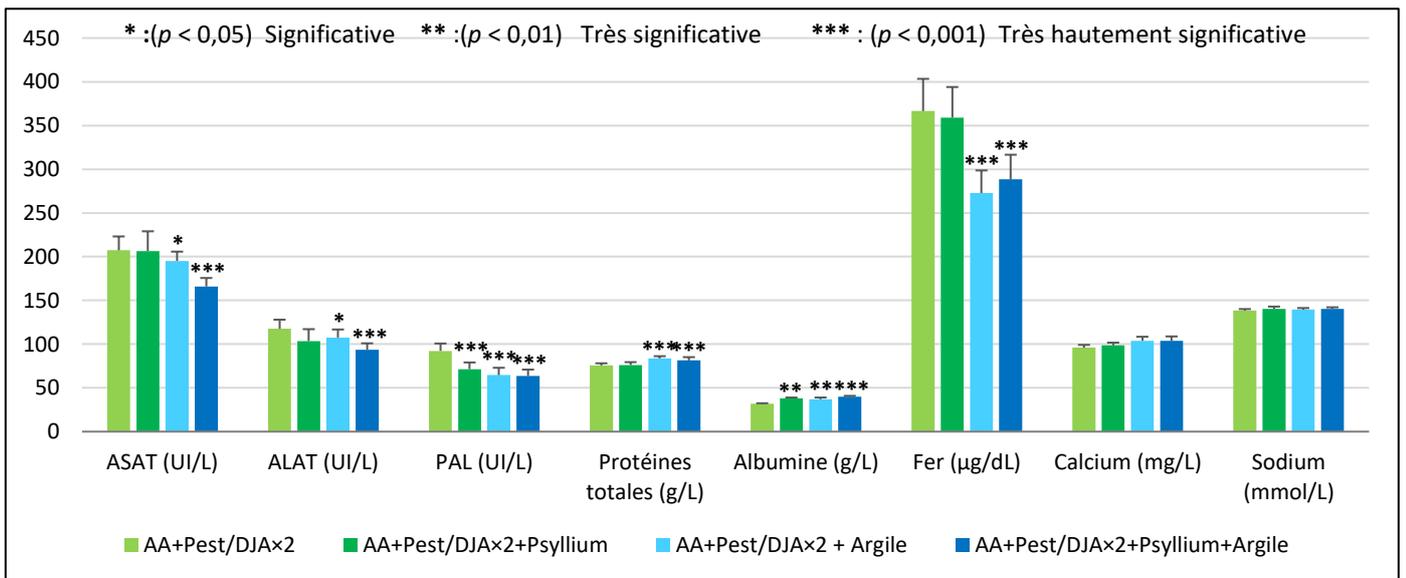


Figure 5.27 : Résultats des analyses biochimiques de l'effet de Psyllium et l'argile contre la toxicité de mélange additifs alimentaires et pesticides sur les paramètres biochimiques des rats.

Les résultats de l'effet protecteur du psyllium et/ou argile verte sur les paramètres biochimiques de la fonction hépatique et rénale des rats femelles traités pendant 7 mois par les mélanges des pesticides + additifs alimentaires DJAx2 sont présentés dans les figures 5.26 et 5.27. Les rats nourris par l'aliment enrichi au psyllium et/ou argile verte en 2% ont montré que :

1) Lot psyllium :

- Une protection moyenne de la fonction hépatique avec une diminution significatifs de GGT, et bilirubine totale, et un rétablissement de la PAL avec une diminution très hautement significative, par contre aucune protection et changement au niveau de d'ALAT, ASAT, protéines totales, et le fer sérique.
- Pour le bilan rénal, nous avons noté une protection moyenne de la fonction rénale par un rétablissement et diminution très significative de l'acide urique.
- Le seul changement très significatif en glycémie est enregistré dans le psyllium probablement à cause de son effet hypoglycémiant.
- Par contre aucun changement n'a été noté dans le taux de créatinine, sodium, calcium et la même chose pour les triglycérides et cholestérol total, par rapport au lot DJAx2.

2) Lot Argile verte :

- Une très bonne protection de la fonction hépatique par un rétablissement avec diminution significative de d'ALAT, ASAT, GGT et Bilirubine totale, une réduction très hautement significative pour PAL et le fer sérique et une augmentation très significative en albumine et très hautement significative pour les protéines totales.
- Concernant la fonction rénale, nous avons noté une meilleure protection avec un rétablissement par augmentation très hautement significative de l'acide urique, et une diminution très significative de la créatinine et significative pour l'urée.
- Par contre aucun changement noté dans le taux de potassium, sodium, calcium et la même chose pour les triglycérides, cholestérol total, et la glycémie, par rapport au lot DJAx2.

3) Lot Psyllium + Argile verte :

Une très bonne protection de la fonction hépatique et rénale. Les résultats sont presque les mêmes avec le lot argile verte.

4.4.8. Effets de Psyllium et l'argile contre la toxicité de mélange additifs alimentaires et pesticides sur les paramètres hématologiques des rats

Les résultats des analyses hématologiques de l'effet du Psyllium et argile contre la toxicité du mélange additifs alimentaires et pesticides sur la formule hématologique du sang des rats sont représentés dans le tableau 5.12 ci-dessous :

Tableau 5.12 : Résultats des analyses hématologiques de l'effet de Psyllium et l'argile contre la toxicité du mélange d'additifs alimentaires et pesticides sur la formule hématologique du sang des rats.

Paramètres	AA+Pest/DJAx2	AA+Pest/DJAx2 + Psyllium	AA+Pest/DJAx2 + Argile	AA+Pest/DJAx2 + Argile+Psyllium
Erythrocytes (10 ⁶ /ul)	7,26 ± 0,19	7,02 ± 0,36	6,71 ± 0,82	6,68 ± 0,31
Hémoglobine (g/dl)	10,58 ± 0,59	11,8 ± 0,72	13,2 ± 1,4*	13,8 ± 0,18*
Hématocrite (%)	36,42 ± 1,53	36,4 ± 1,4	37,87 ± 1,93*	37,16 ± 1,25*
Leucocytes (10 ³ /ul)	7,88 ± 1,73	7,69 ± 1,78	6,62 ± 0,42*	6,58 ± 1,3**
Plaquettes (10 ³ /ul)	603,4 ± 60,59	515,8 ± 54,67*	646,4 ± 60,42*	813,8 ± 69,95***

* : Significative. ** : Très significative *** : Très hautement significative.

Les résultats de l'effet protecteur du psyllium et/ou l'argile verte contre la toxicité du mélange : pesticides et additifs alimentaires DJAx2 sur les paramètres hématologiques sont présentés dans le tableau 5.12.

Les analyses hématologiques ont montré que :

- 1) Lot Psyllium : il y a une amélioration seulement en nombre de plaquettes avec une diminution significative ($p < 0,05$), le psyllium montre une faible protection.
- 2) Lot Argile verte : Une amélioration avec une augmentation significative ($p < 0,05$) pour l'hémoglobine, l'hématocrite, les leucocytes, et les plaquettes sanguines.
- 3) Lot Psyllium + Argile verte : un rétablissement des paramètres hématologiques avec une réduction très significative ($p < 0,01$) pour les leucocytes, très hautement significative ($p < 0,001$) pour les plaquettes sanguines, et une augmentation significative ($p < 0,05$) pour l'hémoglobine et l'hématocrite.

Ces résultats peuvent être expliqués par l'effet protecteur du psyllium et/ou l'argile contre les effets toxiques du mélange : pesticides et/ou additifs alimentaires observé sur les différents paramètres biochimiques et hématologiques des rats Wistar femelles, qui se manifeste par une protection de la fonction hépatique et rénale, cet effet protecteur est probablement dû au pouvoir absorbant et adsorbant et la capacité d'échange cationique des polluants organiques, les pesticides et les colorants qui captent ces substances et réduisent leur disponibilité et absorption au niveau de tractus gastro-intestinal, ce qui protège les systèmes et les organes internes[190, 236, 237].

L'argile non seulement guéri la constipation et les diarrhées mais aussi, agit sur tous les organes, dans l'organisme. Continuant son travail d'épuration, elle le poursuit dans le sang qu'elle nettoie et enrichit et même peut guérir une anémie tenace. Cela s'explique par son pouvoir absorbant, mais pour l'anémie et selon des analyses faites au Centre National de la Recherche Scientifique français (C.N.R.S.), l'argile contient les oxydes, bioxydes, trioxydes, etc., suivant : silice, titane, alumine, fer, calcium, magnésium, sodium et potassium. Cette composition ne suffit pas à expliquer son action reconstituante des globules rouges et l'hémoglobine et hématocrite du sang qu'il est facile de justifier par le test de la numération globulaire. L'argile semble combler ces carences sans que l'analyse ne révèle une exceptionnelle richesse de ces substances carencées dans l'argile [192].

L'argile fait bien d'autres choses que de déposer passivement une substance qu'elle renferme et dont le corps en manque. C'est peut-être ainsi qu'agissent les remplaçants de synthèse, mais l'argile doit faire autre chose que de supplémer une déficience. Une explication semble pouvoir être donnée au rôle joué par l'argile dans le métabolisme. En effet, selon une publication de la NASA, l'argile aurait joué un rôle important, à l'apparition de la vie sur terre, en contribuant à la concentration des acides aminés, éléments constitutifs des protéines. Renfermant des métaux, les argiles attirent les nucléoprotéines dont l'assemblage forme les chaînes d'acide désoxyribonucléiques (ADN). Aussi est-il probable que l'argile peut intervenir dans le processus de la transformation et de l'assimilation des

éléments nutritifs, donc dans les phénomènes d'entretien de la vie et de défense contre les agressions et le vieillissement [192].

Si un organe fonctionne mal ou si une fonction ne s'accomplit qu'en partie, ce n'est pas porter remède que d'introduire dans l'organisme la substance non élaborée. Il faut aller plus loin, et l'argile y va. Elle stimule l'organe déficient et contribue au rétablissement de la fonction défaillante, par l'apport de substances impondérables, de catalyseurs qui permettent l'assimilation, puis la fixation des corps minéraux apportés par les aliments et que l'organisme laissait fuir auparavant. Ces catalyseurs agissent à doses infinitésimales. C'est pourquoi il est inutile d'absorber d'importantes quantités d'argile, une cuillerée à café par jour étant une moyenne bien suffisante. Il existe des substances qui ne se détruisent pas en agissant, ce sont les diastases ou enzymes, dont l'argile doit être exceptionnellement riche. Certaines de ces diastases, les « oxydases », ont le pouvoir de fixer l'oxygène libre, ce qui expliquerait l'action purificatrice et enrichissante de l'argile sur le sang [192].

Le psyllium forme avec l'eau un gel dans les intestins, Cet effet est potentialisé par une absorption réduite des aliments au niveau intestinal, notamment des sucres et des graisses et des toxines et polluants chimiques [193].

Le complexe argile-psyllium renforce le son pouvoir absorbant et adsorbant et la protection des organes comme le foie et les reins par la réduction de disponibilité gastro-intestinale de mélange des pesticides et additifs alimentaires. Ces propriétés sont dues probablement à formation une structure complexe entre la fraction minérale des phyllosilicates des montmorillonites d'argile verte et le gel visqueux des fibres solubles du psyllium blond (*Plantago ovata*).

4. 5. Etude Histopathologique des organes de rats

4.5.1. Résultats de l'examen macroscopique des organes des rats

Les résultats de l'examen macroscopique des organes de rats sont représentés dans le tableau 5.13 ci-dessous :

Tableau 5.13 : Résultats de l'examen macroscopique des organes de rats.

Lot	Poids corporel (g)	Poids des organes (g)		Apparence des organes
		Foie	Reins	
Témoin	241 ± 29,23	8,226 ± 1,737	1,560 ± 0,264	Aucune anomalie
AA/DJA	238 ± 20,6	6,787 ± 0,670	1,480 ± 0,103	Aucune anomalie morphologique
AA/DJAx2	247 ± 17,29	6,364 ± 0,225	1,433 ± 0,067	Aucune anomalie morphologique
Pesticides/DJA	255 ± 10,30	6,472 ± 0,792	1,455 ± 0,095	Aucune anomalie morphologique
Pesticides/DJAx2	250 ± 5,51	6,096 ± 0,251	1,406 ± 0,117	Aucune anomalie morphologique
AA+Pesticides /DJA	235 ± 12,67	6,108 ± 0,470	1,300 ± 0,138	Aucune anomalie morphologique
AA+Pesticides/ DJAx2	251± 29,32	6,120 ± 1,214	1,278 ± 0,151	1/6 Tumeur de 5cm de diamètre
AA+Pesticides/ DJAx2+ Psyllium	250 ± 25,1	7,742 ± 0,377	1,436 ± 0,119	Aucune anomalie morphologique
AA+Pesticides/ DJAx2+ Argile	251 ± 19,46	8,397 ± 1,727	1,495 ± 0,142	Aucune anomalie morphologique
AA+Pesticides/ DJAx2+ Psyllium+ Argile	251 ± 12,85	8,854 ± 1,334	1,396 ± 0,171	Aucune anomalie morphologique

* : Significative.

D'après les résultats du tableau 5.13, dans les 7 mois de l'expérimentation sur les rats femelles de notre étude, aucune anomalie sur la morphologie corporelle externe ni sur la morphologie des organes, dans l'aspect et la couleur (foie et reins) n'ont été enregistrés pour les 10 lots, sauf l'apparition d'une tumeur sous cutanée de 5 cm de diamètre pour le lot AA+Pesticides/ DJAx2(Figure 5.28), la tumeur est maligne selon les résultats histologiques (Figure 5.43).



Figure 5.28 : Apparition d'une tumeur maligne sous cutané chez un rat de lot pesticides+ additifs alimentaires DJA x2 (Photo originale).

4.5.2. Résultats des poids absolu et relatif du foie

Les résultats de l'étude statistique des poids absolu et relatif du foie sont enregistrés dans le tableau 5.14 ci-dessous :

Tableau 5.14 : Résultats du poids absolu et relatif du foie et des reins.

Lot	Foie		Reins	
	Poids absolu (g)	Poids relatif (g%)	Poids absolu (g)	Poids relatif (g%)
Témoin	8,226 ± 1,737	3,413 ± 0,571	1,560 ± 0,264	0,647 ± 0,071
AA/DJA	6,787 ± 0,670*	2,851 ± 0,412*	1,480 ± 0,103	0,621 ± 0,080
AA/DJAx2	6,364 ± 0,225*	2,576 ± 0,441*	1,433±0,067	0,580 ± 0,022
Pesticides/DJA	7,472 ± 0,792	2,930 ± 0,500	1,455 ± 0,095	0,570 ± 0,019
Pesticides/DJAx2	6,086 ± 0,251*	2,095 ± 0,332*	1,406 ± 0,117	0,562 ± 0,015
AA+Pesticides /DJA	6,108 ± 0,470*	2,540 ± 0,496*	1,300 ± 0,138	0,553 ± 0,017
AA+Pesticides/ DJAx2	6,120 ± 1,214*	2,597 ± 0,453*	1,278 ± 0,151	0,509 ± 0,011
AA+Pesticides/ DJAx2+ Psyllium	7,742 ± 0,377	2,438 ± 0,235	1,436 ± 0,119	0,574 ± 0,013
AA+Pesticides/ DJAx2+ Argile	8,397 ± 1,727	3,345 ± 0,521	1,495 ± 0,142	0,595 ± 0,032
AA+Pesticides/ DJAx2+ Psyllium+ Argile	8,854 ± 1,334	3,527 ± 0,171	1,396 ± 0,171	0,556 ± 0,028

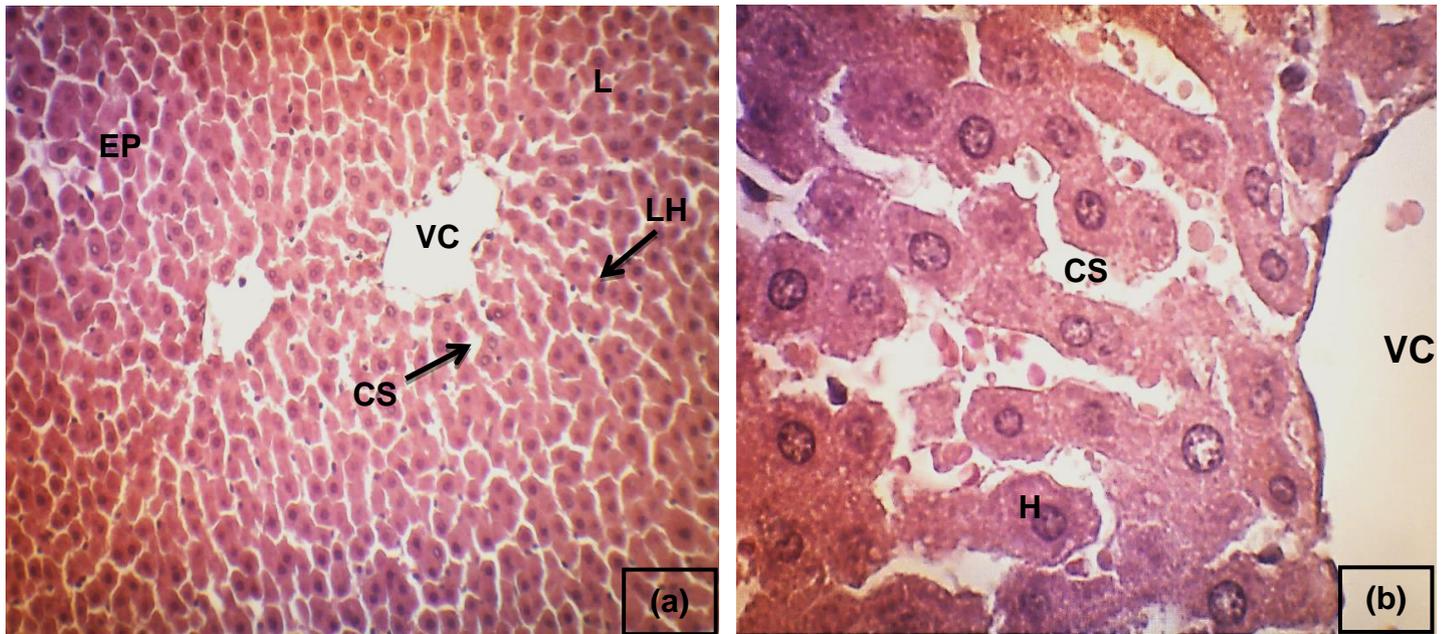
Selon les résultats du poids absolu et relatif du foie et reins présenté dans le tableau 5.14, nous avons constaté une réduction significative ($p < 0,05$) du poids absolu et relatif des foies des lots : 2 et 3 additifs alimentaires DJA et DJAx2, 4 et 5 pesticides DJA et DJAx2, et 6 et 7 additifs alimentaires et pesticides DJA et DJAx2, par contre la diminution est non significative pour les lots 8, 9, et 10. Aussi nous avons enregistré une réduction dans le poids absolu et relatif des reins pour les 10 lots mais cette réduction est statistiquement non significative.

Le poids des organes et le poids relatif des organes sont des repères importants des études toxicologiques [238, 239].

La diminution des poids du foie pourrait s'expliquer par le métabolisme du processus des xénobiotiques dans le foie et pourrait être attribuée à divers effets toxicologiques ainsi la nécrose et l'atrophie des hépatocytes du parenchyme hépatique [240].

4.5.3. Examen microscopique (coupes histologiques du foie et des reins)

4.5.3.1. Coupes histologiques de lot témoin du foie et des reins

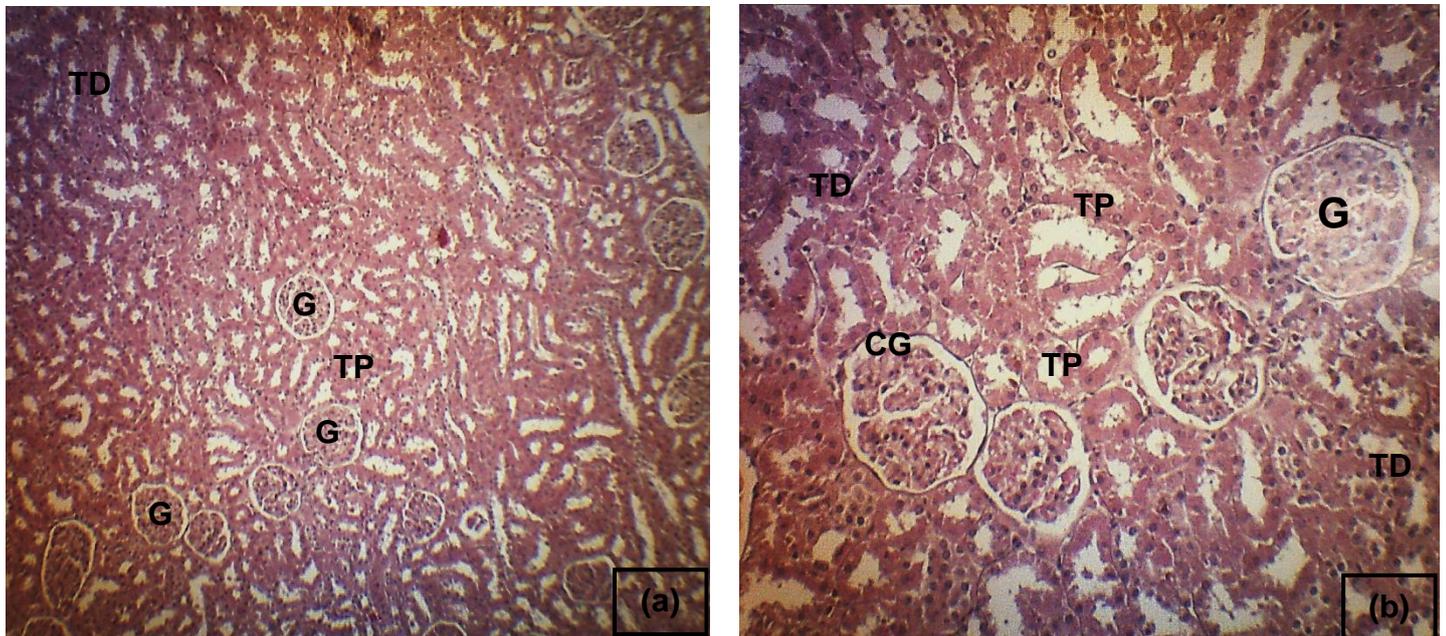


VC : Veine Centrolobulaire ; **L** : Lobule Hépatique ; **EP** : Espace Porte ; **H** : Hépatocyte ;
CS : Capillaire Sinusoïde ; **LH** : Lame Hépatique.

Figure 5.29 : Histologie du parenchyme hépatique d'un rat femelle témoin (photo originale).
 Coloration: HE; Gr: x40 (a) ; x100 (b).

En ce qui concerne le foie, d'après l'observation microscopique d'une coupe transversale du parenchyme hépatique d'un rat femelle témoin illustrée dans la figure 5.29, qui a montré un parenchyme hépatique normal constitué de plusieurs lobules hexagonaux, chaque lobule est composé de plusieurs hépatocytes polygonales à cytoplasme granuleux basophile organisées en travées de Remak tout autour d'une veine centrolobulaire de grand diamètre, les petites hépatocytes possèdent un seul noyau alors que les plus grandes en possèdent deux, les noyaux arrondis, présentent plus souvent deux nucléoles et une chromatine dispersée. Entre les lames hépatocytaires, nous avons observé des capillaires sinusoiïdes bordées par les cellules endothéliales.

Chaque lobule est limité de chaque angle par un espace porte renfermant une veine, une artère et un canal biliaire.



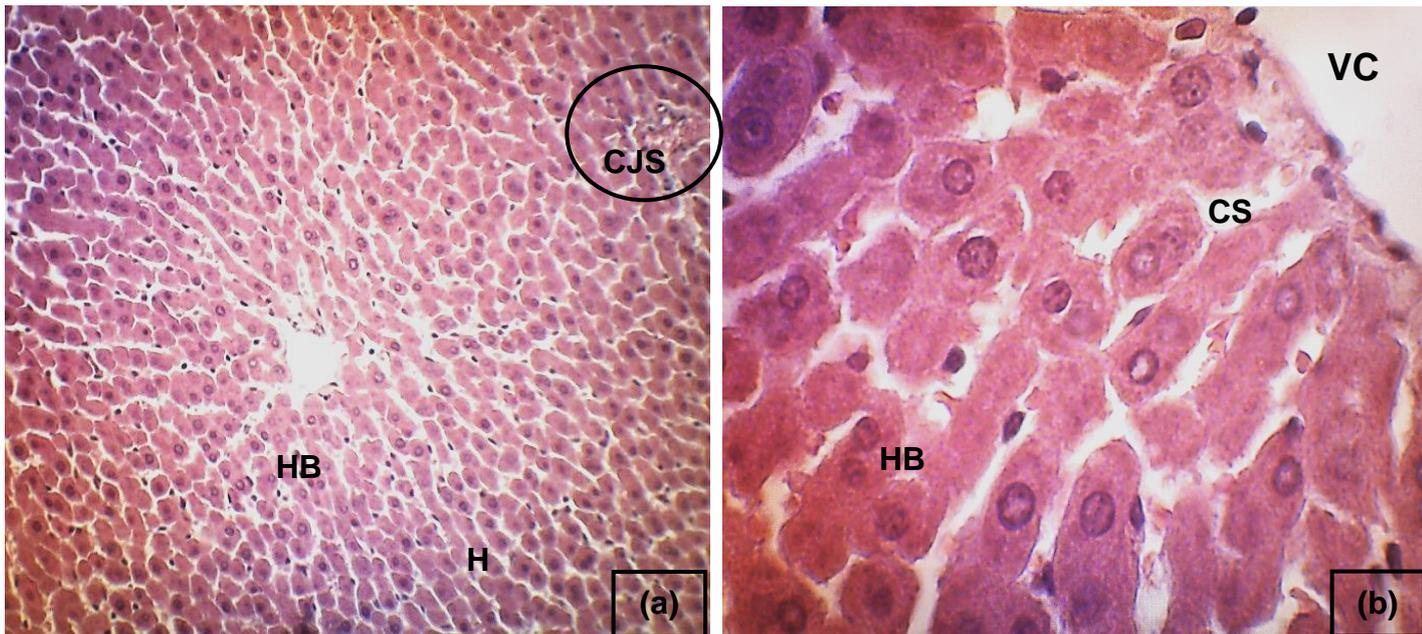
G : Glomérule rénale ; **CG** : Chambre Glomérulaire (espace de Bowman) ;
TD : Tubes Distaux ; **TP** : Tubes Proximaux.

Figure 5.30 : Histologie du parenchyme rénal d'un rat femelle témoin (photo originale).
 Coloration: HE; Gr: x10 (a) ; x 40 (b).

En ce qui concerne les reins, l'observation microscopique d'une coupe transversale du parenchyme rénal d'un rat femelle témoin illustrée dans la figure 5.30, montre un parenchyme rénal normal constitué de l'extérieur vers l'intérieur d'une capsule rénale sous laquelle se trouve un cortex et après la médulla. Le cortex est constitué d'un tissu de cellules aux noyaux arrondis sombres, ainsi que plusieurs glomérules rénaux de formes arrondies avec un contour irrégulier, constitué de cellules mésangiales à noyaux sombres entourées d'une chambre glomérulaire (espace de Bowman). Les glomérules sont entourés par des tubes contournés proximaux et des tubes distaux.

Dans la médulla, de nombreux tubes collecteurs de forme allongée entourés par des cellules allongées sombres et des vaisseaux sanguins sont présents.

4.5.3.2. Effets des additifs alimentaires sur l'histologie de foie et reins

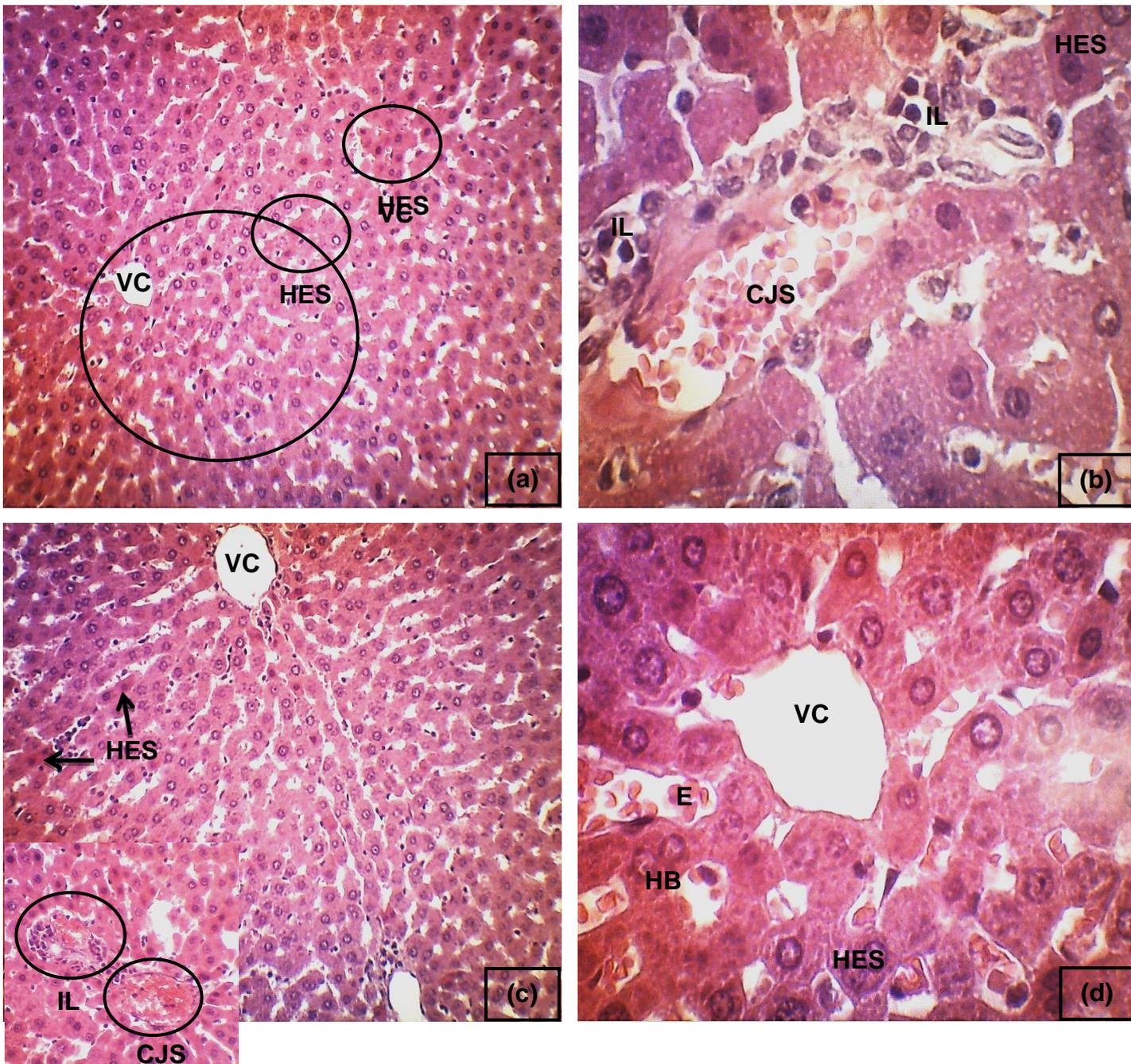


VC : Veine Centrolobulaire ; **H** : Hépatocyte ; **CJS** : Congestion sanguine ; **HB** : Hépatocyte binoculaire ; **CS** : Capillaire Sinusoïde.

Figure 5.31 : Histologie du parenchyme hépatique d'un rat femelle du lot traité par les additifs alimentairesDJA (photo originale).

Coloration: HE ; Gr: x40 (a) ; x100 (b)

Dans le cas de rats traités par le mélange des additifs alimentaires et par rapport aux témoins, l'observation microscopique du parenchyme hépatique des rats traités par une dose DJA illustrée dans la figure 5.31 montre d'une façon globale un faible effet sur l'histologie de foie et pas de modification architecturale du parenchyme hépatique observée sauf quelques foyers de congestion sanguine.



VC : Veine Centrolobulaire ; **IL** : Infiltrat Leucocytaire ; **HE** : HépatocyteEosinophile ; **E** : Erythrocyte ;

CJS : Congestion sanguine ; **HB** : Hépatocyte binoculaire ; **CS** : Capillaire Sinusoïde ;

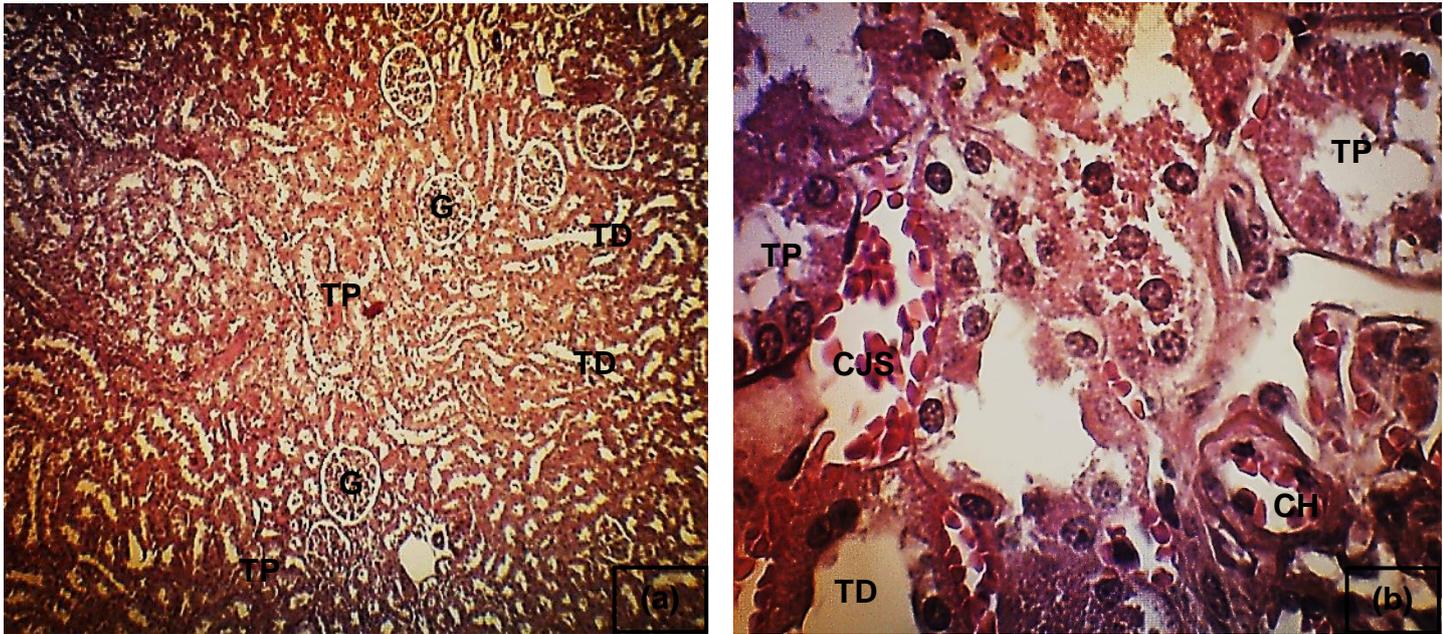
Figure 5.32 : Histologie du parenchyme hépatique d'un rat femelle du lot traité par les additifs alimentaires DJAx2 (photo originale).

Coloration: HE ; Gr: x40 (a, c) ; x100 (b, d).

Ce qui concerne le lot DJA×2, la figure 5.32 ne montre aucun effet direct sur l'architecture hépatique mais sur les hépatocytes, on observe plusieurs hépatocytes éosinophiles, ce sont des hépatocytes qui souffrent en voie de nécrose, nous avons observé plusieurs infiltrats lymphocytaires, plasmocytaires, et polynucléaires éosinophiles dans les espaces porte et congestion du sang avec des capillaires hémorragiques.

Ces résultats sont des signes de lésions hépatiques avec inflammation et souffrance hépatique [241, 242].

Des chercheurs ont expliqué le changement de taille des hépatocytes chez le rat Wistar par la conservation des fluides dans le cytoplasme, ce qui entraîne une perturbation dans les échanges ioniques et provoque un stress métabolique qui cause l'inefficacité du foie dans la biotransformation des xénobiotiques en permettant la pénétration des métabolites toxiques dans les tissus [243].

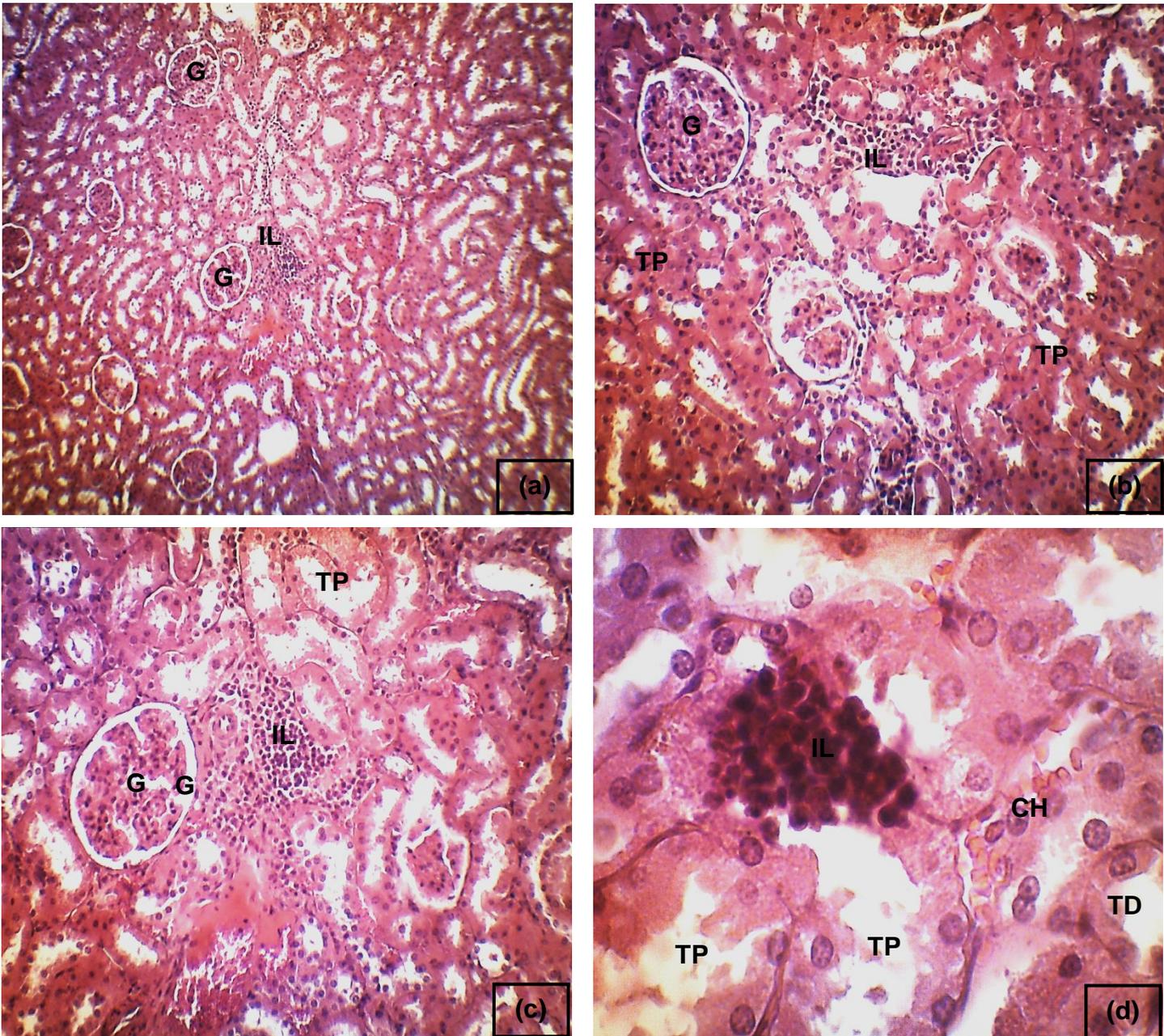


G : glomérule rénale ; **CG** : chambreglomérulaire ; **TD** : Tubes Distaux ; **TP** : Tubes Proximaux ; **CH** : Capillaires hémorragiques **CJS** : Congestion sanguine.

Figure 5.33 : Histologie du parenchyme rénal d'un rat femelle du lot traité par les additifs alimentairesDJA (photo originale).

Coloration: HE ; Gr: x 10 (a) ; x100 (b).

D'après la figure 5.33, l'observation microscopique du parenchyme rénal des rats appartenant au lot DJA, a montré qu'aucun changement de la structure histologique rénale n'a été signalé, sauf la présence de quelques foyers d'infiltrats lymphocytaires dans interstisium rénale et quelques capillaires hémorragiques.

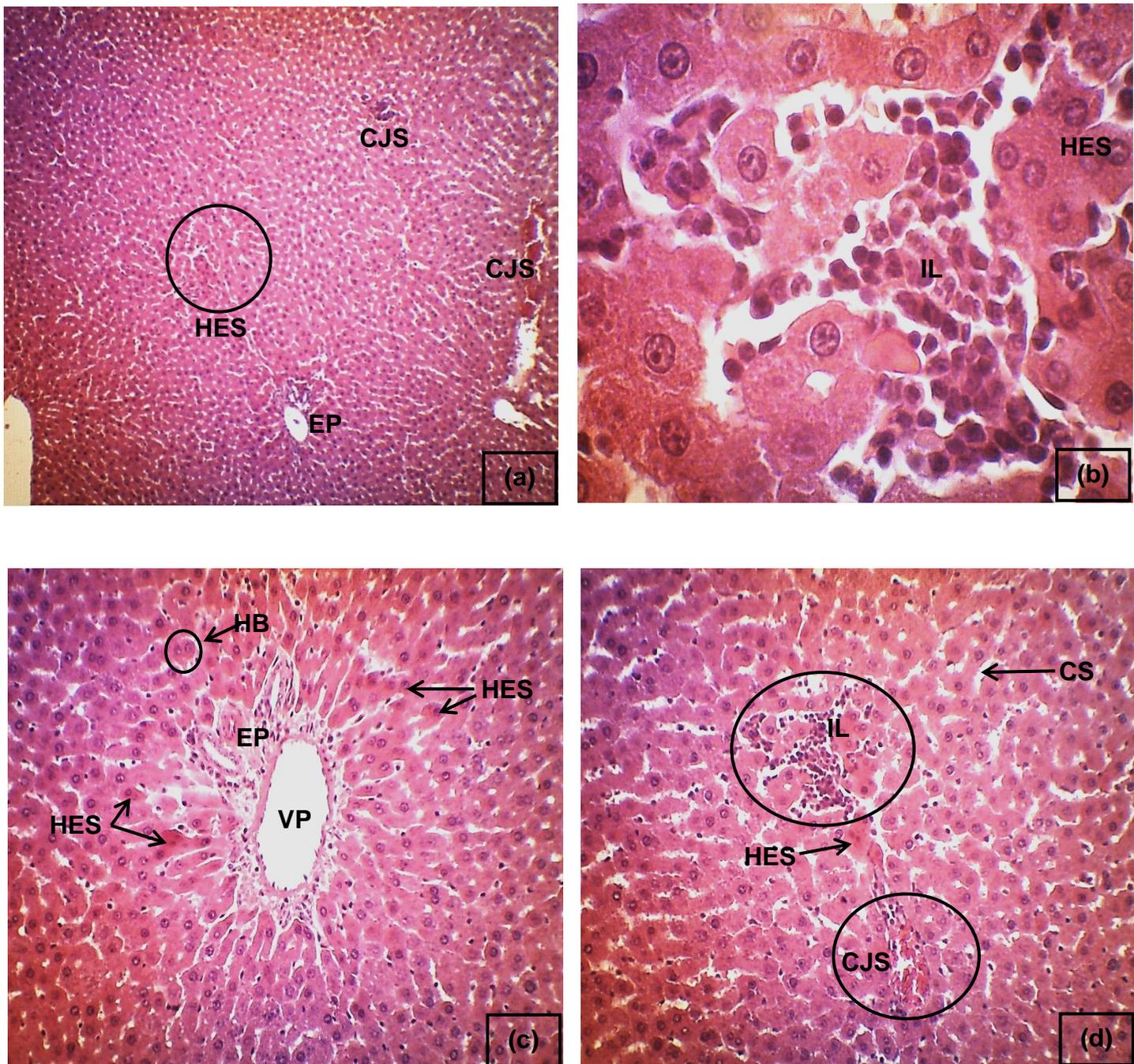


G : glomérule rénale ; **CG** : chambre glomérulaire (espace de Bowman) ; **IL** : Infiltrat Leucocytaire; **TD** :Tubes Distaux ; **TP** : Tubes Proximaux ; **CH** : Capillaires hémorragiques.
 Figure 5.34 : Histologie du parenchyme rénal d'un rat femelle du lot traité par les additifs alimentaires DJAx2 (photo originale).

Coloration: HE ; Gr: x 10 (a) ; x 40 (b, c) ; x 100 (d).

Aussi pour les sujets du lot DJAx2 et selon la figure 5.34, les additifs alimentaires ne provoquent pas des modifications directes sur l'histologie rénale mais plusieurs foyers d'infiltrats lympho-plasmocytaires dans interstisium rénaux ont été observés et surtout autour des vaisseaux sanguins et quelque capillaires hémorragiques. Ce qui témoigne d'un début d'inflammation rénale.

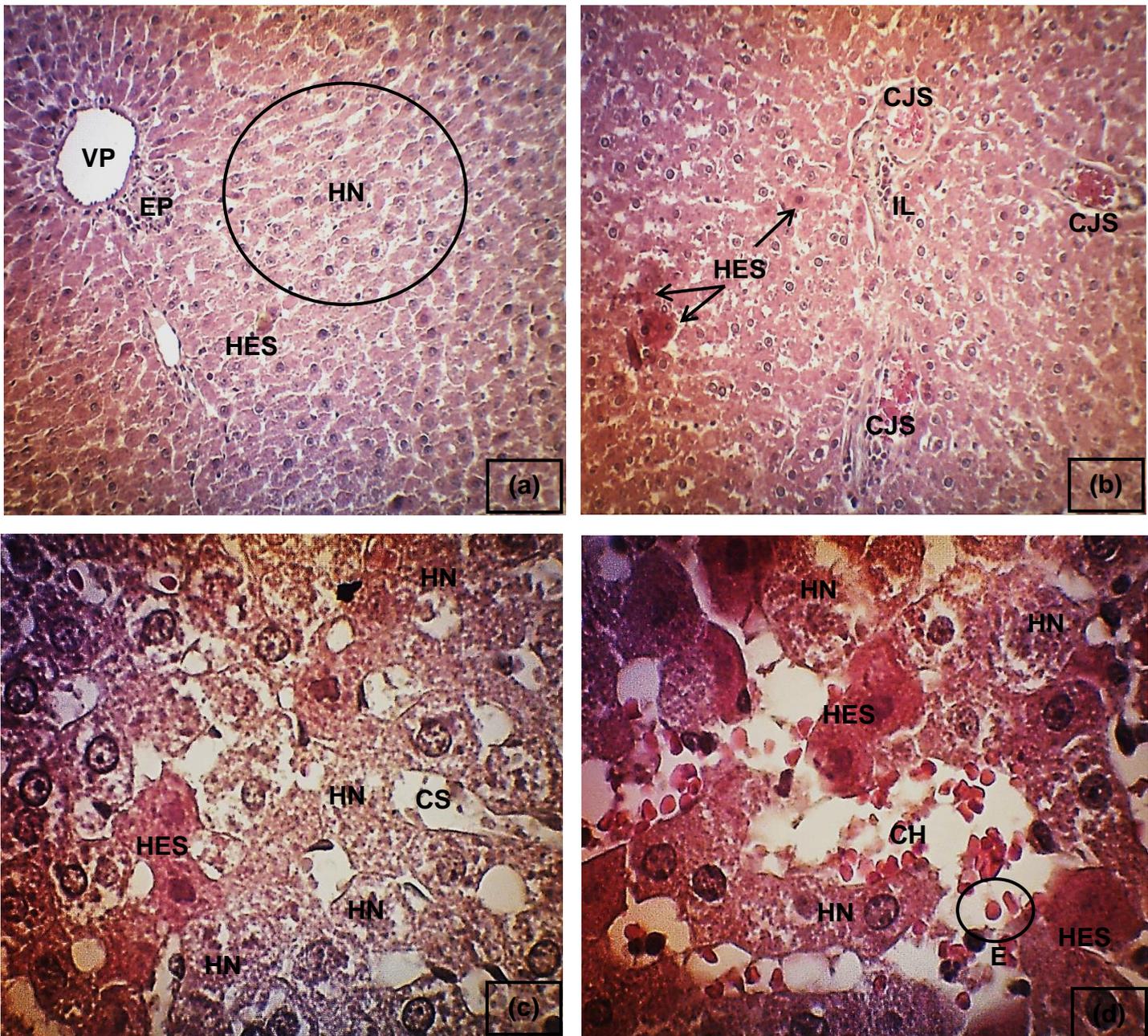
4.5.3.3. Effet des pesticides sur l'histologie du foie et des reins



VP : Veine Porte ; **IL** : Infiltrat Leucocytaire; **EP** : Espace Porte ; **HES** : Hépatocyte Eosinophile ; **CJS** : Congestion sanguine ; **HB** : Hépatocyte binoculaire ; **CS** : Capillaire Sinusoïde ;

Figure 5.35 : Histologie du parenchyme hépatique d'un rat femelle du lot traité par les pesticides DJA (photo originale).

Coloration: HE ; Gr: x10 (a) ; x 40 (c, d) ; x 100 (b).



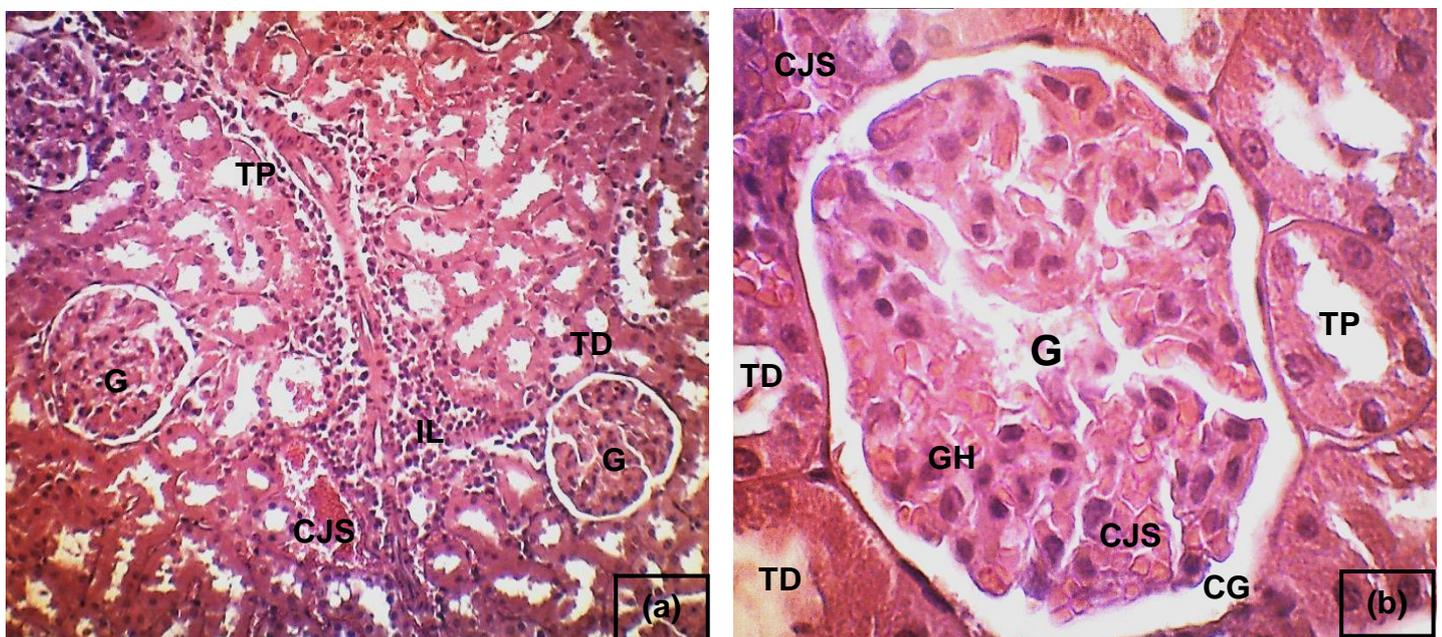
VP : Veine Porte ; **IL** : Infiltrat Leucocytaire; **EP** : Espace Porte ; **HN** : Hépatocyte Nécrosé ; **CJS** : Congestion sanguine ; **CS** : Capillaire Sinusoïde ; **HES** : Hépatocyte Eosinophile; **CH** : Capillaire Hémorragique; **E** : Erythrocyte.

Figure 5.36 : Histologie du parenchyme hépatique d'un rat femelle du lot traité par les pesticides DJAx2 (photo originale).

Coloration: HE ; Gr: x40 (a, b) ; x 100 (c, d).

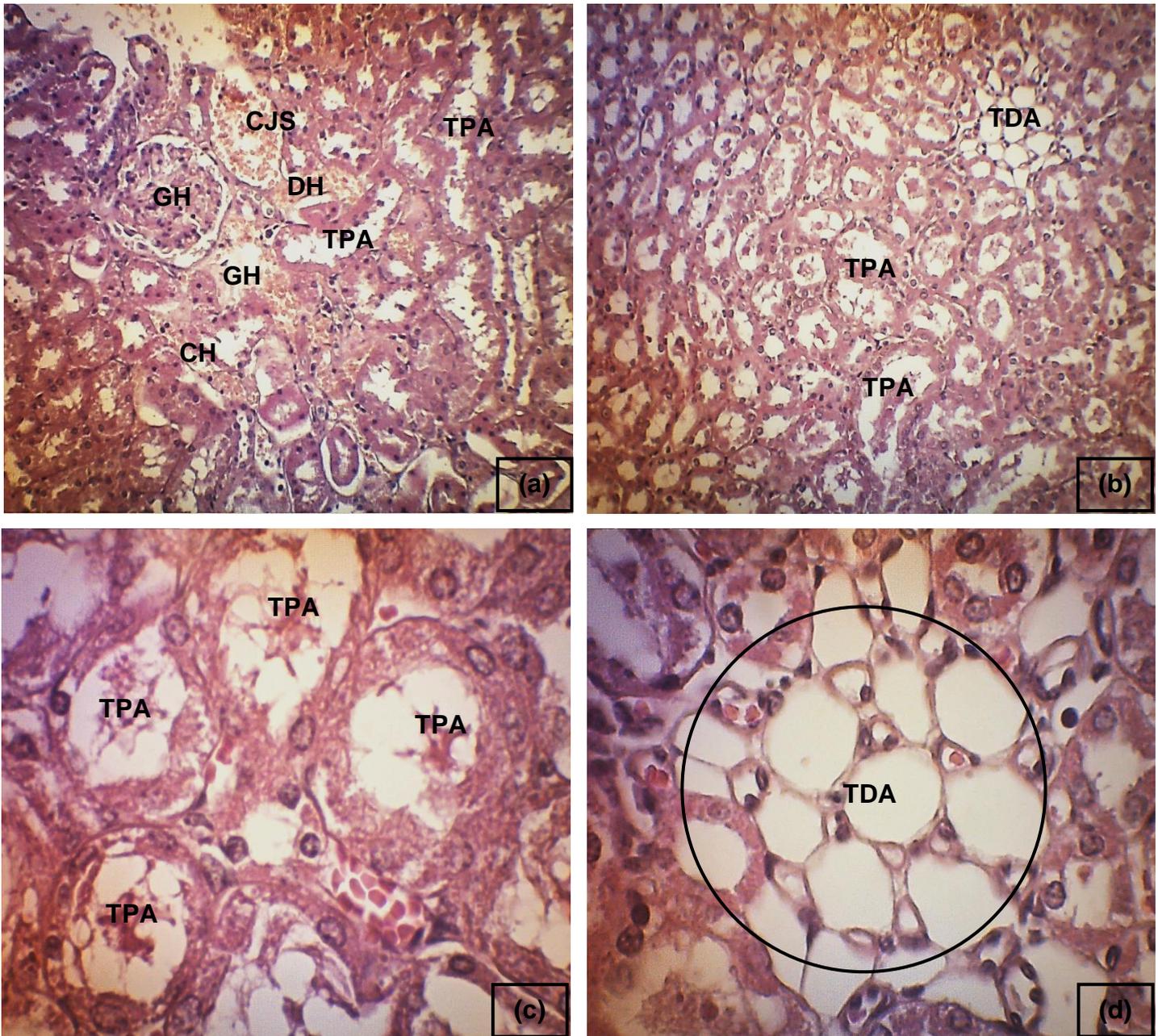
Dans le cas de rats traités par le mélange des pesticides et en comparaison avec les témoins, l'observation microscopique du parenchyme hépatique des rats traités par une dose DJA illustrée dans la figure 5.35 montre d'une façon générale qu'il y a eu des changements dans l'histologie du foie par l'apparition de plusieurs zones infiltrats lympho-plasmocytaires au niveau des espaces porte et les capillaires sinusoïde, dilatation des capillaires sinusoïdes et congestion du sang, hépatocytes fortement colorés en rose avec un cytoplasme éosinophiles en voie de nécrose.

Ce qui concerne le lot traité par les pesticides DJAx2, la figure 5.36 montre un grand effet de pesticides sur l'histologie hépatique qui se manifeste par l'apparition des hépatocytes fortement colorés en rose avec une cytoplasme éosinophiles partout dans le parenchyme hépatique, ce sont des hépatocytes qui souffre en voie de nécrose et de plusieurs zones d'hépatocytes totalement nécrosés avec dénaturation des organites cellulaires et même la membrane plasmique , avec la présence de plusieurs foyers d'infiltrats lympho-plasmocytaires dans les espaces porte, dilatation des capillaires sinusoïdes et congestion du sang avec des capillaires hémorragiques.



G : glomérule rénale ; **CG** : chambre glomérulaire ; **TD** : Tubes Distaux ; **TP** : Tubes Proximaux ; **GH** : Glomérule hémorragique, **CJS** : Congestion sanguine ; **IL** : Infiltrat Leucocytaire.

Figure 5.37 : Histologie du parenchyme rénal d'un rat femelle du lot traité par les pesticides DJA (photo originale).Coloration: HE ; Gr: x40 (a) ; x100 (b).



GH : Glomérule Hémorragique ; **DH** : Dépôt d'Hémosidérine ; **TDA** : Tubes Distaux Atrophiques ; **TPA** : Tubes Proximaux Atrophiques ; **CH** : Capillaires hémorragiques ; **CJS** : Congestion sanguine.

Figure 5.38 : Histologie du parenchyme rénal d'un rat femelle du lot traité par les pesticides DJAx2 (photo originale).

Coloration: HE ; Gr: x40 (a, b) ; x100 (c, d).

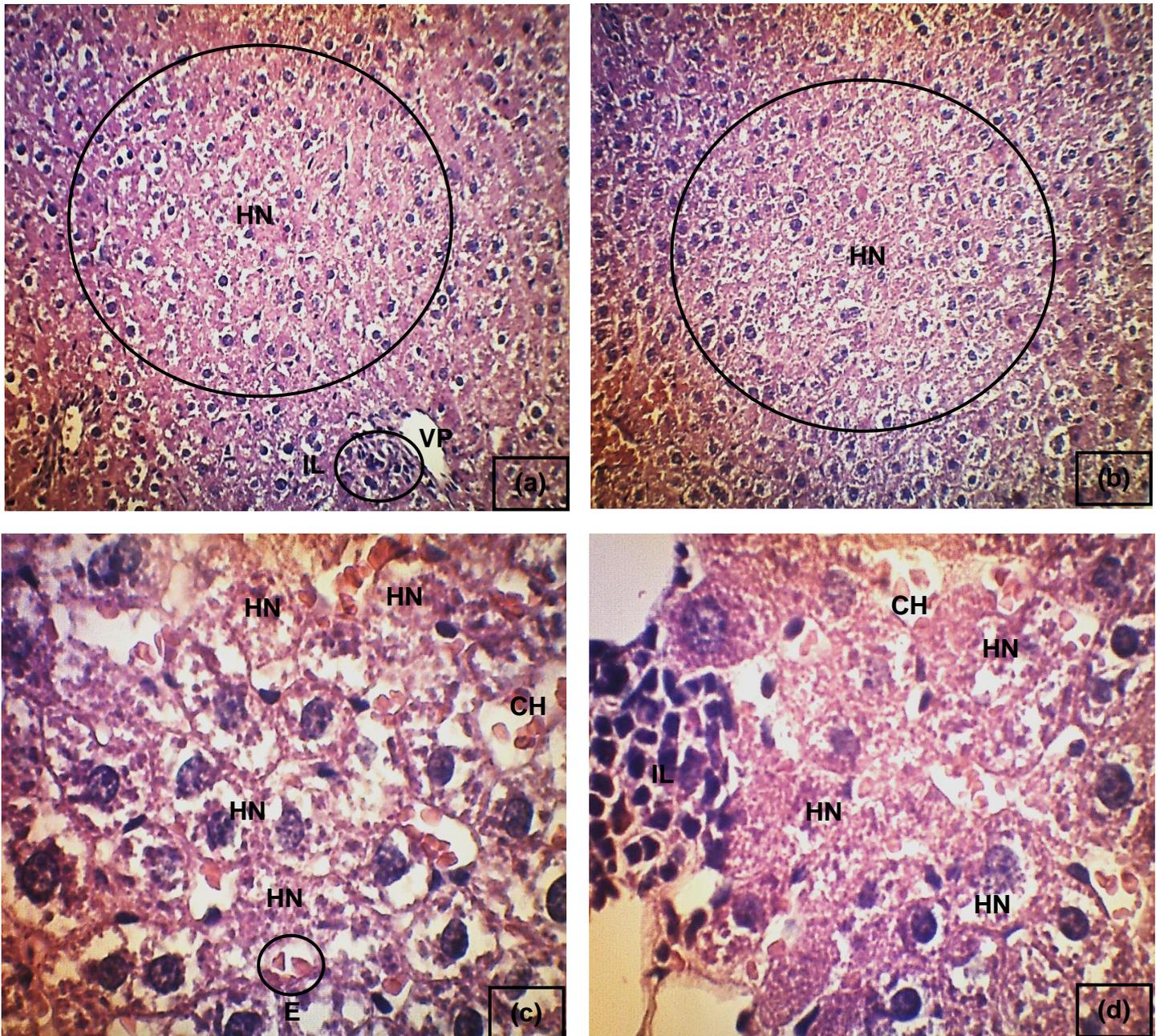
D'après l'illustration de la figure 5.36, l'observation microscopique du parenchyme rénal de rats traités par les pesticides DJA montre une présence de plusieurs foyers d'infiltrats lympho-plasmocytaires dans interstisium rénal et infiltrats plasmocytaires autour des glomérules, tubes proximaux et distaux en voie de dénaturation et même dénaturés, congestion du sang et glomérules hémorragiques avec un gonflement des glomérules et rétrécissement de la chambre glomérulaire en raison d'une hyperplasie des cellules mésangiales des glomérules.

Ainsi pour les sujet traités par les pesticides DJAx2 et selon la figure 5.37, le mélange des six pesticides provoque plusieurs modifications importantes sur l'histologie rénale par l'apparition de congestions sanguines, vaisseaux sanguins hémorragiques avec un dépôt d'hémosidérine dans les tubes proximaux, présence de plusieurs zones d'infiltrats lympho-plasmocytaires dans interstisium rénal, et une atrophie et dilatation des tubes rénaux proximaux avec un épithélium aplati et des cellules dénaturées, des tubes rénaux distaux endommagés avec des cellules dénaturés, des glomérules hémorragiques avec un gonflement des glomérules à cause d'une hyperplasie des cellules mésangiales et la présence des glomérules dénaturés.

Ces résultats sont des signes d'une souffrance, lésion, inflammation et une insuffisance rénale [222].

Les résultats des coupes histologiques des reins confirment les résultats de bilan biochimique rénal.

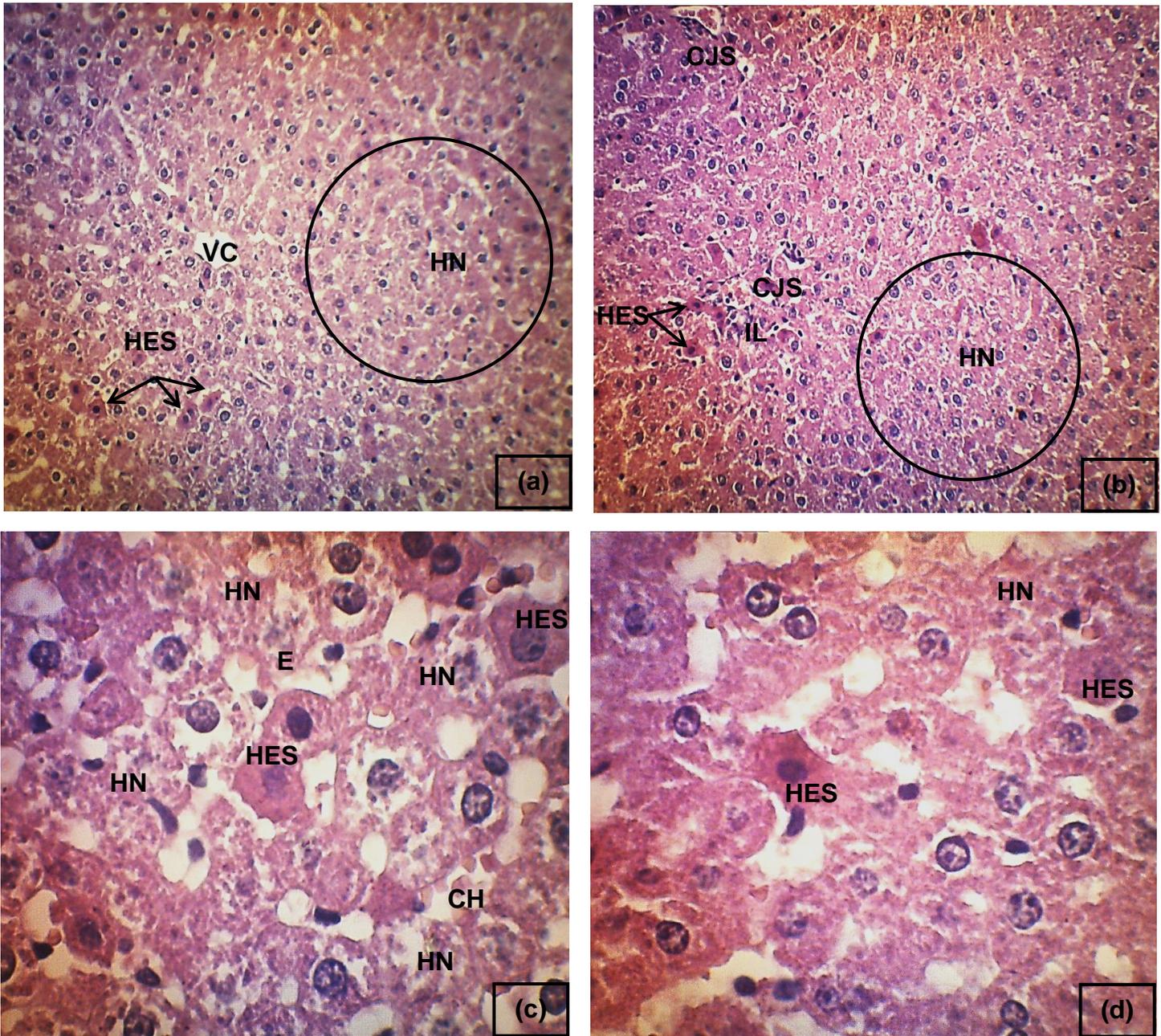
4.5.3.4. Effets du mélange additifs alimentaires et pesticides sur l'histologie du foie et des reins



VP : Veine Porte ; **IL** : Infiltrat Leucocytaire; **EP** : Espace Porte ; **HN** : Hépatocyte Nécrosé ; **CJS** : Congestion sanguine ; **HES** : Hépatocyte Eosinophile; **CH** : Capillaire Hémorragique; **E** : Erythrocyte.

Figure 5.39 :Histologie du parenchyme hépatique d'un rat femelle du lot traité par le mélange des additifs alimentaires et pesticides DJA (photo originale).

Coloration: HE ; Gr: x40 (a, b) ; x100 (c, d).



VC : Veine Centrolobulaire ; **IL** : Infiltrat Leucocytaire ; **HN** : Hépatocyte Nécrosé ;
CJS : Congestion sanguine ; **HES** : Hépatocyte Eosinophile ; **CH** : Capillaire Hémorragique ;
E : Erythrocyte.

Figure 5.40 : Histologie du parenchyme hépatique d'un rat femelle du lot traité par le mélange des additifs alimentaires et pesticides DJA \times 2 (photo originale).

Coloration: HE ; Gr: \times 40 (a, b) ; \times 100 (c, d).

Lorsqu'il s'agit de rats traités par le mélange d'additifs alimentaires et pesticides, l'observation microscopique du parenchyme hépatique des rats traités par une dose DJA illustrée sur la figure 5.39 qui montre d'une façon générale la présence de plusieurs foyers d'infiltrats lympho-plasmocytaires au niveau des espaces porte et les capillaires sinusoides et au niveau des hépatocytes avec clarification des cytoplasmes qui deviennent plus ou moins blancs avec une membrane cytoplasmique plus visible, ce sont des hépatocytes nécrosés et un signe de souffrance hépatique .

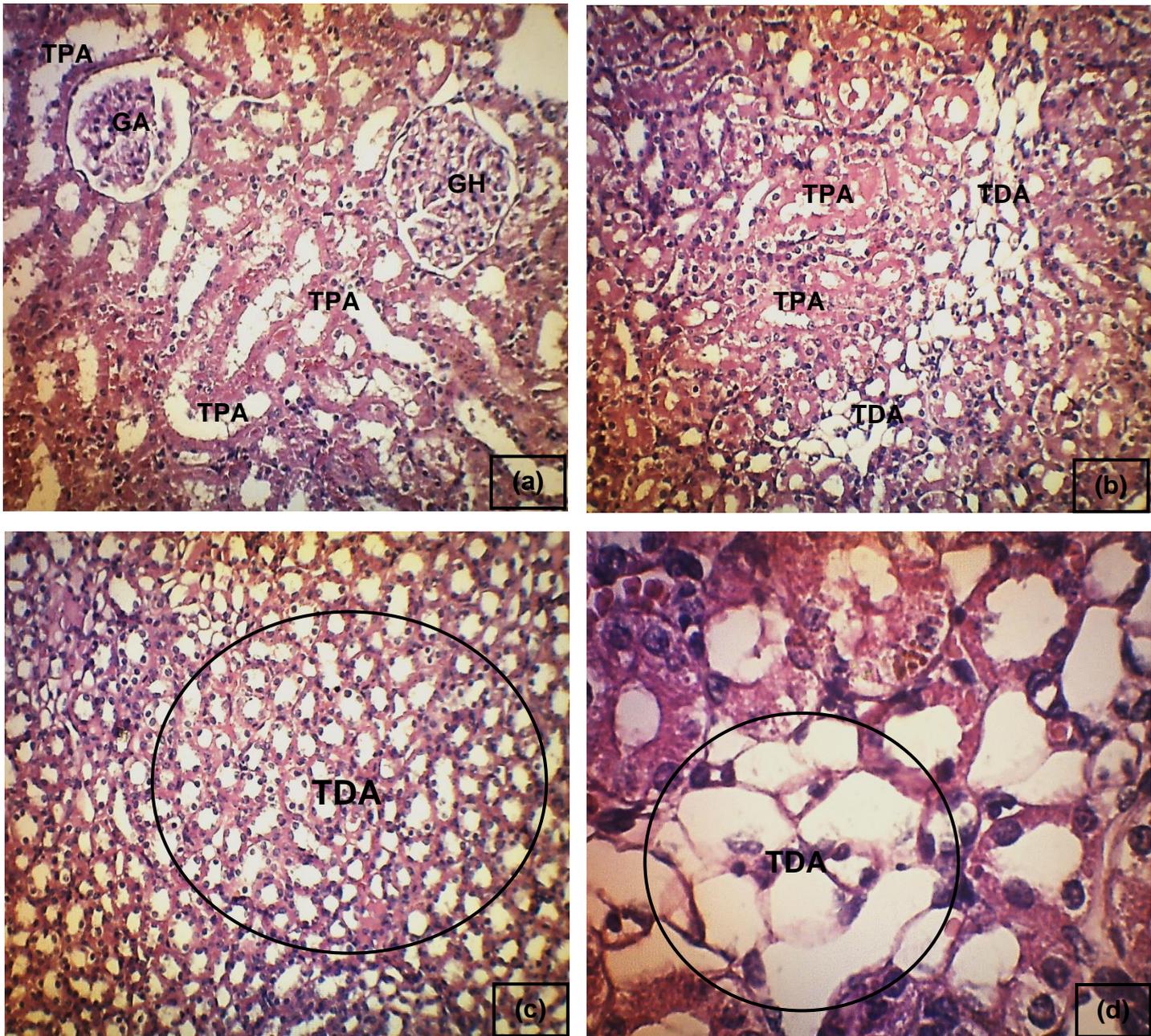
Ce qui concerne le lot traité par le mélange d'additifs alimentaires et pesticides DJAx2, la figure 5.40 montre un effet notable sur l'histologie hépatique qui se manifeste par l'observation des hépatocytes encocytaires fortement colorés en rose avec un cytoplasme éosinophile généralisé dans le parenchyme hépatique, ce sont des hépatocytes qui souffrent en voie de nécrose, avec la présence de plusieurs foyers d'infiltrats lympho-plasmocytaires dans les espaces porte.

La peroxydation des lipides membranaires entraîne une augmentation de la perméabilité et de la fragilité de la membrane qui peut entraîner une nécrose [244].

Ces résultats sont des signes de lésions hépatiques avec inflammation, souffrance et dysfonctionnement hépatique [241, 242].

Les effets toxiques sur l'histologie hépatique se sont aggravés dans ce cas de mélange pesticides + additifs alimentaires même à de très faibles doses et la DJA (dose de sécurité) grâce à l'addition de doses ou interaction et synergie. Tous les mélanges avec des structures chimiques similaires produisent des effets additifs ce qui modifie la toxicocinétique avec une désintoxication réduite [244].

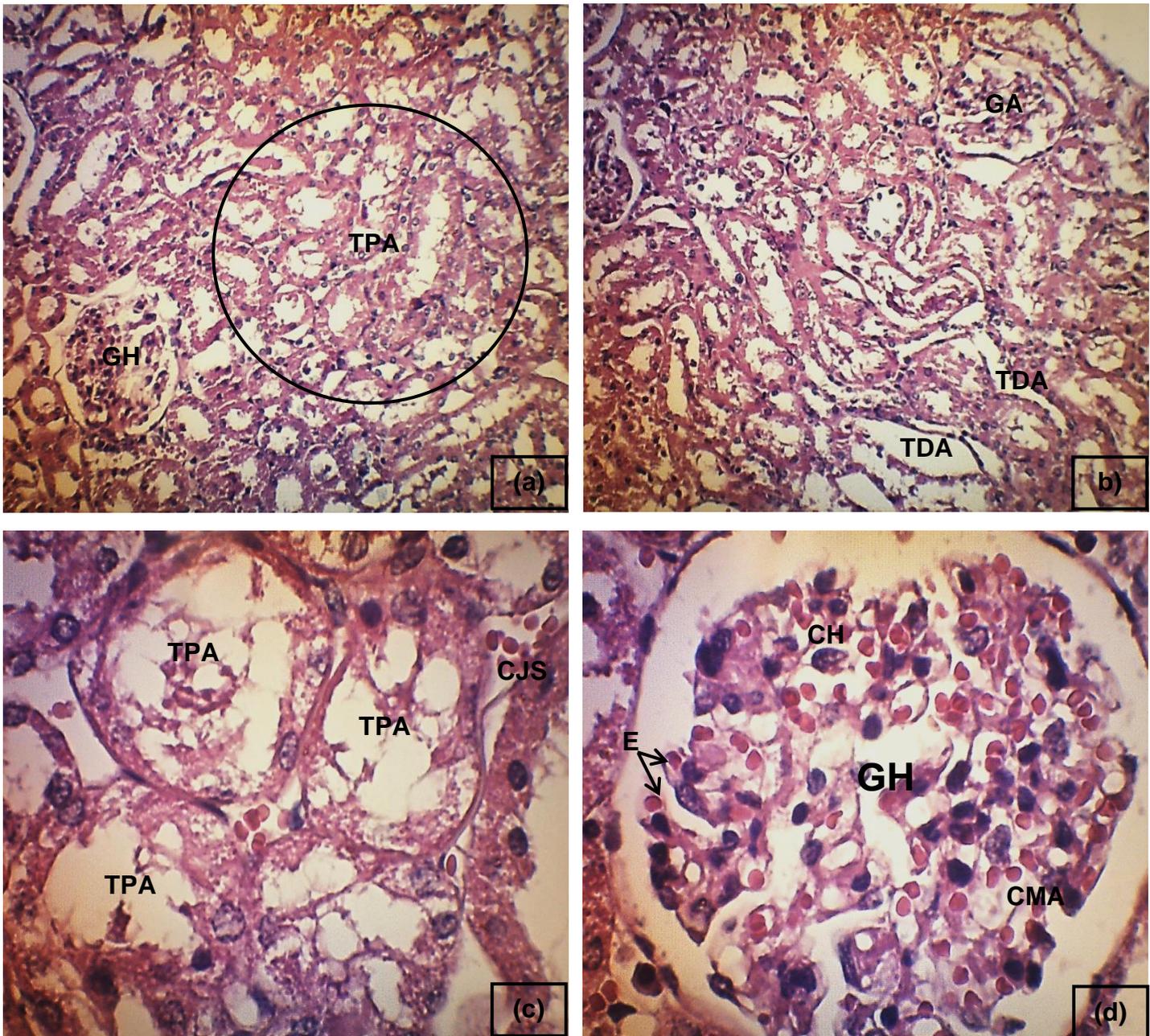
Ces résultats histologiques confirment les résultats biochimiques de la fonction hépatique.



GH : Glomérule Hémostatique ; **GA** : Glomérule Atrophique; **TDA** :Tubes Distaux Atrophiques
TPA : Tubes Proximaux Atrophiques.

Figure 5.41 : Histologie du parenchyme rénal d'un rat femelle du lot traité par le mélange des additifs alimentaires et pesticides DJA (photo originale).

Coloration: HE ; Gr: x40 (a, b, c) ; x100 (d).



GH : Glomérule Hémostatique ; **GA** : Glomérule Atrophique ; **E** : Erythrocyte; **TDA** :Tubes Distaux Atrophiques ;**TPA** : Tubes Proximaux Atrophiques ; **CH** : Capillaires hémorragiques ; **CJS** : Congestion sanguine ; **CMA** : Cellules mésangiales Atrophiques.

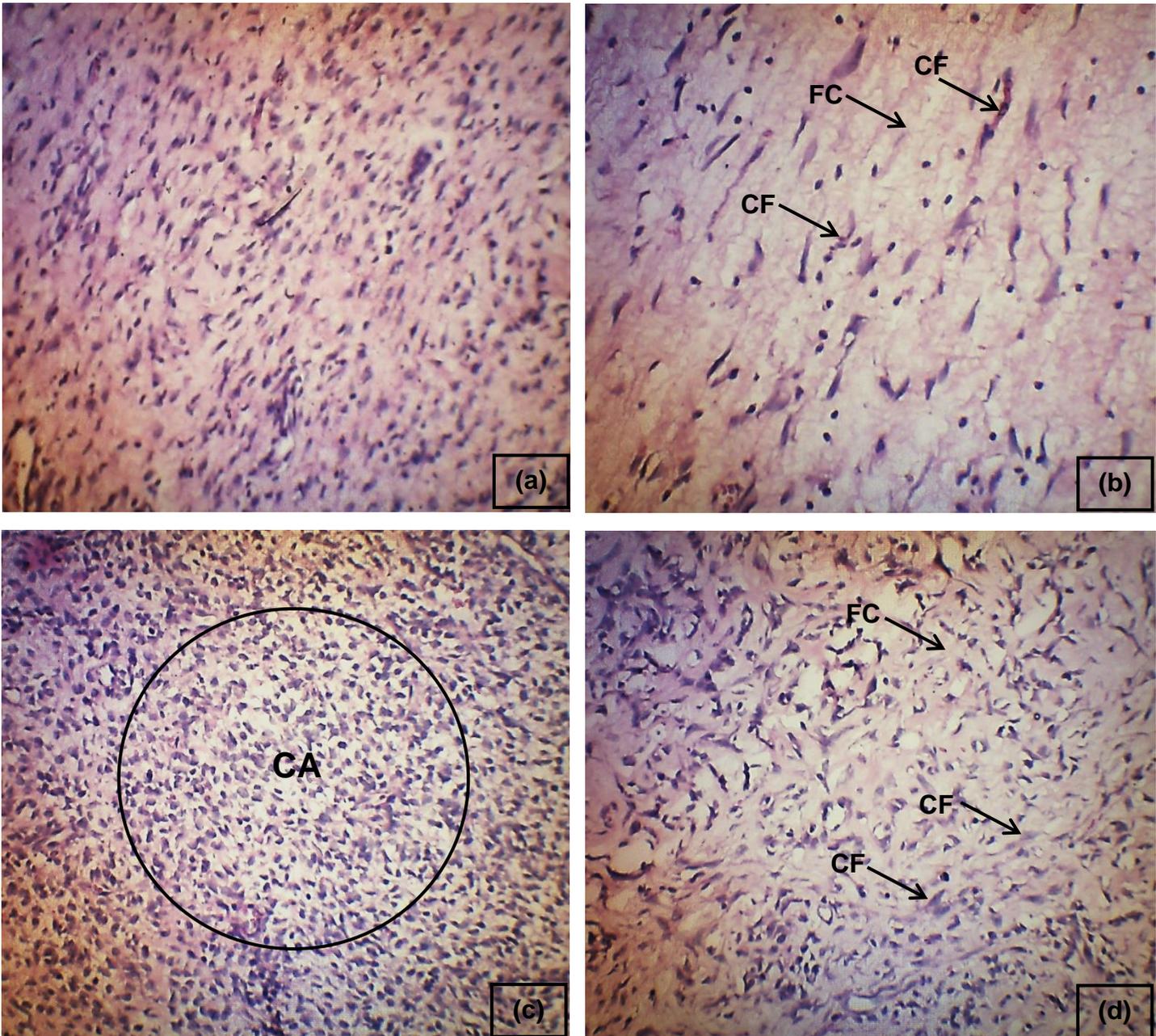
Figure 5.42 : Histologie du parenchyme rénal d'un rat femelle du lot traité par el mélange des additifs alimentaires et pesticides DJAx2 (photo originale).

Coloration: HE ; Gr: x40 (a, b) ; x 100 (c, d).

D'après l'illustration de la figure 5.41, l'observation microscopique du parenchyme rénal de rats traités par le mélange d'additifs alimentaires et pesticides DJA montre une présence de plusieurs foyers d'infiltrats lympho-plasmocytaires dans l'interstisium rénal avec une atrophie et dilatation des tubes rénaux proximaux et distaux qui présentent un épithélium aplati et des cellules plus au moins dénaturés avec une lumière plus large, ce sont des signes d'une souffrance rénale.

Ainsi pour les sujet traités par le mélange d'additifs alimentaires et pesticides DJAx2 et selon la figure 5.42, le mélange provoque plusieurs modifications importantes sur l'histologie rénale par l'observation des cylindre hyalins, présence de plusieurs zones d'infiltrats lympho-plasmocytaires dans interstisium rénal, et une atrophie et dilatation des tubes rénaux proximaux et distaux avec un épithélium aplati et des cellules plus au moins dénaturés, nécrose des cellules mésangiales des glomérules avec un dépôt de fragments d'hématies dans la chambre glomérulaire.

Ces résultats sont des signes d'une souffrance, lésion, inflammation et une insuffisance rénale importante même pour la dose DJA [222].



FC : Fibre de collagène ; **CF** : Cellule Fusiforme ; **CA** : Cellule Arrondie

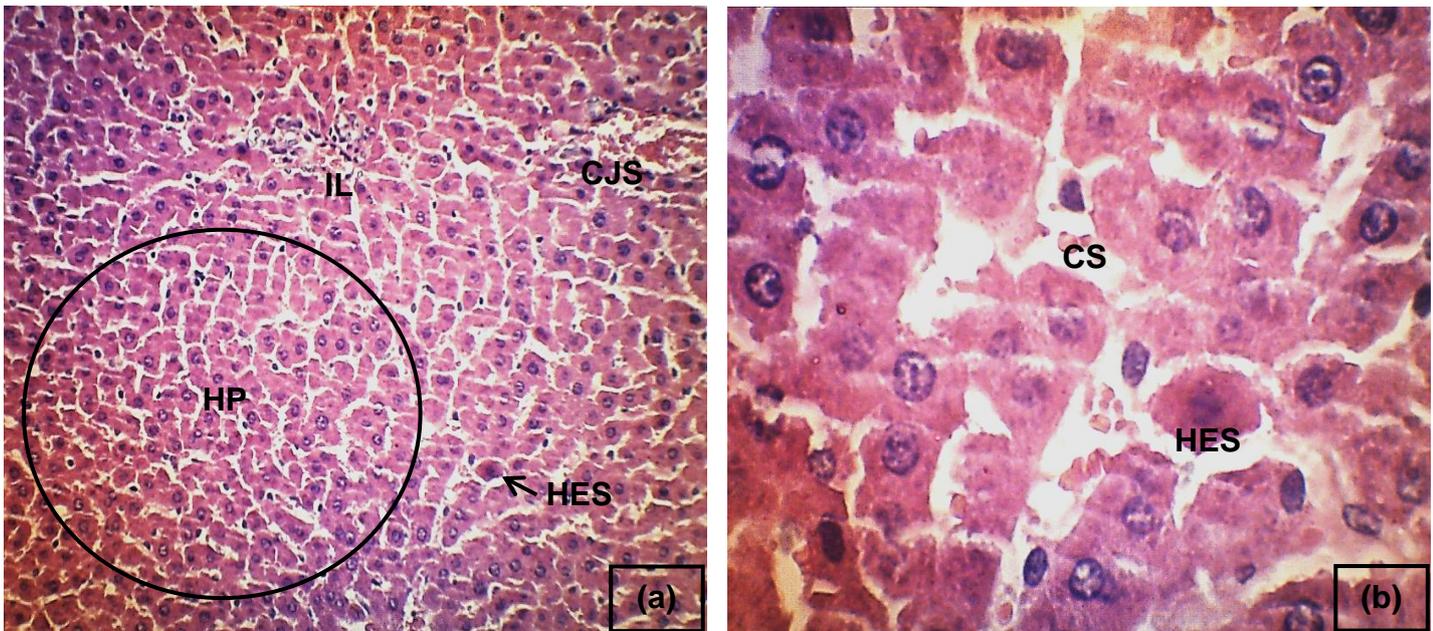
Figure 5.43 : Histologie du parenchyme de la tumeur apparu chez un rat de lot traité par le mélange de pesticides et additifs alimentaires DJAx2 (photo originale).

Coloration: HE ; Gr: x40 (a, c, b,d).

Plus tous ces effets, nous avons aussi l'apparition d'une tumeur sous cutanée de 5 cm de diamètre. Les résultats des coupes histologiques présenté sur la figure 5.43 montrent que cette tumeur est une tumeur maligne de type myosarcome avec des cellules arrondies et faisceaux entrelacés de cellules

fusiformes entremêlés de fibres de collagène, suggérant un phénotype fibroblastique. Ce résultat est provoqué par la toxicité physiologique générale de mélange de pesticides + additifs alimentaires.

4.5.3.5. Effets protecteurs du Psyllium et l'argile contre la toxicité du mélange additifs alimentaires et pesticides sur l'histologie de foie et des reins

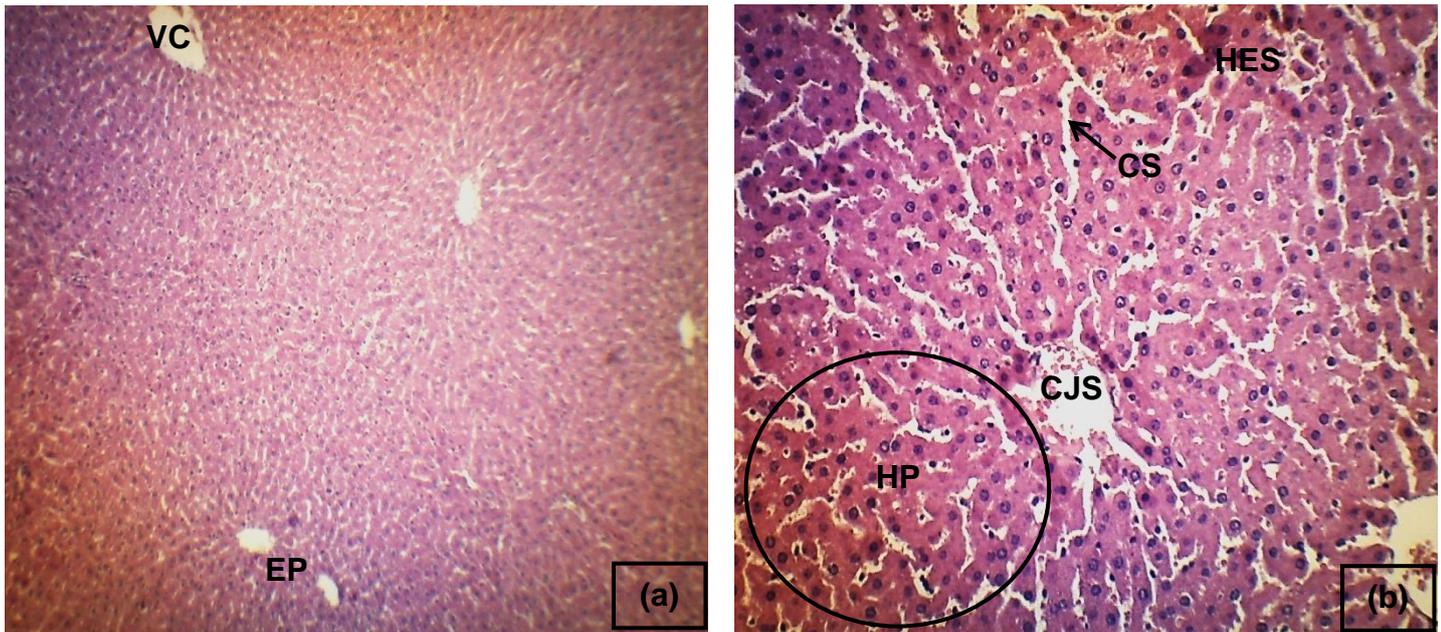


IL : Infiltrat Leucocytaire; **HP** : Hépatocyte protégé ; **CJS** : Congestion sanguine ;
HES : Hépatocyte Eosinophile; **CH** : Capillaire sinusoidal.

Figure 5.44 : Histologie du parenchyme hépatique d'un rat femelle du lot traité par el mélange des additifs alimentaires et pesticides DJAx2 associée au psyllium (photo originale).

Coloration: HE ; Gr: x40 (a) ; x100 (b).

Dans le cas de rats traités par le mélange d'additifs alimentaires et pesticides DJAx2 en présence du psyllium à 2% dans la nourriture, l'observation microscopique du parenchyme hépatique illustrée sur la figure 5.44 montre d'une façon générale que l'histologie du foie mieux protégé par le psyllium avec quelques hépatocytes encocytaires éosinophiles et quelques zones d'infiltrats lympho-plasmocytaires au niveau des espaces porte témoin de l'inflammation du parenchyme hépatique et les hépatocytes sont bien protégés avec une absence des hépatocytes nécrosés.

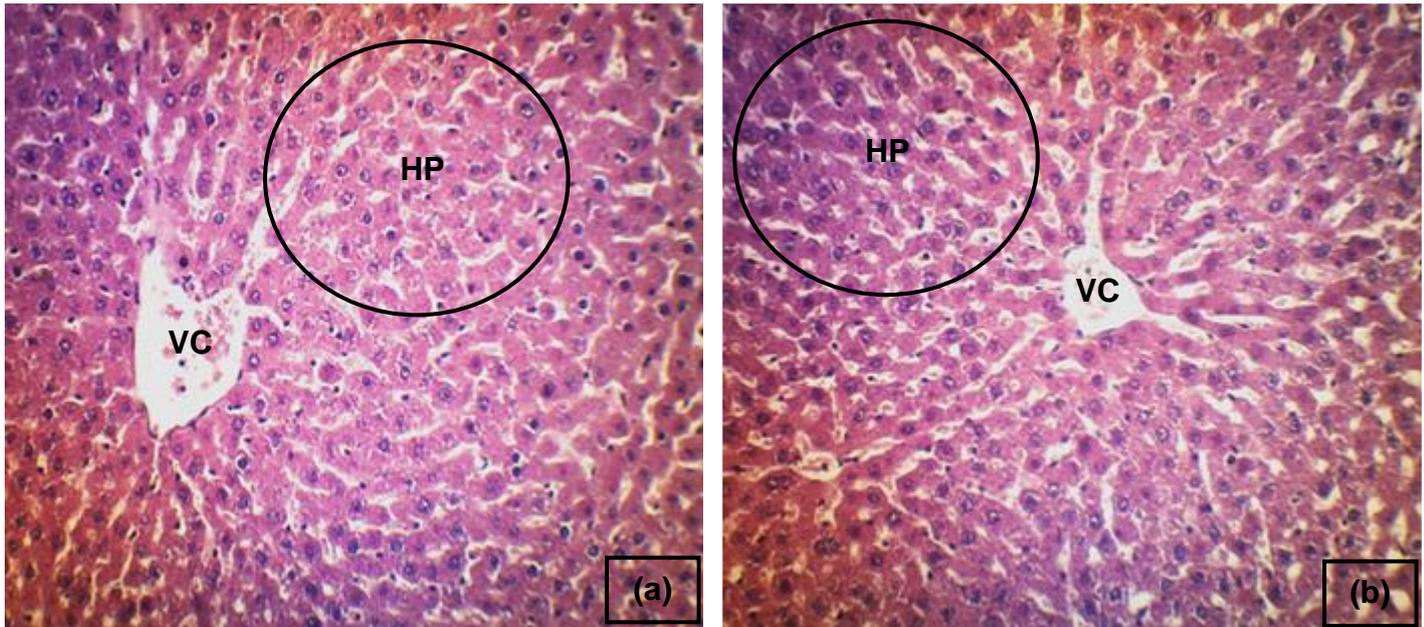


VC : Veine Centrolobulaire ; **HP** : Hépatocyte protégé ; **CJS** : Congestion sanguine ;
HES : Hépatocyte Eosinophile; **CH** : Capillaire sinusoïde.

Figure 5.45 : Histologie du parenchyme hépatique d'un rat femelle du lot traité par el mélange des additifs alimentaires et pesticides DJAx2 associé à l'argile verte (photo originale).

Coloration: HE ; Gr: x 10 (a) ; x 40 (b).

Ce qui concerne le lot traité par le mélange d'additifs alimentaires et pesticides DJAx2 en présence de l'argile verte à 2% dans la nourriture. La figure 5.45 montre une protection importante de l'argile sur l'histologie hépatique, hépatocytes sont préservés avec une absence des hépatocytes nécrosés avec quelques petits foyers d'infiltrats lympho-plasmocytaires et congestion sanguine dans les espaces porte.



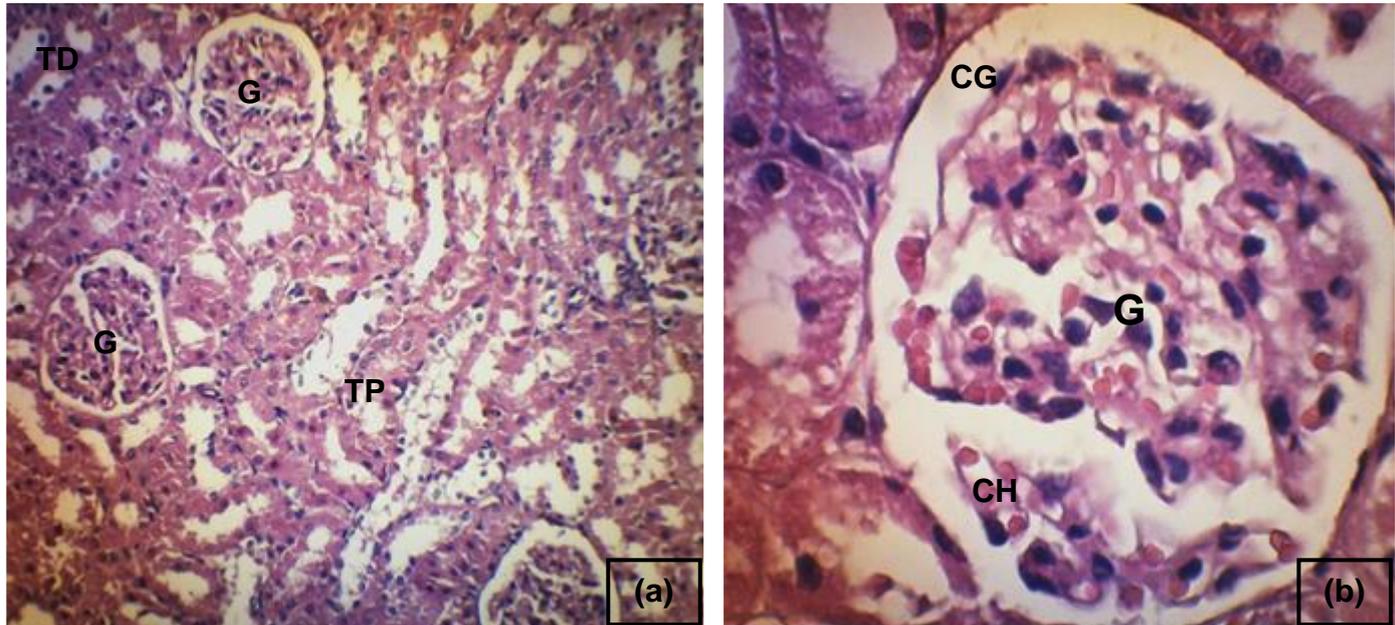
VC : Veine Centrolobulaire ; **HP** : Hépatocyte Protégé.

Figure 5.46 : Histologie du parenchyme hépatique d'un rat femelle du lot traité par le mélange des additifs alimentaires et pesticides DJAx2 associées au psyllium et l'argile verte (photo originale).

Coloration: HE ; Gr: x40 (a, b).

Pour le lot traité par le mélange d'additifs alimentaires et pesticides DJAx2 en présence de l'argile verte et le psyllium dans la nourriture, et d'après la figure 5.46, nous avons noté une très bonne protection de la structure hépatique contre le mélange toxique, les hépatocytes sont très bien protégés avec une absence d'infiltrats leucocytaires et les hépatocytes nécrosés.

L'association de l'argile verte et psyllium montre une meilleure protection de l'histologie hépatique grâce à ces pouvoirs absorbant et adsorbant ainsi que purifiant.

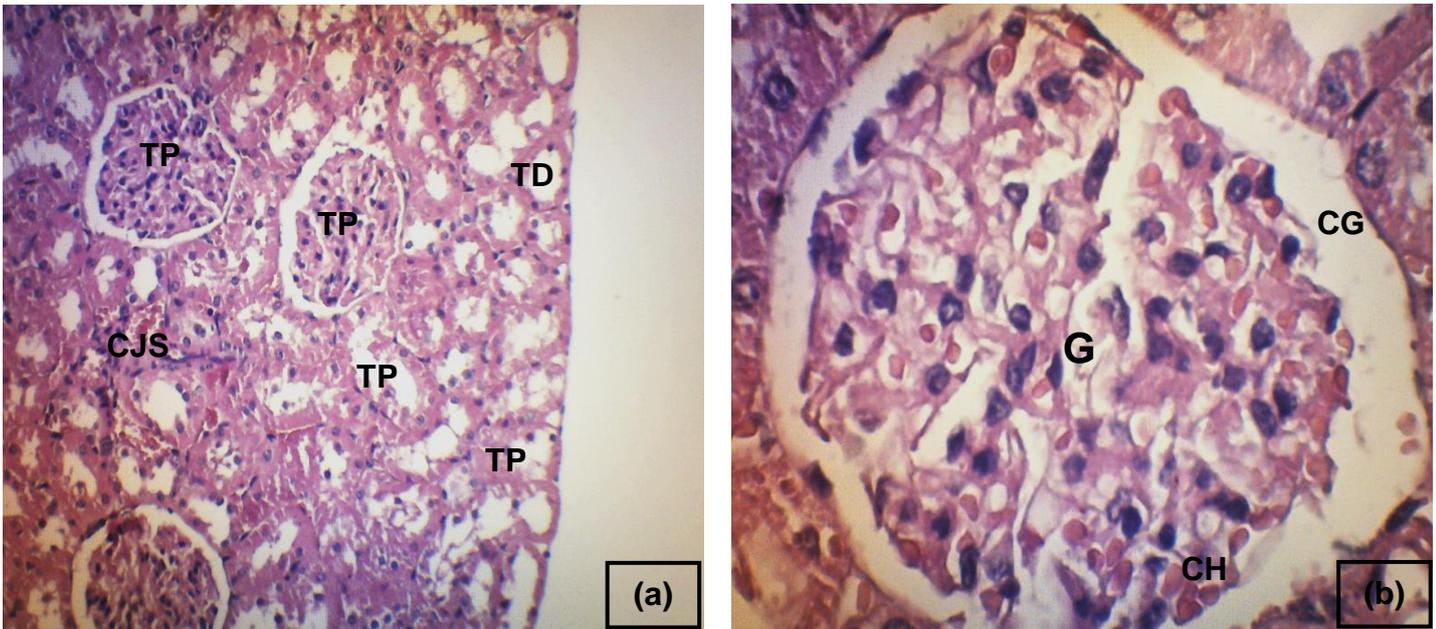


G : Glomérule rénale ; **CG** : Chambre glomérulaire ; **TD** : Tubes Distaux ; **TP** : Tubes Proximaux ; **CH** : Capillaires hémorragiques; **CJS** : Congestion sanguine.

Figure 5.47 : Histologie du parenchyme rénal d'un rat femelle du lot traité par le mélange des additifs alimentaires et pesticides DJAx2 associées au psyllium (photo originale).

Coloration: HE ; Gr: x40 (a) ; x100 (b)

D'après l'illustration de la figure 5.47, l'observation microscopique du parenchyme rénal de rats traités par le mélange d'additifs alimentaires et pesticides DJAx2 en présence du psyllium à 2% dans la nourriture, montre une protection moyenne de l'histologie rénale, les glomérules et les tubes rénaux sont plus au moins protégés avec la présence de quelques foyers d'infiltrats lymphoplasmocytaires, d'atrophie et dilatation des tubes rénaux proximaux et distaux.



G : Glomérule rénale ; **CG** : Chambre glomérulaire ; **TD** : Tubes Distaux ; **TP** : Tubes Proximaux ; **CH** : Capillaires hémorragiques.

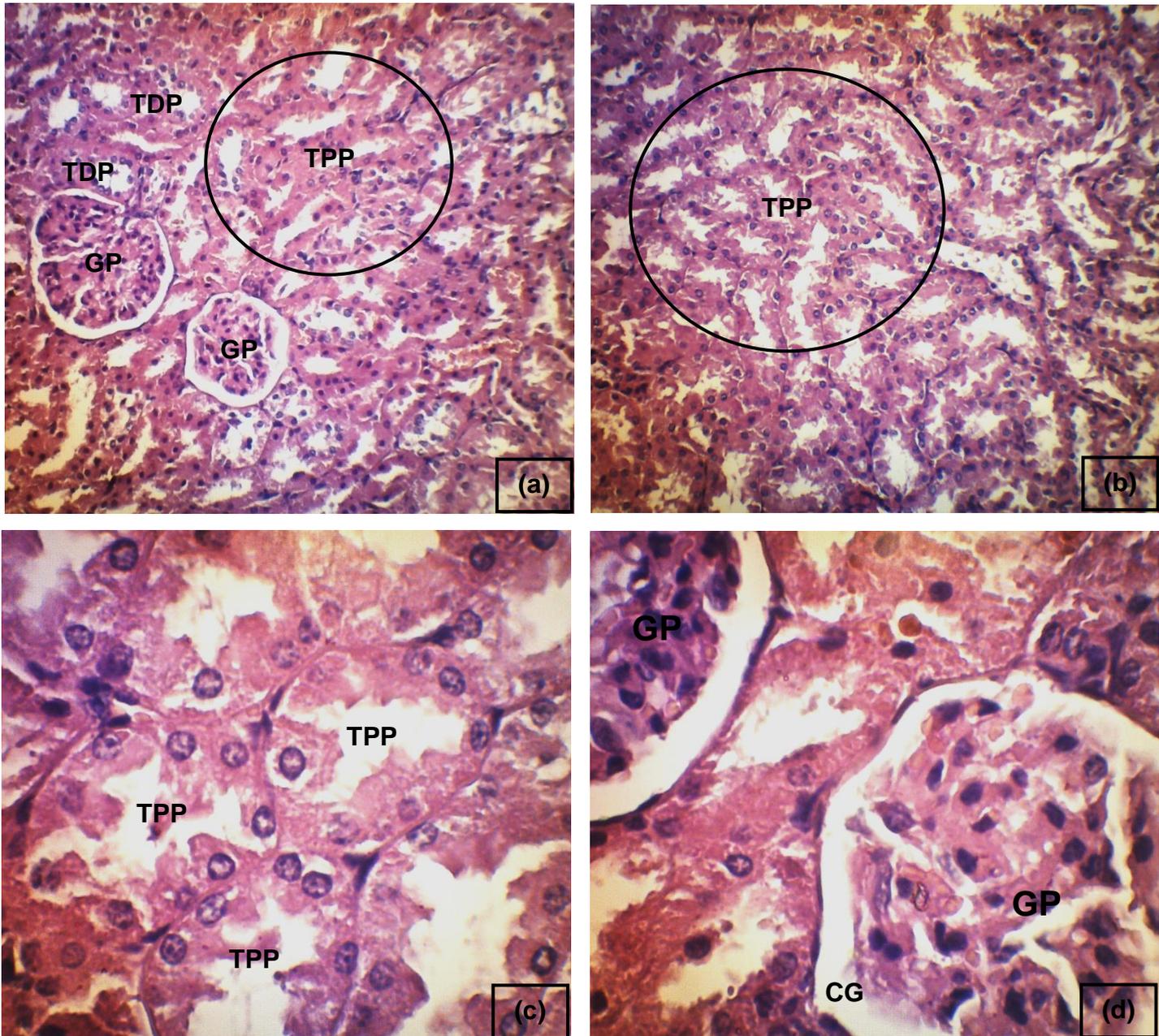
Figure 5.48 : Histologie du parenchyme rénal d'un rat femelle du lot traité par le mélange des additifs alimentaires et pesticides DJA×2 associé à l'argile verte (photo originale).

Coloration: HE ; Gr: ×40 (a) ; ×100 (b).

Ainsi pour les sujets traités par le mélange d'additifs alimentaires et pesticides DJA×2 en présence de l'argile verte à 2% dans la nourriture et selon la figure 5.48, l'argile montre une protection moyenne de l'histologie rénale, les glomérules et les tubes rénaux contournés sont plus au moins protégés avec la présence de quelques zones d'infiltrats lympho-plasmocytaires et d'atrophie et dilatation des tubes rénaux proximaux.

Lorsqu'il s'agit de rats traités par le mélange d'additifs alimentaires et pesticides DJA×2, en présence de l'argile verte et le psyllium dans la nourriture, l'observation microscopique du parenchyme hépatique illustrée sur la figure 5.49 montre d'une façon générale une très bonne protection de l'histologie rénale où les glomérules et les tubes rénaux sont protégés avec une absence d'atrophie des tubes rénaux et quelques zones d'infiltrats leucocytaires.

L'association de l'argile verte et psyllium montre une meilleure protection de l'histologie rénale grâce à ses pouvoirs absorbant, adsorbant et purifiant.



GP : Glomérule Protégé ; **CG** : Chambre glomérulaire ; **TDP** : Tubes Distaux Protégés ;
TPP : Tubes Proximaux Protégés ; **CH** : Capillaires hémorragiques.

Figure 5.49 : Histologie du parenchyme rénal d'un rat femelle du lot traité par le mélange des additifs alimentaires et pesticides DJA×2 associées au psyllium et l'argile verte (photo originale). Coloration : HE ; Gr: ×40 (a, b) ; ×100 (c, d).

Tous les résultats de l'histologie de structure hépatique et rénale sont en bonnes corrélations et confirment les résultats biochimiques de la fonction hépatique et rénale.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Du fait de l'industrialisation galopante, l'Homme se trouve exposé par différentes voies à plusieurs types d'agents toxiques. Parmi ceux hautement toxiques et nuisibles pour la santé ; les pesticides et certains additifs alimentaires. Les agences internationales de réglementation ont fixé des limites d'exposition à ces produits nocifs tels que la DJA qui ne doit pas être dépassée comme étant la dose de sécurité.

Malheureusement, les limites d'exposition réglementaires sont des simulations incomplètes et ne tiennent pas compte de l'exposition réelle des êtres humains à plusieurs substances toxiques en même temps. Par conséquent, le degré de protection réel dans le monde offert par les limites d'exposition réglementaires est jusqu'à ce jour inconnu et pourrait être pratiquement inexistant [245].

Une solution s'ouvre pour l'Homme afin de préserver sa santé, c'est la protection contre la toxicité de ces agents en revenant à la nature et à sa richesse en substances bioactives cachées à l'intérieur de plusieurs organismes vivants. A cet effet, l'argile verte et le psyllium sont parmi les substances naturelles dotées de pouvoirs absorbant, adsorbant et purifiant remarquables et forts intéressants dans le domaine de la nutrition et la santé.

Dans ce contexte précis, cette présente étude concerne la recherche de l'effet protecteur de l'argile verte et/ou psyllium contre la toxicité chronique par voie orale d'un mélange de 7 pesticides et/ou 10 additifs alimentaires sous forme de solutions aqueuses en dose de DJA et DJAx2, pendant 7 mois d'expérimentation sur des rats femelles adultes de la souche Wistar. Les résultats de cette étude nous ont conduits à des conclusions pertinentes :

Une toxicité chronique de mélange des 7 pesticides et/ou 10 additifs alimentaires de la dose DJA qui se considère comme dose limite de sécurité.

Une toxicité chronique par la voie orale des doses DJA et DJAx2 d'un mélange de 7 pesticides et/ou 10 additifs alimentaires qui s'est manifesté chez les rats femelles adultes par :

- ✓ Une diminution du nombre de bactéries du microbiote intestinale jusqu'à 73%.

- ✓ Diminution du temps de transit intestinal (7 %).
- ✓ Installation d'insuffisance rénale qui est un signe de la néphrotoxicité avec une augmentation dans la créatinémie (19,23 %), l'urémie (27,14 %) et du potassium (38,67 %), sauf pour le lot additifs alimentaires DJA.
- ✓ Inflammation du parenchyme rénal et néphrotoxicité, qui se manifeste par une dénaturation des cellules mésangiales des glomérules, glomérules hémorragiques, et atrophie des tubes rénaux, sauf le lot additifs alimentaires DJA.
- ✓ Altération de l'activité hépatique avec une diminution du taux sérique du cholestérol total, les triglycérides, protéines totaux et albumine et augmentation des ASAT, ALAT, PAL, GGT, Bilirubine et fer sérique.
- ✓ Lésions hépatiques avec inflammation, souffrance et dysfonctionnement hépatique avec une désorganisation architecturale du parenchyme hépatique et nécrose généralisée des hépatocytes avec des capillaires hémorragiques et infiltrats leucocytaires, sauf le lot additifs alimentaires DJA.
- ✓ Anémie microcytaire avec une diminution du taux sérique d'hémoglobine (26,52 %), et d'hématocrite (7,47 %), sauf le lot additifs alimentaires DJA.
- ✓ Augmentation du nombre de leucocytes (16,24 %) suite à une réponse immunitaire contre la toxicité du mélange : pesticides et additifs alimentaires.
- ✓ Augmentation du nombre de plaquettes sanguines (50,60 %).
- ✓ Diminution du poids absolu et relatif du foie (24,52 %).
- ✓ L'apparition d'une tumeur maligne sous cutanée de type myosarcome.

Des effets bénéfiques et un effet protecteur produit probablement par l'argile verte et/ou le psyllium contre les effets toxiques des 7 pesticides et/ou 10 additifs alimentaires observés chez les rats femelles d'une façon globale avec une régression significative de la majorité des effets toxiques observés :

- ✓ L'argile seule et combinée au psyllium montre un meilleur effet protecteur par rapport au psyllium.
- ✓ Un effet protecteur et stimulant des bactéries du microbiote intestinal sur tous les Bactériodes jusqu'à 65%.
- ✓ Un effet laxatif très remarquable du psyllium sur le transit digestif.
- ✓ Un effet protecteur sur les reins et l'activité rénale par une diminution de l'altération de l'activité rénale et néphrotoxicité, avec une diminution dans

l'urémie (21,42 %) et la créatinine (23,72 %) et du potassium (30,36 %) sauf le psyllium qui montre une protection faible sur la structure et la fonction rénale.

- ✓ Effet protecteur sur les reins surtout la protection des glomérules rénaux avec une amélioration générale dans l'organisation architecturale du parenchyme rénal, et une diminution de la dénaturation et des cellules mésangiales des glomérules et diminution de l'atrophie des tubes rénaux.
- ✓ Rétablissent des paramètres biochimiques du foie et l'activité hépatique avec : ASAT, ALAT, PAL, GGT, Bilirubine, Fer sérique, protéines totales et albumine jusqu'à 47%.
- ✓ Effet protecteur sur l'histologie du foie, avec une amélioration générale dans l'organisation architecturale du parenchyme hépatique et une diminution de l'inflammation, la congestion sanguine, l'infiltrat leucocytaire et la nécrose hépatocytaire.
- ✓ Diminution de l'anémie microcytaire avec une augmentation du taux d'hémoglobine (23,33 %), et d'hématocrite (7,37 %).
- ✓ Rétablissement du nombre des leucocytes (16,49 %) et les plaquettes sanguines (25,85 %).
- ✓ Absence des tumeurs malignes chez les rats traités par l'argile verte et psyllium.

Des études complémentaires approfondies s'avèrent primordiales afin d'approfondir certains aspects non développés dans notre étude tels que :

- Réalisation d'autres études expérimentales sur des rats Wistar mâles.
- Réalisation d'autres études sur d'autres espèces animales comme les lapins.
- Augmentation des quantités de l'argile verte et le psyllium utilisées pour l'enrichissement de l'aliment des rats jusqu'à 5 %.
- Utilisation d'extraits de différents constituants de psyllium : polysaccharides, lipides, protéines.....etc, pour bien sélectionner l'élément actif.
- Tester l'effet de l'argile verte et le psyllium sur d'autres substances toxiques comme les métaux lourds et l'aflatoxine.
- Réalisation d'études sur l'effet anti-cancer de l'argile verte et le psyllium.

- Réalisation de recherches à-propos de l'effet protecteur de l'argile verte et le psyllium sur le tube digestif déjà cité dans notre étude par des coupes histologiques sur l'estomac et les intestins.
- Réalisation d'une enquête approfondie avec un dosage du mélange de pesticides réel dans les fruits et les légumes largement consommés en Algérie.
- Réalisation d'autres études sur la présence de toxicité en dose DJA pour d'autres mélanges de substances.
- Recherche sur la cinétique de l'effet toxique du mélange : additif, potentialisation, synergie, action coactive et antagonisme.
- Réalisation des essais de culture de la plante de psyllim en Algérie.
- Formulation d'un complément alimentaire à base de l'argile verte et le psyllium blond.

APPENDICES

APPENDICE A

REACTIFS DES ANALYSES PHYSICOCHIMIQUES DE L'EAU

1- Réactifs du pH-mètre

- Solution tampon pH=10 et pH =4.

- Solution H₂So₄ à 0,01N.

2- Réactifs de dosage duCa et Mg

➤ Solution E.D.T.A

- 40 g E.D.T.A

- 5 g Soude caustique

- 1 g Chlorure de Magnésium.

Dissoudre 40 g E.D.T.A, ajouter les 5 g NaOH puis ajuster avec de l'eau distillée 1000 ml. A part, mélanger 1 g de chlorure de magnésium à l'eau distillée et ajuster jusqu'à 1000 mL. Enfin mélanger l'ensemble et y ajouter 8 litres d'eau pour obtenir 10 litres d'E.D.T.A.

➤ Solution Tampon pH=10 (Ca/Mg)

Le Tampon pH=10 est constitué par des mélanges à volume égal des solutions A et B.

▪ Solution A

Peser 67 g de Chlorure d'ammonium préalablement séché 12 heures à l'étuve à 100°C puis refroidi au dessiccateur. Ajouter 400 ml d'Ammoniaque à 28% (448 mL à 25%) et compléter à 1000 ml par de l'eau distillée.

▪ Solution B

Dissoudre à 2 litres d'eau distillée 1,5 Kg environs de Tartrate double de Sodium et de Potassium appelés couramment sels de seignette. Chauffer jusqu'à dissolution totale et ajuster à 2 litre.

➤ Solution de soude

40 g de Soude par litre d'eau distillée.

➤ Indication colore : Poudre colorée

3- Réactifs de dosage de chlorure

➤ Solution Saturée de Thiocyanate Mercurique

Dissoudre 2g Hg (SCN)₂ dans 2 litres d'eau bidistillée.

➤ Solution d'alun ferrique

67 g d'Alunferrique Fe₂(SO₄)₃, NH₄24H₂O

430mL d'acide nitrique concentré

L'eau distillée Q.S.P 1000 mL.

➤ Solution mère de chlorures à 10 g/l

Dissoudre 20,984g de Chlorure de potassium pur préalablement desséché 12 heures à l'étuve à 100°C dans de l'eau distillée, ajuster à 1000 mL.

➤ Solutions étalons

Prendre successivement :

100, 80, 65, 50, 35, 20, 10 et 5 mL de la solution mère de Cl⁻ compléter chaque prélèvement à 1000 mL exactement par de l'eau distillée. On obtient alors des solutions étalons contenant respectivement :

1000, 800, 650, 500, 350, 200, 100 et 50 mg/L en chlorures. Les stocker dans des flacons étiquetés.

4- Réactifs de dosage de Na⁺ et K⁺

➤ Solution mère de sodium et de potassium

Dissoudre dans de l'eau distillée 25,434 g de chlorure de sodium préalablement séché à l'étuve à 100°C pendant 12 heures puis refroidi au dessiccateur.

Dissoudre simultanément 3,823 g de chlorure de potassium préalablement séché à l'étuve à 100°C pendant 12 heures puis refroidi au dessiccateur.

Compléter le tout à 1000 mL par de l'eau distillée.

On obtient une solution contenant 10 000 mg/L en Na⁺ et 2000 mg/l en K⁺.

➤ Solutions étalons en Na⁺ et K⁺

Mettre successivement dans des fioles jaugées à 1000 mL:

50, 40, 30, 20, 15, 10, 5 et 2 mL de la solution mère en Na⁺ et K⁺ compléter à 1000ml par de l'eau distillée.

On obtient des solutions étalons contenant respectivement:

500, 400, 300, 150, 100, 50 et 20 mg/L de Na⁺.

100, 80, 60, 40, 30, 20, 10 et 4mg/L de K⁺.

- Sulfate de Lithium : dissoudre 23.042 g de Lithium sulfate dans 250 mL d'eau distillée.
- Bridj 35 (solution à préparée).
- Eau distillée q.s.p. 100 mL.

APPENDICE B

REACTIFS DES ANALYSES PHYSICOCHEMIQUES DE L'ALIMENT DES RATS

1- Réactifs de dosage des protéines

1 à 2 g de catalyseur.

12,5 mL d'acide sulfurique concentré.

100 mL d'eau distillée.

50 mL de solution NaOH (soude à 47%).

Solution de soude (333 g de NaOH dans 1L d'eau distillée).

20 mL de la solution absorbante (solution d'acide borique et l'indicateur : rouge de méthyle+ vert de bromocrésol).

1 à 2 g de catalyseur.

Acide sulfurique à 0,1 N.

2- Réactifs de dosage de la matière grasse

150 mL d'éther.

Eau distillée.

3- Réactifs de dosage du calcium

40 mL d'acide chlorhydrique.

60 mL d'eau distillée.

Quelques gouttes d'acide nitrique.

20 à 40 mg de solution mère calcium.

1 mL d'acide citrique.

5 mL de solution chlorure d'ammonium.

100 mL l'eau distillé.

Quelques gouttes de solution de vert de bromocrésol.

30 mL de solution d'oxalate d'ammonium chaude.

50 mL d' H₂SO₄ chaude.

Le permanganate de potassium (0,1N).

4- Réactifs de dosage du phosphore

20 mL d'acide sulfurique.

2 mL d'acide nitrique.

1 g de carbonate de calcium.

10 mL d'acide chlorhydrique.

10 mL du réactif vanado-molybdique.

APPENDICE C

REACTIFS DES ANALYSES BIOCHIMIQUES DU SANG

1) Réactifs de dosage de l'Urée

- Le réactif A1 :
 - Salicylates sodique (62 mmol/L).
 - Nitroprussiate sodique (3,4 mmol/L).
 - Tampon phosphate pH=6,9 (20 mmol/L).
- Le réactif A2 :
 - Uréase (>500 mmol/L).
 - Hypochloride sodique (7 mmol/L).
 - Hydroxyde de sodium (150 mmol/L).
- L'étalon d'urée (0,5 g/L)

2) Réactifs de dosage de la Créatinine

- Le réactif A1 : Solution picrate (17,5 mmol/L)
- Le réactif A2 : Hydroxyde de sodium (0,29 mmol/L).
- L'étalon de la créatinine (2 mg/L).

3) Réactifs de dosage de l'Acide urique

- Le réactif 1 (tampon) :
 - Phosphate pH=7,4 (50 mmol/L).
 - 2-4 dichlorophénolsulfonate DCPS (4 mmol/L).
 - Tampon phosphate pH=6,9 (20 mmol/L).
- Le réactif 2 (enzymes) :
 - Uricase (60, 600 U/L).
 - Ascorbate oxydase (200 U/L).
 - 4-6 Aminophénazone 4-AP (150 mmol/L).
- L'étalon de l'acide urique (60 mg/L).

4) Réactifs de dosage du Cholestérol total

➤ Réactif de travail :

- Pipes (35 mmol/L).
- Cholate de sodium (0,5 mmol/L).
- Phénol (28 mmol/L).
- Cholestérol estérase (>0,2 mmol/L).
- Cholestérol oxydase (>0,1 mmol/L).
- Peroxydase (0,8 mmol/L).
- 4-aminoantipyrine (0,8 mmol/L).

➤ L'étalon du cholestérol (200 mg/l).

5) Réactifs de dosage des triglycérides

➤ Le réactif 1 (tampon) :

- Pipes Puffer pH=7,2 (50 mmol/L).
- p-chlorophénol (2 mmol/L).

➤ Le réactif 2 (enzymes) :

- Lipoprotéine lipase (150000 U/L).
- Glycérol kinase GK (800 U/L).
- Glycérol-3-P-oxydase (4000 U/L).
- Peroxydase (440 U/L).
- Amino-4-antipyrine (0,7 mmol/L).
- ATP (0,3 mmol/L).

➤ L'étalon de triglycérides (2,28 mmol/L).

6) Réactifs de dosage de la Bilirubine totale

➤ Réactif 1 :

- Acide sulfanilique (30 mmol/l)
- Acide Chlorhydrique (150 mmol/l)
- Diméthylsulfoxyde (7 mmol/l)

➤ Réactif 2 :

- Acide sulfanilique 30 mmol/l
- Acide chlorhydrique (150 mmol/l)

➤ Réactif 3 : Nitrite de sodium (20 mmol/l)

- Réactif 4 : Standard

7) Réactifs de dosage de calcium

- Réactif 1 Solution tampon : Tampon Alcalin 2-Amino-2-methyl 1-Propanol (500 mmol/l)
- Réactif 2 Solution chromogène : Complexant crésolphtaléine Hydroxy 8 quinolène (0.62 mmol/l), (69 mmol/l)
- Réactif 3 Standard : Standard calcium (10 mg/dl), (100 mg/l), (2.5 mmol/l).

8) Réactifs de dosage de sodium

R1 : Tampon THAM pH 9,0 (5,5 %)

Chélatant (0,15 %)

β -galactosidase (0,01 %)

R2 : Tampon THAM pH 8,8 (0,2 %)

ONPG (0,4 %)

9) Réactifs de dosage de Gamma GT :

- Réactif 1 Solution tampon : Tampon Glycylglycine pH 7,9 à 30°C (150 mmol/l)
- Réactif 2 Substrat : GlupaCarboxy (6 mmol/l)

10) Réactifs de dosage de la phosphatase alcaline

- Réactif 1 Solution tampon : Tampon diéthanolamine pH 9,8 Chlorure de magnésium (1 mmol/l), (0,5 mmol/l)
- Réactif 2 Substrat : Nitrophénylphosphate (10 mmol/l)

11) Réactifs de dosage des protéines totales

- Réactif 1 Réactif alcalin
 - Tartrate de Sodium Potassium (31, 9 mmol/l)
 - Hydroxyde de sodium (0,6 mol/l)
 - Lodure de potassium (30 mmol/l)
- Réactif 2 Réactif de coloration : Sulfate de cuivre (NOCIF) (0,6 mol/l)
- Réactif 3 Standard Albumine bovine (50 g/l), (5 g/dl)

12) Réactifs de dosage de la glycémie

- Réactif 1 : Solution tampon
 - Tampon Tris pH= 7 (100 mmol/l)

- Phénol (0,3 mmol/l)
- Réactif 2 : Enzymes
 - Glucose oxydase (10000 U/l)
 - Peroxydase (1000 U/l)
 - Amino-4-antipyrine (2,6 mmol/l)
- Réactif 3 Standard : Standard Glucose (100 mg/dl),(1 g/l),(5,56 mmol/l).

13) Réactifs de dosage ASAT

- Réactif 1 Solution tampon
 - Tampon Tris pH 7.8 à 30°C (80 mmol/l)
 - L- aspartate (200 mmol/l)
- Réactif 2 : Substrat
 - NADH (0,18 mmol/l)
 - LDH (800 UI/l)
 - MDH (600 UI/l)
 - Oxoglutarate (12 mmol/l)

14) Réactifs de dosage des triglycérides

- Réactif 1 Solution tampon
 - Tampon Tris pH 7.5 à 30°C (100 mmol/l)
 - Alanine (500 mmol/l)
- Réactif 2 : Substrat
 - NADH (0.18 mmol/l)
 - LDH (1200 U/l)
 - Oxoglutarate (15 mmol/l)

15) Réactifs de dosage des triglycérides

- Réactif 1 : Guanidine, HCl Tampon acétate 4,5 (mmol/l) pH 5
- Réactif 2 : Acide ascorbique (40 mmol/l)
- Réactif 3 : Ferrozine (1 mg/l)
- Réactif 4 : Standard (17,9 µmol/l)

16) Réactifs de dosage de l'albumine

- Réactif 1 : Réactif de coloration
 - Vert de bromocrésol (BCG) : (0,14 g/l)
 - Tampon succinate : (75 mmol/l)
 - Brij : (7 ml/l)
- Réactif 2 : Standard : Albumine Bovine : (200 mg/dl),(2 g/l),(5,17 mmol/l).

APPENDICE D

REACTIFS DE L'ETUDE HISTOPATHOLOGIQUE

➤ Réactifs utilisés pour les coupes histologiques

Le formole à 10%

L'alcool éthylique à différentes concentrations : 50°, 70°, 95° et 100°

Le xylène.

L'hématoxyline.

L'Éosine.

L'huile à émersion

La paraffine pure.

APPENDICE E

VERRERIE ET OUTILS UTILISES DANS LE TRAVAIL

- Bouteilles en plastique PET.
- Les béchers: 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml.
- Les fioles: 100 ml, 250 ml, 500 ml.
- Des erlens.
- Ballons en verre.
- Eprouvettes gradues : 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 1000 ml.
- Nacelles métalliques menues de couvercle.
- Creusets en céramiques.
- Le creuset filtrant porosité 4.
- Les matrass de KJELDAHL en verre.
- Entonnoir verre et en plastique.
- Piécette d'eau distillée.
- Pipettes graduées : 5 ml, 10 ml, 20 ml, 25 ml.
- Burette gradue en verre.
- Cartouche à extraction de matière grasse.
- Dispositif de filtration sous vide.
- Fiole conique a filtré.
- Tubes à essais en verre.
- Les tubes de prélèvement sanguin en plastique (hépariné et EDTA).
- Les micropipettes : 1 ml, 2 ml, 5 ml.
- Portoirs des tubes.
- Les lames et les lamelles en verre.
- Les lames de dissection stériles.
- Les peaux de prélèvement d'organes.
- Les cassettes en plastiques pour les bloque des coupes histologiques.

APPENDICE F

FICHE D'ENQUETE SUR LE CHOIX DES PESTICIDES

- Type d'intervenant : Agriculteur Vendeur de produits phytosanitaire
- Région :.....

Classement	Nom de pesticides	Types
1
2
3
4
5
6

APPENDICE G

FICHE D'ENQUETE SUR LE CLASSEMENT DES FRUITS ET LEGUMES SELON DE DEGRE D'UTILISATION DE PESTICIDES

- Type d'intervenant : Agriculteur Vendeur de produits phytosanitaire
- Région :

Fruits	Classement	Légumes	Classement
Raisin	Haricot vert
Pastèque	L'oignon
pomme	Courgette
poire	Carotte
Abricot	Tomate
Pêche	Concombre
Fraise	Poivre vert
melon	Aubergine
Orange	Petit pois
Prune	Salade verte
Le néflier du Japon	Pomme de terre

APPENDICE H

COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE UTILISE EN RECHERCHE MICROBIOLOGIQUES

➤ Gélose ENDO:

- Peptone.....10,0 g
- Lactose.....10,0 g
- Fuchsine basique à 10 % dans l'éthanol4,0 mL
- Hydrogénophosphate de potassium3,5 g
- Sulfite de sodium10,0 g
- Agar.....15,0 g
- pH = 7,5.

➤ Gélose TSI : Pour 1 litre de milieu :

- Extrait autolytique de levure3,0 g
- Extrait de viande3,0 g
- Peptone20,0 g
- Chlorure de sodium5,0 g
- Lactose10,0 g
- Saccharose10,0 g
- Glucose1,0 g
- Thiosulfate de sodium0,3 g
- Citrate de fer (III)0,3 g
- Rouge de phénol 24,0 mg
- Agar agar bactériologique9,0 g

➤ Bouillon Schubert avec cloche :

- Ammonium sulfate 0.4 g
- L-Glutamic acid0.2 g
- Magnesium sulfate0.7 g
- Mannitol7.5 g
- Peptone10 g
- Sodium chloride2 g
- Sodium citrate 0.5 g
- Tryptone10 g
- Tryptophan0.2 g

➤ Géloseslanetz :

- Agar-agar10 g
- Peptone20 g
- Azide de sodium0,4 g
- Glucose2 g
- TTC (chlorure de 2-3-5-triphényl-tétrazolium) 0,1 g
- pH = 7,2

➤ Gélose BEA :

- Peptone.....17,0 g
- Peptone pepsique de viande.....3,0 g
- Extrait de levure.....5,0 g
- Esculine1,0 g
- Citrate de sodium.....1,0 g
- Citrate de fer ammoniacal.....0,5 g
- Bile de bœuf déshydratée.....10,0 g
- Azoture de sodium0,25 g
- Chlorure de sodium.....5,0 g
- Agar.....13,0 g

➤ Gélose viande foie (VF) : Pour 1 L de milieu viande foie

- Base viande foie30,0 g
- Glucose2,0 g
- Agar 6,0 g
- pH = 7,4

➤ Gélose PCA :

- Tryptone5g
- Extrait de levure2,5g
- Glucose1g
- Agar agar bactériologique12g
- pH à 25 °C : 7,0 ± 0,2.

➤ Gélose VRBL :

- Peptone7 g
- Extrait de levure3 g
- Lactose10 g
- Chlorure de sodium5 g
- Mélange sel biliaire1,5 g

- Cristal violet0,002 g
- Rouge neutre0,03 g
- Agar-agar15 g
- Eau distillée 1 000 mL

➤ Gélose Baird-Parker au jaune d'œuf tellurite de potassium :

- Peptone de caséine 10 g
- Extrait de bœuf 5 g
- Extrait de levure 1 g
- Glycine 12 g
- Pyruvate de sodium.....10 g
- Chlorure de lithium5 g
- Émulsion de jaune d'œuf 50 mL
- Tellurite de potassium 100 mg
- Agar20 g
- Ajuster le pH à $6,8 \pm 0,2$ à 25°C .

➤ Gélose Héктоène :

- Protéose-peptone12,0 g
- Extrait de levure3,0 g
- Lactose : critère de différenciation.....12,0 g
- Saccharose : critère de différenciation.....12,0 g
- Salicine : critère de différenciation.....2,0 g
- Citrate de fer III et d'ammonium révélateur d' H_2S1,5 g
- Sels biliaires : inhibiteur.....9,0 g
- Fuchsine acide : inhibiteur.....0,1 g
- Bleu de bromothymol : indicateur de pH.....0,065 g
- Chlorure de sodium : maintien de la pression osmotique....5,0 g
- Thiosulfate de sodium : précurseur d' H_2S5,0 g
- Agar.....14,0 g
- pH = $7,5 \pm 0,2$

➤ Gélose OGA à l'Oxytétracycline :

- Extrait de levure5,0mg/L
- Glucose20,0mg/L
- Agar12,0mg/L
- pH 7,6* ± 0,2 à 25°C
- Oxytétracycline (hydrochlorure)100 mg/L

➤ Gélose EMB :

- Peptone (quelconque)10 g.
- Lactose5 g.
- Saccharose5 g.
- Hydrogénophosphate de potassium 2 g.
- Éosine Y400 mg.
- Bleu de méthylène65 mg.
- Agar13,5 g.

➤ Gélose MRS :

- Peptone.....10,0 g
- Extrait de viande8,0 g
- Extrait de levure4,0 g
- Glucose20,0 g
- Acétate de sodium trihydraté.....5,0 g
- Citrate d'ammonium2,0 g
- Tween 801,0 ml
- Hydrogénophosphate de potassium2,0 g
- Sulfate de magnésium heptahydraté.....0,2 g
- Sulfate de manganèse tétrahydraté.....0,05 g
- Agar10,0 g
- pH = 6,2

➤ Gélose MRS cystéiné :

- Milieu MRS + cystéine à raison de 0,1%
- pH ajuster à 6,4 additionné de 15 µg/ml d'acide nalidixique

➤ Gélose au sang :

- Mélange spécial de peptones23 g
- Amidon.....1 g
- Chlorure de sodium5 g
- Agar.....10 g
- Sang.....50 mL
- Le potentiel hydrogène (pH) est de 7,3.

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

AFSSA : Agence française de sécurité sanitaire et alimentaire.

ASAT : Aspartate Aminotransferase.

ALAT : Alanine transaminase.

ADI : Acceptable Daily Intake.

AA : Additifs Alimentaires.

AESA : Agence de l'Union européenne pour la sécurité aérienne.

Argl : Argile.

BPA : Bonne Pratique Agricole.

BPF : Bonne Pratique de Fabrication.

CEE : Communauté économique européenne.

DSEO : Dose Sans Effet Observable.

DJA : Doses Journalières Admissibles.

DL₅₀ : Dose Létale 50.

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane.

EDTA : Acide Ethylène Diamino Tétra Acétique.

FAO : Food and Agriculture Organization.

FNS : Formule Numération Sanguine.

Gr : Grossissement.

g/ha : Gramme par hectare.

GGT : Gamma Glutamyl Transférase.

HE : Hématoxyline-Eosine.

ISO : Organisation International de Normalisation.

J : Jour.

JECFA : Joint Expert Committee on Food Additives.

JORA : Journal Officiel de la République Algérienne.

LMR : La limite maximale de résidus.

LDL : low-density lipoprotein.

mé/L : Milli-équivalent.

N : Normalité.

NA : Norme Algérienne.

NF : Norme Français.

OMS : Organisation Mondiale de Santé.

PE : Prise d'Essai.

Pest : Pesticides.

Psyl : Psyllium.

PAL : Phosphatase Alcaline.

SIN : System International de Numérisation des Additifs Alimentaires.

SSP : plusieurs espèces.

T : Total.

V : Volume.

US EPA : U.S. Environmental Protection Agency.

UFC : Unité Formant Colonie.

REFERENCES

- [1]. Soubra, L., "Evaluations scientifiques des risques toxiques liés à certaines substances chimiques (additifs alimentaires) et contaminants (mycotoxines), Thèse de Doctorat, l'Institut des Sciences et Industries du vivant et de l'environnement", Agro Paris Tech, (2008), 224 p.
- [2]. Rani L., Thapa K., Kanojia N., Sharma N., Singh S., Grewal AS., Kaushal J., "An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment.", *Journal of Cleaner Production*, V. 283, (2021), 124657.
- [3]. Girard, G., "Résidus de pesticides et protection du consommateur, la détermination des LMR, Directions régionales de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt", (2009).
- [4]. Neghab, M., Jalilian, H., Taheri, S., Tatar, M., Haji Zadeh, Z., "Evaluation of hematological and biochemical parameters of pesticide retailers following occupational exposure to a mixture of pesticides", *Life sciences*, V. 20, (2018), 182-187.
- [5]. Noguerol, A.T., Martalguat, M. and Pagán, M.J., "Developing psyllium fibre gel-based foods: Physicochemical, nutritional, optical and mechanical properties", *Food Hydrocolloids*, V. 122, (2022), 107108.
- [6]. Hamid, Y., Tang, L., Hussain, B., Usman, M., Liu, L., Ulhassan, Z. and Yang, X., "Sepiolite clay: A review of its applications to immobilize toxic metals in contaminated soils and its implications in soil-plant system", *Environmental Technology & Innovation*, V. 23, (2021), 101598.
- [7]. Directive 91/414/EC, CONSLEG: 1991L0414 — 01/01/2004, Office des publications officielles des Communautés européennes, 207p.
- [8]. Devillers, J., Farret, R., Girardin, P., Rivière, J.L. et Soulas, G., "Indicateurs pour évaluer les risques liés à l'utilisation des pesticides", Lavoisier, Tec et Doc, Paris, (2005), 280 p.
- [9]. ACTA., "Index phytosanitaire, Association De Coordination Technique Agricole", 194rue de Bercy, 75595 Paris, (2006).

- [10]. Clavet, R., Barriuso, E., Bedos, C., Benoit, P., Charnay, M.P. et Coquet, Y., "Les pesticides dans le sol conséquences agronomiques et environnementales", France Agricole, Paris, (2005), 625 p.
- [11]. Boland, J., koomen, I., Van lidth, J., Jeude, D.E. et Oudejans, J., "Lespesticide composition, utilisation et risques"Editions Agrodok, (2004),125 p.
- [12]. Zhu, J., Wang, J., Ding, Y., Liu, B. and Xiao, WA., "Systems-level approach for investigating organophosphorus pesticide toxicity", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, V. 149, (2018), 26–35.
- [13]. Abubakar, Y., Tijjani, H., Egbuna, C., Adetunji, C.O., Kala, S., Kryeziu, T.L. and Patrick-Iwuanyanwu,K.C., "Pesticides, History, and Classification of natural Remedies for Pest", *Disease and Weed Control*, (2020),29–42.
- [14]. Ensley S., "Pesticides and Herbicides", Edition *Encyclopedia of Food and Health*, 2nd ed., Vol. 2, (2016), p. 307-310.
- [15]. Karasali, H. and Maragou, N., "Pesticides and Herbicides: Types of Pesticides", *Food and Health*, (2016), p. 319-325.
- [16]. Index phytosanitaire., 2015 "Index des produits phytosanitaires à usage agricole. ALGERIA: Ministère de l'Agriculture, du Développement Rural et de la Pêche", 217 p.
- [17]. JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE N° 74., "Décret exécutif n° 14-366 du 15 décembre 2014 fixant les conditions et les modalités applicables en matière de contaminants tolérés dans les denrées alimentaires".
- [18]. Doumandji, A., "Notions de toxicologie", *Agroscopies volumes 3*, INRAA, Alger, (2009), 168 p.
- [19]. World Health Organization., "The WHO recommended classification of pesticides by hazard. And guidelines to classification", 2009, IPCS, IOMC, WHO, (2010), 78 p.

- [20]. Chubilleau, C., Pubert, M., Comte, J. et Giraudj, J., "Étude écologique du lien entre pesticides et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007", Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement, V. 73, n°3, (2012), 553-554.
- [21]. Baldi, I., Lebailly, P., Jean, S., Rougetet, L., Dulaurent, S. and Marquet, P., "Pesticide contamination of workers in vineyards in France", Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology, V. 16, (2006) ,115-124
- [22]. Kauppinen, T., Toikkanen, J., Pedersen, D., Young, R., Ahrens, W., Boffetta, P., Hansen, J., Kromhout, H., Maqueda Blasco, J., Mirabelli, D., Orsen-Rivera, V., Pannett, B., Plato, N., savela, A., Vincent, R. and Kogevinas, M., "Occupational exposure to carcinogens in the European Union", Occupational and Environmental Medicine, V. 57, (2000),10-18.
- [23]. Gatignol, C. et Etienne, J.C., "Pesticides et santé. Rapport parlementaire", Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques, Rapport n° 2463 de l'Assemblée nationale et n° 421 du Sénat, (avril 2010), 257 p.
- [24]. Coignard, C. et Lorente, C., "Exposition aérienne aux pesticides des populations à proximité de zones agricoles. Bilan et perspectives du programme régional intercire", InVS, (2006), 64 p.
- [25]. Ricoux, C., "Evaluation de l'exposition aérienne aux pesticides de la population générale. Etude en air extérieur dans quatre sites de l'Hérault en 2006", InVS, (2009), 55 p.
- [26]. Coutrelis, N., "La réglementation communautaire sur les pesticides – la mise en marché des produits phytopharmaceutiques", ERA Forum, V. 10, n°2, (2009), 231-240.
- [27]. Martin, A., "La production des saviors sur les pesticides dans la règlementation européenne", sciences de l'environnement, Hors-série 27, (2016).
- [28]. ALGERIE, MINISTER D'AGRICULTURE., "Décretexécutive du 02 Décembre 1995 relative relatif au contrôle des produits phytosanitaires à usage

agricole. Journal officiel de la république algérienne", N° 75 du 13 Décembre (1995), 19-25.

- [29]. ALGERIE, MINISTER DE COMMERCE., "Décret exécutif n° 05-67 du 30 janvier 2005 portant création du comité national du Codex Alimentarius et fixant ses missions et son organisation. Journal officiel de la république algérienne", N° 10 du 06 Février (2005), 4-5.
- [30]. ALGERIE, MINISTER DE COMMERCE., "Décret exécutif n°14-96 du 4 mars 2014 modifiant et complétant le décret exécutif n° 11-125 22 mars 2011 relatif à la qualité de l'eau de consommation humaine", Journal officiel de la république algérienne, N° 13 du 09 Mars (2014), 14-17.
- [31]. Chatterjee, A., Bhattacharya, R., Chatterjee, S. and Saha, N.C., "Acute toxicity of organophosphate pesticide profenofos, pyrethroid pesticide λ cyhalothrin and biopesticide azadirachtin and their sublethal effects on growth and oxidative stress enzymes in benthic oligochaete worm, Tubifex tubifex", Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology, V. 242, (2021), 108943.
- [32]. Wang, L.L., Ding, J.J., Pan, L., Fu, L., Tian, J.H., Cao, D.S. and Ding, X.Q., "Quantitative structure-toxicity relationship model for acute toxicity of organophosphates via multiple administration routes in rats and mice." Journal of Hazardous Materials, V. 401, (2021), 123724.
- [33]. El-Nahhal, I. and El-Nahhal, Y., "Pesticide residues in drinking water, their potential risk to human health and removal options", Journal of Environmental Management, V. 299, (2021), 113611.
- [34]. Rani, L., Thapa, K., Kanojia, N., Sharma, N., Singh, S., Grewal, A.S. and Kaushal, J., "An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment", Journal of Cleaner Production, V. 283, (2021), 124657.
- [35]. Alengebawy, A., Abdelkhalek, S.T., Qureshi, S.R. and Wang, M.Q. "Heavy metals and pesticides toxicity in agricultural soil and plants: Ecological risks and human health implications", Toxics, V. 9, n°3, (2021), 42.

- [36]. Rizzati, V., Briand, O., Guillou, H. and Gamet-Payrastré, L., "Effects of pesticide mixtures in human and animal models: An update of the recent literature", *Chemico-Biological Interactions*, V. 254, (2016), 231–246.
- [37]. Multon, J.L., "Additifs et Auxiliaires de Fabrication dans les IAA". Ed. Tec et Doc, Lavoisier, Paris, (2009), 736 p.
- [38]. Carocho, M., Barreiro, M.F., Morales, P. and Ferreira, I.C., "Adding Molecules to Food, Pros and Cons: A Review on Synthetic and Natural Food Additives", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, V. 13, n°4, (2014), 377–399.
- [39]. Parlement européen et du Conseil., "Règlement (UE) No 231/2012 DE LA COMMISSION du 9 mars 2012 établissant les spécifications des additifs alimentaires énumérés aux annexes II et III du règlement (CE) no 1333/2008. Journal officiel", N° 13 du 22 Mars (2012), 1-282.
- [40]. FAO/ OMS., "Norme générale pour les additifs. Codex alimentarius, CODEX STAN 192-1995", (1995), 2-446.
- [41]. ALGERIE, MINISTER DE COMMERCE., "Décret exécutif n° 12-214 du 15 mai 2012 fixant les conditions et les modalités d'utilisation des additifs alimentaires dans les denrées alimentaires destinées à la consommation humaine Journal officiel de la république algérienne", N° 30 du 16 Mai (2012), P16.
- [42]. El-Wahab, H.M. and Moram, G.S., "Toxic effects of some synthetic food colorants and/or flavor additives on male rats", *Toxicology and Industrial Health*, V. 29, n°2, (2012), 224–232.
- [43]. Ribiere, C., "Edulcorant intenses : Additifs et auxiliaires de fabrication dans les IAA", Ed Technique et Documentation, Lavoisier, Paris, (2002), 327-353.
- [44]. Cox, S., Sandall, A., Smith, L., Rossi, M. and Whelan, K., "Food additive emulsifiers: a review of their role in foods, legislation and classifications, presence in food supply, dietary exposure, and safety assessment", *Nutrition Reviews*, V. 79, n°6, (2021), 726-741.
- [45]. Melethil, S., "Proposed rule: Current good manufacturing practice in manufacturing, packing, or holding dietary ingredients and dietary supplements", *Life Sciences*, V. 78, n°18, (2006), 2049–2053.

- [46]. Parlement européen et du Conseil., "Directive 95/31/CE de la Commission du 5 juillet 1995 établissant des critères de pureté spécifiques pour les édulcorants pouvant être utilisés dans les denrées alimentaires", Journal officiel L 178 du 28 Juillet (1995), p. 1.
- [47]. Parlement européen et du Conseil., "Directive 95/45/CE de la Commission du 26 juillet 1995 établissant des critères de pureté spécifiques pour les colorants pouvant être utilisés dans les denrées alimentaires", Journal officiel N° 226 du 22 Septembre (1995), p. 1.
- [48]. Parlement européen et du Conseil., "Directive 96/77/CE de la Commission du 2 décembre 1996 portant établissement de critères de pureté spécifiques pour les additifs alimentaires autres que les colorants et les édulcorants", Journal officiel N° 339 du 30 Décembre 1996, p. 1.
- [49]. Parlement européen et du Conseil., "Règlement (CE) N° 1331/2008, 1332/2008, 1333/2008, et 1334/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 établissant une procédure d'autorisation uniforme pour les additifs, enzymes et arômes alimentaires", Journal officiel N° 354/16 du 31 Décembre (2008), p. 1.
- [50]. Codex Alimentarius : FAO/ OMS., CODEX STAN 192-1995, "Norme générale pour les additifs alimentaires", CODEX STAN 107, (1981), 1-6.
- [51]. Codex Alimentarius : FAO/ OMS., CODEX STAN 107-1981, "Norme générale codex pour l'étiquetage des additifs alimentaires vendus en tant que tels", CODEX STAN 107, (1981), 1-6.
- [52]. Parent-Massin, D., "Les additifs alimentaires autorisés en charcuterie font-ils courir des risques aux consommateurs?", Cahiers de Nutrition et de Diététique, V. 54, n°5, (2019), 5S28–5S33.
- [53]. Tsatsakis, M., "Toxicological Risk Assessment and Multi-System Health Impacts from Exposure", AP Academic press, Elsevier United States, (2021), 3-12.
- [54]. Buşuricu, F., Schroder, V., Margaritti, D., Nadolu, D. and Anghel, A.H., "Preliminary study regarding sodium benzoate and other food dyes synergic action using BSLA cytotoxicity test", Scientific Papers, Series D, Animal Science, V. 62, n°1, (2019), 410-416.

- [55]. Anbara, H., Sheibani, M.T., Razi, M. and Kian, M., "Insight into the mechanism of aspartame-induced toxicity in male reproductive system following long-term consumption in mice model", *Environmental toxicology*, V. 36, n°2, (2021), 223-237.
- [56]. Tsatsakis, A., Docea, A.O., Constantin, C., Calina, D., Zlatian, O., Nikolouzakis, T.K. and Neagu, M., "Genotoxic, cytotoxic, and cytopathological effects in rats exposed for 18 months to a mixture of 13 chemicals in doses below NOAEL levels", *Toxicology Letters*, V. 316 (2019), 154-170.
- [57]. Motwadie, M.E., Hashem, M.M., Abo-EL-Sooud, K., Abd-Elhakim, Y.M., El-Metwally, A.E. and Ali, H.A., "Modulation of immune functions, inflammatory response, and cytokine production following long-term oral exposure to three food additives; thiabendazole, monosodium glutamate, and brilliant blue in rats", *International Immunopharmacology*, 98, (2021), 107902.
- [58]. Roberts, A., Renwick, A.G., Stannard, D., Myers, D., Pugh, G. and Bhusari, S., "The potential developmental neurotoxicity of calcium cyclamate in CD rats", *Food and Chemical Toxicology*, V. 153, (2021), 112236.
- [59]. Hu, Y., Xie, M. and Wu, X., "Interaction studies of sodium cyclamate with DNA revealed by spectroscopy methods", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, V. 220, (2019), 117085..
- [60]. Caner, L., "Phyllosilicates des sols: de l'altération à la quantification." Habilitation, University of Poitiers, France (2011).
- [61]. Decarreau, A., "Matériaux argileux, structure, propriétés et applications, Edition Masson, Société française de Minéralogie et de Cristallographie et Groupe Français des Argiles, Paris, (1990), 586 p.
- [62]. Dananaj, I., Frankovská, J. and Janotka, I., "The influence of smectite content on microstructure and geotechnical properties of calcium and sodium bentonites", *Applied Clay Science*, V. 28, n°1-4, (2005), 223-232.
- [63]. Demolon, A., (1996) "Principes d'agronomie", Tome 1, Edition Dunod, Paris.

- [64]. Luckham, P.F. and S. Rossi., "The colloidal and rheological properties of bentonite suspensions", *Advances in colloid and interface science*, V. 82, n°1-3, (1999), 43-92.
- [65]. Belkacem Benguella, B. et Yacouta-Nour, A., "Elimination des colorants acides en solution aqueuse par la bentonite et le kaolin", *Comptes Rendus Chimie*, V. 12, n°6-7, (2009), 762-771.
- [66]. Jozja, N., "Étude de matériaux argileux Albanais. Caractérisation "multi-échelle" d'une bentonitemagnésienne. Impact de l'interaction avec le nitrate de plomb sur la perméabilité." Thèse de doctorat de l'Université d'Orléans (2003).
- [67]. Merabet, D. et Belkacemi, H., "Caractérisation minéralogique et chimique du kaolin de Tamazert (Algérie)", *Annales de Chimie Science des Matériaux* V. 28, n°5, (2003), 61-83.
- [68]. Obaje, S.O., Omada, J.I. et Dambatta, U.A., "Clays and their industrial applications", *Synoptic Review, International Journal of Science and Technology*, vol. 3, n°15, (2013), 264-270.
- [69]. M. Segad, M., Jonsson, B., Åkesson, T., Cabane, B., "Ca/Na montmorillonite: structure, forces and swelling properties, *Langmuir*, V. 26 n°8, (2010), 5782-5790.
- [70]. Darcel, C.L., "Aliver, antigen associated with avian erythroblastosis : binding by bentonite and precipitation with sodium dodecyl sulphate", *Canadian Journal of Comparative Medicine*, V. 46, n°1, (1982), 97.
- [71]. M'bodj, O., Ariguib, N. K., Ayadi, M.T. and Magnin, A., "Plastic and elastic properties of the systems interstratified clay–water–electrolyte–xanthan", *Journal of Colloid and Interface Science*, V. 273, n°2, (2004), 675-684.
- [72]. Valášková, M. and Martynkova, G.S., "Vermiculite: structural properties and examples of the use. Clay minerals in nature-their characterization, modification and application", *InTech*, (2012), 209-238.
- [73]. Dixon, J.B., Schulze, D.G., Kohut, C.K. and Warren, C.J., *Chlorites. SSSA Book Series*, (2002).
- [74]. Villieras, F., "Argiles : histoire d'avenir", éditions Récréateurs, dépôt légal, (2009), 144 p.

- [75]. Cousin, N., "Argile : Un concentré de bienfaits pour votre santé, votre beauté et votre maison", éditions Eyrolles, dépôt légal, (avril 2013), 150 p.
- [76]. Adrienne, P., "L'argile, médecine ancestrale de la tradition aux preuves scientifiques", éditions Amirys SPRL, dépôt légal, (2003), 263 p.
- [77]. Chossat, J.C., (2005)"La mesure de la conductivité hydraulique dans les sols. Choix des méthodes". Ed., Lavoisier TEC et DOC, 713 p.
- [78]. LE Pluart, L., "Nanocomposites Epoxyde/amine/montmorillonite : Rôle des interactions sur la formation, la morphologie aux différents niveaux d'échelle et les propriétés mécaniques des réseaux", Thèse de doctorat, Ecole doctorale matériaux de Lyon, (2002).
- [79]. Sposito, G. and Grasso, D., "Electrical double layer structure, forces and fields at the clay-water interface. Surfactant Science Series", V. 85, (1999), 207-249.
- [80]. Vivier S., "Stratégie d'optimisation par la méthode des plans d'expériences et application aux dispositifs électrotechnique modélisés par éléments finis", Thèse de doctorat. Université Lille1 -Sciences et Technologies, (2002).
- [81]. Passebecq, A., "L'argile pour votre santé Applications thérapeutiques et esthétiques. Dictionnaire de naturopathie indiquant les traitements naturels à associer à l'argile", Éditions Dangles, Paris, France, (2006), 126 p.
- [82]. Phillips, T.D., Sarr, A.B. and Grant, P.G., "Selective chemisorption and detoxification of aflatoxins by phyllosilicate clay", Natural toxins, V. 3, n°4, (1995), 204-213.
- [83]. Schell, T.C., Lindemann, M.D., Kornegay, E.T. and Blodgett, D.J., "Effects of feeding aflatoxin contaminated diets with and without clay to weaning and growing pigs on performance, liver function, and mineral metabolism", J. Anim. Sci, V. 71, (1993), 1209-1218.
- [84]. Wang, J.S., Luo, H., Billam, M., Wang, Z., Guan, H., Tang, L., Goldston, T., Afriyie-Gyawu, E., Lovett, C., Griswold, J., Brattin, B., Taylor, R.J., Huebner, H.J. and Phillips, T.D., "Short-term safety evaluation of processed calcium montmorillonite clay (NovaSil) in humans", Food Addit.Contam, V. 22, n°3, (2005), 270-279.
- [85]. Halsted, J.A., "Geophagia in man: its nature and nutritional effects", The American Journal of Clinical Nutrition, V. 21, n°12, (1968), 1384-1393.

- [86]. Phillips, T.D., "Dietary clay in the chemoprevention of aflatoxin-induced disease", *Toxicol Sci*, V. 52, n°2 Suppl, (1999), 118-126.
- [87]. Wu, F. and Khlangwiset, P., "Evaluating the technical feasibility of aflatoxin risk reduction strategies in Africa", *Food Additives and Contaminants*, V. 27, n°5, (2010), 658-676.
- [88]. Phillips, T.D., Afriyie-Gyawu, E., Williams, J., Huebner, H., Ankrah, N.A., Ofori-Adjei, D., Jolly, P., Johnson, N., Taylor, J., Marroquin-Cardona, A., Xu, L., Tang, L. and Wang, J.S., "Reducing human exposure to aflatoxin through the use of clay: a review", *Food additives and contaminants*, V. 25, n°2, (2008), 134-145.
- [89]. Barrientos Velazquez, A.L. and Deng, Y., "Reducing Competition of Pepsin in Aflatoxin Adsorption by Modifying a Smectite with Organic Nutrients", *Toxins*, V. 12, n°1, (2020), 28.
- [90]. Wang, M. and Phillips, T.D., "Potential Applications of Clay-Based Therapy for the Reduction of Pesticide Exposures in Humans and Animals" *Applied Sciences*, V. 9, n°24, (2019), 5325.
- [91]. Theodorou, V., Fioramonti, J., Droy-lefaix, M. T., Plique, O. and Buéno, L., "Protective action of diosmectite treatment on digestive disturbances induced by intestinal anaphylaxis in the guinea pig", *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, V. 8, (1994), 295-299.
- [92]. Droy-Lefaix, M.T., "Intestinal mucosa barrier and smectite", *Revue de Médecine Vétérinaire*, 138, (1987), 411-421.
- [93]. Wang, Q., Wang, Y. and Chen, L., "A green composite hydrogel based on cellulose and clay as efficient absorbent of colored organic effluent", *Carbohydrate polymers*, V. 210, (2019), 314-321.
- [94]. Gonzalez, J.J., Owens, W., Ungaro, P.C., Werk, E.E. and Wentz, P.W., "Clay ingestion: a rare cause of hypokalemia", *Annals of Internal Medicine*, V. 97, n°1, (1982), 65-66.
- [95]. Severance, H.W., Holt, T., Patrone, N.A. and Chapman, L., "Profound muscle weakness and hypokalemia due to clay ingestion", *Southern Medical Journal*, V. 81, n°2, (1988), 272-274.

- [96]. Ashwini, R.M., Monica, R.P. and Deepa, W., "Characterization of psyllium (*Plantago ovata*) polysaccharide and its uses", *Polysaccharides*, (2015), 871-890.
- [97]. Gonçalves, S. and Romano, A., "Ispaghula (*Plantago ovata* Forssk.)", *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*. Academic Press, (2019), 301-306.
- [98]. National Plant Data Center., NRCS, USDA, Baton Rouge, USA, (2000).
- [99]. Monographs on Herbal Drugs of Unani Medicine., "Bait Al-Hikmah, Hamdard Foundation Pakistan and DC & TMD", National Institute of Health, Islamabad, Pakistan, (2003), 435-436.
- [100]. Nadkarni, A.K., "Indian materia medica, Mumbai: Bombay popular prakashan", V. 1, (1982), 980-985.
- [101]. Said, M., "Hamdard Pharmacopoeia of Eastern Medicine", No. 55. South Asia Books, (1970), 411 p.
- [102]. Said, M., "Medicinal Herbal". V. 1, (1996), 194-196.
- [103]. Singh, B., "Psyllium as therapeutic and drug delivery agent", *International journal of pharmaceutics*, V. 334, n°1-2, (2007), 1-14.
- [104]. Devesh, T., Nishat, A. and Tripathi, Y.C., "Phytochemistry and pharmacology of *Plantago ovata*: A natural source of laxative medicine", *World Journal of Pharmaceutical Research*, V. 3, n°9, (2014), 361-372.
- [105]. Bandopadhyay, P.C., "Viscometric investigations in high polymeric acids, acid polysaccharides from *Plantago ovata*", *Journal of Scientific & Industrial Research*, V. 20, (1961), 101-104.
- [106]. Tomoda, M., Yokoi M. and Ishikawa K., "Isolation and characterization of mucous polysaccharide plantago mucilage A from seeds of *Plantago ovata*", *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, V. 299, (1981), 2877-2884.
- [107]. Rao, M.R., Sadaphule, P., Khembete, M., Lunawat, H., Thanki, K. and Gabhe, N., "Characterization of Psyllium (*Plantago ovata*) Polysaccharide and its Use as a Binder in Tablets", *Ind. J. Pharm. Edu. Res*, V. 47, n°2, (2013).
- [108]. Healthcare, T., "PDR for Herbal Medicines", (2007), 990 p.
- [109]. Meena, V.D., Dotania, M.L., Meena, B.P. and Das, H.B., "Isabgol (*Plantago ovata* Forsk.)- A Medicinal Herb: Good Source of Income Generation in Water Scarcity Regions", *Popular Kheti*, V. 3, n°4, (2015), 2-5.

- [110]. Majmudar, H., Mourya, V., Devdhe, S. and Chandak, R., "Pharmaceutical applications of ispaghula husk: mucilage", *Int J Pharm Sci Rev Res*, V. 18, n° 1, (2013), 49-55.
- [111]. Sharma, V. K. and Bhattacharya, A., "Isabgol husk: A herbal remedy for human health", *J. Pharm. Res*, V. 2, (2009), 296-301.
- [112]. Deepak, K., Jyoti, P., Pramendra, K. and Vinit, R., "Psyllium mucilage and its use in pharmaceutical field: An overview.", *Curr Synthetic Sys Biol*, V. 5, n°134, (2017), 2332-0737.
- [113]. Thakur, V.K. and Thakur, M.K., "Recent trends in hydrogels based on psyllium polysaccharide: a review", *Journal of Cleaner Production*, V. 82, (2014), 1-15.
- [114]. Erum, A., Bashir, S., Saghir, S., Tulain, U.R., Saleem, U., Nasir, M. and Hayat malik, M.N., "Acute toxicity studies of a novel excipient arabinoxylan isolated from Ispaghula (*Plantago ovata*) husk", *Drug and Chemical Toxicology*, V. 38, n°3,(2014), 300–305.
- [115]. Bijkerk, C.J., Muris, J.W., Knottnerus, J.A., Hoes, A.W. and Wit, N.J., "Systematic review: the role of different types of fibre in the treatment of irritable bowel syndrome", *Aliment. Pharmacol*, V. 19, (2004), 245-251.
- [116]. Ford, A.C., Talley, N.J., Spiegel, B.M., Foxx-Orenstein, A.E., Schiller, L., Quigley, E.M.M. and Moayyedi, P., "Effect of fibre, antispasmodics, and peppermint oil in the treatment of irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis", *Br. Med. J*, V. 337, (2008), 23-13.
- [117]. Moayyedi, P., Quigley, E.M., Lacy, B.E., Lembo, A.J., Saito, Y.A., Schiller, L.R., Soffer, E.E., Spiegel, B.M.R. and Ford, A.C., "The effect of fiber supplementation on irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis", *Am. J. Gastroenterol*, V. 109, (2014), 1367–1374.
- [118]. Cicero, A.F.G., Derosa, G., Bove, M., Imola, F., Borghi, C. and Gaddi, A.V., "Psyllium improves dyslipidaemia, hyperglycaemia and hypertension, while guar gum reduces body weight more rapidly in patients affected by metabolic syndrome following an AHA Step 2 diet", *Mediterr. J. Metab*, V. 3,(2010), 47–54.
- [119]. Clark, C.A., Gardiner, J., McBurney, M.I., Anderson, S., Weatherspoon, L.J., Henry, D.N. and Hord, G., "Effects of breakfast meal composition on

second meal metabolic responses in adults with type 2 diabetes mellitus", Eur. J. Clin. Nutr., V. 60,(2006), 610–616.

- [120]. Steevens, J.A. and Benson, W.H., "Toxicological interactions of chlorpyrifos and methyl mercury in the amphipod, *Hyaella azteca*", Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology, V. 52, n°2, (1999), 168-177.
- [121]. Berton, T., Mayhoub, F., Chardon, K., Duca, R.C., Lestremau, F., Bach, V. and Tack, K., "Development of an analytical strategy based on LC-MS/MS for the measurement of different classes of pesticides and their metabolites in meconium: Application and characterisation of foetal exposure in France", Environmental Research, V. 132, (2014), 311-320.
- [122]. Rodier, J., "L'analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduelles, eau de mer, chimie, physicochimie, bactériologie, biologie", 7eme édition, Dunod, Paris, (1984), 1365 p.
- [123]. NF V 05-108, 1970 : juillet 1970, Produits de l'agriculture. Produits dérivés des fruits et légumes. Mesure du pH.
- [124]. NA 652, 1994 : Détermination conventionnelle de la teneur en protéines brutes à partir de la teneur en azote, dosée selon KJELDAHL.
- [125]. N A 654, 1994 : Dosage de la matière grasse : méthode d'extraction par solvant organique.
- [126]. N A 653, 1994 : Dosage de calcium par méthode de minéralisation et titration.
- [127]. N A 657, 1994 : Dosage de phosphore par méthode de minéralisation et colorimétrie.
- [128]. ISO 9308, 1990 : Qualité de l'eau : Détermination des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes
- [129]. ISO 9305,1989 : Seamless steel tubes for pressure purposes-Full peripheral ultrasonic testing for the detection of transverse imperfections.
- [130]. ISO 7899, 2000 : Qualité de l'eau- Recherché et dénombrement entérocoques intestinaux.
- [131]. ISO 6461-1, 1986(FR) : Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des spores de micro-organismes anaérobies sulfite-réducteurs (*clostridia*) - Partie 1: Méthode par enrichissement dans un milieu liquide

- [132]. NF 08 010, 1996 : Microbiologie des aliments : Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique. Partie 1: Règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales.
- [133]. NF 08 05, 1991 : NF V 08 05, (1991). Dénombrement de la flore mésophile totale (FMAT).
- [134]. NF ISO 4832, 2006 : V 08-015. Juillet 2006. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour le dénombrement des coliformes. Méthode par comptage des colonies.
- [135]. NF ISO 6888-1, 2004 : NF EN ISO 6888-1/A1 (V 08-014-1/A1). Janvier 2004. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus* et autres espèces). Partie 1 : Technique utilisant le milieu gélosé de Baird-Parker. Amendement 1 : Inclusion des données de fidélité.
- [136]. NF ISO 6579, 2007 : NF EN ISO 6579 (V 08-013). Mars 2007. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche des *Salmonella* spp.
- [137]. NF V 08-059. Novembre 2002 (3ème tirage d'Août 2003). Microbiologie des aliments. Dénombrement des levures et moisissures par comptage des colonies à 25 °C en milieu OGA à l'Oxytétracycline.
- [138]. Official Journal of the European Union Directive 2010/63/EU revising Directive 86/609/EEC on the protection of animals used for scientific purposes was adopted on 22 September 2010. 276/79.
- [139]. Bernard, J. et Reynaud, A., "Les Entérobactéries, systématiques et méthodes de diagnostic", Ed : Techniques et Documentations, Lavoisier, Paris, (2003), 349 p.
- [140]. Guiraud, J.P., "Microbiologie alimentaire", Ed : Dunod, Paris, (1998), 13-520.
- [141]. Philippon, A. et Dubreuil, L., "Cours de bactériologie médicale", Ed : *fa* de médecine, Paris (2007).
- [142]. Diez, M. et Istasse, L., "Fibres alimentaires chez le chien : II. Effets sur la vidange gastrique et le transit gastro-intestinal", *Annales de Médecine Vétérinaire*, V.141, (1997), 25-35.

- [143]. Fiche technique., Dosage de glucose, methode enzymatique (GOD - PAP). Biomagreb, FT Fr 25, (2008).
- [144]. Chaney, A.L. et Marbach, C.P., "Modified reagents for determination of urea and ammonia", Clinical chemistry, V. 8, n°2, (1962), 130-132.
- [145]. Tabacco, A., "Quantitative determination of urea", Clinical chemistry, V. 25, n°2, (1971), 336-337.
- [146]. Bartels, H., et Bohmer, M., "Creatina Cinéticae spectrofotometrica", Clinica Chimica Acta, V. 32 (1971), 81-85.
- [147]. Schultz, A., Kaplan, A. et Mosby, L., "Uric acid", Clin Chem C.V, (1984), 1261-1266.
- [148]. Fossati, P., Dosage de l'acide urique. Clin Chem, (1980), 227-231.
- [149]. Meiattini, F., Prencipe, L., Bardelli, F., Giannini, G. and TarliP., "The 4-hydroxybenzoate/4-aminophenazone chromogenic system used in the enzymic determination of serum cholesterol", Clinical chemistry, V.24, n°12, (1978), 2161-2165.
- [150]. Bucolo, G., "Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes.", Clinical chemistry, V.19, n°5, (1973), 476-482.
- [151]. Fiche technique., Dosage de GOT-ASAT, méthode cinétique IFCC sans phosphate de pyridoxal. Biomagreb, FT Fr 01, (2014).
- [152]. Fiche technique., Dosage de GPT-ALAT, méthode cinétique IFCC sans phosphate de pyridoxal. Biomagreb, FT Fr 01, (2014).
- [153]. Fiche technique., Quantitative determination of Alkaline phosphatase (APL) IVD, p-Nitrophenylphosphatate. Kinetic. DGKC. SPINREACT, Spain, BEIS07-1, (2015).
- [154]. Fiche technique., Dosage de GAMMA GLUTAMYL TRANSFÉRASE, Méthode colorimétrique cinétique IFCC, détermination quantitative de l'activité Gamma Glutamyl transférase, [EC 2.3.2.2] dans le plasma humain. Biomagreb, Tunisie, FT Fr 10, (2015).
- [155]. Fiche technique., BILIRUBINE TOTALE ET DIRECTE, Réactifs pour le dosage quantitatif de la bilirubine totale (accélérateur : DMSO) et dans le plasma humain. Biomagreb, Tunisie, FT Fr 20, (2015).
- [156]. Fiche technique., Dosage des PROTEINES TOTALES, Méthode colorimétrique au Biuret Réactif pour le dosage quantitatif des protéines totales dans le sérum humain. Biomagreb, Tunisie, FT Fr 26, (2016).

- [157]. Fiche technique., Dosage de l'ALBUMINE Méthode colorimétrique BCG Réactif pour le dosage quantitatif de l'albumine dans le plasma humain, SPINREACT, Spain, M11547c-20, (2008).
- [158]. Fiche technique., Dosage de Fer ferrozine et capacité totale de fixation du fer, Biomagreb, Tunisie, FT Fr 49, (2007).
- [159]. Fiche technique., Dosage de Calcium liquicolor, Dosage colorimétrique pour calcium, méthode CPC, Human Gesellschaft, Germany, EY-CA INF 101101 F, (2015).
- [160]. Fiche technique., Dosage de Sodium FS, Réactif de diagnostic in vitro pour la détermination quantitative du sodium dans le sérum ou le plasma sursystèmes photométriques, DiaSys Diagnostic Systems GmbH, 65558 Holzheim, Allemagne, 844 4808 10 03 00, (2019).
- [161]. Fiche technique., Dosage de POTASSIUM-d UV Test, Quantitative determination of Potassium IVD, Store at 2-8°C, INTENDED USE For the quantitative in vitro determination of Potassium in serum and plasma., SPINREACT, Spain, BSIS82-E, (2018).
- [162]. Sysmex Journal International, Vol. 17 N° 2, (2007).
- [163]. Gabe, M., "Techniques histologiques", Masson et cie édition, Paris, (1961), 1-1113.
- [164]. ALGERIE. MINISTER DU COMMERCE., "Décret exécutif n°14-96 du 4 mars 2014 modifiant et complétant le décret exécutif n° 11-125 du 22 mars 2011 relatif à la qualité de l'eau de consommation humaine", Journal officiel de la république algérienne, N° 13 du 09 Mars (2014), 14-17.
- [165]. Baldwin, R.L., Bayne, K.A. and Carl J.D., "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals", 1st ed. Washington, D.C. National Academy Press, (1996), 140 p.
- [166]. Clapp, M.J.L. and Bradbrook, C., "Growth and longevity of rats fed an agar-bound diet", Laboratory Animals, V.16, n°2, (1982), 138-142.
- [167]. Carpenter, J.W. and Kolmstetter, C.M., "Feeding small exotic mammals", Small animal clinical nutrition, Walsworth Publishing Company, Tc (2000), 947-952.
- [168]. Rogers, A.E., Baker, H.J., Lindsey, J.R. and Weisbroth, S.H., "Biology and diseases, The Laboratory Rat", Volume I 1st ed. New York: Academic Press, (1979), 123-147.

- [169]. Rosse D.J., "Alimentation des Rongeurs et Lagomorphes de compagnie", Thèse Médecin Vétérinaire, n°10, (1999), 113 p.
- [170]. Cunliffe-beamer, T.L., The Laboratory Mouse, editor. The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals. 6th ed. Harlow, UK: Longman Scientific and Technical, (1987), 275-295.
- [171]. Neale, R.J., "Coprophagy in iron-deficient rats." *Laboratory Animals* 16.2 (1982): 204-207.
- [172]. Benali, R., Brahmi, S., Mekni, M.A., Raddaoui, A., OUNIS, A., Chadli Dziri, C. et ElMay, M.V., "Evaluation de l'activité antibactérienne de l'argile verte Tunisienne et son effet sur la flore intestinale chez le rat Wistar", *Revue F.S.B XV*, (2017).
- [173]. IFFA, CREDO., "Animaux de laboratoire", Paris, (1990), 19 p.
- [174]. Hrnčirova, L., Machova, V., Trckova, E., Krejsek, J. and Hrnčíř, T., "Food preservatives induce proteobacteria dysbiosis in human-microbiota associated Nod2-deficient mice", *Microorganisms*, V.7, n°10, (2019), 383.
- [175]. Bian, X., Chi, L., Gao, B., Tu, P., Ru, H. and Lu, K., "The artificial sweetener acesulfame potassium affects the gut microbiome and body weight gain in CD-1 mice", *PloS one*, V.12, n°6, (2017), e0178426.
- [176]. Frankenfeld, C.L., Sikaroodi, M., Lamb, E., Shoemaker, S., and Gillevet, P.M., "High-intensity sweetener consumption and gut microbiome content and predicted gene function in a cross-sectional study of adults in the United States", *Annals of epidemiology*, V.25, n°10, (2015), 736-742.
- [177]. Davidson, P.M., Sofos, J.N. and Branen, A.L., "Antimicrobials in food", 3rd edn. CRC Press, New York, (2005), 270 p.
- [178]. Russell, A.D., "Plasmids and bacterial resistance to biocides", *Journal of applied Microbiology*, V. 83, n°2, (1997), 155-165.
- [179]. Sulavik, M.C., Houseweart, C., Cramer, C., Jiwani, N., Murgolo, N., Greene, J., DiDomenico, B., Shaw, K.J., Miller, G.H., Hare, R. and Shimer, G., "Antibiotic susceptibility profiles of Escherichia coli strains lacking multidrug efflux pump genes", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, V. 45, (2001), 1126-1136.
- [180]. Berger-Bächi, B., "Resistance mechanisms of gram-positive bacteria", *International Journal of Medical Microbiology*, V.292, n°1, (2002), 27-35.

- [181]. Saltmarsh, M., Food Safety: Pesticides. Human Nutrition (Third Edition); 2013. 347-352.
- [182]. Ivanovic-Matic, S, Poznanovic, G, Grigorov, I, Dinic, S, Mihailovic, M, Grdovic, N., Uskokovic, A., Martinovic, V., Arambasic, J., Petrovic, M. and Bogojevic, D., "The organophosphate-induced acute-phase response is characterized by synthesis of α 1-acid glycoprotein that exhibits an immunomodulatory effect", Journal of Applied Toxicology: An International Journal, V. 28, n°1, (2008), 63-71.
- [183]. Kamboj, S.S., Kumar, V., Kamboj, A. and Sandhir, R., "Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in rat brain induced by carbofuran exposure", Cellular and molecular neurobiology, V. 28, n°7, (2008), 961-969.
- [184]. Zuryn, S., Kuang, J. and Ebert, P., "Mitochondrial modulation of phosphine toxicity and resistance in *Caenorhabditis elegans*", Toxicological Sciences, V. 102, n°1, (2008), 179-186.
- [185]. Walker, C.H., "Biochemical biomarkers in ecotoxicology-some recent developments", Science of the Total Environment, V. 171, n°1-3, (1995), 189-195.
- [186]. L'Héritier, F., Marques, M., Fauteux, M. and Gaudreau, L., "Defining molecular sensors to assess long-term effects of pesticides on carcinogenesis", International journal of molecular sciences, V. 15, n°9, (2014), 17148-17161.
- [187]. Zhang, Y. H., Xu, D., Liu, J. Q. and Zhao, X. H., "Enhanced degradation of five organophosphorus pesticides in skimmed milk by lactic acid bacteria and its potential relationship with phosphatase production", Food chemistry, V. 164, (2014), 173-178.
- [188]. Jason, P.V., Peta, A.N., Steven, D.M. and Frederic, D.L., "In vitro bioassays reveal that additives are significant contributors to the toxicity of commercial household pesticides", Aquatic Toxicology, V. 199, (2018), 263-268.
- [189]. Hernández, A.F., Parrón, T., Tsatsakis, A.M., Requena, M., Alarcón, R. and López-Guarnido, O., "Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular their relevance to human health", Toxicology, V. 307, (2013), 136-145.
- [190]. Bouberka, Z., Khenifi, A., Sekrane, F., Bettahar, N. and Derriche, Z., "Adsorption of Direct Red 2 on bentonite modified by

- cetyltrimethylammonium bromide", *Chemical engineering journal*, V. 136, n°2-3, (2008) 295-305.
- [191]. Trckova, M., Vondruskova, H., Zraly, Z., Alexa, P., Hamrik, J., Kummer, V., Maskova, J., Mrlik, V., Krizova, K., Slana, I., Leva, L. and Pavlik, I., "The effect of kaolin feeding on efficiency, health status and course of diarrhoeal infections caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains in weaned piglets", *Veterinarni Medicina*, V. 54, n°2, (2009), 47-63.
- [192]. Dextreit, R. et Labbé, P., *L'Argile qui Guérit : Mémento de Médecine Naturelle*, Éditions Vivre en Harmonie, Les poul, France, (1997), 8-15
- [193]. Scimeca, D., *Plantes et microbiote : Troubles digestifs fonctionnels*, édition CREGG laboratoires, France, (2019), 8-27.
- [194]. Liu, H., Xu, L., Zhao, M., Liu, W., Zhang, C. and Zhou, S., "Enantiomer-specific, bifenthrin-induced apoptosis mediated by MAPK signalling pathway in Hep G2 cells", *Toxicology*, V. 261, n°3, (2009), 119-125.
- [195]. Sulabo, R.C., Ju, W.S. and Stein, H.H., 2013, "Amino acid digestibility and concentration of digestible and metabolizable energy in copra meal, palm kernel expellers, and palm kernel meal fed to growing pigs", *Journal of Animal Science*, V. 91, n°3, (2013), 1391-1399.
- [196]. Son, A.R., Hyun, Y., Htoo, J.K. and Kim, B.G., "Amino acid digestibility in copra expellers and palm kernel expellers by growing pigs", *Animal Feed Science and Technology*, V. 187, (2014), 91-97.
- [197]. Holzer, P., "Sensory neurone responses to mucosal noxae in the upper gut: relevance to mucosal integrity and gastrointestinal pain", *Neurogastroenterology & Motility*, V. 14, n°5, (2002), 459-475.
- [198]. Triantafyllou, K., Chang, C. and Pimentel, M., "Methanogens, methane and gastrointestinal motility", *Journal of neurogastroenterology and motility*, V. 20, n°1, (2014), 31.
- [199]. Mima, K., Ogino, S., Nakagawa, S., Sawayama, H., Kinoshita, K., Krashima, R., Ishimoto, T., Imai, K., Iwatsuki, M., Hashimoto, D., Baba, Y., Sakamoto, Y., Yamashita, Y., Yoshida, N., Chikamoto, A., Ishiko, T. and Baba, H., "The role of intestinal bacteria in the development and progression of gastrointestinal tract neoplasms", *Surgical oncology*, V. 26, n°4, (2017), 368-376.

- [200]. Wheater, P.R. et Heath, J.W., Histologie fonctionnelle, Boeck université, 1ere édition, Paris, (2001), 144-335.
- [201]. Hodgson, E., "A Textbook of Modern Toxicology", 3rd ed., John Wiley and Sons, Inc., New Jersey, (2004), 203–211.
- [202]. Bandyopadhyay, U., Das, D. and Banerji, K.R., "Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis", Current science, V. 5, (1999), 658-666.
- [203]. De Boer, W.B., Segal, A., Frost, F.A. and Sterrett, G.F., "Can CD34 discriminate between benign and malignant hepatocytic lesions in fine-needle aspirates and thin core biopsies?", Cancer Cytopathology: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society, V. 90, n°5, (2000), 273-278.
- [204]. Green, T., Toghil, A., Lee, R., Waechter, F., Weber, E., Peffer, R. and Robinson, M., "Thiamethoxam induced mouse liver tumors and their relevance to humans: part 1: mode of action studies in the mouse", Toxicological sciences, V. 86, n°1, (2005), 36-47.
- [205]. Schropp, D.M. and Kovacic, J., "Phosphorus and phosphate metabolism in veterinary patients", Journal of Veterinary Emergency and Critical Care, V. 17, n°2, (2007), 127-134.
- [206]. Andjelkovic, M., Buha Djordjevic, A., Antonijevic, E., Antonijevic, B., Stanic, M., Kotur-Stevuljevic, J. and Bulat, Z., "Toxic effect of acute cadmium and lead exposure in rat blood, liver, and kidney", International journal of environmental research and public health, V. 16, n°2, (2019), 274.
- [207]. Marieb, P., Anatomie et physiologie humaine, 2eme édition de Boeck université, Paris, (2005), 730 p.
- [208]. Cherifi, M., "L'apport de la biochimie au diagnostic clinique". Alger, (2000), 159 p.
- [209]. Femi-Oloye, O.P. Olatunji-Ojo, A.M., Owoloye, A. Adewumi, B. Ibitoye, B.O. Oloye, F.F. and Gbore, F.A., "Effects of simultaneous consumption of food additives on functions and histopathology of Wistar rats Liver", Mc Journal of Biology, V. 16, (2019), 1114-8756
- [210]. Femi-Oloye, O.P., Owoloye, A., Olatunji-Ojo, A.M., Abiodun, A.C., Adewumi, B., Ibitoye, B.O. and Akinwumi, F.O., "Effects of commonly used

food additives on haematological parameters of Wistar rats", *Heliyon* V. 6, n°10, (2020), e05221.

- [211]. Elghazaly, M.M., Hussein, H.K., Abdel Aziz, K.K. and Barakat, A.I., "Adverse effect of mixture of food additives on some biochemical parameters in male albino rats", *Journal of advances in biology*, V. 13, (2020), 2347-6893.
- [212]. Abd-Elhakim, Y.M., Hashem, M.M., Anwar, A., El-Metwally, A.E., Abo-El-Sooud, K., Moustafa, G.G. and Ali, H.A., "Effects of the food additives sodium acid pyrophosphate, sodium acetate, and citric acid on hemato-immunological pathological biomarkers in rats: Relation to PPAR- α , PPAR- γ and $\text{tnf}\alpha$ signaling pathway", *Environmental toxicology and pharmacology*, V. 62, (2018), 98-106.
- [213]. Moeen, S.S., Elhalwagy, M.E. and Ayaz, N.O., "Alterations in oxidative stress and antioxidant in albino rats treated with individual and combined various food additives", *Int. J. Adv. Res. Bio Sci*, V. 5, (2018), 118-123.
- [214]. El-Ezaby, M.M., Abd-El Hamide, N.H., Abd El-Maksoud, M.A., Shaheen, E.M. and Embashi, M.M., "Effect of some food additives on lipid profile, kidney function and liver function of adult male albino rats", *Journal of Basic and Environmental Sciences*, V. 5 (2018), 52-59.
- [215]. Ivanović-Matić, S., Poznanović, G., Grigorov, I., Dinić, S., Mihailović, M., Grdović, N. and Bogojević, D., "The organophosphate-induced acute-phase response is characterized by synthesis of α 1-acid glycoprotein that exhibits an immunomodulatory effect", *Journal of Applied Toxicology*, V. 28, n°1, (2007), 63–71.
- [216]. Kambo, S.S., Kumar, V., Kamboj, A. and Sandhir, R., "Mitochondrial Oxidative Stress and Dysfunction in Rat Brain Induced by Carbofuran Exposure", *Cellular and Molecular Neurobiology*, V. 28, n°7, (2008), 961-969.
- [217]. Armagan, D., Bayram, I.A., Candan, A., Yigit, E., Celik, H.H., Armagan, A.C. and Uguz, A.C., "Effects of pentoxifylline and alpha lipoic acid on methotrexate-induced damage in liver and kidney of rats, *Environ. Toxicol. Pharmacol*, V. 39, n°3, (2015), 1122–1131.

- [218]. Bruno, M., Moore, T., Nesnow, S. and Ge, Y., "Protein Carbonyl Formation in Response to Propiconazole-Induced Oxidative Stress", *Journal of Proteome Research*, V. 8, n°4, (2009), 2070–2078.
- [219]. Attia, AM. and Nasr, HM., "Dimethoate-induced changes in biochemical parameters of experimental rat serum and its neutralization by black seed (*nigella sativa* L.) oil. Slovak", *J Anim Sci*, V. 42, n°2, (2009), 87-94.
- [220]. Yang, J.D., Liu, S.H., Liao, M.H., Chen, R.M., Liu, P.Y. and Ueng, T.H., "Effects of tebuconazole on cytochrome P450 enzymes, oxidative stress, and endocrine disruption in male rats", *Environmental Toxicology*, V. 33, n°8, (2018), 899–907.
- [221]. Celik, I. and Temur, A., "Determination hematotoxic and hepatotoxic effects of trichloroacetic acid at sublethal dosage in rats", *Food and Chemical Toxicology*, V. 47, n°6, (2009), 1324–1326.
- [222]. Chaâbane, M., Koubaa, M., Soudani, N., Elwej, A., Grati, M., Jamoussi, K., Boudawara, T., Chaabouni, S.E. and Zeghal, N., "Nitrariaretusa fruit prevents penconazole-induced kidney injury in adult rats through modulation of oxidative stress and histopathological changes", *Pharm Biol* V. 55, (2017), 1061–1073.
- [223]. Abdel-Wahhab, M.A., Abdel-Azim, S.H. and El-Nekeety, A.A., "Inulacrithmoides extract protect against ochratoxin A-induced oxidative stress, clastogenic and mutagenic alterations in male rats", *Toxicon*, V. 52, (2008), 566–573.
- [224]. Ojha, A. and Srivastava, N., "Redox imbalance in rat tissues exposed with organophosphate pesticides and therapeutic potential of antioxidant vitamins", *Ecotoxicol. Environ. Saf*, V. 75, n°1, (2011), 230-241.
- [225]. Takakura, N., Sanders, P., Fessard, V. and Le Hégarat, L., "In vitro combined cytotoxic effects of pesticide cocktails simultaneously found in the French diet", *Food and Chemical Toxicology*, V. 52, (2013), 153–162.
- [226]. Josse, R., Sharanek, A., Savary, C.C. and Guillouzo, A., "Impact of isomalathion on malathion cytotoxicity and genotoxicity in human HepaRG cells", *Chemico-Biological Interactions*, V. 209, (2014), 68–76.
- [227]. Svingen, T., Ramhøj, L., Mandrup, K., Christiansen, S., Axelstad, M., Vinggaard, A.M. and Hass, U., "Effects on metabolic parameters in young

- rats born with low birth weight after exposure to a mixture of pesticides", *Scientific reports*, V. 8, n°1, (2018), 1-10.
- [228]. Sergievich, A.A., Khoroshikh, P.P., Artemenko, A.F., Zakharenko, A.M., Chaika, V.V., Kodintsev, V.V. and Golokhvast, K.S., "Behavioral impacts of a mixture of six pesticides on rats", *Science of The Total Environment*, V. 727, (2020), 138491.
- [229]. Crépet, A., Héraud, F., Béchaux, C., Gouze, M.E., Pierlot, S., Fastier, A. and Cravedi, J.P., "The PERICLES research program: An integrated approach to characterize the combined effects of mixtures of pesticide residues to which the French population is exposed", *Toxicology*, V. 313, n° 1-2, (2013), 83–93.
- [230]. Savary, C.C., Josse, R., Bruyere, A., Guillet, F., Robin, M.A. and Guillouzo, A., "Interactions of Endosulfan and Methoxychlor Involving CYP3A4 and CYP2B6 in Human HepaRG Cells", *Drug Metabolism and Disposition*, V. 42, n°8, (2014), 1235–1240.
- [231]. Docea, A.O., Gofita, E., Goumenou, M., Calina, D., Rogoveanu, O., Varut, M. and Tsatsakis, A., "Six months exposure to a real life mixture of 13 chemicals' below individual NOAELs induced non monotonic sex-dependent biochemical and redox status changes in rats", *Food and Chemical Toxicology*, V. 115, (2018), 470–481.
- [232]. Gbore, F.A., Adewole, A.M., Oginni, O., Adu, O.A., Akinnubi, T., Ologbonjaye, K.I. and Usaefat, A.K., "Ameliorative Potential of Vitamins on Haematological and Biochemical Profiles of *Clarias gariepinus* Fed Diets Contaminated with Fumonisin B1" *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, V. 8, n°4, (2020), 388-402.
- [233]. Ekanem, A.U., Kwari, H.D., Garba, S.H. and Salami, H.A., "Effect of lead acetate on spleen and blood parameters in albino rats." *IOSR J. Dent. Med. Sci. Ver. I*, V. 14, n°3, (2015), 43-49.
- [234]. Al-Hamdany, A.S., "The effect of lead acetate on histological structure of liver, kidney, spleen and some blood parameters in the white rats *Rattus rattus*," Msc Degree. Dept. biology, Univ. of Babylon. Iraq, (2010).
- [235]. Achukwu, P.U., Ufelle, S.A., Ukaejiofo, E.O., Ejezie, F.E., Nwachukwu, D.N., Nwagha, U.I., Nworie, W.C. and Anyaehie, U.S.B., "The effect of

- potassium bromate on some haematological parameters of wistar rats", Nigerian journal of physiological sciences, V. 24, n°1, (2009).
- [236]. Abbès, S., Ben Salah-Abbès, J., Ouanes, Z., Houas, Z., Othman, O., Bacha, H., Abdel-Wahhab, M.A. and Oueslati, R., "Preventive role of phyllosilicate clay on the immunological and biochemical toxicity of zearalenone in Balb/c mice", International immunopharmacology, V. 6, n°8, (2006), 1251-1258.
- [237]. Abdel-Wahhab, M.A., Hasan, A.M., Aly, S.E. and Mahrous, K.F., "Adsorption of sterigmatocystin by montmorillonite and inhibition of its genotoxicity in the Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*)", Mutation research/genetic toxicology and environmental mutagenesis, V. 582, n°1-2 (2005), 20-27.
- [238]. Crissman, J.W., Goodman, D.G., Hildebrandt, P.K., Maronpot, R.R., Prater, D.A., Riley, J.H., Seaman, W.J. and Thake, D.C., "Best practices guideline: toxicologic histopathology", Toxicologic pathology, V. 32, n°1, (2004), 126-131.
- [239]. Yavasoglu, A., Karaaslan, M.A., Uyanikgil, Y., Sayim, F., Ates, U. and Yavasoglu, N.U., "Toxic effects of anatoxin-a on testes and sperm counts of male mice", Experimental and Toxicologic Pathology, V. 60, n°4-5, (2008), 391-396.
- [240]. Selmanoğlu, G., Karacaoğlu, E., Kılıç, A., Koçkaya, E.A., and Akay, M.T., "Toxicity of food contaminant furan on liver and kidney of growing male rats", Environmental Toxicology, V. 27, n°10, (2011), 613–622.
- [241]. Kobatake, K., Kato, M. and Mita, K., "Advanced testicular cancer associated with life-threatening tumourlysis syndrome and choriocarcinoma syndrome", Canadian Urological Association Journal, V. 9, n°1-2, (2015), 62.
- [242]. Waseem, M., Pandey P., Tomar B., Raisuddin S. and Parvez S., "Ameliorative Action of Curcumin in Cisplatin-mediated Hepatotoxicity: An In Vivo Study in Wistar Rats", Archives of Medical Research, V. 45, n°6, (2014), 462–468.
- [243]. Yamamoto, C., Fujiwara, Y. and Kajja, T., "The biological effects of depolymerized sodium spirulan and sulfated colominic acid on vascular cells are beneficial in preventing atherosclerosis", Journal of Health Science V. 52, (2006), 205-210.

- [244]. Mason, R.P. Walter, M.F. and Mason, P.E., "Effect of oxidative stress on membrane structure: small-angle X-ray diffraction analysis", *Free Radic. Biol. Med*, V. 23, (1997), 419–425.
- [245]. Kostoff, R.N., Goumenou, M. and Tsatsakis, A., "The role of toxic stimuli combinations in determining safe exposure limits", *Toxicology Reports*, V. 5, (2018), 1169-1172.