

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة باجي مختار - عنابة

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR -
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



LABORATOIRE : DE BIOCHIMIE ET DE TOXICOLOGIE ENVIRONNEMENTALE



THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT
En IMMUNOTOXICOLOGIE

THEME

ÉVALUATION DES RISQUES BIOLOGIQUES LIÉS À
L'EXPOSITION AUX ENGRAIS MINÉRAUX NPK :
ÉTUDE HUMAINE ET EXPÉRIMENTATION ANIMALE

Présentée par: M^{me} Sara MENADI

Membres de Jury:

Présidente :	Mme HABBACHI Wafa	Professeur, Université d'Annaba
Directrice de thèse :	Mme BOUMENDJEL Amel	Professeur, Université d'Annaba
Co-directrice de thèse:	Mme BOUBIDI Fatima	Maitre de conférences B, Université d'Annaba
Examinatrice :	Mme BOUAZIZ-TIGHA Nadia	Professeur, Université d'Annaba
Examinatrice :	Mme SLIMANI Soheila	Professeur, Université de Skikda

2024

DÉDICACE



DEDICACE

A mes chers parents Mohamed et Zahia

A mes chères sœurs

A mon mari

A toute ma grande famille

A travers les pages de cette thèse, je souhaite immortaliser ma reconnaissance envers vous.

Votre amour inconditionnel, votre soutien indéfectible et vos encouragements constants ont été les piliers qui ont rendu cette réalisation possible. Cette humble dédicace est une expression sincère de ma gratitude pour votre présence inestimable dans ce voyage académique.



REMERCIEMENTS



Remerciements

Louanges à ALLAH, le miséricordieux qui m'a permis de mener à terme mon projet de thèse.

*Un merci particulier à ma directrice de thèse, Mme **BOUMENDJEL Amel**. Professeur à l'université Badji Mokhtar d'Annaba pour sa guidance éclairée, son expertise inestimable et son dévouement exceptionnel. Ses conseils éclairés ont façonné cette thèse et ma croissance académique. Merci d'avoir partagé votre savoir et d'avoir contribué de manière significative à la réalisation de cette thèse.*

*Mes profonds remerciements vont également à ma co-directrice de thèse Mme **BOUBIDI Fatima**, Maitre de Conférences à l'Université de Badji Mokhtar Annaba, je tiens à vous exprimer ma profonde reconnaissance pour votre engagement exceptionnel tout au long de ce voyage académique. Votre expertise, vos conseils éclairés et votre patience ont été des atouts inestimables.*

Je tiens également à exprimer ma profonde gratitude aux membres de mon jury de soutenance:

*Je remercie vivement Mme **HABBACHI Wafa**, Professeur à l'université de Badji Mokhtar Annaba, qui me fait l'honneur de présider ce jury de soutenance.*

*J'exprime également mes vifs remerciements à Mme **BOUAZIZ-TIGHA NADIA**, Professeur à la faculté de médecine de l'université Badji Mokhtar d'Annaba, pour avoir accepté d'examiner notre travail, ainsi que Mme **SLIMANI SOUHEILA**, Professeur de l'université de Skikda quia non seulement bien voulu examiner ce travail mais aussi quis'est aimablement déplacée jusqu'à Annaba. Je vous suis à toutes sincèrement reconnaissante.*

*Je ne peux clôturer les remerciements de ma thèse sans exprimer ma profonde gratitude envers le Dr. **AISSI Radia**, médecin exerçant chez FERTIAL, pour son soutien indispensable lors de la réalisation de mon travail pratique au sein de l'industrie. Sa contribution a été cruciale pour la réussite de la première partie de ma thèse. Je la remercie pour sa*

collaboration active qui a grandement enrichie mon expérience, ses conseils éclairés et surtout sa disponibilité pendant toute la période de mon stage.

*Je tiens aussi à exprimer ma profonde gratitude aux **Dr. YASSI Fatiha & Dr BELGHARSSA Mohamed Lamine**, tous deux médecins anatomopathologistes au CHU IBN ROCHD d'ANNABA, pour leur disponibilité, leur expertise inestimable et leur soutien déterminant tout au long de la réalisation de la partie histopathologique de ma thèse. Leur contribution dans l'exécution des techniques histologiques et l'interprétation des résultats ont été des atouts majeurs qui ont grandement enrichi la qualité de ma recherche doctorale.*

*En fin, je remercie tous ceux qui ont contribué de prêt ou de loin à la réalisation et la réussite de ma recherche doctorale, en particulier un grand MERCI au **Professeur MESSARAH Mahfoud**, Directeur de notre laboratoire de recherche (Laboratoire de Biochimie et de Toxicologie Environnementale) et adjoint de la post-graduation au niveau de notre département de Biochimie, pour toutes ses contributions scientifiques, logistiques et administratives tout au long de mon parcours de thèse.*



RÉSUMÉS

RÉSUMÉ

Il est certes connu que les engrais chimiques sont des substances qui fournissent aux plantes les éléments nécessaires à leur croissance grâce aux nutriments qu'ils contiennent. Ils renferment principalement le nitrogène, le phosphore et le potassium. Cependant, ils peuvent potentiellement causer des effets nocifs sur la santé humaine. Dans ce contexte, nous avons entrepris notre étude afin d'évaluer les effets potentiellement toxiques des engrais de type NPK 15.15.15 sur les différentes fonctions de l'organisme. Pour ce faire, cette étude a été abordée sous deux angles différents et complémentaires à la fois. Un premier aspect concerne une étude humaine menée sur 40 participants du sexe masculin, et qui appartiennent à deux groupes : groupe exposé de 20 employés, de l'industrie des engrais chimiques FERTIAL (Annaba), sélectionnés aléatoirement, et un groupe témoin (20 participants) qui ne présentent aucune historique d'exposition aux engrais étudiées. Le deuxième volet de notre recherche concerne une expérimentation animale menée sur un total de 24 rats males adultes de la souche Wistar. L'ensemble des animaux a été divisé en 4 groupes. Le premier groupe est un groupe témoin et les autres groupes ont été exposés, pendant 30 minutes quotidiennement durant 28 jours, à des doses croissantes (10 mg/m³, 30 mg/m³, 50 mg/m³ respectivement) d'aérosol du même engrais cité précédemment (NPK 15.15.15). Dans les deux études, plusieurs paramètres ont été évalués (paramètres biochimiques, hématologiques et histo-pathologique). Les résultats concernant la première partie ont montré l'apparition d'une nitriturie, une hématurie ainsi qu'une leucocyturie chez les travailleurs directement exposés à la poussière d'engrais par rapport au groupe témoin. Concernant l'expérimentation animale, nos résultats ont indiqué une augmentation significative ($p \leq 0,05$) du cholestérol total, des marqueurs hépatiques (ASAT, ALAT, PAL) ainsi que des marqueurs de la fonction rénale (urée et créatinine) et ceci chez les rats exposés à la plus forte dose par rapport au groupe témoin. Une augmentation hautement significative ($p \leq 0,01$) des lymphocytes a été détectée chez les rats de ce dernier groupe comparativement au témoin. De même, les globules rouges, l'hémoglobine et l'hématocrite ont été significativement diminués chez les rats traités par la plus forte dose d'engrais. D'autre part, on a noté une diminution significative ($p \leq 0,05$) de la Superoxyde dismutase, au niveau de la plupart des organes clés (foie, poumons et cerveau). L'étude histopathologique a indiqué différentes altérations au niveau de la morphologie de ces organes, illustré principalement par des infiltrations lymphocytaires et des congestions vasculaires. A la lumière de nos résultats on peut conclure que l'exposition aux engrais chimiques NPK 15.15.15 peut entraîner une néphrotoxicité, une hépatotoxicité, une anémie ainsi qu'un état de déséquilibre du système antioxydant qui est considéré comme l'origine de la plupart des maladies.

Mots-clés : Engrais chimiques, NPK 15.15.15, néphrotoxicité, hépatotoxicité, stress oxydatif

[ABSTRACT]

ABSTRACT

It is well known that chemical fertilizers are substances that provide plants with the necessary elements for their growth through the nutrients they contain, mainly nitrogen, phosphorus, and potassium. However, they can potentially have harmful effects on human health. In this context, we conducted a study to assess the potentially toxic effects of NPK 15.15.15 type fertilizers on various functions of the organism.

To achieve this, the study was approached from two different yet complementary angles. The first aspect involves a human study conducted on 40 male participants, divided into two groups: an exposed group of 20 employees from the FERTIAL chemical fertilizer industry (Annaba), randomly selected, and a control group (20 participants) with no history of exposure to the studied fertilizers. The second part of our research involves an animal experiment conducted on a total of 24 adult male Wistar strain rats. All animals were divided into 4 groups. The first group served as a control, while the other groups were exposed, for 30 minutes daily for 28 days, to increasing doses (10 mg/m³, 30 mg/m³, 50 mg/m³ respectively) of aerosol from the aforementioned fertilizer (NPK 15.15.15).

In both studies, several parameters were evaluated (biochemical, hematological, and histopathological). The results from the first part showed the occurrence of nitrituria, hematuria, and leukocyturia in workers directly exposed to fertilizer dust compared to the control group.

Regarding the animal experiment, our results indicated a significant increase ($p \leq 0.05$) in total cholesterol, liver markers (ASAT, ALAT, PAL), and markers of renal function (urea and creatinine) in rats exposed to the highest dose compared to the control group. A highly significant increase ($p \leq 0.01$) in lymphocytes was detected in the rats of this latter group compared to the control. Similarly, red blood cells, hemoglobin, and hematocrit were significantly decreased in rats treated with the highest dose of fertilizer. Furthermore, a significant decrease ($p \leq 0.05$) in Superoxide dismutase was noted in most key organs (liver, lungs, and brain). Histopathological study indicated various alterations in the morphology of these organs, primarily illustrated by lymphocytic infiltrations and vascular congestion.

In light of our results, we can conclude that exposure to NPK 15.15.15 chemical fertilizers can lead to nephrotoxicity, hepatotoxicity, anemia, and an imbalance in the antioxidant system, considered as the origin of most diseases.

Keywords: Chemical fertilizers, NPK 15.15.15, nephrotoxicity, hepatotoxicity, oxidative stress

الملخص

من المعروف أن الأسمدة الكيميائية هي مواد توفّر لنا العناصر الضرورية لنموها من خلال العناصر الغذائية التي تحتوي عليها، وتحديد النيتروجين والفوسفور والبوتاسيوم. ومع ذلك، يمكن أن تسبب هذه الأسمدة آثاراً ضارة على الصحة البشرية. في هذا السياق، أجرينا دراستنا لتقييم التأثيرات السامة المحتملة للأسمدة من نوع 15.15.15 NPK على مختلف وظائف الجسم.

ولتحقيق ذلك، تمت دراستنا بطريقتين مختلفتين وفعاليتين في آن واحد. الجانب الأول يتعلق بدراسة إنسانية أجريت على 40 مشاركاً ذكورياً، تم تقسيمهم إلى مجموعتين: مجموعة معرضة تتألف من 20 موظفاً من صناعة الأسمدة الكيميائية FERTIAL (عنابة)، تم اختيارهم عشوائياً، ومجموعة شاهد (20 مشاركاً) لا تظهر أي سجل تعرض للأسمدة المدروسة. يعنى الجانب الثاني من أبحاثنا تجربة على حيوانات أجريت على مجموعة من 24 جرذاً من الذكور البالغين من سلالة Wistar. تم تقسيم جميع الحيوانات إلى 4 مجموعات. كانت المجموعة الأولى هي مجموعة شاهدة وتعرضت المجموعات الأخرى، لمدة 30 دقيقة يومياً لمدة 28 يوماً، إلى جرعات متزايدة (10 ملغ/م³، 30 ملغ/م³، 150 ملغ/م³ على التوالي) من الرذاذ الناتج عن نفس الأسمدة المذكورة سابقاً (NPK 15.15.15).

في كلتا الدراستين، تم تقييم عدة معايير (البيوكيميائية والهيماتولوجية والنسجية). أظهرت نتائج الجزء الأول ظهور نتائج إيجابية لظهور النيتريتوريا والهيماتوريا والليوكوسيتوريا لدى العمال المعرضين مباشرة لغبار الأسمدة بالمقارنة مع المجموعة الشاهدة.

فيما يتعلق بالتجربة على الحيوانات، أشارت نتائجنا إلى زيادة ملحوظة ($p \leq 0.05$) في الكوليسترول الكلي وعلامات الكبد (PAL، ALAT، ASAT) وعلامات وظيفة الكلى (اليوريا والكرياتينين) في الجرذان المعرضة لأعلى جرعة مقارنة بالمجموعة الشاهدة. كما اكتشفت زيادة ملحوظة جداً ($p \leq 0.01$) في الليمفوسيتات لدى الجرذان في هذه المجموعة مقارنة بالشاهد. بالمثل، انخفضت خلايا الدم الحمراء والهيموغلوبين ونسبة الهيماتوكريت بشكل ملحوظ في الجرذان التي تمت معالجتها بأعلى جرعة من الأسمدة. على جانب آخر، لاحظنا انخفاً ملحوظاً ($p \leq 0.05$) في السوبروكسيد ديسموتيز في معظم الأعضاء الرئيسية (الكبد والرئتين والدماغ). أظهرت الدراسة النسيجية التغييرات المختلفة على مستوى مورفولوجيا هذه الأعضاء، ممثلة أساساً في التسلل المفاوي واحتقان الأوعية الدموية.

نظراً لنتائجنا، يمكننا الاستنتاج بأن التعرض للأسمدة الكيميائية 15.15.15 NPK قد يؤدي إلى النيفروتوكسيسيتي، والهيباتوتوكسيسيتي، والأنيميا، وحالة عدم توازن في الجهاز المضاد للأكسدة، الذي يعتبر مصدراً لمعظم الأمراض.

الكلمات المفتاحية: الأسمدة الكيماوية، 15.15.15 NPK، السمية الكلوية، السمية الكبدية، الإجهاد ألتأكسدي.

***LISTE DES
ABRÉVIATIONS***

[Liste des abréviations]

(NH₄)₂SO₄	Sulfate d'ammonium
•O1	Radical hydroxyle.
238U	Uranium
4-AD	4-aminophénazone
8-OHG	8-hydroxy-guanine
ADP	Adénosine-5-diphosphate
ALAT	Alanine amino-transférase
As	l'arsenic
ASAT	Aspartate amino-transférase
BHT	Burtylhydroxy toléine
BSA	Sérum albumine bovine
Ca(PO₄)₂	Phosphate de calcium
CaCN₂	Cyanamide calcique
CAT	Catalase
DAP	Dihydroxy acétone phosphate
EDTA	Ethylène diamine tétra-acétique
EOA	Espèces Oxygénées Activées
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
FAO	Food and agriculture organization
Fe 2⁺	Fer ferreux
Fe3⁺	Fer ferrique
G3P	Glycérol-3-phosphate
G6PD	Glucose-6 phosphate déshydrogénase
GB	Globules Blancs
GOD	Glucose oxydase
GPO	Glycérol phosphate déhydrogénase
GPx	Glutathion peroxydase

[Liste des abréviations]

GR	Glutathion réductase
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
GST	Glutathion S-transférase
H₂S	Le sulfate d'hydrogène
Hg	Mercure
KCl	Chlorure
KNO₃	Sulfate
LDH	Lactate déshydrogénase
LDL	Lipoprotéines de base densité
LPO	Peroxydes lipidiques
MDA	Malondialdéhyde.
MetHb	La méthémoglobinémie
NaClO	L'hypochlorite
NADH	Adénine dinucléotide hydrogène
NADPH	Nicotinamide dinucléotide phosphate.
NBT	Nitro-bleu tétrazolium
NH₄NO₃	Nitrate d'ammonium
NPK	Nitrate-phosphate-potassium

[Liste des abréviations]

Po 210	Polonium
POD	P-Chlorophénol
SOD	Superoxyde dismutase
SSP	Atelier super simple phosphate
TBA	2-Thiobarbituric acid": L'acide thiobarbiturique
TCA	Trichloroacétique.
TGMH	Teneur globulaire moyenne en hémoglobine
Trx	Thiorédoxine
TrxR	Thiorédoxine réductase
VGM	Volume globulaire moyen des hématies

LISTE DES FIGURES

Liste des tableaux

Figure 1 :	Effets des engrais chimiques sur les propriétés physiques, chimiques et biologiques du sol.....	6
Figure 2 :	Déséquilibre de la balance entre les espèces réactives de l’oxygène et le système antioxydant (Fantaine,2007).....	10
Figure 3 :	Réaction de la peroxydation lipidique (Daun-badouard,2006).....	12
Figure 4 :	Schématisation de la réaction d’oxydation protéique (Bonnefont et colin,2010)	13
Figure 5 :	Domages radicalaires sur la molécule d’ADN (Bonnefont et colin,2010)	13
Figure 6 :	Activités de certains antioxydants non (Adamy et al,2005).....	16
Figure 7 :	Représentation schématique résumant le Protocol d’étude humaine.....	19
Figure 8 :	Représentation schématique des étapes de Protocol de l’étude animale.....	20
Figure 9 :	Zone sud de l’industrie FERTIAL (Photo réelle).....	22
Figure 10 :	Quelques zones de contact direct des travailleurs avec l’engrais NPK 15.15.15 (Photo réelle)	23
Figure 11 :	Engrais NPK 15.15.15 avant et après le broyage (Photo réelle).....	29
Figure 12 :	Fréquence des différents composants chimiques apparient dans les urines des travailleurs par rapport aux témoins.....	49
Figure 13 :	Concentration du glutathion peroxydase au niveau des différents organes (foie, poumons, reins et cerveau).....	56
Figure 14 :	Concentration du superoxyde dismutase au niveau des différents organes (foie, poumons, reins et cerveau).....	57
Figure 15 :	Concentration du glutathion au niveau des différents organes (foie, poumons, reins et cerveau).....	59
Figure 16 :	Concentration du malondyaldehyde au niveau des différents organes (foie, poumons, reins et cerveau).....	60
Figure 17 :	Coupes histologiques du foie des rats traités par différentes doses d’engrais NPK 15.15.15.....	62
Figure 18 :	Coupes histologiques des poumons des rats traités par différentes doses d’engrais NPK 15.15.15.....	63
Figure 19 :	Coupes histologiques des reins des rats traités par différentes doses d’engrais NPK 15.15.15.....	64
Figure 20 :	Coupes histologiques du cerveau des rats traités par différentes doses d’engrais NPK 15.15.15.....	66

LISTE DES TABLEAUX

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Principales espèces réactifs de l'oxygène (Dwassy, 2014)	11
Tableau 2 :	Informations sociodémographiques des travailleurs	45
Tableau 3 :	Détermination des paramètres biochimiques chez le groupe témoin (n=20) et les travailleurs (n=20)	46
Tableau 4 :	Détermination des paramètres hématologiques chez le groupe témoin (n=20) et les travailleurs (n=20)	47
Tableau 5 :	Détermination des paramètres hormonaux chez le groupe témoin (n=20) et les travailleurs (n=20)	48
Tableau 6 :	Détermination des paramètres de stress oxydatif chez le groupe témoin (n=20) et les travailleurs (n=20)	48
Tableau 7 :	Variation de la masse corporelle (g) chez les rats témoins et traités par différentes doses d'engrais NPK 15.15.15.....	50
Tableau 8 :	Variation du poids absolu (PA) (g) et du poids relatif (PR) (%) des différents organes (foie, poumons, reins et cerveau) chez les rats témoins et traités par différentes doses d'engrais NPK 15.15.15.....	51
Tableau 9 :	Variation des paramètres lipidiques chez les rats témoins et traités par différentes doses d'engrais NPK 15.15.15.....	52
Tableau 10 :	Variation des paramètres des bilans rénaux et hépatiques chez les rats témoins et traités par différentes doses d'engrais NPK 15.15.15	53
Tableau 11 :	Variation des paramètres hématologiques chez les rats témoins et traités par différentes doses d'engrais NPK 15.15.15.....	54
Tableau 12 :	Variation des marqueurs enzymatiques (GPx, SOD) de stress oxydatif dans les organes (foie, poumons, reins et cerveau) chez les rats témoins et traités par différentes doses d'engrais NPK 15.15.15.....	55
Tableau 13 :	Variation des marqueurs non enzymatiques (GSH, MDA) de stress oxydatif dans les organes (foie, poumons, reins et cerveau) chez les rats témoins et traités par différentes doses d'engrais NPK 15.15.15.....	58

TABLE DES MATIÈRES

[Table des matières]

DEDICACE

REMERCIEMENTS

RESUME I

ABSTRACT II

المخلص III

LISTE DES ABREVIATIONS..... V

LISTE DES FIGURES..... IX

LISTE DES TABLEAUX XI

TABLE DES MATIERES XIII

INTRODUCTION 1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1. LES ENGRAIS

1.1. Définition des engrais..... 3

1.2. Classification des engrais 3

1.2.1. Engrais organiques..... 3

1.2.2. Engrais chimiques..... 4

1.2.2.1. Engrais simple..... 4

1.2.2.2. Engrais composés 4

1.2.3. Utilisation des engrais..... 5

1.2.4. Effets des engrais sur l'environnement et la santé 5

1.2.4.1. Effets sur l'environnement..... 5

1.2.4.2. Effets sur la santé humaine..... 6

CHAPITRE 2. STRESS OXYDATIF

2.1. Définition du stress oxydatif..... 10

2.2. Les radicaux libres..... 10

2.3. Les espèces réactives de l'oxygène 11

Biomarqueurs du stress oxydatif 11

2.4.1. Peroxydation lipidique..... 11

2.4.2. Oxydation des protéines..... 12

2.4.3. Oxydation de l'ADN..... 13

Système de défense antioxydant..... 14

2.5.1. Système de défense enzymatique 14

2.5.1.1. La Superoxyde dismutase 14

2.5.1.2. La Catalase..... 14

2.5.1.3. Le Glutathion peroxydase..... 14

2.5.1.4. Glutathion S-transférase..... 15

[Table des matières]

2.5.2. Les antioxydants non enzymatiques.....	15
2.5.2.1. Le glutathion	15
2.5.2.2. Les métallothionines.....	15
2.5.2.3. La vitamine A.....	15
2.5.2.4. La vitamine E.....	15
2.5.2.5. La vitamine C.....	16
2.5.2.6. Les oligoéléments	16
2.6. Stress oxydatif et engrais.....	16
PARTIE EXPERIMENTALE	
CHAPITRE 3. MATERIEL ET METHODES	
3.1. Etude humaine.....	19
3.1.1. Zone d'étude.....	21
3.1.2. Population d'étude.....	22
3.1.3. Collecte des échantillons et Protocoles des dosages.....	23
3.2. Etude animale.....	29
3.2.1. Matériel chimique.....	29
3.2.2. Animaux.....	30
3.2.3. Traitement et Protocole expérimentale.....	30
3.2.4. Préparation des homogénats de tissus.....	31
3.2.5. Dosage des paramètres biochimiques au niveau du sang.....	31
3.2.6. Dosage des paramètres hématologiques.....	40
3.2.7. Dosage des paramètres de stress oxydatif dans les organes clés.....	41
3.2.8. Etude histologique.....	42
3.2.9. Traitement statistique des résultats.....	42
CHAPITRE 4. RESULTATS ET DISCUSSION	
4.1. RESULTATS.....	44
4.1.1. ETUDE HUMAINE.....	44
4.1.1.1. Caractéristique sociodémographique	44
4.1.1.2. Paramètres biochimiques.....	45
4.1.1.3. Paramètres hématologiques.....	47
4.1.1.4. Paramètres hormonaux.....	48
4.1.1.5. Paramètres de stress oxydatif.....	48
4.1.1.6. Chimie des urines.....	49
4.1.2. Expérimentation animale	50
4.1.2.1. Effet du traitement sur le poids corporel des rats.....	50
4.1.2.2. Effet du traitement sur le poids absolu et relatif des organes.....	50

[Table des matières]

4.1.2.3. Analyse biochimiques	51
4.1.2.4. Paramètres hématologiques.....	53
4.1.2.5. Paramètres de stress oxydatif	54
4.1.2.5.1. Paramètres enzymatiques	54
4.1.2.5.2. Paramètres non enzymatiques	57
4.1.2.6. Etude histologique.....	61
4.2. DISCUSSION	67
4.2.1. Etude humaine.....	67
4.2.2. Etude animale.....	72
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	
PRODUCTION SCIENTIFIQUE	

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'industrie agricole joue aujourd'hui un rôle important dans la survie de la population mondiale. Cependant, sachant que la croissance démographique mondiale est en augmentation perpétuelle, passant d'environ 7,8 milliards de personnes en 2020 à 9,8 milliards en 2050, la demande alimentaire mondiale continuera à croître au cours des prochaines décennies avec des défis concomitants pour une offre agricole durable (**Conijn et al., 2018; Gouel et Guimbard, 2019**). Dans le but de rendre l'industrie agricole plus efficace, en terme de quantité, différentes innovations scientifiques ne cessent de se développer, telle que le concept de la « révolution verte » qui a entraîné une augmentation importante du rendement agricole, mais aussi a augmenté l'utilisation des engrais synthétiques dans l'agriculture (**Savci, 2012 ; Sharma et Shetani, 2017**). Selon leurs compositions, on distingue deux classes principales d'engrais. D'une part, les engrais organiques qui sont dérivés des résidus organiques, des poissons, des nourritures, ainsi que de fumier (**Tahat et al., 2020**). D'autre part, les engrais minéraux ou également engrais chimiques sont principalement constitués de sels de nitrate, d'ammonium, de phosphate et de potassium (**Aoun et al., 2010**). Parmi ces derniers, l'engrais composé tertiaire (Nitrate, Phosphore, Potassium) décrit sous les symboles NPK qui représente l'engrais minéral le plus économique, le plus équilibré et le plus efficace en agriculture. Comme tous les engrais apportant aux plantes les nutriments nécessaires à leurs croissances, l'engrais NPK sert à assurer un rendement agricole optimal et son efficacité dans l'amélioration de la croissance des plantes et l'augmentation de la production agricole est très importante (**Maurya et al., 2016**). Cependant, l'utilisation exagérée de cet engrais comme tout type d'engrais minéraux est devenue une source de pollution potentielle qui peut provoquer une pollution environnementale avec des effets indésirables sur les organismes vivants (**Kumar et al., 2017**). Il a été estimé qu'environ 50% des engrais collés à la terre et les eaux souterraines ont démontré leurs effets néfastes sur la santé humaine. En effet, les éléments nuisibles contenus dans les engrais chimiques peuvent engendrer, même durant les expositions de courtes durées, des cas d'intoxication aigüe allant jusqu'à l'insuffisance rénale, l'hyperkaliémie et la méthémoglobinémie ainsi que plusieurs autres pathologies comme la dépression, l'insomnie, l'automatisme oral, la myoclonie et l'hyperreflexie (**Kumar et al., 2017; Gandhi et al., 2022 ; Nganchamung et al. 2017 ; Ajmal et al. 2018**). Plusieurs études précédentes menées à travers le monde ont également rapporté un effet tératogène chez des agriculteurs exposés aux engrais minéraux et qui ont donné naissance à des enfants avec des

malformations des membres (Sutton et al., 2012 ; Wong et al., 2022). De plus, durant l'industrialisation de ces engrais chimiques, les travailleurs peuvent être exposés à plusieurs accidents professionnels (Khan et al., 2006 ; Kamel et al., 2017). Des allergies cutanées associées à l'exposition professionnelle aux engrais ont été rapportées. Une diminution de la fonction pulmonaire a été observée chez les travailleurs d'une industrie agricole des engrais chimiques (Wang et al., 2022).

Dans ce contexte, notre présente étude a été réalisée dans le but d'évaluer les effets nocifs de l'exposition aux engrais minéraux de type NPK 15.15.15 sur différents paramètres, essentiellement les biomarqueurs du stress oxydatif et ce au niveau de plusieurs compartiments ou systèmes biologiques. Pour ce faire, notre thèse a été divisée en deux parties :

- L'une concernant les données de la littérature en lien avec les engrais d'une façon générale et l'engrais NPK d'une façon particulière. Un deuxième chapitre sur le stress oxydatif nous a semblé capital afin de comprendre et interpréter au mieux les résultats de nos expérimentations.
- La deuxième partie pratique de notre thèse, a également été divisée en deux parties distinctes mais complémentaires. En effet, nous avons commencé par une étude humaine ciblant une population de travailleurs employés dans l'industrie agricole FERTIAL (située à Annaba) commercialisant ce type d'engrais. Ainsi, l'évaluation de quelques paramètres biologiques sanguins et urinaires accompagnés par l'analyse d'un questionnaire clinico-socio-démographique ont été comparés à une population témoin. Par la suite, nous avons récupéré l'engrais NPK qui a été aimablement fourni par l'entreprise FERTIAL et nous avons jugé utile d'entreprendre une étude d'impact de cet engrais dans un modèle animal chez des rats de la souche Wistar. Ainsi, simulant l'inhalation par aérosol de la poussière de NPK 15.15.15 à différentes doses, nous avons évalué in vivo la toxicité par l'analyse de divers paramètres biologiques, notamment ceux du stress oxydatif, confortés par l'étude histopathologique et validés par l'étude statistique. Durant notre recherche nous avons visé les objectifs suivants:

Objectif général: étudier les effets des engrais NPK 15.15.15 chez les travailleurs exposés et les rats de la souche Wistar

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1
LES ENGRAIS

Définition des engrais

Les engrais englobent l'ensemble des substances fertilisantes répandues sur la surface des sols dans le but de fournir aux plantes les éléments essentiels à la constitution de leurs tissus (Elouardi et al., 2022) et de leur fournir les nutriments nécessaires à leur croissance. Généralement incorporés directement dans le sol, ils peuvent également être transportés par le biais des eaux d'irrigation (Hery et al., 2021). Selon la FAO (2003), tout produit contenant au moins 5% ou plus des trois principaux éléments nutritifs des plantes (azote, phosphore, potassium), qu'il soit d'origine naturelle ou fabriqué, est qualifié d'engrais (Ayoub et al., 2023). Les engrais renferment également des "micronutriments" tels que le fer, le bore, le cuivre, le manganèse et le zinc, ainsi que des métaux lourds comme l'arsenic, le cadmium et le chrome (Gorman et al., 2013). En fonction de leur origine, on distingue deux types d'engrais: les engrais organiques et les engrais inorganiques (chimiques).

Classification des engrais

Engrais organiques

Les engrais organiques, comme leur nom l'indique, proviennent de matières "organiques" et englobent des éléments naturels tels que les déchets animaux (fumiers bovins, lisiers bovins, porcins ou de volaille), les résidus de cultures tels que les feuilles et les tiges, les composts, ainsi que de nombreux autres sous-produits d'organismes vivants (poils, plumes, sang, etc.). Ces engrais représentent la forme la plus ancienne d'engrais et sont utilisés depuis des centaines, voire des milliers d'années, pour améliorer le rendement ou l'état des plantes agricoles. Ils sont moins riches en éléments nutritifs que les engrais inorganiques commerciaux, nécessitant ainsi l'application d'un volume plus important d'engrais pour répondre aux besoins des cultures en éléments nutritifs (Hellali et al., 2022). Les engrais organiques, en tant qu'engrais à "large spectre", fournissent toute une gamme d'éléments nutritifs à la plante en une seule application, nécessitant que la matière organique se décompose pour permettre la libération des nutriments dans le sol.

Parmi les engrais organiques, on distingue ceux qui sont solides ou en poudre tel que les fientes déshydratées et la poudre d'algues marines, ainsi que ceux qui sont liquides tels que le jus d'algue et les purins (Loiseau, 2019).

Les engrais chimiques

Les engrais inorganiques, aussi appelés engrais minéraux ou chimiques, proviennent principalement de sources non vivantes ou de processus artificiels. Ils ont généralement une concentration élevée de quelques éléments nutritifs, strictement contrôlée (**Hellali et al., 2022**). Ces engrais agricoles se présentent souvent sous forme de granulés sphériques de 2 à 3 mm de diamètre, épanchés mécaniquement par gravité ou à l'aide d'appareils centrifuges ou pneumatiques générant des poussières.

Les principaux constituants des engrais minéraux sont :

- **Azote (N)**: Nitrate d'ammonium ou ammonitrate (NH_4NO_3), sulfate d'ammonium [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$], urée, ammoniac liquéfié, etc.
- **Phosphore (P)**: Phosphate de calcium [$\text{Ca}(\text{PO}_4)_2$], superphosphates issus du traitement des phosphates de roche naturels, scories, Thomas de sidérurgie, acide phosphorique, etc.
- **Potassium (K)**: Chlorure, nitrate et sulfate de potassium (KCl , KNO_3 et K_2SO_4).

D'autres compositions sont disponibles pour répondre aux besoins spécifiques de chaque type de sol et de culture. Certaines formulations d'engrais prêts à l'emploi peuvent également contenir de la cyanamide calcique (CaCN_2), souvent considérée comme un amendement du sol. Les engrais chimiques utilisés en agriculture peuvent être simples ou composés.

Engrais simples

Le type le plus fréquent des engrais simples est le type NPK (N : azote ; P: phosphore; K: potassium). Mais ils peuvent aussi être à base de calcium (CA), de magnésium (M) ou de soufre (S); Un engrais granulé NPK typique contient 15 à 20 % d'ammonitrate, 8 à 10 % d'anhydride phosphorique sous forme de phosphates d'ammonium et bicalcique, 5 à 15 % d'oxyde de potassium (**Loiseau, 2019**).

Engrais composés

Ils d'agit des engrais qui se composent de deux ou trois éléments, identifiables par des formules affichées sur les emballages tels que NK, NP, PK ou NPK. Chacun de ces engrais peut avoir des effets variables en fonction des situations et des types de cultures (**Hellali et al., 2022**).

Utilisation des engrais

- **Enrichissement du sol et stimulation de la croissance des plantes:** Dans un contexte où les terres cultivables se réduisent, les plantes épuisent les nutriments du sol au fil du temps. Les engrais, riches en azote et en potassium, fournissent les ressources nécessaires pour maintenir la fertilité des sols, favorisant ainsi le développement optimal des plantes en leur fournissant les éléments essentiels à leur développement, assurant ainsi une croissance saine.
- **Accroissement du rendement:** Avec la diminution des terres cultivables, les agriculteurs cherchent à maximiser leurs rendements. Chaque composant de base présent dans les engrais a un impact positif immédiat sur la croissance et le rendement des plantes:
 - L'azote accélère la synthèse des acides nucléiques, des acides aminés, des protéines et de la chlorophylle, favorisant une croissance rapide.
 - Le phosphore renforce la résistance des plantes et contribue au développement des racines.
 - Le potassium stimule la floraison et le développement des fruits (**Hellali et al., 2022**).

Effet des engrais sur l'environnement et la santé

Effet sur l'environnement

- Effet sur le sol:

L'impact des engrais chimiques sur le sol ne se manifeste pas immédiatement, mais plutôt à long terme. Avec le temps, l'équilibre naturel des éléments et le pH du sol sont perturbés, et l'accumulation de produits chimiques toxiques entraîne une contamination de la chaîne alimentaire. Cette situation est souvent due à l'utilisation d'engrais contenant des niveaux élevés de sodium et de potassium. La fertilisation acide peut conduire à un chaulage, provoquant un déséquilibre dans la fixation symbiotique de l'azote (**Bünemann et al., 2006**)(Figure 1).

- Pollution de l'eau

L'utilisation excessive des engrais pourrait être à l'origine de la contamination des eaux de surface et souterraines. Selon les estimations faites dans des conditions idéales, environ 2 à 10 % des engrais peuvent interférer avec les eaux de surface et souterraines (**Conley et al., 2009**). La pollution engendrée par l'azote peut se produire de trois manières, à savoir le drainage, le lessivage et l'écoulement. Une fois que l'engrais atteint les profondeurs du sol, il

est converti en nitrates par nitrification grâce aux micro-organismes. Ces nitrates se dirigent ensuite vers la nappe phréatique (Morakinyo et al., 2013).

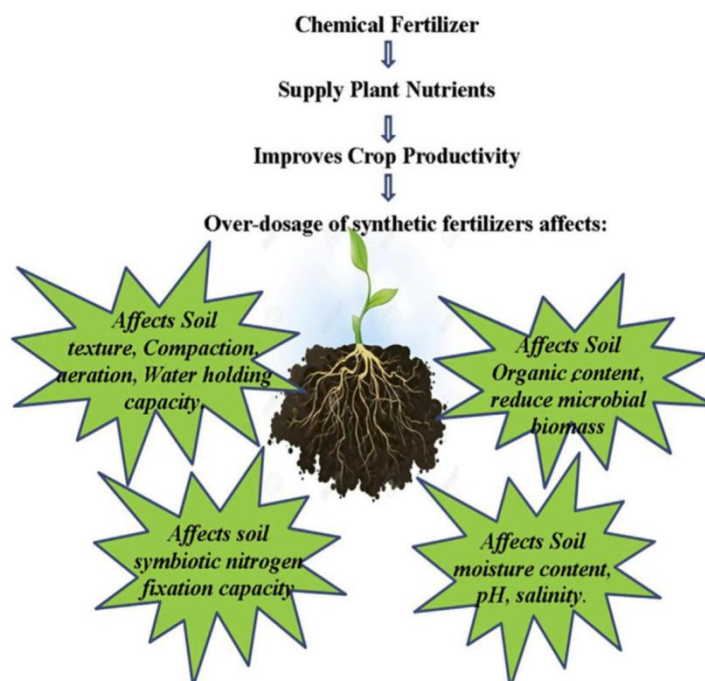


Figure 1: Effet des engrais chimiques sur les propriétés physique, chimiques et biologiques du sol

- Pollution de l'atmosphère

L'utilisation excessive d'engrais génère des oxydes d'azote qui sont libérés dans l'atmosphère. Ces composés subissent ensuite des transformations en d'autres substances nocives telles que le dioxyde de carbone, le méthane, la vapeur d'eau ainsi que le sulfure d'hydrogène (H₂S) et des hydrocarbures chlorofluorés comme les gaz halons. L'évaporation de l'ammoniac (NH₃) se produit à partir de sols alcalins traités avec des engrais à base d'ammonium, pouvant éventuellement causer des pluies acides après des réactions chimiques, provoquant des dommages aux animaux et à la végétation (Shaviv, 2000 ; Sommer et al., 2004).

Effet des engrais sur la santé humaine

L'exposition aux divers types d'engrais est liée à plusieurs pathologies, engendrant des effets à court terme tels que les intoxications aiguës, ainsi que des effets à long terme sous forme d'intoxication chronique.

- Effets à court terme (toxicité aiguë)

L'utilisation inappropriée des engrais pourrait être associée à des intoxications aiguës, dans ce type d'intoxication, L'exposition se fait principalement par voie respiratoire ou cutanéomuqueuse. Les symptômes courants résultant de l'exposition aux engrais incluent: nausées et vomissements, diarrhée, hypertension ou hypotension, parfois accompagnées de tachycardie, irritations oculaires et/ou cutanées, fatigue et perte d'appétit (**Hellali et al.,2022**).

- Effets à long terme (toxicité chronique)

Une toxicité chronique pourrait avoir lieu suite à une exposition chronique aux engrais résiduels, ce risque étant lié à la formation des nitrites à partir des nitrates. Cette réduction des nitrates en nitrites est effectuée par des bactéries possédant une activité nitrate réductase, entraînant plusieurs pathologies fréquentes, notamment La méthémoglobinémie(**Piazza et al., 2014**).

□ La méthémoglobinémie

Dans une hémoglobine normale, le fer ferreux (Fe_2^+) assure la fixation de l'oxygène, facilitant ainsi la formation d'une liaison entre les molécules de l'hème et la globine. La méthémoglobinémie (MetHb) représente une destruction de la structure de l'hémoglobine au cours de laquelle, l'ion ferreux (Fe_2^+) subit une oxydation pour devenir ferrique (Fe_3^+). Ce dernier ne peut pas établir la liaison avec l'oxygène, et de plus, cela modifie l'affinité de l'oxygène, entraînant un déplacement vers la gauche de la courbe de dissociation de l'hémoglobine. Cette configuration induit l'apparition d'une anémie fonctionnelle avec une diminution de l'oxygénation des tissus.

Deux types de méthémoglobinémie distingués: le type congénital ou bien acquis. La forme congénitale est rare, son incidence est inconnue. Par contre, la forme acquise est plus couramment distingué, apparaissant suite aux expositions aux substances oxydantes exogènes, notamment les nitrates et les nitrites présents dans certains engrais, ainsi que certains végétaux tels que les épinards, les carottes ou les choux (**Brunato et al., 2003; Sanchez et al., 2001**).

□ Risque cancérigène :

Le risque cancérigène associé aux engrais découle notamment des nitrates ou de leurs dérivés nitrates présents dans ces produits. En effet, les nitrates peuvent présenter un risque en raison de leur transformation éventuelle en nitrite et puis en nitrosamines au niveau du tractus digestif. Bien que Ces substances aient été identifiées comme ayant des propriétés

cancérogènes il y a plusieurs décennies, les données de recherches précédentes ne permettent pas de confirmer de manière certaine le pouvoir cancérogène de nitrosamines résultantes des nitrates chez les animaux (OMS, 1995), des études épidémiologiques n'ont pas établi de liens définitifs entre l'exposition aux nitrates et le risque de cancers. Prouver de manière concluante une telle relation est particulièrement complexe en raison du délai entre la cause et la détection de la pathologie. De plus, la grande variabilité dans la concentration en NO_3^- dans l'eau et les aliments, à la fois dans le temps et l'espace, complique encore davantage cette démonstration. Néanmoins, des tests, menés sur différentes espèces animales, ont prouvé l'effet cancérogène de nombreuses nitrosamines (OMS, 1995). Plusieurs études suggèrent une forte corrélation entre l'apparition du cancer du pharynx, de l'œsophage, du colon et de la prostate, et les concentrations élevées des nitrates dans l'eau et les aliments (Damien et Jean, 2010).

□ Autres pathologies liées aux engrais chimiques et organiques

Des infections digestives, notamment par des agents pathogènes tels que les salmonelles, les listeria, les Escherichia coli, les clostridies peuvent avoir lieu suite à une exposition orale à des particules d'engrais (Hellali et al., 2022). Des résidus d'engrais organiques peuvent également avoir des impacts graves sur le système nerveux central, provoquant des maladies respiratoires telles que la respiration sifflante et des troubles gastro-intestinaux (Rana et al., 2019). Les infections pulmonaires peuvent résulter de l'inhalation prolongée et de l'exposition à des résidus d'engrais organiques. D'autre part, l'exposition à l'engrais chimique peut engendrer divers problèmes de santé, notamment des toxicités neurologiques, un retard de croissance, un retard cognitif et des dommages au système nerveux. Une exposition accrue à l'aluminium, souvent présent dans les engrais chimiques, a été associée à l'asthme, la maladie d'Alzheimer et des maladies osseuses. Les dommages pulmonaires peuvent survenir en raison d'une exposition intensive aux engrais chimiques contenant des composants radioactifs tels que le cobalt et le bore, entraînant des problèmes de reproduction, notamment une faible numération des spermatozoïdes (Ajmal et al., 2018).

Chapitre 2
STRESS OXYDATIF

Définition du stress oxydatif

La notion du stress oxydatif est définie par une perturbation de l'état d'équilibre entre le processus de production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) et les systèmes de défense antioxydants. Ce déséquilibre peut résulter d'une surproduction d'agents oxydants endogènes, tels que ceux produits lors d'une inflammation, d'un déficit alimentaire en antioxydants, ou d'une exposition extérieure à des éléments pro-oxydants contenues dans l'environnement tels que le tabac, les médicaments, les rayons gamma, les rayons ultraviolets (UV), les métaux lourds, les pesticides et les solvants industriels, entre autres (Pham-Huy et al., 2008) (Figure 2).

Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des molécules ou des atomes ayant un ou plusieurs électrons célibataires sur la couche électronique périphérique, les rendant très réactifs chimiquement avec les éléments voisins. Cette haute réactivité se manifeste par la recherche d'électrons pour appairer ceux qui sont non appariés, conduisant à une réaction en chaîne. Les espèces radicalaires ont une propriété électrophile et cherchent toujours à capter une molécule voisine ou un électron. Bien que l'existence de ces éléments soit transitoire, de l'ordre de la microseconde, ils ont la capacité soit de transférer des électrons libres à une autre molécule (lipide, protéine, acide nucléique, soit d'accepter un autre électron, favorisant ainsi la production de nouveaux radicaux libres (Bonnefont, 2010).

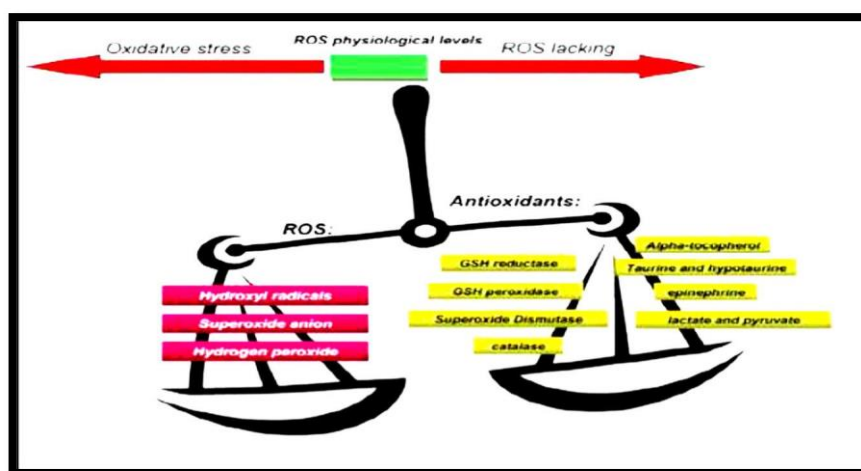


Figure 2: Déséquilibre de la balance entre les espèces réactives de l'oxygène et le système antioxydant (Fantaine, 2007)

Les espèces réactives de l'oxygène

L'oxygène, constituant majeur de l'atmosphère à environ 22%, joue un rôle essentiel dans la vie des organismes aérobies. L'oxygène est utilisé par ces organismes afin d'oxyder les substrats à forte teneurs en hydrogène et en carbone. Lors de ces processus d'oxydation, l'oxygène peut être réduit pour former des espèces radicalaires hautement réactives, nommés les espèces réactives de l'oxygène (ERO).

Les ERO renferment les radicaux tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$) ou le radical hydroxyle ($HO\cdot$) ainsi que des espèces non radicalaires telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). (Bonnefont, 2010) (Tableau 1).

Tableau 1: Principales espèces réactifs de l'oxygène (Dwassy, 2014)

Espèces réactives de l'oxygène (ERO)	
Espèce radicalaires	Espèces non radicalaires
Radical superoxyde: $O_2^{\circ-}$	Peroxyde d'hydrogène: H_2O_2
Radical hydroxyle: $OH\cdot$	Ion hypochlorite: ClO^-
Peroxyde: $RO_2\cdot$	Ozone: O_3
Alkoxyde: $RO\cdot$	Oxygène singulet: 1O_2
Hydropéroxyde: $HO_2\cdot$	Péroxinitrite: $ONOO^-$

Biomarqueurs de stress oxydatif

Peroxydation lipidique

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) et les phospholipides membranaires sont particulièrement vulnérables aux attaques oxydatives. Leur degré d'instauration est responsable de leur sensibilité à l'oxydation (Kowalczyk et al., 2021), le processus de peroxydation lipidique se déroule généralement en trois stades.

1. Initiation: Durant cette phase, les pro-oxydants et les espèces radicalaires, tels que les radicaux hydroxyles, alcoxydes, l'oxygène singulet..., ont la capacité de capter un atome d'hydrogène à partir du groupement méthylène bis-allylique. Cela forme un radical pentadiényle qui, ensuite, s'associe avec l'oxygène pour former un radical peroxyde (Wang et al., 2022).

2. Propagation: Le peroxyde est capable de réagir avec un autre acide gras polyinsaturé, conduisant à la formation d'un hydroperoxyde (LOOH). On parle ici de la phase de "Propagation" de la peroxydation lipidique (Martinez et al., 2004).

3. Terminaison: cette phase est caractérisée par la formation de molécules plus stables non-radicalaires obtenues par l'interaction entre deux radicaux libres ou par l'intermédiaire d'un antioxydant. Les peroxydes lipidiques ainsi formés peuvent être réduits et neutralisés par des enzymes telles que la glutathion peroxydase et la vitamine E intégrée dans la bicouche lipidique des membranes. Alternativement, ils peuvent se décomposer, libérant des produits tels que le malondialdéhyde (MDA), les isoprostanes et le 4-hydroxynonéal, qui sont considérés comme des marqueurs importants du stress oxydatif (Singh et al., 2015)(Figure 3).

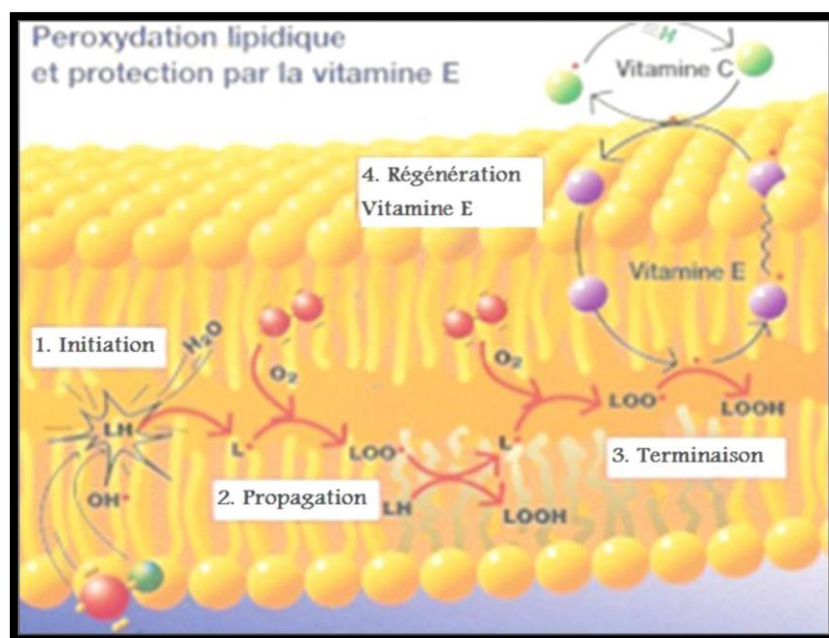


Figure 3: Réaction de la peroxydation lipidique (Daum-badouard, 2006)

Oxydation protéique

Les protéines constituent des cibles privilégiées par attaques radicalaires, résultant en différentes modifications de l'ensemble de la protéine. Ces attaques peuvent être initiées soit par des radicaux libres oxygénés, tels que le radical hydroxyle (OH \cdot), soit sous l'effet de métaux de transition. L'oxydation radicalaire des protéines est principalement initiée par le radical hydroxyle et est généralement influencée par la présence de cations métalliques en conjonction principalement avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Davies, 2000)(Figure 4).

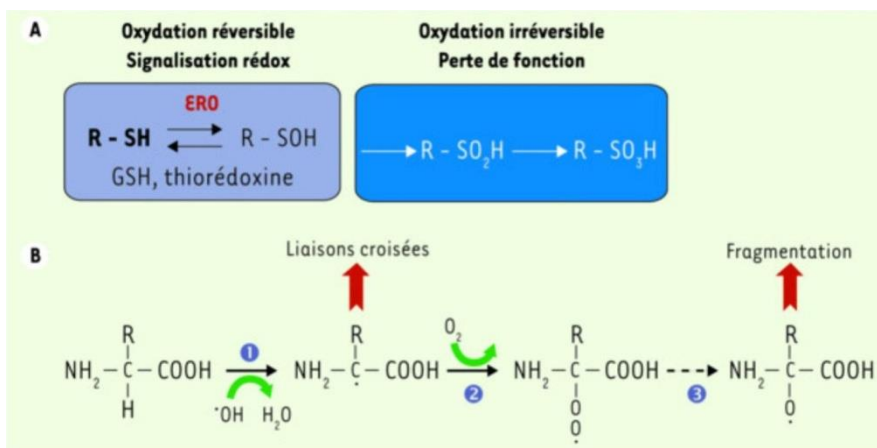


Figure 4: Schématisation de la réaction d'oxydation protéique (Bonnefont et colin, 2010)

Oxydation de l'ADN

Le matériel génétique, représenté par la molécule d'ADN, est également influencé par les attaques radicalaires (Kryston et al., 2011). Ces attaques peuvent créer plusieurs types de lésions sur la molécule d'ADN, pouvant aller jusqu'à l'apoptose provoquant l'apparition des tumeurs selon les degrés des dommages engendrés (Cadet et al., 2002) (Figure 5).

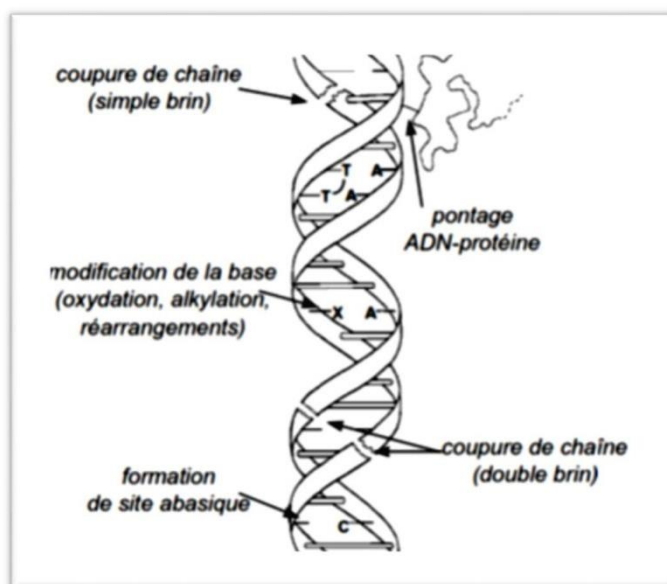


Figure 5: Dommages radicalaires sur la molécule de l'ADN (Bonnefont et colin, 2010)

Systèmes de défense antioxydant :

Le système antioxydant est représenté par toutes les substances ayant la capacité d'agir, même à faible concentration, pour retarder, voire empêcher l'effet cytotoxique des ERO (**Berger, 2006**). Le choix du type de système antioxydant varie selon la nature tissulaire ou cellulaire du tissu ou de la cellule, ainsi que du lieu de l'attaque radicalaire. Deux systèmes de défense antioxydant sont distingués: le système de défense enzymatique et non enzymatique (**Kebiache, 2009**).

Le système de défense enzymatique

Il comprend plusieurs enzymes dont les plus importants sont :

Superoxyde dismutase (SOD : EC 1.15.1.11)

Le SOD, ou superoxyde dismutase, représente la première ligne de défense contre les attaques des ERO. Il s'agit d'une métalloenzyme qui assure la dismutation de $O_2^{\bullet-}$ en peroxyde H_2O_2 et en O_2 . Il existe trois isoformes de SOD qui diffèrent selon leur localisation cellulaire, chromosomique et leur cofacteur métallique (**Pisoschi et Pop., 2015**).

Catalase (CAT : EC 1.11.1.6)

La catalase est une enzyme présente dans la plupart des organes et des tissus, notamment dans les érythrocytes et le foie (**Phaniendra et al., 2015**). Elle possède une activité détoxifiante plus puissante que d'autres enzymes du système antioxydant, en régulant l'activité du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (**Pisoschi et Pop., 2015**). La réaction catalysée par la catalase est la suivante : $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ (**Powers et Jackson, 2008**). Cette réaction est catalysée par un atome de fer, induisant une rupture hétérolytique de la liaison O-O du peroxyde d'hydrogène, créant ainsi une molécule d'eau et un groupement intermédiaire $Fe(IV)=O$ très oxydant. Ce groupe peut à son tour oxyder une autre molécule de peroxyde d'hydrogène pour générer une molécule de dioxygène (**Bouayed et Bohn, 2010**).

Glutathion peroxydase (GPx : EC 1.11.1.9)

Le glutathion peroxydase est une sélénoprotéine localisée généralement dans la mitochondrie et le cytosol. Elle agit en synergie avec la SOD pour éliminer les hydroperoxydes, en particulier le peroxyde d'hydrogène (produit de la dismutation de l'anion superoxyde), en utilisant le glutathion réduit GSH (**Zhu et al., 2008**). L'action de cette enzyme est médiée par le sélénium comme cofacteur (**Santos-Sanchez et al., 2019**).

Glutathion S-transférases (GST, EC 2.5.1.18)

Les glutathion S-transférases sont des antioxydants enzymatiques à fonctions multiples. Elles catalysent la conjugaison du GSH à plusieurs composés électrophiles, qu'ils soient endogènes ou exogènes, tels que les EROs, les xénobiotiques et les cancérogènes environnementaux (Nissar et al., 2017). Selon leur localisation cellulaire, on peut distinguer deux groupes de GST : les GST microsomales membranaires et les GST cytosoliques localisées dans le cytosol (Revathy et al., 2012).

Les antioxydants non enzymatiques

Ils s'agissent soit des constituants endogènes, que l'organisme secrète, soit exogènes apportés sous forme d'alimentation (Dasgupta et Klein, 2014), les plus importants sont:

Le glutathion

Le glutathion est le composant le plus important parmi les antioxydants non enzymatiques (Bonnefont, 2010). Il s'agit d'un tripeptide (γ L-glutamyl-cystéinyl-glycine) dont la fonction majeure consiste à éliminer espèces radicalaires, en agissant comme substrat pour la glutathion peroxydase (Birk et al., 2013).

Métallothionéines

Les métallothionéines sont des métalloprotéines riches en soufre. Elles maintiennent l'état d'équilibre des concentrations intracellulaires en métaux (mercure, zinc, cadmium, etc.) en inhibant leur circulation sous forme libre, en réponse à l'intoxication provoquée les métaux lourds (Petersen et al., 2008).

La vitamine A (caroténoïde)

La vitamine « A » exerce un effet anti-radicalaire en association avec la vitamine E. En cas d'oxydation de la vitamine E, la vitamine A peut la régénérer grâce à sa capacité à piéger les radicaux libres et ceci grâce à sa richesse en doubles liaisons (Haton, 2005).

Vitamine E (tocophérols)

Les tocophérols sont des antioxydants exogènes ayant une forte capacité antioxydante. Ils protègent les différents systèmes biologiques de l'organisme en raison de leur propriété

liposoluble, qui leur permet de s'intégrer dans les lipides membranaires pour inhiber la peroxydation lipidique (Martinez-Ferran et al., 2020).

Vitamine C

Appelée aussi la L-ascorbique, bien que la majorité des mammifères ont la capacité de produire cette vitamine, l'homme ne peut pas le faire grâce à une mutation du gène codant pour la L-gulono-gamma-lactone oxydase. La vitamine C est un excellent piègeur des espèces réactives de l'oxygène. Elle inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec des radicaux lipidiques. (Carr et Maggini, 2017) (Figure 6).

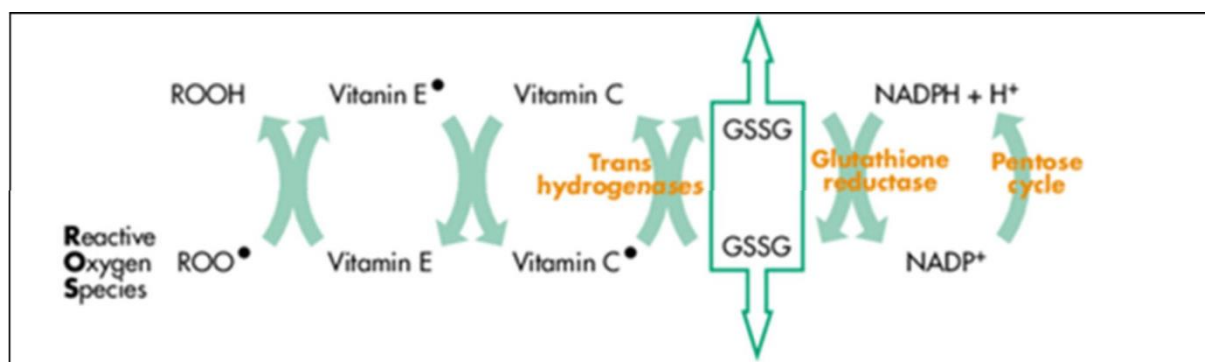


Figure 6: Activités de quelques antioxydants non enzymatiques (Adamy et al., 2005)

Les oligoéléments

Les oligoéléments, agissant en tant que cofacteurs enzymatiques, présentent d'importantes activités antioxydantes. Parmi eux, le sélénium (Se) se localise dans le site actif des glutathions peroxydases, le zinc agit en tant que cofacteur de l'enzyme superoxyde dismutase, et le cuivre dismute les radicaux superoxydes en peroxyde d'hydrogène (Marreiro et al., 2017).

Stress oxydatif et engrais

Un état de stress oxydatif peut avoir lieu suite à la contamination atmosphérique par les effluents émis par les usines d'engrais chimiques. Chez les mammifères, ces métaux lourds oxydent les lipides et des protéines, générant des produits fortement radicalaires qui génèrent des ERO (Servais, 2004). Des études antérieures (Bodjok, 2003; Ouro-Sama et al., 2014) ont démontré que les effluents des usines d'engrais chimiques rejetés en mer et les poussières atmosphériques contiennent des traces de métaux lourds, faisant partie des xénobiotiques les plus puissants induisant un état de stress oxydatif.

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 3.

MATERIEL ET METHODES

But et objectifs :

Le but de cette présente étude est d'évaluer les effets des engrais NPK 15.15.15 sur les systèmes biologiques. Dans un premier temps, un des objectifs de cette thèse a été de mettre en exergue l'effet de ce fertilisant chez une population de travailleurs dans une industrie de fabrication d'engrais et ce via un questionnaire englobant des données socio-démographiques et cliniques, ainsi que la mesure des paramètres biochimiques, hématologiques, hormonaux, urinaires et ceux du stress oxydatif en comparaison avec une population témoin (Figure 7).

Ensuite, un deuxième objectif a été l'étude des effets de ces engrais sur des rats de la souche Wistar via un protocole expérimental schématisé ci-dessous (Figure 8), en mesurant leurs impacts sur : (1) La peroxydation lipidique à travers le dosage du MDA au niveau du sang (érythrocytes) et des organes clés (foie et poumon). (2) Les différents systèmes antioxydants (GPx, SOD, CAT) et ce au niveau des mêmes compartiments précédemment cités. (3) Quelques marqueurs biochimiques (dosage protéines totales, des leucocytes et de l'interleukine-4) au niveau du sérum et du liquide du lavage broncho-alvéolaire. (4) L'architecture tissulaire pulmonaire, hépatique, rénal et cérébrale.

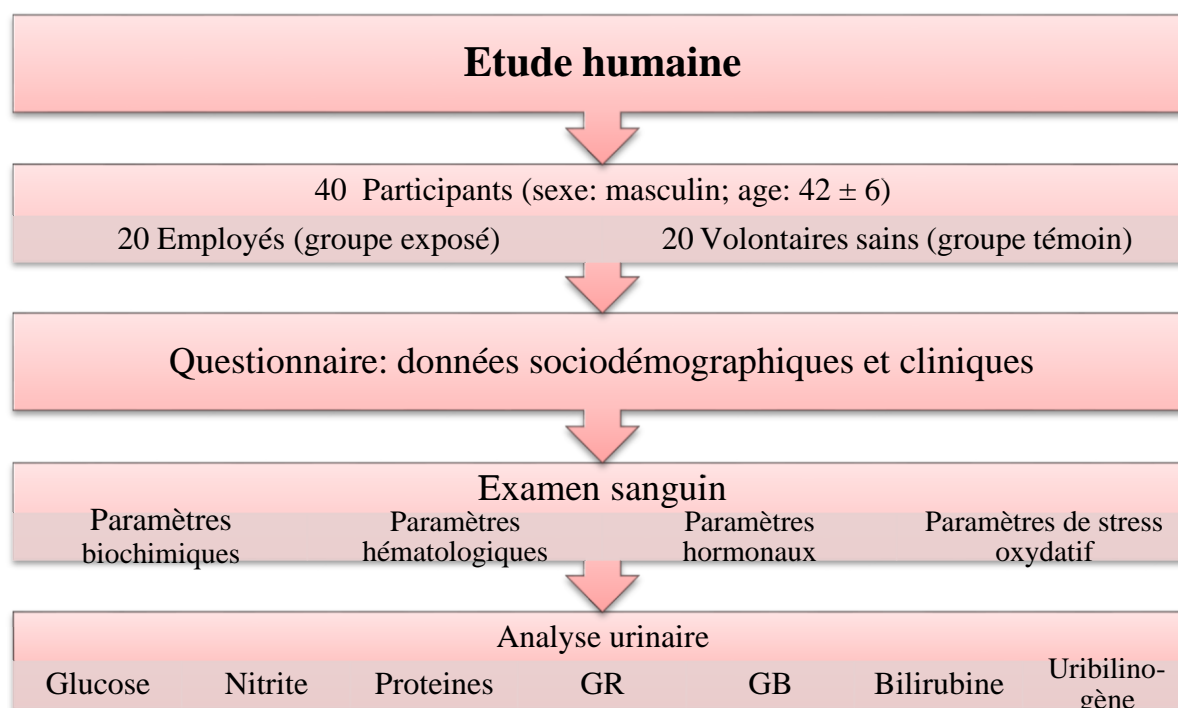


Figure 7: Représentation schématique résumant le protocole d'étude humaine

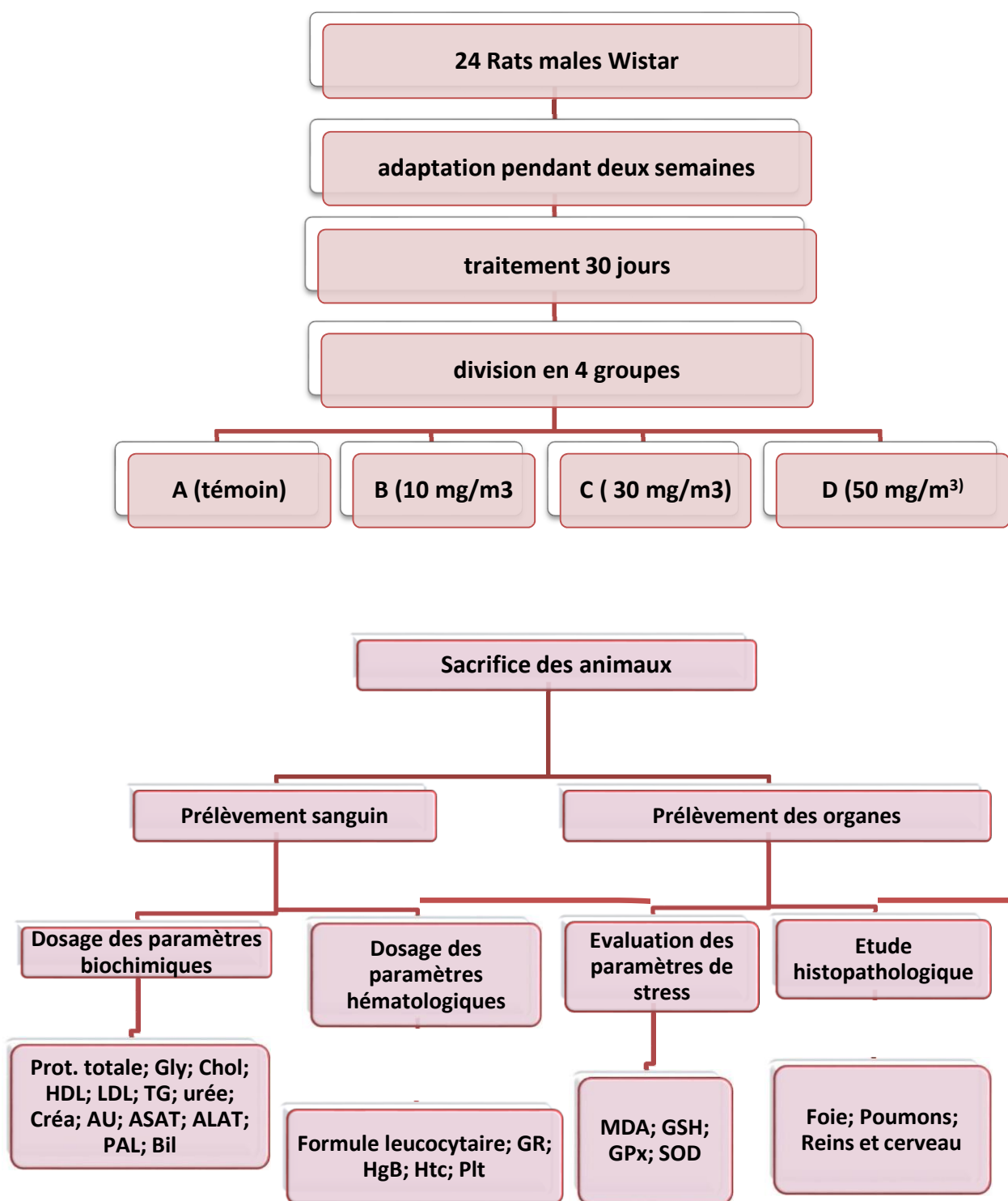


Figure 8: Représentation schématique des étapes du Protocole expérimental de l'étude animale

Etude humaine

Zone d'étude

Notre étude a été menée au niveau de l'industrie agricole 'FERTIAL', une société dont la production d'engrais et d'ammoniac en Algérie. Cette entreprise est le fruit d'un partenariat entre le Groupe espagnol Grupo Villar Mir et le Groupe algérien Asmidal, établi en août 2005. Les deux installations de FERTIAL, situées à Annaba et à Arzew (Oran), ont une capacité annuelle de production d'un million de tonnes d'ammoniac. Une partie de cette production est réutilisée pour fabriquer une large gamme d'engrais azotés et phosphatés.

Environ 75% de la production de FERTIAL est exportée, ce qui la positionne comme l'un des leaders du marché national. Elle est reconnue comme l'un des principaux producteurs et distributeurs d'engrais. L'usine d'Annaba, située dans la zone industrielle d'Annaba, emploie environ 800 personnes et s'étend sur une superficie de 108 hectares, délimitée par la mer Méditerranée au Nord-Est, l'Oued Seybouse et la cité Sidi Salem au Sud-Est, la route RN 44 et la cité El Bouni au Sud-Ouest, et l'Oued Boudjlina et la cité Seybouse au Nord-Ouest.

Le complexe est divisé en deux zones: la zone sud, avec des ateliers datant de 1972 spécialisés dans les engrais phosphatés, comprenant un atelier d'engrais (NPK et UAN liquide), un atelier super simple phosphate (SSP), et une centrale utilités 1; la zone nord, dédiée aux engrais azotés depuis 1982, comprenant un atelier d'acide nitrique, un atelier de nitrate d'ammonium, un atelier d'ammoniac, une installation de manutention et de stockage, et une centrale utilités 2 (<https://www.fertial-dz.com/somme.html>) (**Figure 9**).



Figure 9: Zone sud de l'industrie FERTIAL (Photo personnelle)

Population d'étude

Nous avons sélectionné aléatoirement 20 employés de sexe masculin pour participer à notre étude, avec un âge moyen de 42 ± 6 ans. Parallèlement, un groupe témoin composé de 20 volontaires a été constitué. Avant leur participation à la recherche, les travailleurs de notre étude ont préalablement donné leur consentement éclairé tout en remplissant, avec l'aide du médecin de travail affilié à FERTIAL, un questionnaire couvrant des aspects cliniques et sociodémographiques (antécédents professionnels, état de santé, respect des moyens de protection, ... etc.) (voir l'annexe 1). L'ensemble des individus inclus dans notre recherche travaillent dans la zone sud de l'installation industrielle de FERTIAL (l'unité de production d'engrais ternaire de type NPK 15.15.15) (**Figure 10**).

Les individus présentant des maladies chroniques, prenant des médicaments, ainsi que les fumeurs ont été éliminés de l'étude (facteurs d'exclusion). Des échantillons sanguins et urinaires ont été prélevés chez l'ensemble des participants. Les résultats obtenus à partir des travailleurs ont été comparés à ceux du groupe témoin, répondant aux mêmes critères sociodémographiques et ne présentant aucun antécédent personnel ou professionnel lié à n'importe quel type d'engrais ou produit chimique (facteur d'exclusion).

Toutes les procédures réalisées dans cette étude impliquant des participants humains étaient conformes aux normes éthiques ainsi qu'à la Déclaration d'Helsinki de 1964.



Figure 10: Quelques zones de contact direct des travailleurs avec l'engrais NPK 15.15.15 (Photos personnelle)

Collecte des échantillons et protocoles de dosages

- **Echantillons sanguins**

La collection des échantillons sanguins a été effectuée le matin, à partir du pli du coude entre 8:00 et 8:30 AM, avec l'aide d'une technicienne du laboratoire (au sein de FERTIAL). Les échantillons ont été recueillis immédiatement dans deux différents types de tubes. Le premier

contient de l'acide éthylènediamine tétracétique (EDTA), et qui sert à évaluer les paramètres hématologiques. Le deuxième tube, sans anticoagulant a été centrifugé à 3000 tours par minute pendant 10 minutes. Le sérum obtenu a servi à évaluer les paramètres biochimiques tandis que le sédiment qui contient les érythrocytes a été utilisé pour la détermination des paramètres du stress oxydatif.

- **Préparation du lysat d'érythrocytes**

Après la centrifugation, les érythrocytes ont été suspendus à deux reprises dans une solution tampon du phosphate [KH₂PO₄ (10 mM), NaCl (150 mM), pH 7.4], et puis centrifugés à 3000 tours par minute pendant 15 minutes à 4 C° et à 4000 tours par minute pendant 30 minutes à 4 C°, pour le premier et le deuxième lavage, respectivement(Khaldi, 2018). Le lysat résultant est ensuite aliquoté dans des tubes stériles et stocké à - 20 C° jusqu'à son utilisation pour la détermination de la peroxydation lipidique et l'évaluation des paramètres du stress oxydatif.

- **Détermination des paramètres biochimiques**

Les taux des paramètres suivants ont été déterminés en utilisant des kits commerciaux de Biomagreb (Tunisia) : glucose, cholestérol total, cholestérol à basse densité (LDL), cholestérol à haute densité (HDL), triglycérides (TG), urée, créatinine, acide urique (AU), bilirubine total, aspartate aminotransférase (ASAT), alanine transaminase (ALAT) et phosphatases alcalines (PAL).

- **Détermination des paramètres hématologiques**

Les paramètres hématologiques évalués au cours de notre étude sont: les globules blancs (GB) incluant les lymphocytes, les monocytes et les granulocytes; les érythrocytes ou les globules rouges (GR), l'hémoglobine (Hgb), l'hématocrite (Htc), le volume globulaire moyen (VGM), l'hémoglobine corpusculaire (MCHC); les plaquettes (PLT) et le volume plaquettaire moyen (VPM). L'ensemble de ces paramètres a été estimé par un compteur automatique hématologique des cellules (PCE-210N).

- **Protéines totales**

La concentration des protéines totales a été évaluée par une méthode colorimétrique selon Vasconcelos et al (2021). Dans cette méthode, un volume de 1000 µL du réactif de biuret a été mélangé à 20 µL du sérum et incubé pendant 5 minutes à 37°C. Enfin, on a procédé à la lecture spectrophotométrique à 540 nm.

Détermination des paramètres du stress oxydatif**- Dosage des protéines dans le lysat d'érythrocytes**

Principe : Le réactif utilisé pour ce dosage est le Bleu brillant de Coomassie (G250), selon la méthode de **Bradford (1976)**. Le G250 réagit avec les groupements NH des protéines pour former un complexe de couleur bleue, reflétant le degré d'ionisation du milieu acide. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des protéines. La DO étant mesurée à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible Jenway 6305.

Mode opératoire :

Un volume de 5 mL de G250 est ajouté à un volume de 0,1 mL de lysat d'érythrocytes. Après agitation (légère), le mélange est mis durant 5 min à une température ambiante afin que la couleur puisse se stabiliser. Ensuite, l'absorbance du lysatest mesurée à 595 nm contre un blanc (tampon phosphate). La DO obtenue est ensuite rapportée sur la courbe d'étalonnage établit sous des conditions similaires à partir d'une solution mère de BSA (1 mg/mL) (voir annexe 2).

- Dosage du malondialdéhyde (MDA)

Principe : Le dosage du MDA est réalisé selon la méthode de **Nimse et Pal (2015)**. Elle consiste à mesurer l'absorbance à 530 nm d'un pigment rosé qui apparait lors de la condensation du MDA avec l'acide thiobarbiturique TBA, et ce en milieu acide et à chaud.

Mode opératoire :

Un volume de 375 µL du lysatest ajouté à 150 µL de tampon TBS et 375 µL de la solution TCA-BHT. Le mélange est vortexé puis centrifugé à 1000 tours/min pendant 10 minutes. Ensuite, 400 µL de surnageant sont prélevés et additionnés à 80 µL d'HCl (0,6 M) et 320 µL du tampon Tris-TBA. Ce dernier mélange est incubé au bain-Marie à 80°C pendant 10 minutes. L'absorbance est mesurée à 530 nm, étant directement proportionnelle à la quantité de MDA formé, fournissant ainsi une évaluation précise des lipides peroxydés.

Les solutions sont préparées comme suit :

TBS : Tris 50 mM, NaCl 15 mM, pH = 7.4.

TCA-BHT : TCA 20% et BHT 1%.

Tris-TBA : 26 mM et 120 mM, respectivement.

La concentration de MDA est calculée selon l'équation suivante:

$$C \text{ (nmol/mg protéine)} = \frac{0 \times 10}{\varepsilon \times L \times x \times fd}$$

Où :

C : concentration du MDA en nmoles par mg de protéines ;

Do : densité optique lue à 530 nm ;

ϵ : coefficient d'extinction molaire du MDA= 1,56. 10⁵ M⁻¹cm⁻¹ ;

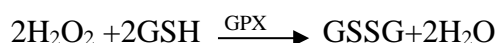
L : longueur du trajet optique (L = 0,779 cm) ;

x : concentration de l'extrait en protéines (mg/mL) ;

Fd : facteur de dilution (Fd = 0,2083).

- Dosage de la glutathione peroxydase GPX

Principe : L'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) a été mesurée par la méthode de (Flohe et al., 2022). Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en présence de glutathion réduit (GSH). Ce dernier est transformé en GSSG sous l'influence de la GPx selon la réaction suivante :



Mode opératoire

Un volume de 0,4 mL de GSH (0,1 mM) ainsi que 0,2 mL du tampon TBS (Tris 150 mM, NaCl 150 mM, pH = 7,4) sont ajoutés à 0,2 mL de lysat. Après incubation au bain marie à 25°C durant 5 minutes, 0,2 mL d'H₂O₂ (1,3 mM) sont ajoutés pour initier la réaction qui dure 10 minutes. Cette dernière est arrêtée par l'ajout de TCA (0,1%). Le mélange est refroidi dans de la glace durant 30 minutes puis centrifugé à 3000 tours/min pendant 10 minutes. Enfin, 0,48 mL de surnageant sont mélangés à 2,2 mL du même tampon précédent TBS et 0,32 mL de DTNB (1,0 mM). Une incubation de 5 minutes à température ambiante est nécessaire à la formation d'un complexe jaunâtre dont la DO est mesurée à 412 nm. L'activité enzymatique du GPx est calculée en déterminant la quantité de GSH consommée par minute et pour chaque mg de protéine, selon l'équation suivante :

$$\text{GPx (nmol GSH/mg de protéines)} = \frac{\text{DO échantillon} - \text{DO étalon} \times 0,04}{\text{DO étalon}}$$

Où :

DO échantillon : Densité optique de l'échantillon ;

DO étalon : Densité optique de l'étalon ;

0,04 : Concentration de substrat (GSH).

- Dosage de la superoxyde dismutase SOD

Principe : l'activité de la SOD se détermine en mesurant sa capacité d'inhibition de la réduction du nitrobleu tetrazolium (NBT). Le milieu réactionnel comprend une molécule photosensibilisatrice, la riboflavine, ainsi que le NBT. L'intensité de la couleur du milieu réactionnel induit l'oxydation de la riboflavine, qui cède un électron au dioxygène pour former un anion superoxyde. Cet anion superoxyde interagit ensuite avec le NBT, le transformant de sa forme incolore en bleu de formazan (**Fruyer et al., 2002**). La mesure de cette réaction permet d'évaluer l'activité du superoxyde dismutase.

Mode opératoire

La détermination de la SOD se fait comme suit :

Le mélange réactionnel du « Blanc » est constitué de : 1 mL d'EDTA (0.1 mM) / Méthionine (13 mM) ; 1830 µL de tampon phosphate (pH 7,8) ; 85 µL de NBT (75 µM) et 22 µL de riboflavine (2 µM). Quant au mélange réactionnel de « échantillon » est constitué du mélange réactionnel du blanc additionné de 50 µL de lysat. Les deux tubes (Blanc et Échantillon) sont incubés à moins de 20 cm d'un tube néon pendant 20 minutes à température ambiante. Ensuite, les absorbances sont mesurées à 560 nm contre un blanc stocké à l'obscurité. Une unité d'activité SOD correspond à une inhibition de la réduction du NBT de 50%.

L'activité de la SOD se calcule en suivant la réaction ci-dessous :

$$Y = \frac{A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{blanc}}} \times 100 \times \text{facteur de dilution}$$

Activité spécifique SOD = Y/50 unité de SOD/mg de protéine.

- Dosage de la catalase CAT

Principe : L'activité du catalase (CAT) est mesurée selon la méthode de **Aebi (1984)**. Cette expérimentation est basée sur la capacité de l'enzyme à induire la dismutation du peroxyde d'hydrogène en suivant la diminution de l'absorbance à 240 nm pendant 1 minute, et ce en faisant réagir, en amont, 780 µL de tampon phosphate (100 mM) (pendant 1 minute à pH 7.4) avec 200 µL de H₂O₂ (500 mM) additionné de 20 µL de lysat, à une température de 25°C. Les résultats sont exprimés en µmoles de H₂O₂ par minute et par mg de protéines.

- Détermination des paramètres hormonaux

Les paramètres hormonaux sanguins évalués au cours de notre étude sont: les hormones thyroïdiens représentés par la triiodothyronine (T3), tetraiodothyronine (T4), hormone thyroïdienne (TSH) et l'hormone sexuelle (testostérone). L'analyse des hormones a été effectuée à l'aide d'un appareil analyseur des hormones de Biobase kings Co.Ltd.

• Echantillons urinaires

Les prélèvements ont été collectés dans des crachoirs stériles hermétiquement fermés à partir des premières urines du matin, et les analyses ont été réalisées immédiatement après le prélèvement pour préserver la composition chimique des urines. La méthode d'analyse urinaire utilisée est une approche colorimétrique qualitative sur bandelettes caractérisées par des zones réactives de chimie sèche. Les bandelettes urinaires 8 paramètres URITEST, conçues pour des tests cliniques, sont utilisées par les professionnels de santé au niveau de l'unité (FERTIAL). Les différents paramètres de dépistage sont indiqués et facilement identifiables par des codes couleurs clairement montrés sur le flacon des tigettes de test urinaire. Les analyses urinaires par bandelettes URITEST visaient à détecter la présence des éléments suivants (valeur seuil) (Mauris et al, 2013):

- Glucose (0.4g/L)
- Nitrites (0,3 mg/L)
- Protéines (60 mg/L)
- Hématies(5GR/ μ L)
- Leucocytes (10 leucocytes/ μ L)
- Corps cétoniques (0.05g/L)
- Bilirubine 84 mg/L
- Urobilinogène 4 mg/L

Cette méthode consiste à rechercher la présence des paramètres susmentionnés dans les urines, selon le processus opératoire suivant:

- Les échantillons d'urine ont été homogénéisés en les tournants à plusieurs reprises.
- Une bandelette spécifique a été immergée dans le crachoir pendant une seconde, humidifiant complètement ses zones réactives.
- Ensuite, cette bandelette a été immédiatement placée sur un papier absorbant pour éliminer les excès d'urine. Les résultats pour les nitrites, les protéines, le glucose, les

corps cétoniques, l'urobilinogène, la bilirubine et le sang apparaissent dans la minute qui suit. Pour les leucocytes, les résultats sont prêts après deux minutes.

- Lorsque la période indiquée s'est écoulée, les couleurs des plages réactives, sont comparées, dans un lieu éclairé, avec la gamme colorimétrique indiquée sur l'emballage du flacon. Lors de la comparaison, la bandelette est maintenue dans une position horizontale afin d'éviter le mélange éventuel des réactifs en présence d'un excès d'urine.

Etude animale

Matériel chimique

- Préparation d'engrais NPK

L'engrais NPK utilisé dans cette étude a été aimablement fourni par l'industrie agricole FERTIAL. Ce fertilisant, initialement sous forme de granulés de couleur grisâtre, a été soumis à un processus de broyage mécanique jusqu'à obtenir une poudre (**Figure 11**). Cette transformation vise à faciliter sa solubilisation dans l'eau, rendant ainsi son utilisation plus pratique pour les besoins de l'expérience.



Figure 11: Engrais NPK 15.15.15 avant et après le broyage (Photos personnelle)

Animaux

Nous avons utilisé 24 rats mâles adultes de la souche Wistar, acquis auprès de l'Institut Pasteur d'Algérie, pesant entre 196 et 203 g. Les animaux ont été logés dans des cages en polypropylène, revêtues d'une litière constituée de copeaux de bois pour absorber les liquides. Le nettoyage des cages a été effectué tous les deux jours jusqu'à la fin de l'expérimentation.

Les animaux ont été soumis à une période d'adaptation (durant deux semaines) aux conditions standards de l'animalerie, comprenant une température de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, un cycle lumière-obscurité 12/12h heures, et une hygrométrie maintenue à $40\pm 2\%$. Ils ont été nourris conformément à un régime standard de laboratoire, dont les détails sont fournis dans l'annexe 3, avec un accès libre à l'eau potable.

Les rats ont été manipulés conformément aux directives du comité d'éthique sur l'utilisation des animaux de laboratoire.

Traitement et protocole expérimental

Les 24 rats ont été répartis de manière aléatoire en 4 groupes (A, B, C et D), chacun comprenant 6 individus. Pendant la période d'exposition, les rats ont été placés dans une chambre en plastique de dimensions 45 x 30 x 20 cm. Cette chambre était équipée d'une ouverture permettant la libre circulation du nébulisat, administré via un nébuliseur à compression (OMRON, NE-C29-E) fonctionnant à un débit de 0,4 mL/min pendant une durée de 30 minutes (**Khaldi et al., 2018**).

Les rats de notre expérimentation ont été regroupés en fonction de la dose d'inhalation d'aérosol d'engrais NPK comme suit :

- Groupe A (témoin) : Exposé à une nébulisation d'eau salinée selon les mêmes conditions que les rats des groupes ci-dessous.
- Groupe B : Exposé à une nébulisation d'engrais NPK à une concentration de 10 mg/m^3 .
- Groupe C : Exposé à une nébulisation d'engrais NPK à une concentration de 30 mg/m^3 .
- Groupe D : Exposé à une nébulisation d'engrais NPK à une concentration de 50 mg/m^3 .

L'engrais NPK utilisé dans les différents lots a été dilué dans de l'eau de boisson, et la durée quotidienne d'exposition a été de 30 minutes. Les doses utilisées ont été choisies en se basant sur les recommandations de **PETROKEMIJA (2020)**.

- **Sacrifice et prélèvement des organes**

Les rats ont été mis à jeun pendant 24 heures avant d'être sacrifiés, après 30 jours de traitement par l'aérosol d'engrais NPK.

- **Prélèvement sanguin :**

Le sang de chaque animal sacrifié a été immédiatement prélevé et recueilli dans deux types de tubes. Le premier, hépariné, a été centrifugé à 3000 tours par minute pendant 10 minutes, et le plasma récupéré a été conservé à -20°C pour l'analyse des paramètres biochimiques. Le deuxième tube, contenant un anticoagulant EDTA, a été utilisé pour déterminer les paramètres hématologiques.

- **Prélèvement des organes**

Après le sacrifice et la récupération du sang, les animaux ont été rapidement disséqués pour récupérer leurs organes, notamment le foie, les poumons, les reins et le cerveau. Ces organes ont été lavés dans une solution physiologique à 0,9%, pesés, puis divisés en deux parties. La première moitié a été conservée au congélateur pour la préparation ultérieure de l'homogénat, utilisé pour le dosage des paramètres du stress oxydatif. La deuxième moitié a été fixée dans une solution de formol à 10% en vue de la réalisation de coupes histologiques des organes susmentionnés.

Préparation des homogénats de tissus

Après le prélèvement des organes étudiés, un fragment d'environ un (01) gramme a été broyé à l'aide d'un broyeur ultrason, puis homogénéisé dans 2 mL de solution tampon phosphate (TBS : Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) à une proportion de 1:2 (P/V). Ensuite, la suspension a été centrifugée à 3500 tours/min à 4°C pendant 35 minutes. Le surnageant obtenu a été soigneusement recueilli et conservé dans des tubes Eppendorf à -20°C jusqu'à son utilisation ultérieure pour le dosage des paramètres du stress oxydatif.

Dosages des paramètres biochimiques au niveau du sang

- **Dosage des protéines totales**

Principe : le dosage des protéines totales repose sur la formation d'un complexe coloré en bleu-violet. Cette réaction est initiée par l'interaction entre les ions cuivriques et les liaisons peptidiques des protéines, et ce, dans un milieu alcalin. L'intensité de la couleur formée reflète la concentration des protéines selon la méthodologie décrite par (Almohamadi et al., 2009).

Mode opératoire : Le réactif de travail est combiné avec les échantillons selon les proportions suivantes :

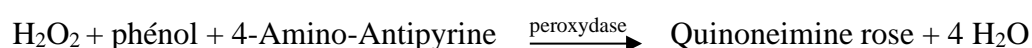
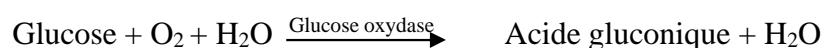
	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (mL)	1,00	1,00	1,00
Etalon (µL)	--	25	--
Echantillon (µL)	--	--	25

Ensuite, les mélanges réactionnels sont soigneusement agités et incubés pendant 5 minutes à 37 °C. Les absorbances des échantillons et de l'étalon sont ensuite mesurées par rapport au blanc réactif à une longueur d'onde de 540 nm. La coloration finale reste stable pendant au moins 30 minutes. La concentration des protéines se fait selon l'équation suivante :

$$\text{Protéines totales (g/dL)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times \text{concentration de l'étalon}$$

- Dosage du glucose

Principe: dans une solution aqueuse, le glucose subit une oxydation grâce au dioxygène dissout, se transformant en acide gluconique avec la production de H₂O₂. Ce processus est catalysé en présence de glucose oxydase (GOD).



Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Solution de travail (mL)	1,00	1,00	1,00
Standard (µL)	--	10	--
Echantillon (µL)	--	--	10

Les échantillons sont mélangés et incubés à 37 °C pendant 15-20 minutes à température ambiante. L'absorbance (A) des échantillons et de l'étalon (eau distillée) sont lues par

spécrophotométrie à une longueur d'onde de 505 nm. La concentration du glucose est calculée en utilisant la formule suivante:

$$\text{glucose(mg/dl)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times \text{concentration de l'étalon(100mg/dl)}$$

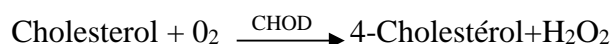
- Dosage du cholestérol total

Principe: le dosage du cholestérol dans les échantillons implique plusieurs réactions successives. Les étapes sont décrites ci-après :

- **Hydrolyse de l'Ester de Cholestérol:** L'Ester de Cholestérol interagit avec l'eau en formant du Cholestérol et d'acide gras.



- **Oxydation du Cholestérol :** Le Cholestérol réagit avec le dioxygène pour produire du Cholestérol-4 et du peroxyde d'hydrogène :



- **Formation de la Quinonimine:** la concentration de cholestérol dans l'échantillon est déterminé selon l'intensité de la couleur formée (Quinonimine). Cette couleur est ensuite mesurée spectrophotométriquement à une longueur d'onde spécifique. Le cholestérol présent dans les échantillons est déterminé selon la réaction suivante :



Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Solution de travail (mL)	1,00	1,00	1,00
Standard (μL)	--	10	--
Echantillon (μL)	--	--	10

Les solutions sont mélangées et incubées pendant 5 min à 37°C ou 10 min à une température ambiante. Les densités optiques des échantillons et de l'étalon sont lues contre le blanc à 505 nm. La concentration de cholestérol est calculée par la formule suivante:

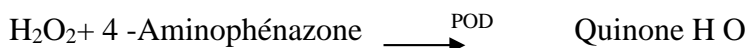
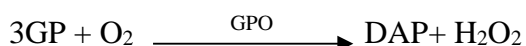
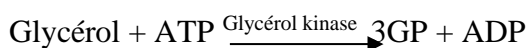
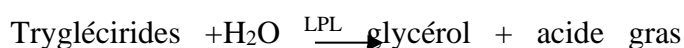
$$\text{cholestérol(mg/dl)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times \text{concentration de l'étalon(200mg/dl)}$$

- Dosage des HDL/LDL

Principe: Les lipoprotéines de très basse densité (HDL) et de basse densité (LDL) subissent une précipitation en présence de phosphotungstate et d'ions magnésium. Après centrifugation, le surnageant contenant les lipoprotéines de haute densité (HDL) est utilisé pour quantifier le HDL-cholestérol selon la méthode décrite par **Gupta et al. (2009)**. La détermination du LDL-cholestérol est réalisée en utilisant la formule énoncée par **Martemucci et al. (2022)**.

- Dosage des triglycérides

Principe: La lipoprotéine lipase catalyse l'hydrolyse des triglycérides, libérant ainsi du glycérol et des acides gras. Le glycérol subit une conversion en G3P en présence de la glycérol kinase et de l'ATP, produisant également de l'ADP. Le G3P est ensuite transformé en dihydroxyacétone phosphate (DAP) et peroxyde d'hydrogène par l'action du glycérol phosphate déshydrogénase (GPO). Le H₂O₂ réagit avec le 4-aminophénazone (4-AD) et le p-chlorophénol en présence de la POD, formant un complexe coloré selon le schéma suivant :



Mode opératoire

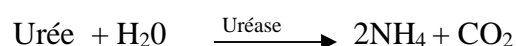
	Blanc	Etalon	Echantillon
Solution de travail (mL)	1,00	1,00	1,00
Standard (μL)	--	10	--
Echantillon (μL)	--	--	10

Les solutions sont mélangées et incubées pendant 5 min à 37°C ou 10 min à une température ambiante. Les densités optiques des échantillons et de l'étalon sont lues contre le blanc à 505 nm. La concentration des triglycérides est calculée par la formule suivante:

$$\text{Tryglicirides(mg/dl)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times \text{concentration de l'étalon(200mg/dl)}$$

- Dosage d'urée

Principe :L'urée subit une hydrolyse enzymatique, se décomposant en ions ammonium (NH₄⁺) et dioxyde de carbone (CO₂) sous l'action de l'uréase. Les ions ammonium ainsi formés réagissent avec le salicylate et l'hypochlorite (NaClO) en présence du catalyseur nitroprusside, générant de l'indophénol vert, comme décrit par **Kaplan, 1984**. Le schéma réactionnel est le suivant:



L'intensité de la coloration formée est directement proportionnelle à la concentration d'urée présente dans l'échantillon.

Mode opératoire

Dissoudre l'enzyme dans une bouteille de tampon en mélangeant doucement. Le NaClO est réparé pour l'utiliser. Le réactif de travail est mélangé aux échantillons dans les proportions suivantes :

	Blanc	Etalon	Echantillon
Solution de travail (mL)	1,00	1,00	1,00
Standard (µL)	--	10	--
Echantillon (µL)	--	--	10

Puis, les mélanges réactionnels sont mixés et incubés 5 min à 37 °C ou 10 min à la température ambiante. Les absorbances des échantillons et de l'étalon sont lues contre le

blanc réactif à 340 nm. La coloration se stabilise après moins de 30 minutes. La concentration d'urée est calculée selon la formule suivante :

$$\text{urée (mg/dl)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times \text{concentration de l'étalon (50mg/dl)}$$

- Dosage de la créatinine

Principe : le dosage repose sur l'interaction de la créatinine avec le picrate de sodium. La créatinine réagit avec le picrate alcalin pour former un complexe de couleur rouge, dont l'intensité reflète la concentration de créatinine testé, comme mentionné par **Chowdhry et Kaushik en 2017**.

Mode opératoire

Un volume de réactif 1, est mélangé avec un volume de réactif 2. Le réactif de travail est mélangé aux échantillons selon les proportions suivantes :

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (mL)	1,00	1,00	1,00
Etalon (μL)	--	100	--
Echantillon (μL)	--	--	100

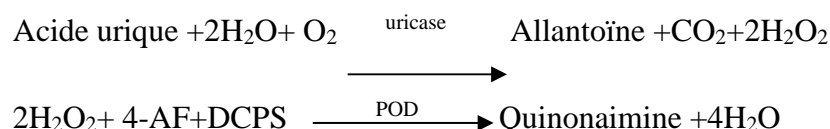
La lecture des densités optiques se réalise à 492 nm, avec la densité optique (DO1) mesurée après 30 secondes et la densité optique (DO2) après 90 secondes. La concentration de la créatinine s'effectue comme suit :

$$\text{créatinine (mg/dl)} = \frac{\text{DO échantillon} - \Delta \text{DO blanc}}{\text{DO étalon} - \Delta \text{DO blanc}} \times \text{concentration de l'étalon (2mg/dl)}$$

$$\Delta \text{DO} = (\text{DO 2} - \text{DO 1})$$

- Dosage d'acide urique.

Principe : L'uricase oxyde l'acide urique en le transformant en allantoïne, dioxyde de carbone et peroxyde d'hydrogène. En présence de peroxydase (POD), le H₂O₂ réagit avec un chromogène (dichlorohydroxybenzène sulfonate et aminoantipyrine). Ces composants réagissent pour former le quinona-imine, un complexe de couleur rosé (**Fan et al., 2020**).



L'intensité de la couleur formée reflète la concentration d'acide urique présente dans l'échantillon testé.

Mode opératoire

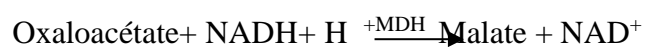
Pour préparer le réactif, le contenu d'une capsule d'enzyme (uricase) « R2 » est mélangée dans une petite quantité de tampon « R1 ». Le réactif obtenu dit de « travail » est agité doucement jusqu'à dissolution complète du contenu. Il est ensuite mélangé aux échantillons dans les proportions suivantes :

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (mL)	1,00	1,00	1,00
Etalon (μL)	--	25	--
Echantillon (μL)	--	--	25

Le mélange est incubé à 37°C pendant 15-20 minutes, ou à température ambiante. L'absorbance (A) des échantillons et de l'étalon par rapport au blanc est mesurée à une longueur d'onde de 505 nm. La couleur produite est directement proportionnelle à la concentration d'acide urique dans l'échantillon.

- Dosage d'aspartate aminotransférase

Principe : les ASAT, catalysent le transfert réversible d'un groupe amine de l'aspartate vers l' α -cétoglutarate, formant ainsi le glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate produit est ensuite réduit en malate par l'action de la malate déshydrogénase (MDH) en utilisant le coenzyme NADH, comme décrit par **Chowdhry et Kaushik en 2017**.



Mode opératoire

Un comprimé de R2 est dissout dans un flacon de R1. Ensuite, le réactif de travail est mélangé avec les échantillons selon les proportions suivantes :

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (mL)	1,00	1,00	1,00
Etalon (μL)	--	100	--
Echantillon (μL)	--	--	100

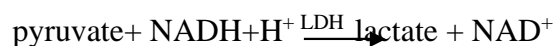
Les mélanges réactionnels sont homogénéisés et incubés pendant une minute. L'absorbance initiale est mesurée à 340 nm. Le chronomètre est ensuite redémarré simultanément pour permettre la lecture des absorbances après 1, 2 et 3 minutes. La concentration d'aspartate aminotransférase (ASAT) peut être calculée en utilisant la formule suivante :

$$\text{ASAT (U/L)} = \Delta\text{DO}/\text{min} \times 1750 \quad \text{Où :}$$

- ΔDO représente le changement d'absorbance mesuré à 340 nm pendant la période spécifiée.
- /min est la durée en minutes sur laquelle le changement d'absorbance est enregistré.
- Le facteur de conversion (1750) est utilisé pour convertir l'unité de mesure de l'absorbance à la concentration d'ASAT en Unités par litre (U/L).

- Dosage l'alanine aminotransférase

Principe: les ALAT, catalysent le transfert réversible d'un groupe amine de l'alanine vers l' α -cétoglutarate, formant le glutamate et le pyruvate. Le pyruvate ainsi produit est ensuite réduit en lactate par l'action de la LDH en utilisant le coenzyme NADH, comme décrit par **Murray en 1984**. Le schéma réactionnel est le suivant :



L'activité enzymatique de ALAT est déterminée par la diminution de la concentration en NADH, comme souligné par **Chowdhry et Kaushik en 2017**.

Mode opératoire

Un comprimé de R2 est dissout dans un flacon de R1. Ensuite, le réactif de travail est mélangé avec les échantillons selon les proportions suivantes :

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (mL)	1,00	1,00	1,00
Etalon (µL)	--	100	--
Echantillon (µL)	--	--	100

L'évaluation de la concentration de l'ALAT se fait selon les étapes suivantes: Les réactifs et les échantillons sont mélangés, puis incubés pendant une minute à température ambiante. L'absorbance initiale est mesurée à 340 nm. Le chronomètre est redémarré et la mesure de l'absorbance à 340 nm se fait après 1, 2 et 3 minutes. La moyenne des absorbances est calculée à partir de la formule suivante :

$ALAT (U/L) = \Delta DO/min \times 1750$; le facteur de conversion (1750) est utilisé pour convertir l'unité de mesure de l'absorbance à la concentration d'ALAT en Unités par litre (U/L).

- Dosage des phosphatases alcalines

Principe : les PAL catalyse l'hydrolyse du p-nitrophényl phosphate à pH 10.4, produisant ainsi du p-nitrophénol et du phosphate, comme décrit par **Wenger et al. (1984)** et **Sabokbar et al. (1994)**, selon la réaction suivante :



L'activité catalytique des PAL est proportionnelle à la formation de p-nitrophénol.

Mode opératoire

Pour réaliser l'analyse de la phosphatase alcaline, une tablette du réactif 2 (substrat) est dissoute dans une bouteille du réactif 1 (tampon). Un volume de 1,2 mL de ce réactif de travail est mélangé à 20 µL d'échantillon. Le mélange est incubé pendant une minute et l'absorbance initiale est mesurée à 405 nm. Le chronomètre est alors redémarré et l'absorbance est à nouveau mesurée à 405 nm après 1, 2 et 3 minutes. La moyenne des absorbances est

calculée et l'estimation de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline est estimée selon la formule suivante : $PAL (U/L) = \Delta DO/min \times 3300$

Où :

-DeltaDO/min représente la moyenne des absorbances par minute.

- Le facteur de conversion (3300) est utilisé pour convertir l'unité de mesure de l'absorbance à la concentration de phosphatase alcaline en Unités par litre (U/L).

- Dosage de la bilirubine totale

Principe : La bilirubine réagit avec l'acide sulfanilique diazoté à pH acide pour produire l'azobilirubine. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de la bilirubine dans l'échantillon (**klibet, 2016**).

Mode opératoire

Les réactifs sont mélangés selon les proportions ci-après.

	Blanc	Bilirubine totale
Réactif 1 : BL totale (mL)	1,50	1,50
Réactif 2 (µL)	--	50
Echantillon/ calibrant (µL)	100	100

Puis les densités optiques sont lues après 5 minutes d'incubation à une longueur d'onde 555 nm. La concentration de la bilirubine est calculée comme suit:

$$\text{bilirubine totale (mg/dl)} = \frac{\text{DO échantillon} - \Delta \text{DO blanc échantillon}}{\text{DO étalon} - \Delta \text{DO blanc calibrant}} \times \text{concentration du calibrant}$$

Dosage des paramètres hématologiques

Les paramètres hématologiques ont été mesurés grâce à un analyseur automatique d'hématologie de modèle Erma Coulter, Inc., modèle : PCE – 210N. Il s'agit du dosage du nombre total des cellules leucocytaires ou globules blancs (GB), du nombre total des érythrocytes ou globules rouges (GR), de la concentration d'hémoglobine (Hgb), du volume globulaire moyen (VGM), du coefficient de variation du volume cellulaire des globules rouges du sang (Red cell Distribution Width ou RDW), des plaquettes (Plt), et du volume plaquettaire moyen (VPM).

Dosage des paramètres de stress oxydatif dans les organes clés

L'évaluation de la peroxydation lipidique dans les homogénats de tissus est basée sur l'évaluation de la formation du malondialdhyde en utilisant l'acide thiobarbituric (TBA) comme substrat, selon la méthode **d'Esterbauer et al. (1992)**. Les activités des enzymes antioxydantes (la glutathion peroxydase (GPx) et la superoxide dismutase (SOD)) ont été estimées en utilisant les méthodes suivantes : l'activité du GPx a été mesurée en utilisant la méthode de **Flohe et Gunzler (1984)**. L'activité du superoxide dismutase (SOD) a été déterminée en utilisant la méthode de **Beyer and Fridovich (1987)**. Ces méthodes ont été précédemment détaillées dans la partie « étude humaine ».

- Dosage du Glutathion réduit GSH

Principe : Le dosage du GSH est réalisé selon la méthode de **Kramer et al. (2022)**. La réaction consiste à découper la molécule d'acide 5,5' dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH, libérant ainsi le TNB, qui présente une absorbance à 412 nm.

Mode opératoire :

Un volume de 0.8 mL de l'homogénat est ajouté à 0.2 mL de la solution d'acide sulfosalicylique (0.25%) et laissé pendant 15 min dans un bain de glace. Après centrifugation à 1000 tours/min pendant 15 min, 0.5 mL du surnageant sont prélevés et ajoutés à 1 mL du tampon Tris-EDTA (contenant 0,02M d'EDTA, pH 9.6) et 0.025 mL de l'acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à 0.01 M. Après agitation et incubation pendant 5 min à une température ambiante, les densités optiques sont mesurées à 412 nm contre le blanc réactif.

On calcule la concentration du GSH exprimée en micromoles par milligramme de protéines ($\mu\text{mol}/\text{mg prot.}$) selon la formule suivante :

$$\text{GSH } (\mu\text{mol}/\text{mg protéine}) = \frac{= \times L \times 1,125}{13,1 \times 0,8 \times 0,5 \times \text{mg en protéines}}$$

Etude histologique

L'examen histologique a été conduit à l'hôpital IBN ROCHD d'Annaba, Service d'anatomie pathologique, en suivant la méthode décrite par **Piaton et al. (2016)**. Le processus comprend les étapes suivantes : Un morceau de chaque organe (foie, rein, poumon, et cerveau) a été fixé dans une solution d'aldéhyde formique à 1%. Placés dans des caissettes à parois retournées, les échantillons sont accessibles pour le passage des liquides. Les fragments sont enrobés dans un bloc de paraffine. En premier, les échantillons sont déshydratés à l'aide d'un automate (Leica TP1020) avec des passages progressifs dans des bains d'alcools pendant 24 h (1 bain de formol et 6 bains d'éthanol). L'éthanol est ensuite remplacé par le xylène, un solvant miscible à la paraffine et qui possède la capacité d'éliminer l'éthanol et aide à l'éclaircissement des tissus (3 bains de 30 min chacun). Par la suite, le tissu est inclus dans un bloc de paraffine fondue en plaçant les échantillons dans des bains de paraffine liquide (portée à 56/58°C). Les coupes sont confectionnées en découpant, à partir des échantillons, des morceaux d'environ 5 microns à l'aide d'un microtome (Leica RM2125RT). Elles sont alors étalées sur des lames porte-objet, dépliées et fixées en utilisant une eau gélative chauffée, avant d'être colorées par la technique à l'hématoxyline-Éosine (H&E). Cette dernière consiste d'abord, en un déparaffinage et une hydratation à l'eau du robinet, puis un rinçage à l'eau distillée. Les noyaux sont colorés en bleu violacé après incubation des lames dans un bain d'hématoxyline de Harris pendant 15 minutes. Les coupes sont immergées dans l'alcool acide pour les différencier et sont ensuite immergées dans un bain d'éosine (10 minutes) qui colore en rose les structures acidophiles (cytoplasme). Finalement, les préparations sont montées avec EUKITT, séchées, puis observées au microscope optique (LEICA DM-750) et photographiées avec un appareil photo numérique (Canon Elph shot-305).

Traitement statistique des résultats

L'analyse des résultats a été réalisée en utilisant les moyennes \pm l'écart-type. Les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel MINITAB (version 2016) ainsi que l'ANOVA. Les comparaisons entre les différents groupes ont été réalisées à l'aide du test "t" de Student, et les différences ont été interprétées comme suit :

- * Significatives : $p \leq 0,05$
- ** Hautement significative par rapport au témoin : $p \leq 0,01$
- *** Très hautement significative par rapport au témoin: $p \leq 0,001$.

Chapitre4.
RESULTATS ET
DISCUSSION

Résultats

Etude humaine

Caractéristiques cliniques et sociodémographiques

Nous rappelons que les antécédents personnels relevés dans le questionnaire avaient pour but d'exclure de notre étude tout travailleur souffrant d'une quelconque pathologie.

Néanmoins, l'analyse des questionnaires remplis par les participants inclus dans notre étude a permis de relever les résultats suivants (Tableau 2) :

- **Âge moyen des travailleurs** : la moyenne d'âge des travailleurs dans notre étude est de 42,45 ans, avec une variation un écart type de 9,83 ans. Comparativement au groupe témoin, il n'y a pas de différence significative en termes d'âge, le groupe témoin ayant une moyenne d'âge de 40,15 ans \pm 9,1 ans.
- **Ancienneté professionnelle** : L'ancienneté professionnelle des travailleurs varie de 6 à 32 ans, avec une moyenne de 16,55 \pm 7,94 ans.
- **Pratique d'activités sportives**: 17,5% des travailleurs déclarent avoir exercer régulièrement des activités sportives.
- **Port de moyens de protection** : Tous les employés de l'étude portent des moyens de protection (gants, casque, masque nasal, tenue et chaussures de sécurité) pendant les heures de travail.
- **accidents du travail et maladies professionnelles** : Il est important de noter que 76 % des travailleurs de notre série d'étude ont déclaré avoir eu des accidents professionnels. Ces accidents comprennent des brûlures, des lésions cutanées, ainsi que des allergies respiratoires, oculaires et cutanées.

Tableau 2: caractéristiques cliniques et professionnelles chez les travailleurs inclus dans l'étude

Paramètre	Valeur
Effectif total	20
Sexe	Masculin (100%)
Moyenne d'âge (ans)	42,45 ± 9,83
Moyenne d'ancienneté de travail dans l'industrie (ans)	16,55 ± 7,94
Moyenne des heures de travail (heures)	8
Respect des équipements de protection (%)	100
Activité sportive (%)	17,5
Pathologies professionnelles (%)	76

Paramètres biochimiques

- Bilan lipidique

Nos résultats concernant les paramètres lipidiques ont montré une augmentation significative du cholestérol total et des TG ($p = 0,037$; $p = 0,014$ respectivement). Cependant on n'a noté aucune différence significative pour le reste des paramètres lipidiques et ceci chez les travailleurs par rapport au groupe témoin.

- Bilan hépatique

En ce qui concerne les marqueurs de la fonction hépatique, on a observé une augmentation hautement significative ($p = 0,001$) au niveau des enzymes hépatiques (ASAT, ALAT). D'autre part, aucune différence significative n'a été observée au niveau des marqueurs hépatiques restants.

- Bilan rénal

On a également noté au niveau des marqueurs de la fonction rénale des augmentations significatives : urée ($p = 0,003$) et créatinine ($p = 0,001$) chez les travailleurs par rapport au groupe témoin. Aucun changement significatif n'a été enregistré au niveau des autres paramètres rénaux étudiés (tableau 3), pour le reste des paramètres on n'a pas noté de différence significative.

Tableau 3: répartition des paramètres biochimiques chez le groupe témoin (n=20) et les travailleurs (n=20)

Paramètres	Groupe témoin	Travailleurs	Valeur de p
Glu (g/L)	0,88 ± 0,023	0,89 ± 0,026	0,54
Chol T (g/L)	1,47 ± 0,085	1,9 ± 0,18*	0,005
HDL (g/L)	1,48 ± 0,16	1,52 ± 0,17	0,63
LDL (g/L)	0,695 ± 0,056	0,75 ± 0,073	0,48
TG (g/L)	0,87 ± 0,061	1,43 ± 0,2*	0,046
Urée (g/L)	0,25 ± 0,032	0,45 ± 0,053**	0,009
Créatinine (mg/L)	9,21 ± 0,35	11,14 ± 0,4***	0,001
AU (mg/L)	47,52 ± 0,79	47 ± 1,1	0,2
Bilirubine (mg/L)	8,87 ± 0,37	8,03 ± 0,38	0,58
ASAT (UI/L)	35,79 ± 1,5	45,19 ± 2,1***	0,001
ALAT (UI/L)	36,77 ± 1,6	45,96 ± 1,8***	0,0009
PAL (UI/L)	91,4 ± 4,2	90,3 ± 4,3	0,58

Paramètres hématologiques

Les résultats concernant les analyses des paramètres hématologiques ont indiqué une diminution hautement significative ($p=0,001$) au niveau du nombre des érythrocytes, ainsi qu'une diminution significative de la concentration d'Hgb ($p =0.013$) et ceci chez les travailleurs par rapport aux témoins. D'autre part, aucune différence significative a été notée au niveau des paramètres hématologiques restants (tableau 4).

Tableau 4: Détermination des paramètres hématologiques chez le groupe témoin (n=20) et les travailleurs (n=20)

Paramètres	Groupe témoin	travailleurs	Valeure de p
GB (x 10 ³ /mm ³)	6,97 ± 1,56	7,08 ± 1,25	0,67
Lymph (x 10 ³ /mm ³)	2,795 ± 0,444	2,78 ± 0,431	0,91
Mono (x 10 ³ /mm ³)	0,655 ± 0,044	0,615 ± 0,235	0,86
Gran (x 10 ³ /mm ³)	4,69 ± 1,66	4,67 ± 1,64	0,78
GR (x 10 ⁶ /mm ³)	5,305 ± 0,932	4,295 ± 0,786**	0,001
Hgb (g/dL)	14,65 ± 1,04	13,37 ± 1,33*	0,013
HCT %	41,81 ± 2,74	42,37 ± 3,73	0,66
MCV(μm ³)	87,39 ± 4,08	87,5 ± 4,32	0,95
MCH (pg)	30,29 ± 1,36	30,37 ± 1,68	0,95
MCHC	32,12 ± 0,6	32,09 ± 0,5	0,97
Plt (x 10 ³ /mm ³)	240,8 ± 37	242,1 ± 39,7	0,54
V P M (μm ³)	8,04 ± 0,754	8,175 ± 0,861	0,67

Paramètres hormonaux

En ce qui concerne les analyses hormonales, nos résultats n'ont montré aucun changement significatif chez les travailleurs comparativement au groupe témoin (tableau 5).

Tableau 5. Détermination des paramètres hormonaux chez le groupe témoin (n=20) et les travailleurs (n=20)

Paramètres	Groupe témoin	Travailleurs	Valeur de p
Testosterone (ng/dL)	379 ± 28	316 ± 31	0,42
T3 (Umol/L)	1,489 ± 0,11	1,422 ± 0,12	0,29
T4 (Pmol/L)	1,746 ± 0,19	1,971 ± 0,17	0,38
TSH (μUI/mL)	3,385 ± 0,16	3,391 ± 0,16	0,89

Paramètres du stress oxydatif

L'analyse des paramètres de stress oxydatif a révélé une diminution hautement significative ($p \leq 0,001$) au niveau des activités de la SOD, GPx et la catalase chez les travailleurs par rapport aux témoins. Par contre, une augmentation significative a été enregistrée au niveau du MDA chez les travailleurs comparativement au groupe témoin (tableau 6).

Tableau 6. Détermination des paramètres de stress oxydatif chez le groupe témoin (n=20) et les travailleurs (n=20)

Paramètres	Groupe témoin	Travailleurs	Valeur de p
MDA (nmol/mL)	2,13 ± 0,012	7,08 ± 1,25*	0,05
SOD (U/mg proteine)	59,81 ± 0,63	52,78 ± 0,431**	0,001
GPx (U/mg protéines)	2,93 ± 0,029	1,80 ± 0,19**	0,001
CAT(U/mg protéines)	43,26 ± 0,25	37,00 ± 2,017**	0,0009

Chimie des urines

Les résultats de l'analyse de la chimie des urines ont indiqués les données suivantes:

- **Nitriturie** : 20 % des travailleurs présentent une nitriturie, ce qui signifie la présence de nitrites dans les urines. Chez les participants du groupe témoin, aucune trace de nitriturie n'a été observée.
- **Hématurie et leucocyturie**:15 % des travailleurs présentent une hématurie (présence d'hématies dans les urines) et une leucocyturie (présence de leucocytes dans les urines).A l'état normal, aucune trace de ces éléments ne devrait être présente, comme démontré chez les participants du groupe témoin (**Figure 9**).

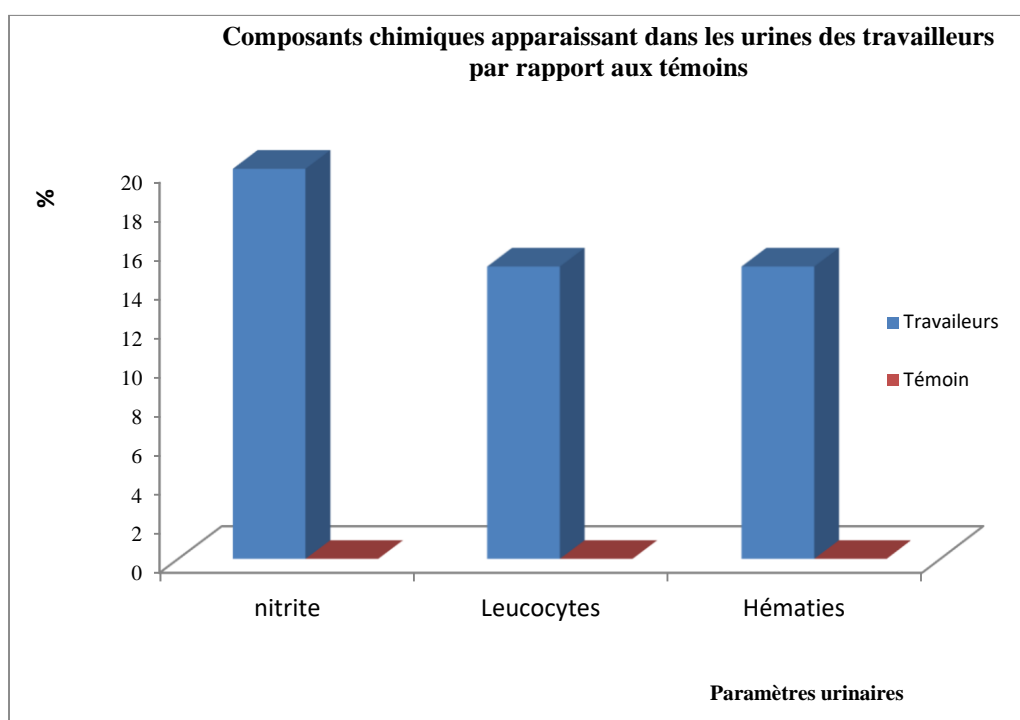


Figure 9: Répartition des paramètres de la chimie des urines chez les exposés et les non exposés

Expérimentation animale

Effet du traitement sur le poids corporel des rats

Les résultats présentés démontrent des effets significatifs sur le poids corporel des rats suite à l'administration de différentes doses d'engrais NPK 15.15.15. Nous avons observé une diminution hautement significative du poids corporel pour les rats traités avec la deuxième et la troisième dose par rapport au groupe témoin, avec des pourcentages de diminution respectifs de -4,69 % et -4,78 %. De plus, le gain de poids a subi une diminution importante, atteignant -76,62 % pour le deuxième groupe et une diminution très hautement significative de -82,76 % pour le troisième groupe par rapport aux rats témoins (**tableau 7**).

Tableau 7: Variation de la masse corporelle (g) chez les rats témoins et traités par différentes doses d'engrais NPK 15.15.15

	Témoin	Dose 1	p	Dose 2	p	Dose 3	p
Poids initial	199,00 ± 1,21	200,33 ± 1,50	0,59	200,00 ± 0,63	0,95	200,67 ± 1,21	0,5
Poids final	213,33 ± 1,51	210,59 ± 5,16	0,21	203,33 ± 3,19**	0,01	203,14 ± 2,94**	0,009
%	/	- 1,28	/	- 4,69	/	- 4,78	/
Gain de poids	14,33	10,26	0,09	3,33**	0,01	2,47***	0,001
%	/	-28,40	/	-76,62	/	- 82,76	/

Effet du traitement sur le poids absolu et relatif des organes (foie, poumons, reins et cerveau)

On observe une augmentation significative ($p \leq 0,05$) du poids hépatique chez les rats du troisième groupe, avec une augmentation de 2,45 % par rapport au groupe témoin. En revanche, aucune modification significative n'a été notée au niveau des poids des autres organes chez les rats traités avec différentes doses par rapport au groupe témoin (**tableau 8**).

Tableau 8: Variations du poids absolu des différents organes chez les rats témoins et les rats traités par différentes doses d'engrais NPK

	Témoin	Dose 1	p	Dose 2	p	Dose 3	P
PA foie (g)	5,78 ± 0,27	5,83 ± 0,21	0,52	5,93±0,13	0,63	6,99 ±0,11*	0,05
PR foie (%)	2,70	2,67	0,08	2,96	0,072	2,45	0,32
PA poumons (g)	1,17± 0,04	1,19±0,15	0,066	1,24±0,10	0,056	1,32 ± 0,14	0,024
PR poumons (%)	0,55	0,81	0,069	0,62	0,054	0,65	0,051
PA reins (g)	1,14±0,02	1,13±0,01	0,049	1,07±0,02	0,065	1±0,61	0,06
PR reins (%)	0,53	0,54	0,083	0,53	0,6	0,49	0,093
PA cerveau (g)	1,21±0,03	1,16±0,14	0,062	1,27±0,03	0,053	1,26± 0,02	0,1
PR cerveau (%)	0,57	0,55	0,072	0,63	0,66	0,62	0,55

Analyses Biochimiques

- Bilan énergétique et lipidique

D'après les résultats obtenus, une augmentation significative ($p \leq 0,05$) a été observée au niveau du taux plasmatique du cholestérol total, avec des augmentations de +43,38% et +51,47% chez les rats du deuxième et troisième groupe, respectivement, par rapport aux rats du groupe témoin (voir tableau 9). En revanche, aucun changement significatif n'a été noté au niveau des autres paramètres énergétiques étudiés, tels que le glucose, les lipoprotéines de haute densité (HDL), les lipoprotéines de basse densité (LDL) et les triglycérides (TG) (**Tableau 9**).

Tableau 9: Variation des paramètres lipidiques chez les rats témoins et les rats traités par différentes doses d'engrais NPK 15.15.15

	Témoin	D1	p	D2	p	D3	p
Gly (g/l)	0,94±0,13	0,935 ± 0,12	0,054	1,02±0,17	0,058	1,04±0,09	0,06
Chol (g/l)	1,36 ± 0,45	1,63±0,43	0,071	1,95± 0,48*	0,048	2,06±0,23*	0,036
HDL (g/l)	0,55±1,14	0,48±0,25	0,066	0,49± 1,16	0,063	0,5±0,20	0,055
LDL (g/l)	1,12±0,05	1,16 ± 0,12	0,065	1,15 ± 0,11	0,058	1,88 ± 0,1	0,088
TG (g/l)	1,1 ± 1,14	1,15±0,24	0,059	1,16±0,28	0,058	1,16 ± 0,16	0,061

- Bilan rénal

Les résultats de l'analyse du bilan rénal révèlent une augmentation significative ($p=0,003$) de l'urée chez les rats traités avec la troisième dose d'engrais, avec une augmentation de 125 % par rapport au groupe témoin. Cependant, aucune variation significative n'a été observée au niveau de la créatinine et de l'acide urique entre les groupes traités et le groupe témoin (Voir tableau 10).

- Bilan hépatique

Selon les résultats obtenus et en comparaison avec le groupe témoin, une augmentation significative ($p \leq 0,05$) des transaminases ASAT et ALAT a été observée chez les rats du groupe 2 et 3 pour les ASAT (+40,81% ; + 41,79% respectivement) et chez le groupe 3 pour les ALAT (+48,39%). De plus, une augmentation hautement significative ($p=0,003$) des phosphatases alcalines a été notée chez les rats traités par la deuxième et la troisième dose (+18,19; + 36,69 % respectivement), toujours par rapport au groupe témoin. En revanche, aucune variation significative n'a été observée au niveau des bilirubines totales entre les rats traités par différentes doses d'engrais et le groupe témoin (**voir tableau 10**).

Tableau 10: Variation des marqueurs des bilans rénaux et hépatiques chez les rats témoins et ceux traités par différentes doses d'engrais NPK 15.15.15

Paramtres	Témoin	Dose 1	p	Dose 2	p	Dose 3	p
Urée (g/L)	0,24±0,14	0,30 ± 0,11	0,072	0,39± 0,14	0,083	0,54 ± 0,12**	0,01
Créa (mg/L)	8,63±0,87	9,12 ± 1,39	0,071	9,03±0,53	0,079	10,29±1,97**	0,009
AU (mg/L)	48,83±6,74	48,67 ± 4,50	0,086	47,5 ± 7,34	0,071	47,17 ± 2,14	0,054
BIL (mg/L)	7,67 ±2,07	7,83 ± 1,94	0,071	8,33 ± 3,08	0,063	6,33 ± 1,63	0,056
ASAT (UI/L)	33,50 ±8,31	39,00 ± 9,21	0,055	47,17 ± 12,60*	0,05	47,50 ± 7,34*	0,047
ALAT (UI/L)	37,20 ±11,40	40,30 ±12,60	0,066	52,80 ± 17,70	0,059	55,20 ± 12,60*	0,046
PAL (UI/L)	96,20 ±14,30	113,00 ± 15,4	0,055	113,70 ±10,70*	0,046	131,50 ± 16,20**	0,001

Paramètres hématologiques

Le traitement des rats avec la deuxième et la troisième dose d'engrais NPK a entraîné une élévation hautement significative des taux sanguins de lymphocytes (+380,36 % ; +447,32 % respectivement) ainsi qu'une élévation hautement significative au niveau des monocytes (+108,7 % ; +175 % respectivement), en comparaison avec le groupe témoin. En outre, une diminution statistiquement significative des taux sanguins de globules rouges (-30,74 %) et d'hématocrite (-29,09 %) a été observée chez les rats traités par la troisième dose d'engrais NPK, accompagnée d'une diminution hautement significative de l'hémoglobine (-31,15 %) par rapport au groupe témoin. Cependant, les autres paramètres hématologiques n'ont pas présenté de différence significative entre les groupes traités et le groupe témoin (**Tableau 11**).

Tableau 11: Variation des paramètres hématologiques chez les rats témoins et ceux traités par différentes doses d'engrais NPK 15.15.15

	Témoin	D1	p	D2	p	D3	p
GB (x10 ³ /mm ³)	6,38 ± 1,97	7,67±0,75	0,065	10,43 ± 3,84	0,061	6,60 ± 2,03	0,59
LYM (x10 ³ /mm ³)	1,12 ± 0,50	3,87 ± 2,71	0,077	5,38 ± 2,06**	0,001	6,13 ± 2,27**	0,0009
MON (x10 ³ /mm ³)	0,92 ± 0,23	1,80 ± 0,60	0,076	1,92±0,56**	0,001	2,15±0,67**	0,001
GRAN (x10 ³ /mm ³)	2,68 ± 0,55	3,35 ± 1,57	0,065	2,92 ± 1,77	0,058	3,58 ± 2,06	0,055
GR (x10 ⁶ /mm ³)	5,92 ± 0,62	4,40 ±0,91	0,069	4,30 ±0,89	0,059	4,10 ±0,82*	0,046
Hgb (g/dL)	16,02±1,94	15,42 ± 1,63	0,075	13,50 ± 2,70	0,054	11,03± 2,30**	0,001
HTC %	50,52±4,89	45,65 ±4,46	0,07	38,57±7,82	0,055	32,37±8,58*	0,043
PLT (x 10 ³ /mm ³)	322,5 ± 75,6	313,00 ± 74,60	0,075	348±170	0,066	371± 134	0,056

Paramètres du stress oxydatif

Paramètres enzymatiques

- **Glutathion peroxydase** L'analyse statistique des résultats du GPX a révélé une diminution significative ($p \leq 0,05$) au niveau des reins (-35,37%) des rats du deuxième groupe ainsi qu'au niveau des reins (-48,78%) du troisième groupe. De plus, une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) a été observée au niveau des poumons (-39,18%) des rats du troisième groupe, comparativement au groupe témoin. En revanche, aucun changement significatif du GPX n'a été observé au niveau du cerveau chez les rats des différents lots par rapport au lot témoin (**Voir tableau 12, Figure 13**).
- **Superoxyde dismutase** Les résultats de l'analyse de la teneur cellulaire en SOD ont révélé une diminution significative ($p = 0,05$) au niveau des organes suivants chez les rats traités par la troisième dose d'engrais par rapport au groupe témoin : le foie (-51,01%), les reins (-55,78%), et le cerveau (-71,58%) (**Figure 14**).

Tableau 12: Variation des marqueurs enzymatiques (GPx; SOD) de stress oxydatif dans les organes (foie, poumons, reins et cerveau chez les rats traités par différentes doses d'engrais NPK 15.15.15

Paramètres	Organes	Lots expérimentaux						
		Témoins	Dose 1	p	Dose 2	p	Dose 3	p
GPX (μmol GSH/mg de prot.)	Foie	1,03 \pm 1,14	0,94 \pm 0,02	0,086	0,93 \pm 0,24	0,08	0,65 \pm 0,12	0,66
	Poumons	0,97 \pm 0,04	0,80 \pm 0,26	0,073	0,72 \pm 0,01	0,061	0,59 \pm 0,17	0,58
	Reins	0,82 \pm 0,38	0,86 \pm 0,09	0,07	0,53 \pm 0,03*	0,05	0,42 \pm 0,14**	0,01
	Cerveau	0,89 \pm 0,17	0,80 \pm 0,03	0,071	0,79 \pm 0,07	0,66	0,14 \pm 0,02	0,56
SOD (U/mg de prot.)	Foie	335,80 \pm 41	302,30 \pm 39	0,066	213,9 \pm 37	0,64	164,50 \pm 34	0,06
	Poumons	10,47 \pm 2,20	9,34 \pm 2,30	0,08	8,41 \pm 1,16	0,074	4,63 \pm 0,86	0,066
	Reins	1,80 \pm 0,05	0,27 \pm 0,06	0,07	0,20 \pm 0,03	0,65	0,15 \pm 0,04	0,056
	Cerveau	18,40 \pm 4,10	15,46 \pm 3,30	0,086	11,51 \pm 1,70	0,06	5,22 \pm 1,10*	0,064

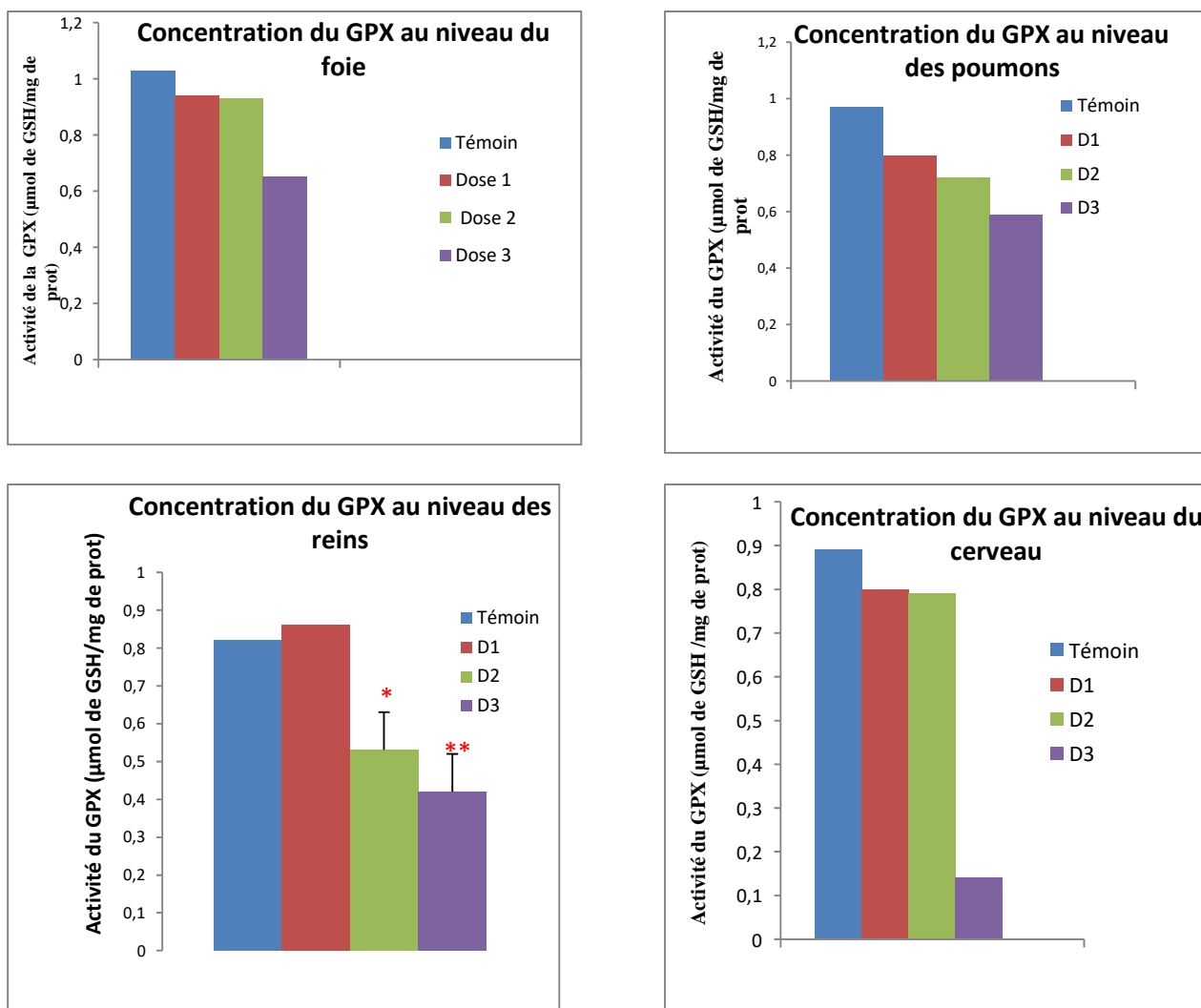


Figure 10: Concentration du glutathion peroxydase au niveau des différents organes (Foie, poumons, reins et cerveau)

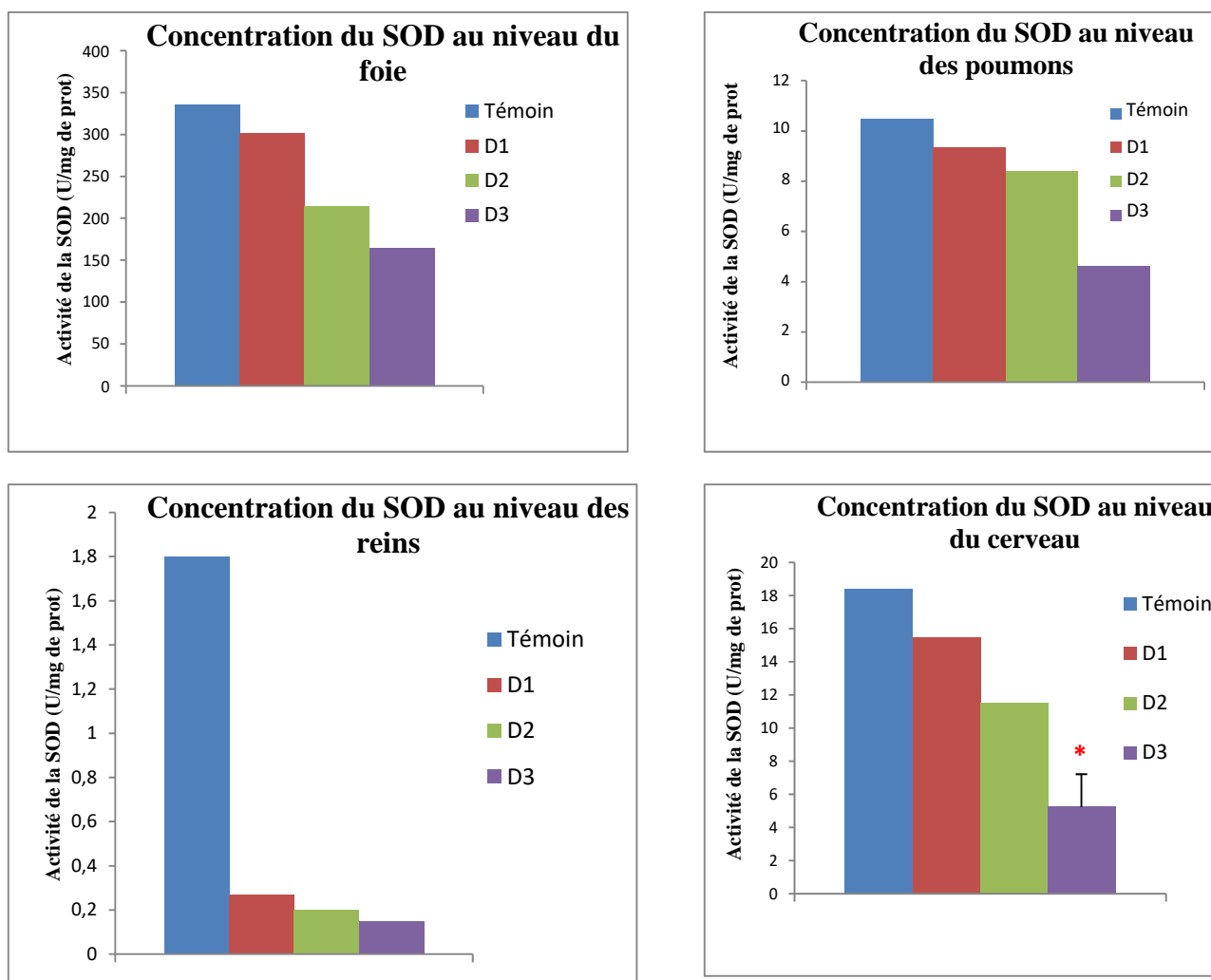


Figure 114: Concentration du superoxyde dismutase au niveau des différents organes (foie, poumons, reins et cerveau)

Paramètres non enzymatiques

□ Glutathion

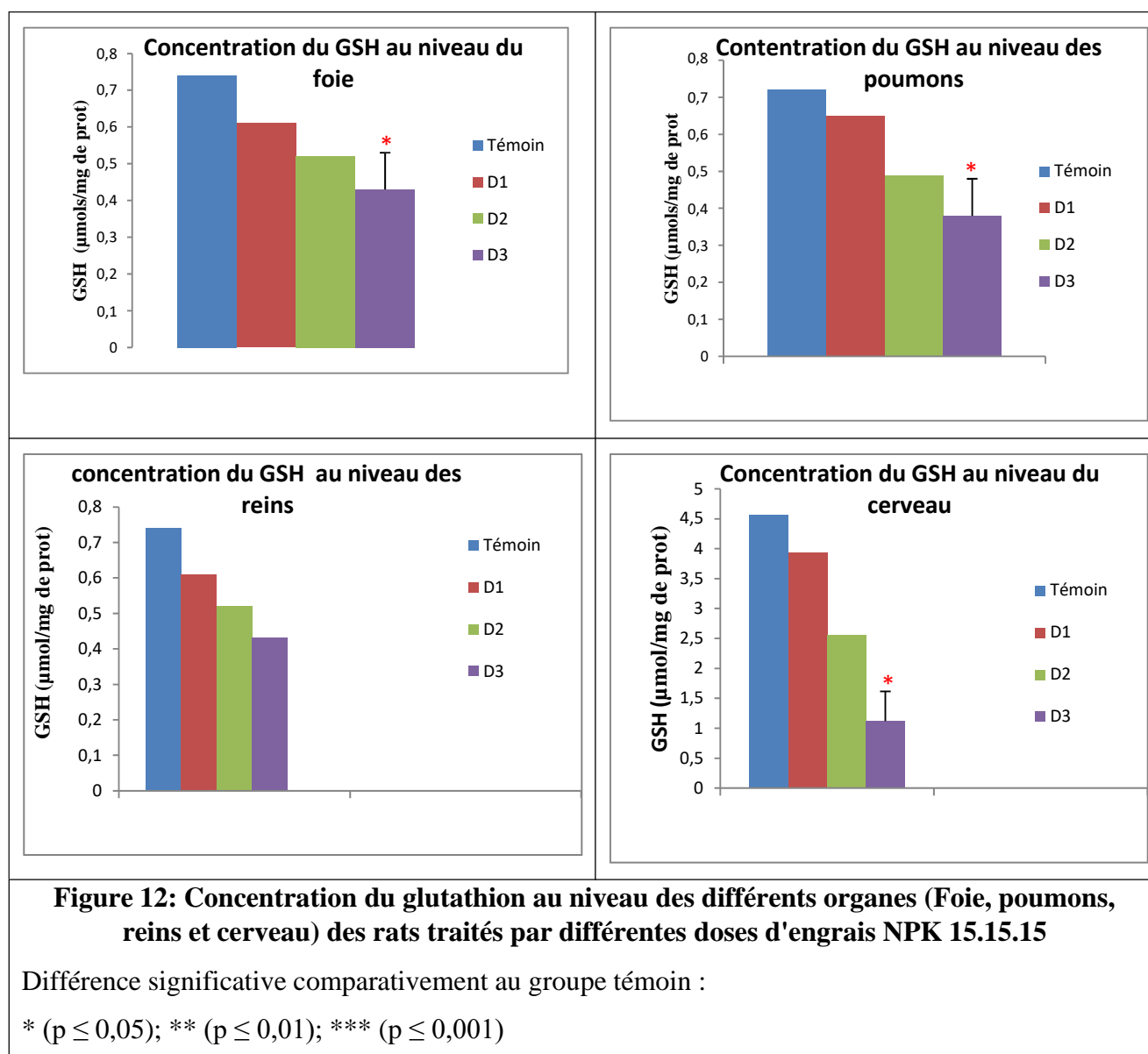
Nos résultats ont indiqué une diminution significative ($p \leq 0,05$) des teneurs cellulaires en GSH au niveau des poumons (-47,22%) et du cerveau (-75,91%) chez les rats traités par la troisième dose d'engrais par rapport au groupe témoin. En revanche, aucune variation significative n'a été observée au niveau du foie et des reins entre les groupes traités et le groupe témoin (Figure 15).

□ Malondyaldehyde

Après un mois de traitement des rats avec des doses croissantes d'engrais NPK, par rapport au groupe témoin, nos résultats ont révélé une augmentation significative ($P \leq 0,05$) au niveau des poumons (+82,91%) chez les animaux traités par la troisième dose. De plus, une élévation significative ($P \leq 0,05$) a été observée au niveau du MDA cérébral (+24,17%) chez le groupe traité avec la forte dose d'engrais par rapport au groupe témoin (Tableau 13, figure 16).

Tableau 13: Variation des marqueurs non enzymatiques (GSH;MDA) de stress oxydatif dans les organes (foie, reins; poumons et cerveau) chez les rats traités par différentes doses d'engrais NPK 15.15.15

Paramètres	Organes	Lots expérimentaux						
		Témoins	Dose 1	p	Dose 2	p	Dose 3	p
GSH($\mu\text{mol}/\text{mgde prot}/$)	Foie	1,37 \pm 0,23	1,29 \pm 0,12	0,065	1,07 \pm 0,06	0,06	0,99 \pm 0,24*	0,05
	Poumons	0,72 \pm 0,11	0,65 \pm 0,01	0,061	0,49 \pm 0,01	0,055	0,38 \pm 0,05*	0,047
	Reins	0,74 \pm 0,13	0,61 \pm 0,18	0,074	0,52 \pm 0,03	0,65	0,43 \pm 0,05	0,06
	Cerveau	4,56 \pm 1,10	3,93 \pm 0,66	0,079	2,56 \pm 0,40	0,06	1,12 \pm 1,10*	0,05
MDA ($\mu\text{mol}/\text{mgde prot}/$)	Foie	2,40 \pm 0,59	2,97 \pm 0,61	0,08	3,82 \pm 0,95	0,066	5,10 \pm 1,10	0,056
	Poumons	3,00 \pm 0,31	3,32 \pm 0,74	0,06	3,01 \pm 0,31	0,56	4,30 \pm 0,79*	0,048
	Reins	2,07 \pm 0,39	2,10 \pm 0,34	0,08	2,26 \pm 0,45	0,079	2,80 \pm 0,48	0,066
	Cerveau	2,29 \pm 0,55	2,56 \pm 0,10	0,056	3,25 \pm 0,61	0,055	3,69 \pm 0,41*	0,05



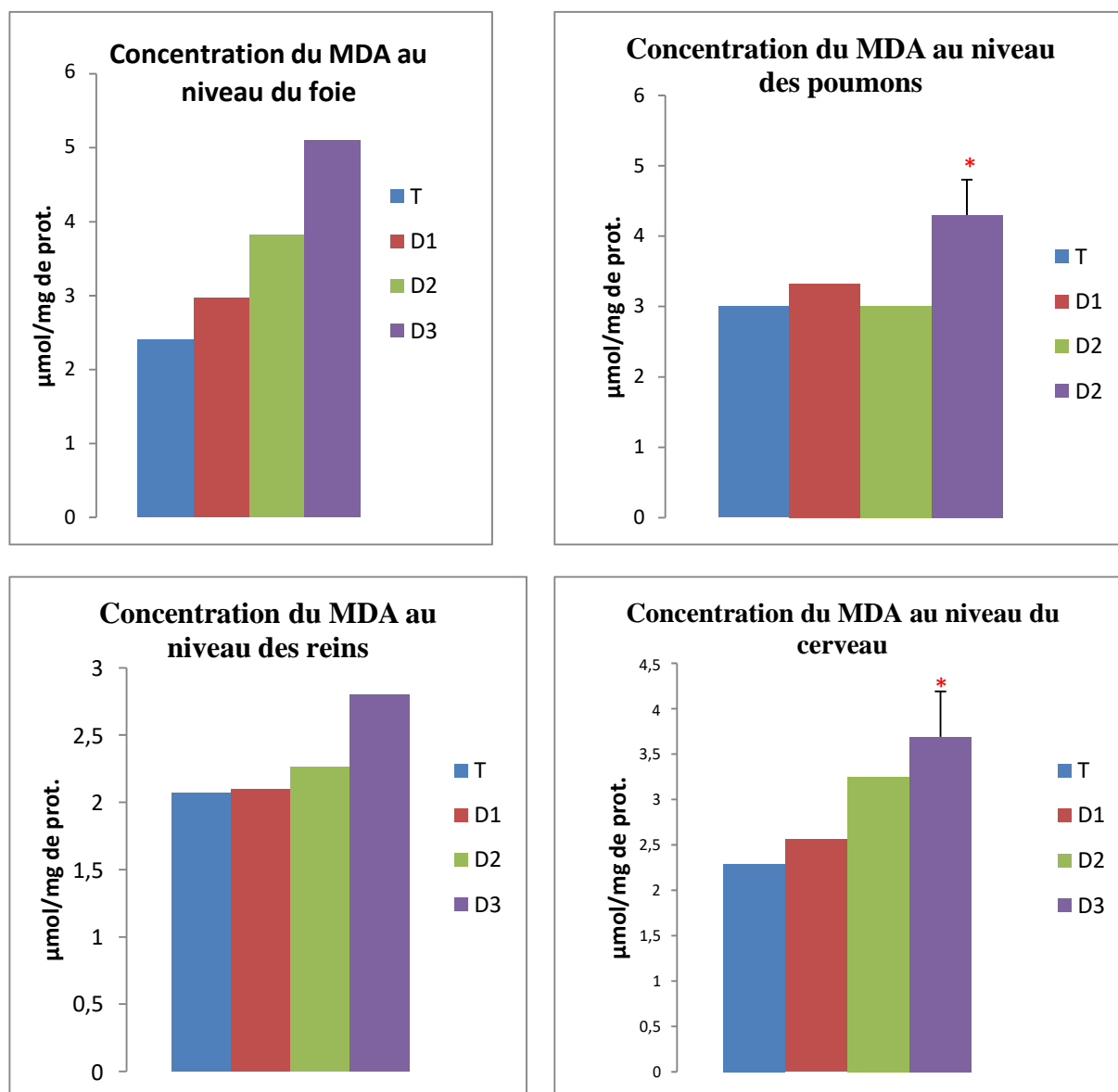


Figure 13: Concentration du malondialdéhyde au niveau des différents organes (foie, poumons, reins et cerveau) des rats traités par différentes doses d'engrais NPK 15.15.15

Etude histologique

- **Foie**

Les observations microscopiques des différents lots sont les suivantes :

- **Lot témoin** : L'étude microscopique révèle un parenchyme hépatique présentant une morphologie et une structure normales. L'architecture lobulaire est respectée, séparée par des espaces portes fins. Les hépatocytes sont réguliers, avec un cytoplasme éosinophile abondant et un noyau central régulier.
- **Dose** : Les prélèvements montrent un parenchyme hépatique proche de la normale, sans modifications lésionnelles décelables, à l'exception d'une discrète congestion vasculaire. Les hépatocytes conservent une morphologie normale.
- **Dose 2** : Pour les rats traités par la deuxième dose, des altérations du parenchyme hépatique persistent, mais elles sont minimales. On observe principalement de discrets remaniements congestifs.
- **Dose 3** : Le parenchyme hépatique présente des altérations et des modifications histologiques majeures. Les espaces portes sont élargis, avec un infiltrat inflammatoire lymphocytaire. On observe une fibrose péri-portale et une importante congestion vasculaire caractérisée par des vaisseaux à paroi épaissie et une lumière gorgée d'hématies. Les hépatocytes montrent souvent des signes de souffrance cellulaire avec ballonnisation et clarification cytoplasmique. Une stéatose micro et macrovésiculaire importante est également présente (**Figure 17**).

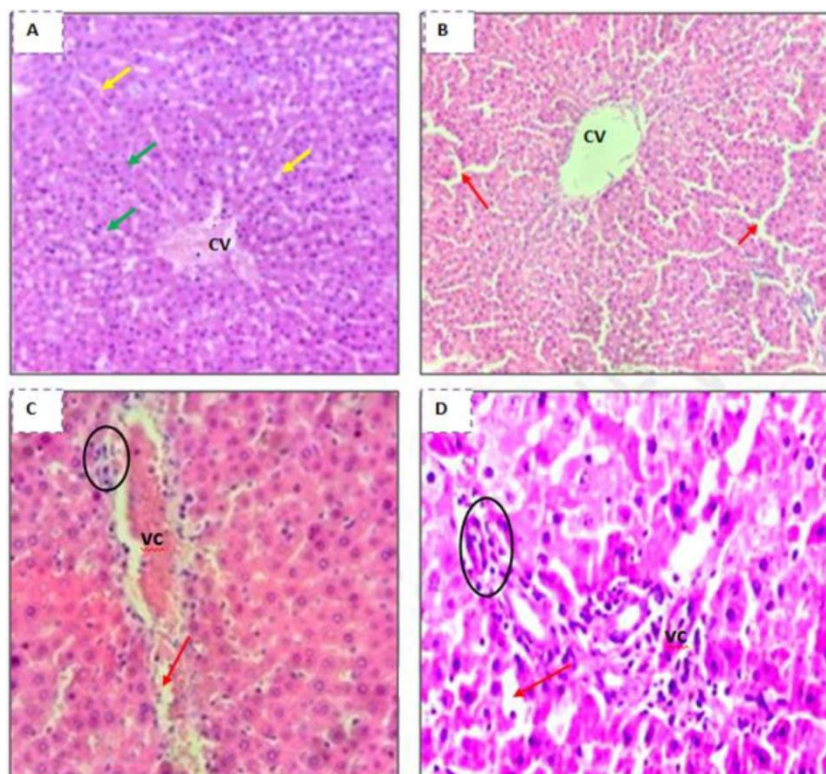


Figure 14: Coupes histologiques du foie des rats traités par différentes doses d'engrais NPK 15.15.15

(A) : Foie d'un rat témoin avec une morphologie normale; (B): Foie d'un rat traité par une faible dose d'engrais NPK 15.15.15, représentant des dilatations sinusoidales (flèche rouge) ; (C) et (D): Foie des rats traités par une dose moyenne et une forte dose d'engrais respectivement représentant des congestions vasculaires (VC), des infiltrations lymphocytaires (cercles) ainsi que des dilatations sinusoidales (**Coloration H et E. X 200**).

- **Poumons**

Les observations microscopiques des différents lots pour les poumons sont les suivantes :

- **Lot témoin** :L'étude microscopique révèle un parenchyme pulmonaire alvéolaire présentant une morphologie et une structure normales. Les lumières alvéolaires sont tapissés par des cellules pneumocytaires régulières, et les parois bronchiques sont bordées par un épithélium pseudostratifié de type respiratoire.
- **Dose 1 et Dose 2** :L'aspect histologique est sensiblement identique pour les poumons des rats traités par la deuxième et la troisième dose. Le parenchyme pulmonaire est presque à la limite de la normale, montrant uniquement de discrètes lésions d'alvéoles interstitielles avec un discret infiltrat lymphocytaire, formant de rares renforcements nodulaires.

- **Dose 3** :Les prélèvements recueillis montrent un parenchyme pulmonaire présentant des altérations et des modifications histologiques. Les alvéoles sont par endroits distendues, avec une légère hyperplasie pneumocytaire réactionnelle et la présence de rares histiocytes macrophages. Au niveau du tissu interstitiel, une importante congestion vasculaire caractérisée par des vaisseaux à paroi épaissie et une lumière gorgée d'hématies est observée, associée à une inondation hémorragique. Un dense infiltrat lymphocytaire est également présent (**Figure 18**).

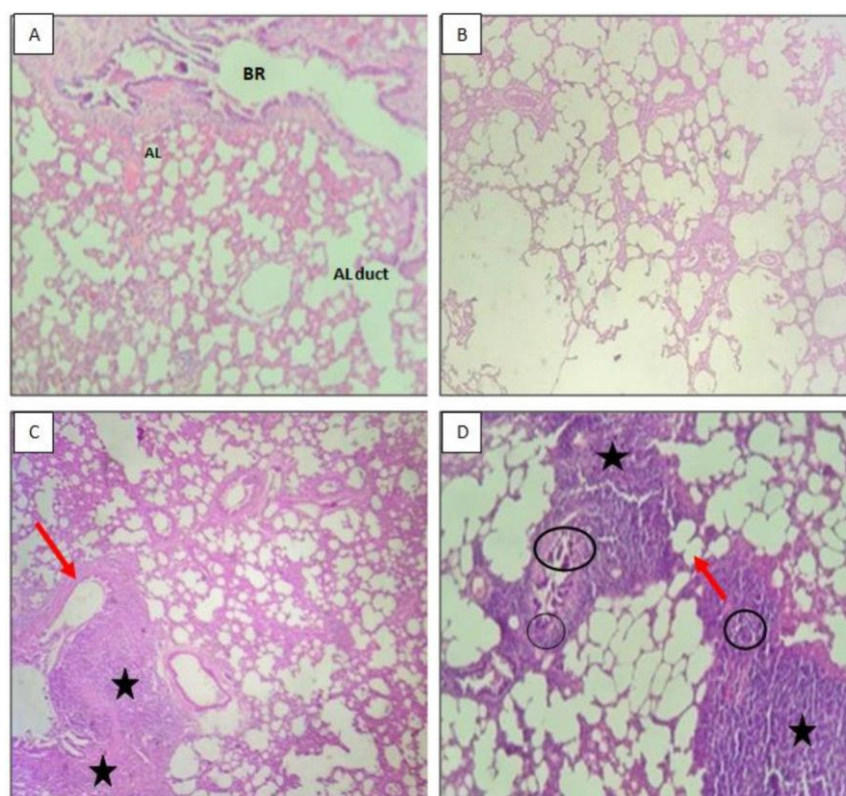


Figure 15: Coupes histologiques des poumons des rats traités par différentes doses d'engrais NPK 15.15.15

(A) : Poumon d'un rat témoin. AL (alvéoles), BR (bronchioles); (B) :Poumon d'un rat traité par une faible dose d'engrais qui ne présente pas de lésions décelables ; (C) : Poumons d'un rat traité par une dose moyenne d'engrais, montre un épaississement du tissu interstitiel (flèche rouge) ainsi qu'une hyperplasie (étoiles); (D): Poumon d'un rat traité par la forte dose d'engrais montre un important épaississement du tissu interstitiel, une infiltration lymphocytaire (cercles) et une implorante hyperplasie (coloration H et E . X 200).

- **Les reins**

L'étude microscopique des reins du lot témoin ainsi que ceux traités par la première dose a révélé un parenchyme rénal de morphologie normale, comportant des tubes choléysteurs réguliers et des glomérules de Malpighi bien définis. Chez les rats du lot traité par la deuxième dose, les prélèvements recueillis ont montré un parenchyme rénal présentant des modifications morphologiques minimales sans altérations histologiques importantes. En revanche, les rats traités par la troisième dose ont montré des modifications morphologiques majeures, illustrées par des dégénérescences des glomérules rénaux, des congestions vasculaires et la présence d'infiltrats lymphocytaires(**Figure 19**).

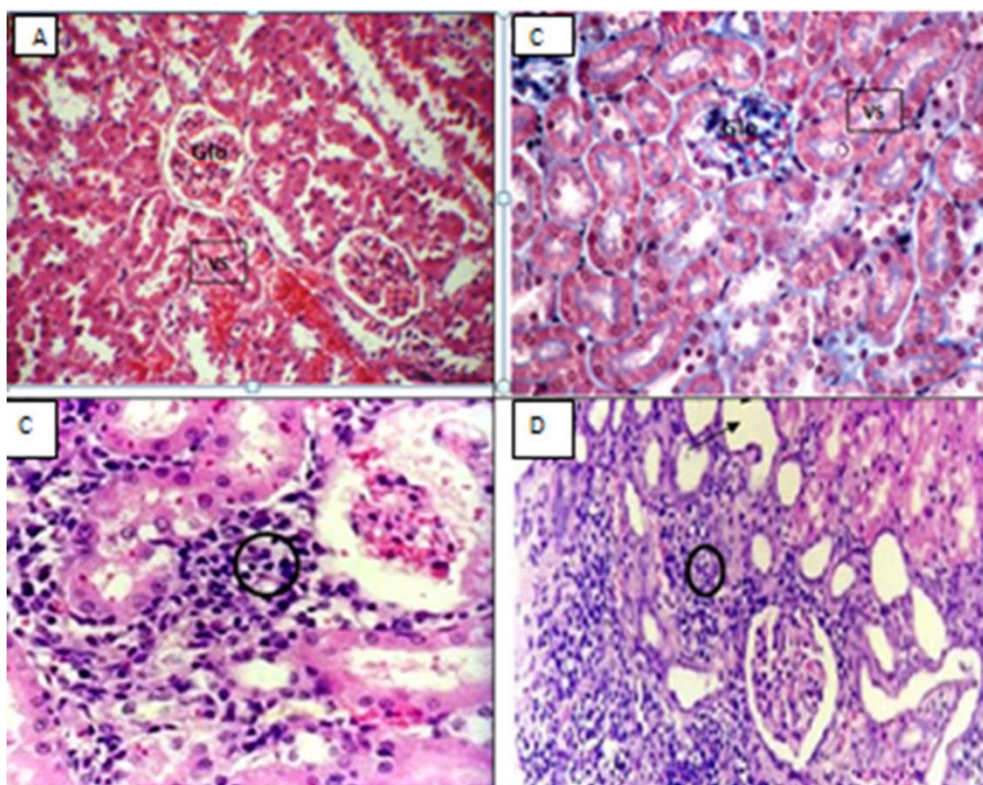


Figure 19: Coupes histologiques des tissus rénaux des rats traités par différentes doses d'engrais NPK 15.15.15

(A et B): Reins d'un rat témoin et rat exposé à une faible dose représentant une morphologie rénale normale. **Glo** (glomérule); **VS** (vaisseau sanguin); (C): Rats d'un rat traité par une dose moyenne caractérisé par de modifications minimales de la structure morphologique. **Cercle** (infiltration lymphocytaire); (D) : Rein d'un rats exposé à une forte dose d'engrais et qui présente des altérations histologiques importantes, **flèche** (dilatation sinusoidale) ; **Cercle** (infiltration lymphocytaire) (coloration H & E. x 400).

- **Cerveau**

Les prélèvements, composés de fragments issus du cortex cérébral et du bulbe olfactif des rats répartis en 4 lots (témoins, dose 1, dose 2, dose 3), ont été étudiés après coupes sériées de 3 microns et coloration HE.

Au niveau du cortex cérébral, l'aspect histologique est sensiblement identique pour tous les prélèvements des rats des 4 lots. Le parenchyme cérébral présente une structure et une morphologie normales, avec une distinction claire entre la substance blanche et la substance grise. La substance grise renferme les six couches moléculaires, granulaire externe, pyramidale externe, granulaire interne, ganglionnaire et polymorphe. On identifie des cellules étoilées en grains et des cellules pyramidales avec des noyaux réguliers, ne présentant aucun signe de souffrance cellulaire ni d'apoptose.

L'examen du bulbe olfactif des rats témoins ainsi que des rats traités par différentes doses ne révèle aucune modification histologique ou altération parenchymateuse. Les trois couches moléculaires, de Purkinje et granulaire sont régulièrement réparties. Les cellules présentent une morphologie normale, et aucun signe de dégénérescence cellulaire ni de critères cytologiques ou architecturaux de malignité n'a été observé (**Figure 20**).

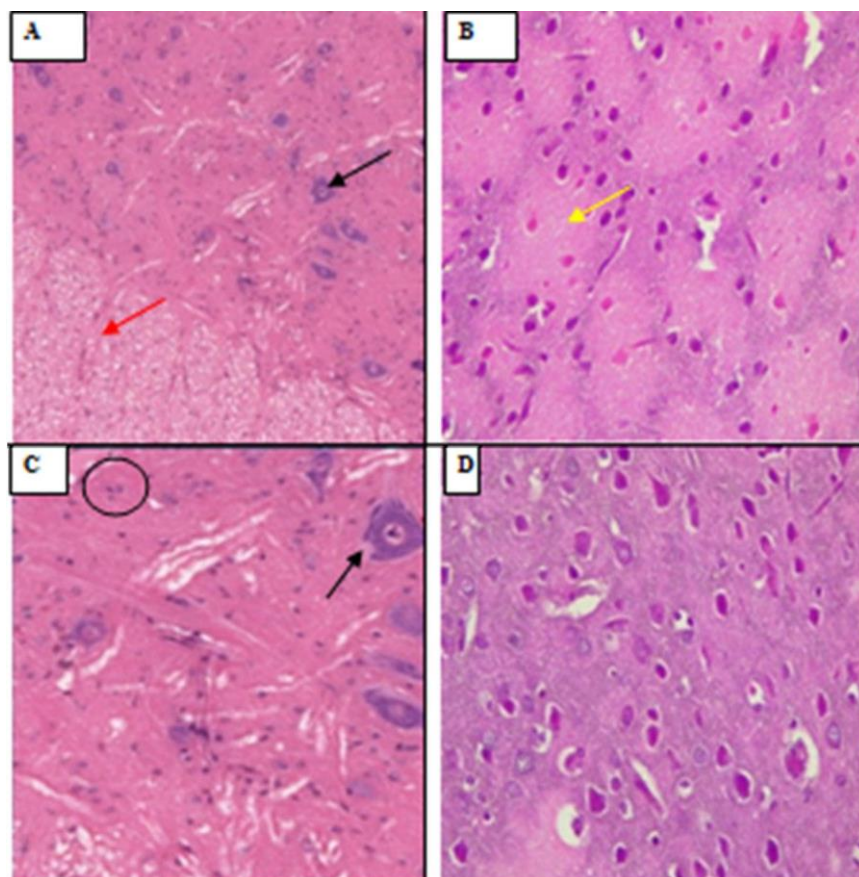


Figure 16: Coupes histologiques des tissus nerveux des rats traités par différentes doses d'engrais NPK 15.15.15

Les rats des 4 groupes traités par de différentes doses d'engrais NPK sont presque identiques et ne présentent pas de lésions décelables. **Flèche noire** (Noyaux); **cercle** (noyaux de cellules gliales); **flèche rouge** (prolongation cytoplasmique), **flèche jaune** (cytoplasme) (coloration & E. X 400).

DISCUSSION

Etude humaine

Le développement industriel actuel, notamment dans le cadre de la révolution verte, a conduit à une augmentation significative du rendement agricole. Cependant, cette évolution s'accompagne d'une utilisation accrue des engrais synthétiques en agriculture. L'intensification de l'utilisation des engrais chimiques a généré divers problèmes de santé humaine et environnementale, ainsi que des impacts de pollution potentiellement irréversibles (**Sharma and Chetani 2017**). Des études menées à l'échelle mondiale ont souligné que l'exposition professionnelle aux engrais chimiques peut entraîner divers types de lésions professionnelles. Dans notre présente étude, 76% des travailleurs ont déclaré avoir développé une pathologie en lien avec leur activité professionnelle et ce malgré le fait que tous les travailleurs de notre série d'étude respectent les moyens de protection pendant leurs heures de travail. Ainsi, sont apparus des accidents professionnels, tels que des brûlures, des lésions et des allergies cutanées. Des résultats similaires ont été observés dans l'étude de **Nganchamung et al. (2017)**, où les agriculteurs directement exposés aux engrais chimiques ont présenté des symptômes tels que la toux, les éternuements, les irritations et les allergies cutanées. **Mallem et al. (2015)** ont également documenté, dans leur recherche menée dans le même type d'industrie que celle de notre étude, que la majorité des travailleurs de l'unité NPK ont connu des problèmes cutanés au niveau du visage et des mains, accompagnés de problèmes oculaires, ce qui concorde aussi avec les résultats de l'étude de **Lazarov et al (2002)**. Ces problèmes de santé peuvent être liés au processus d'industrialisation des engrais, qui se déroule généralement sous haute pression et haute température en présence de plusieurs autres produits chimiques potentiellement dangereux pour la santé (**Geetha et al., 2001**). En effet, au-delà de 200°C, les nitrates se décomposent en émettant une vapeur nitreuse (NOx), pouvant être à l'origine de lésions respiratoires et oculaires (**Testud, 2004**). D'autres perturbations métaboliques peuvent aussi survenir. C'est ce que nous avons tenté de dévoiler en évaluant les paramètres hormonaux et biochimiques chez les travailleurs.

Dans la présente étude, aucune différence significative au niveau des hormones thyroïdiennes (T3, T4, TSH) et de l'hormone sexuelle (testostérone) entre le groupe des travailleurs et le groupe témoin n'a été observée. Ceci est en accord avec les résultats de **Mallem et al. (2015)** qui ont rapporté qu'il n'y avait pas de différence significative au niveau de la concentration de la testostérone chez les travailleurs du complexe de stockage et de distribution des engrais

comparativement aux témoins. Ceci peut être due au développement d'un système adaptatif de l'organisme. En effet, l'organisme pourrait s'adapter aux expositions à long terme dans le cas de ce type de polluants. Ce mécanisme est probablement généré par certains polluants qui peuvent activer les récepteurs des xénobiotiques, un type de récepteurs principalement responsable à l'adaptation de l'organisme aux flux des xénobiotiques afin de les éliminer par différents mécanismes enzymatiques (**Willson and Kliewer 2002**). De plus, au cours de notre rencontre avec les travailleurs, nous avons noté un respect absolu des moyens de protection (gants, casque, masque nasal, tenue et chaussures de sécurité). Ceci pourrait minimiser l'effet des engrais sur leur santé. D'autant plus que de la mise en place des précautions protectives par l'industrie (installation des filtres, installation des sanitaires un peu partout afin de faciliter le lavage du corps après les heures de travail ou bien le lavage des mains durant les heures de travail surtout avant de manger), ainsi que la bonne gestion médicale par l'industrie peut expliquer l'absence de différence significative en terme de variation dans les taux des hormones entre les travailleurs et les témoins.

D'autre part, concernant les paramètres biochimiques, nous avons observé une augmentation significative des taux de cholestérol total et des TG chez les travailleurs comparativement aux témoins. Dans ce sens, il a été rapporté que l'augmentation du niveau de cholestérol peut induire l'accumulation des TG associés à des altérations hépatorénales ainsi que la formation des stéatoses sévères (**Joshi et al. 2014**). D'autre part, les niveaux élevés du cholestérol et des TG sont considérés parmi les facteurs de risque les plus importants des maladies cardiovasculaires, et c'est ce que **Poreba et al. (2011)** ont rapporté dans leur recherche menée sur des travailleurs exposés aux métaux lourds. Ces données de la littérature, suggèrent que l'exposition professionnelle des travailleurs aux engrais étudiés pourrait néanmoins représenter un risque de prédisposer les travailleurs sur le long terme à diverses pathologies. D'autant plus que la moyenne d'ancienneté de travail dans l'industrie est d'environ 17 années et que chacun des travailleurs exerce en moyenne 8 heures au sein de l'unité NPK. Néanmoins, ces constatations mériteraient d'être confirmées puisque les données de la littérature semblent controversés, notamment à cause de résultats d'autres recherches qui ont indiqué qu'il n'existe pas d'anomalies au niveau des paramètres lipidiques malgré l'exposition professionnelle chronique des travailleurs aux mêmes engrais étudiés (**Boukerche et al. 2007; Loukil et al. 2014**).

Par ailleurs, on sait que le foie est considéré comme l'organe métabolique de l'organisme responsable de la défense et la détoxification contre les diverses toxines métaboliques et représente alors un organe particulièrement vulnérable aux dommages engendrés par l'exposition aux xénobiotiques environnementaux (**Manfo et al. 2020**). Cet organe agit par l'intermédiaire de l'enzyme cytochrome p450. Nous supposons donc que l'exposition à fortes doses d'engrais entraîne une inhibition de la biocatalyse méditée par le cytochrome p450 ou affecte négativement le système de transport membranaire mitochondrial des hépatocytes dans le foie (**Ahmed et al., 2020**). C'est ce que nous avons tenté de prouver en évaluant les différents marqueurs de la fonction hépatique. Ainsi, nos résultats ont montré une augmentation hautement significative du niveau des enzymes ASAT et ALAT, rejoignant ceux de **Boukerche et al. (2007)** qui, malgré le fait qu'ils n'avaient pas constaté de changement dans leur bilan lipidique, ont quant même démontré une forte activité enzymatique des ASAT et des ALAT liée à l'effet hépatotoxique du nitrate d'ammonium chez les travailleurs de leur étude. En effet, on retrouve souvent, dans la littérature, un niveau élevé des enzymes sériques de la fonction hépatique au cours du dysfonctionnement hépatique pouvant être dû à un défaut dans la biosynthèse des enzymes ou à une anémie et/ou une méthémoglobinémie (**Talas et al. 2013; Fouad et al. 2017**). D'autres études ont expliqué cela par des dommages au niveau même des cellules hépatiques avec perte de la fonction de la membrane hépatique qui aurait induit une fuite des enzymes hépatiques à partir du cytosol vers la circulation sanguine (**Bhardwj et al. 2020**).

D'autre part, les reins représentent également des organes principalement impliqués dans l'excrétion des xénobiotiques et des métabolites secondaires dans les urines. Ainsi, nous avons constaté que certains marqueurs de la fonction rénale telles que l'urée et la créatinine ont augmenté chez les travailleurs comparativement au groupe témoin. Ceci peut être due à une modification de la filtration glomérulaire par un changement du seuil de réabsorption tubulaire tel que cela a été rapporté dans la littérature (**Zurovsky and Haber 1995 ; Karadeniz et al., 2008 ; Adedara et al., 2012**). Cependant, les données de littérature semblent encore très controversées par rapport aux effets de certains polluants chimiques telles que les nitrates et les nitrites, en faisant toujours allusion aux études de **Boukerche et al. (2007)** ainsi que **Loukil et al. (2014)** qui ont rapporté qu'il n'y avait pas de corrélation entre l'exposition professionnelle aux dérivés nitrates et l'altération des marqueurs des fonctions rénales. Les divergences pourraient être dues à plusieurs raisons

liées à l'âge, le sexe, l'effectif inclu dans l'étude, la dose ou bien la durée de l'exposition et donc du stade du développement des lésions métaboliques, car il a souvent été constaté que des suivis sur le long terme d'individus exposés à un xénobiotique finissent par conclure à une tendance à des dysfonctionnements tubulaires rénaux attribuables à ce xénobiotique en question.

En ce qui concerne les analyses urinaires, la détection de nitrites, de leucocytes et d'érythrocytes dans les urines des travailleurs est similaire aux résultats obtenus dans l'étude de **Boukerche et al., (2007)**, qui a également montré des dommages rénaux illustrés par la présence de leucocytes et d'érythrocytes dans les urines de 50 % des travailleurs. Quoique l'apparition de sang dans les urines des travailleurs peut être expliquée par une infection des voies urinaires, car une nitriturie positive indique généralement la présence de certains organismes bactériens responsables de la conversion des nitrates en nitrites (une molécule toxique), et la leucocyturie peut résulter de processus inflammatoires au niveau des reins (**Jeff et al., 2001**).

Dans la plupart des études conduites sur les effets des dérivés nitrates, les auteurs ont souligné le fait que le sang est le principal trajet emprunté par ces molécules (**Beier et al. 1995; Guastadisegni et al. 1989**). Ainsi, l'exposition des travailleurs, par comparaison aux témoins, ont montré des perturbations au niveau des paramètres hématologiques, tels que les globules blancs (WBC) qui était significativement augmentés. Des études antérieures humaines ont également rapporté une relation entre l'exposition à des xénobiotiques, tels que ceux contenus dans la tabac sans fumée, et la modification de l'indice hématologique, notamment l'augmentation des globules blancs du sang (**Khaldi, 2023**). De plus, tout comme **Ihedioha and Idika (2007a)** qui ont montré une diminution significative au niveau de la concentration de l'hémoglobine chez des rats traités par l'eau contaminé avec l'engrais NPK 15.15.15 aux concentrations de 2%, 1%, 0.5% pendant 3 mois, nous constatons la diminution du nombre des érythrocytes et de la concentration d'hémoglobine chez les travailleurs comparativement aux témoins. En effet, les nitrates et les nitrites oxydent l'hémoglobine qui va être convertie en méthémoglobine et donc la concentration d'hémoglobine va être diminuée. **Ihedioha and Idika (2007a)** ont conclu à partir des résultats obtenus au cours de leur étude que l'eau potable contaminé par les engrais peut conduire à une anémie. Celle-ci pourrait être le résultat d'une hyper/hypoplasie toxique de la moelle osseuse ou bien d'une diminution de la sécrétion de l'érythropoïétine dans le tissu rénal affecté par une intoxication suite à l'exposition aigue

aux engrais (**Aster, 2004**). La diminution de ces paramètres hématologiques est également en corrélation avec l'augmentation des enzymes hépatiques. En effet, l'anémie pourrait être expliquée par un mauvais fonctionnement du foie et des reins, comme nous l'avons constaté nous même précédemment. Elle pourrait également être expliquée par le fait que les niveaux d'érythropoïétine sont affectés mais aussi certains autres composants de l'érythropoïèse sont touchés (**Damian et al. 2020**). Par ailleurs, les études étant toujours controversées, **Neghab et al. (2019)** ont indiqué dans leur étude conduite sur un groupe de travailleurs (de sexe masculin) d'une industrie de pétrochimie qu'il n'existe pas de différence significative entre le groupe exposé et le groupe non exposé au nitrate d'ammonium, toujours concernant les paramètres hématologiques. L'étude de **Boukerche et al. (2007)** ne rapporte également aucune différence significative concernant les paramètres hématologiques dans leur étude chez les travailleurs de l'unité NPK comparativement à des témoins.

Il existe différents facteurs exogènes qui peuvent accélérer la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans l'organisme, comme par exemple les métaux lourds, les radiations, les bactéries et les virus (**Ilieva and Sainova 2022**). Cependant, jusqu'à maintenant, très peu de recherches ont traité les effets des engrais chimiques sur le statut de stress oxydatif chez les humains. Ainsi, on rappelle que le stress oxydatif pourrait être défini comme une concentration élevée des ROS causant ainsi les dommages moléculaires aux structures et fonctions vitales (**Rakers et al.2020**). D'ailleurs, les érythrocytes sont particulièrement sensibles au stress oxydatif à cause de leurs teneurs élevés en oxygène par rapport à toutes les autres cellules de l'organisme (**Valko et al. 2006**). De plus, les enzymes et les protéines contenues dans les érythrocytes matures sont des cibles principales du stress oxydatif. Notre présente étude a montré que l'exposition professionnelle aux engrais chimiques et spécialement les engrais NPK 15.15.15 pourrait entraîner la diminution des enzymes antioxydantes évaluées, à savoir la SOD, la CAT et la GPx. Cette réduction pourrait être à l'origine de la contraction des diverses maladies chroniques chez les travailleurs exposés aux engrais. Des études précédentes menées sur les dérivés nitrates (nitrate et arsenate de sodium) ont également montré une réduction des enzymes antioxydantes chez des animaux (**Rouag et al. 2020; Klibet et al. 2016**). La réduction des enzymes étudiées au cours de notre étude peut expliquer l'incapacité du système de défense antioxydant à éliminer les espèces réactives de l'oxygène générées par les engrais NPK 15.15.15 et accumulés dans l'organisme des travailleurs. D'autre part, on a constaté une augmentation significative du MDA

érythrocytaire chez les travailleurs par rapport aux témoins. En tant que marqueur de la peroxydation lipidique, il a été rapporté que l'augmentation de sa concentration est un signe d'apparition de différentes situations inflammatoires (**Kamalakkanan and Prince 2004 ; (Al-Afaleg et al. 2011).**

Expérimentation animale

Dans le but d'apporter plus d'éléments de réponse concernant l'effet des engrais NPK sur les systèmes biologiques, il nous a paru utile de compléter l'étude humaine, en menant une expérimentation animale sur des rats soumis à l'inhalation de ces mêmes engrais. Dans un premier temps, nous avons effectué des mesures de poids, car la réduction du poids corporel est souvent utilisée comme un indicateur de la détérioration de l'état de santé générale des rats (**Djeffal et al., 2012**). Ainsi, le suivi du poids corporel est donc un critère important pour évaluer les effets toxiques des xénobiotiques (**Mansour et Mossa, 2010**). Nous rappelons que les rats ont été traités durant 30 minutes et ce 28 jours d'affilée en utilisant trois doses différentes du fertiliseur (NPK 15.15.15), à savoir 10 mg/m³, 30 mg/m³ et 50 mg/m³. Les résultats de notre étude montrent une diminution dose-dépendante du poids corporel des rats traités par la deuxième et la troisième dose d'engrais par rapport au groupe témoin. Cette diminution du poids corporel peut s'expliquer par une diminution de l'appétit de ces animaux par rapport au groupe témoin tel que cela a pu être rapporté par d'autres études (**Wango et al., 2014**). La perte d'appétit est souvent synonyme de perturbation du métabolisme des glucides, des protéines et/ou des lipides (**AL-Snafi, 2017**), probablement due à l'accumulation d'engrais dans l'organisme des animaux (**Bouaziz et al., 2014**). Des résultats similaires ont été observés dans des études antérieures, telles que celle d'**Arrar et al. (2022)**, qui ont constaté une baisse significative du poids corporel chez les rats traités avec des doses croissantes d'engrais chimiques. **Rouag et al. (2020)** ont rapporté que le traitement par voie orale des rats avec des nitrates de sodium à une dose de 200 mg/kg/jour pendant 28 jours entraîne aussi une diminution significative du poids corporel des rats traités. Le mécanisme d'action de ces engrais n'est pas totalement élucidé, mais il est suggéré qu'ils pourraient inhiber directement la consommation alimentaire, la digestion, l'absorption et/ou l'utilisation de la nourriture (**Ihedioha et Idika, 2007b**).

L'estimation du poids des organes est également un indicateur important dans l'étude toxicologique pour évaluer les effets néfastes des xénobiotiques (**Bailey et al., 2004, Sellers**

et al., 2007). Dans notre étude, nous avons comparé les poids des organes cibles (foie, poumons, reins et cerveau) des animaux traités par différentes doses d'engrais NPK 15.15.15 avec ceux des animaux sains. Nous avons constaté une augmentation significative du poids absolu du foie chez les rats traités par la troisième dose par rapport au groupe témoin. Des résultats similaires ont été observés dans des études antérieures, comme celle de **Klibet (2016)**, où une augmentation significative du poids relatif du foie a été observée chez les rats traités à l'arsenic de sodium pendant 21 jours. Une élévation significative du poids hépatique absolu a également été constatée chez les rats traités par l'engrais synthétique (mono-ammonium du phosphate) dans l'étude **d'Arrar et al. (2018)**. Cette observation a également été rapportée dans une recherche antérieure sur les effets des engrais synthétiques sur des poissons exposés aux engrais chimiques (**Naqvi et al., 1993**). L'augmentation du poids hépatique chez les animaux traités par ce type d'engrais pourrait être due à une hypertrophie du foie ou à l'accumulation des produits chimiques étudiés dans cet organe (**Arrar et al., 2018**), ou tout simplement à un œdème hépatique inflammatoire sachant que le foie est l'organe principal responsable du métabolisme des composants endogènes et exogènes, et donc la principale voie de métabolisme des xénobiotiques et des toxines dans l'organisme (**Cao et al., 2016**).

D'ailleurs, concernant les paramètres du profil lipidique, conformément à notre étude humaine, une augmentation du taux sérique du cholestérol chez les rats du groupe D par rapport au témoin, a été enregistrée chez les animaux. Ce constat est similaire à l'étude de **Ihedioha and Okorie-Kanu (2011)** menée sur des animaux (chèvres) qui ont été traités par l'eau contaminée avec 3% d'engrais NPK 15.15.15 pendant 4 semaines. Ainsi, étant donné que le foie est l'organe clé du métabolisme du cholestérol et de la régulation de ses taux plasmatiques (**Wadhera et al., 2016**), nous apportons une confirmation supplémentaire qu'il y a bien eu des dommages hépatiques avec destruction des lipides dans le tissu adipeux (**Ghaffar et al., 2017; Feki et al., 2021**) et cela suite à l'exposition aux engrais chimiques chez les animaux traités avec les doses les plus élevées. De plus, concernant les marqueurs hépatiques, nos résultats montrent une élévation dose-dépendante des transaminases (ASAT et ALAT), ainsi que des phosphatases alcalines, surtout chez les rats traités par la troisième dose d'engrais. L'augmentation de l'activité de ces enzymes traduit une lésion hépatique qui, comme nous l'avons déjà souligné dans l'étude humaine, pourrait s'expliquer par la fuite des enzymes du tissu vers le plasma en raison de l'altération de la perméabilité membranaire des

cellules du foie, entraînant ainsi la libération de l'ALAT, de l'ASAT et de la PAL dans la circulation générale (Fleseriu et al., 2006 ; Layachi et Kechrid, 2013).

Les reins, en tant qu'organes vitaux, jouent aussi un rôle essentiel dans l'élimination des déchets métaboliques, le maintien de l'homéostasie et la synthèse d'hormones cruciales (Liguori et al., 2021). Notre expérimentation a mis en évidence une augmentation dose-dépendante hautement significative de l'urémie et de la créatininémie chez les rats des groupes C et D par rapport au groupe témoin. Une élévation similaire des marqueurs de la fonction rénale a été observée par Arrar et al. (2022) dans leur étude sur la toxicité des engrais phosphatés, ainsi que par Bouaziz et al. (2015) dans leur expérimentation menée sur des rats traités par les nitrates de sodium et chez qui ils ont observé une augmentation similaire, au niveau de la concentration de la créatinine et de l'urée. Les changements constatés dans ces paramètres, considérés comme des indicateurs clés de la fonction rénale, viennent confirmer les résultats de notre étude humaine menée chez les travailleurs. Ainsi, l'augmentation des taux sériques d'urée et de créatinine reflète bien la néphrotoxicité de l'engrais chimique NPK 15.15.15. Ce constat, nous avons tenté de l'expliquer par une modification de la filtration glomérulaire par un changement du seuil de réabsorption tubulaire tel que cela a été rapporté dans la littérature (Zurovsky and Haber 1995 ; Karadeniz et al., 2008 ; Adedara et al., 2012).

Pailleurs, tel que nous l'avons souligné précédemment, le sang est le principal moyen de transport dans le corps, fournissant des informations vitales sur la réponse de l'organisme à tout type de lésions. Notre étude a révélé une augmentation hautement significative des lymphocytes sanguins chez les groupes traités par la deuxième et la troisième dose d'engrais par rapport au groupe témoin, indiquant un état d'inflammation, similaire à notre étude humaine. De plus, une élévation dose-dépendante hautement significative des monocytes a été observée chez les animaux des groupes traités par la deuxième et la troisième dose par rapport au groupe témoin. Cette production accrue de lymphocytes et de monocytes peut témoigner d'une réaction allergique ou de l'activation du système immunitaire inné en réponse à une réaction inflammatoire provoquée par des motifs moléculaires du danger dits DAMP (Damage Associated Molecular Pattern) qui sont reconnus par les *toll-like* récepteurs (TLR) (Essakalli et al, 2009). Ces résultats sont en accord avec des études antérieures montrant une augmentation significative des lymphocytes et des monocytes chez des animaux exposés à des substances toxiques (Rawat et al., 2013). En revanche, une diminution

significative a été observée au niveau des globules rouges (GR), de l'hémoglobine (Hgb) et de l'hématocrite (Htc) dans le groupe d'animaux traités par la troisième dose par rapport au groupe témoin. Ces résultats, similaires à ceux de **Ihedioha and Idika (2007a)** que nous avons cités et qui ont montré que la toxicité des engrais NPK 15.15.15, pourraient conduire à une anémie. En effet, au vu des perturbations fonctionnelles touchant le foie des animaux, ceci aurait engendré la diminution des GR, de l'Hb et de l'Htc.

Dans notre présente étude, nous avons également tenté de confirmer les effets de l'inhalation subchronique des engrais chimiques de type NPK 15.15.15 sur le système antioxydant global, en évaluant les variations de pratiquement les mêmes systèmes antioxydants que nous avons évalués dans l'étude humaine. Ainsi, nous avons mesuré la peroxydation lipidique en mesurant le taux de MDA dans les tissus de quatre organes cibles: le foie, les poumons, les reins et le cerveau, mais également les enzymes SOD et GPX, ainsi que le marqueur non enzymatique GSH. C'est ainsi que, le MDA, en tant que produit final de la peroxydation lipidique, a montré, tout comme chez les travailleurs de notre étude humaine, une augmentation significative dans les poumons et le cerveau, indiquant des dommages aux membranes cellulaires dues justement à la peroxydation lipidique. La diminution significative du GSH dans les poumons et le cerveau des animaux exposés à la dose la plus élevée d'engrais NPK 15.15.15 suggère une altération de l'efficacité du système antioxydant, rendant les cellules des tissus cibles plus vulnérables aux espèces réactives de l'oxygène. Pareillement, les enzymes antioxydantes, GPX et SOD, ont également montré une diminution significative au niveau rénal et pulmonaire, indiquant une possible inhibition ou épuisement de ces enzymes, et surtout confirmant les résultats obtenus dans notre première partie d'étude, ainsi que toutes celles qui nous ont précédées (**Brassea-Pérez et al, 2022**).

En conclusion, notre étude met en lumière le fait que le stress oxydatif est bel et bien survenu lorsque les tissus du corps ont été exposés à un xénobiotique induisant un excès de radicaux libres et dépassant la capacité du corps à le neutraliser. Si bien que, même lorsque l'organisme dispose d'enzymes pour contrer le stress oxydatif, ces enzymes peuvent être altérées par l'exposition à des substances étrangères, tel que le NPK.

Pour approfondir notre étude, et confirmer une ultime fois nos résultats, nous avons entrepris une analyse histopathologique des organes précédemment étudiés. L'observation microscopique du tissu pulmonaire au niveau des différents lots de rats a indiqué des modifications histologiques illustrées principalement par une hyperplasie, des congestions

vasculaires ainsi que des infiltrats lymphocytaires. Ces résultats sont similaires à ceux constatés lors des expérimentations animales menées sur les effets de différents types de xénobiotiques telle que celle de **Ahmed et al., (2020)**, conduite sur les effets de pesticides ainsi que celle de **Khaldi et al., (2017)**, qui traite les effets du tabac sans fumée. Les modifications de l'architecture pulmonaire observées lors de notre étude sont en corrélation avec les résultats constatés lors de l'analyse des paramètres de stress oxydatif au niveau des poumons. Quant à l'analyse histologique du foie, cet organe dont nous avons souligné l'implication dans l'étude humaine et animale, vient conforter toutes notre précédente explication puisque les observations microscopiques confirment les résultats de toutes les analyses précédentes. En effet, le traitement des rats par la dose la plus élevée (50 mg/m³) d'engrais NPK 15.15.15 a entraîné des altérations histologiques majeures dont les plus importantes sont : une congestion vasculaire, des hémorragies ainsi qu'une stéatose micro et macro vésiculaire. En accord avec nos résultats de l'étude humaine ainsi que celles retrouvées dans la littérature comme celle de **Rouag et al. (2020)** qui ont constaté des changements de l'architecture du tissu hépatique chez les rats traités par le nitrate d'ammonium. Ces changements sont illustrés par des congestions vasculaires, une infiltration des cellules inflammatoires et des dilatations sinusoidales. Par ailleurs, dans une étude récente (**Arrar et al., 2022**) conduite sur les effets d'un engrai chimique, les chercheurs ont noté plusieurs modifications histologiques comme: une dégénérescence hépatique avec des vacuolisations cytoplasmiques et des dilatations sinusoidales accompagnée d'un infiltrat inflammatoire. Dans d'autres travaux, les auteurs ont montré des altérations histologiques sévères accompagnés d'une nécrose cellulaire (**Deshmukh et ramteke, 2017; Mostafa et al., 2017; Hamdi et al., 2019**).

L'histopathologie rénale réalisée lors de notre étude a indiqué que l'exposition des rats à de fortes doses de l'engrais NPK 15.15.15 est à l'origine de lésions rénales caractérisées par des dégénérescences des glomérules, des congestions vasculaires et la présence des infiltrats lymphocytaires. Ces observations sont en accord avec les observations de **Arrar et al., (2022)**, qui ont noté des dégénérescences des tubules rénaux, une hypertrophie des glomérules, une congestion vasculaire ainsi que des infiltrations leucocytaires. De même, **Anwar et mohamed (2015)** ont observé une atrophie des glomérules et des congestions vasculaires au niveau des reins des rats traités par 500 mg/L de NaNO₃ pendant 6 semaines. Ces altérations pourraient être dues aux radicaux libres générés par l'engrais étudié, ce qui

augmente la peroxydation lipidique et ainsi l'induction des dommages histopathologiques touchant, entre autre, les reins (**Fouad et al., 2017**). L'altération histologique constatée lors de notre étude confirme les données biochimiques à propos de la fonction rénale, aussi bien dans l'étude humaine que dans l'expérimentation animale. En fin, les coupes histologiques réalisées sur les cerveaux des rats des différents lots étudiés ont montré des altérations illustrées principalement par une nécrose et ceci chez le groupe de rats traités par la plus forte dose d'engrais. Ce résultat est similaire aux résultats retrouvés dans une étude précédente (**Merzban et al., 2020**) menée sur les effets toxiques du Nickel et au cours de laquelle les auteurs ont noté des nécroses et des glioses dans le système nerveux central des rats. En effet, le cerveau est un organe fortement sensible à l'activité métabolique oxydante accrue des radicaux libres, étant donné sa teneur élevée en acide gras polyinsaturés (**Nakbi et al., 2016**), il est donc particulièrement vulnérable aux dommages oxydatifs (**Nunomora et al., 2016**). Ainsi, il est possible d'associer l'ensemble des dommages histologiques observés lors de notre étude aux perturbations enregistrés précédemment au niveau des paramètres du stress oxydatif au niveau des mêmes organes. Nos résultats histopathologiques renforcent ainsi les données biochimiques et les paramètres de stress oxydatif précédemment observés, soulignant les effets néfastes de l'exposition subchronique aux engrais chimiques NPK 15.15.15 sur les organes cibles. Ces constatations soulignent l'importance de prendre en compte les impacts sur la santé lors de l'utilisation intensive de tels engrais.

***CONCLUSION ET
PERSPECTIVES***

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les engrais, qu'ils soient minéraux, synthétiques ou organiques, nous l'avons compris sont des intrants importants et largement utilisés dans l'agriculture jouant un rôle essentiel dans la croissance des végétaux et donc dans l'autosuffisance en matière de nutrition humaine. Selon les données de la littérature, l'agriculture algérienne est une grande consommatrice de fertilisants, notamment de type NPK. Malgré cette large utilisation permettant certes de contribuer à la sécurité alimentaire nationale, très peu d'études ont été entreprises pour évaluer leurs effets négatifs sur la santé humaine et animale, alors que nombreuses celles où on retrouve l'impact de leur utilisation sur les sols et l'environnement.

Cette présente étude, originale et unique en son genre, s'était fixé comme objectif l'évaluation des effets néfastes des engrais chimiques, tertiaire NPK 15.15.15, afin d'en confirmer la toxicité. Dans la première partie de notre recherche, l'étude humaine sur les travailleurs dans une entreprise de fabrication de fertilisants (FERTIAL), et donc qui sont directement en contact avec la poussière de cet engrais, a révélé que l'exposition à long terme à ces polluants chimiques entraîne diverses altérations, notamment des lésions cutanées, des réactions allergiques, et une altération des fonctions rénale et hépatique due à l'accumulation de résidus chimiques, tels que les nitrites, dans l'organisme des travailleurs. Ce résultat a été conforté par l'évaluation, chez cette même population, de plusieurs paramètres sanguins et urinaires réalisés suite à un unique prélèvement. Or nous aurions souhaité refaire plusieurs prélèvements pour étudier la cinétique de la variations des différents paramètres. Aucune autre étude de ce genre nous a précédé. Les résultats ont ainsi montré différentes altérations comprenant une augmentation des marqueurs de la fonction hépatique (ASAT, ALAT, PAL) et des marqueurs de la fonction rénale (urée et créatinine), confirmant la capacité hépatotoxique et néphrotoxique, en particulier à fortes doses, de ce xénobiotique. De même, une perturbation des paramètres hématologiques chez la plupart des animaux traités par les engrais a été notée, indiquant une possible situation d'anémie. Les analyses des différents marqueurs du stress oxydatif ont révélé une perturbation de ce statut. En effet, l'exposition à ce type d'engrais a été accompagné par le déclenchement du système de détoxification (MDA, GSH) et la stimulation du système de défense enzymatique représenté ici par l'activité enzymatique anti-oxydante de la SOD et le GPx. Ces altérations ont été confirmées par l'analyse histo-pathologique des organes cibles que sont les poumons, le cerveau et en particulier le foie et les reins, soulignant la dangerosité de ce xénobiotique.

Conclusion et perspectives

Pris dans leur ensemble, nos résultats reflètent l'impact nocif de l'exposition à long terme prouvée par les résultats de l'étude humaine, ainsi que l'effet-dose qui semble évident dans l'étude expérimentale animale. Les résultats scientifiques de notre travail de thèse prouvent que le risque est réel suscitant une attention particulière de tous les acteurs de la société.

Il serait certes pertinent de compléter l'étude humaine par le dosage d'autres paramètres endocriniens et immunologiques et l'évaluation de biomarqueurs moléculaires de l'infertilité ou du cancer, tout en élargissant l'effectif de la population étudiée. La recherche de remèdes naturels en utilisant des extraits de plantes médicinales locales aux propriétés antioxydantes dans l'expérimentation animale, permettra éventuellement d'offrir des solutions potentielles pour atténuer les dommages oxydatifs induits par ces engrais.

Toutefois, Notre contribution doit pouvoir être valorisée par des campagnes de sensibilisation pour arriver à une politique HSE (Hygiène Sécurité Environnement) irréprochable au sein de toute entreprise manipulant des produits chimiques à potentiel dangereux pour la santé humaine, animale et environnementale. Par ailleurs, que ce soit pour les travailleurs dans une entreprise de fabrication ou même pour des utilisateurs tels que les agriculteurs, la mise en œuvre de tous les moyens nécessaires afin de minimiser le risque, quitte à revenir aux engrais biologiques, reste capitale pour la sauvegarde de la santé humaine.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adedara I A, Teberen R, Ebokaiwe AP, Ehwerhemuepha T, Farombi EO. 2012. Induction of oxidative stress in liver and kidney of rats exposed to Nigerian bonny light crude oil. *Environmental Toxicology*. 27(6): 372-379.
- Adouan T, Barrached A, Bezziche H. 2023. Les impacts négatifs des engrais chimiques sur l'environnement et la santé publique. Thèse de doctorat. Université de Kasdi Merbah Ouargla.
- Ahmed M S, Massoud A H, Derbalah A S, Al-Brakati A, Al-Abdawani M A, Eltahir H A Elmahallawy E K. 2020. Biochemical and Histopathological alterations in different tissues of rats due to repeated oral dose toxicity of cymoxanil. *Animals*. 10 (12): 2205.
- Ajmal M, Iqra Ali H, Saeed R, Akhtar A, Tahir M, Zain Mehboob M and Ayub A. 2018. *Research & Reviews: Journal of Agriculture and Allied Sciences*. 7(1): 1-7.
- Anwar M M, Mohamed N E. 2015. Amelioration of liver and kidney functions disorders induced by sodium nitrate in rats using wheat germ oil. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 8(1): 77-83.
- Aoun M, El Samrani A G, Lartiges B S, Kazpard V, Saad Z. 2010. Releases of phosphate fertilizer industry in the surrounding environment: investigation on heavy metals and polonium-210 in soil. *Journal of Environmental Sciences*. 22(9) :1387-1397.
- Araar S, Khaldi F, Sayah S, Chaib S, Gheid A. 2022. Toxicological evaluation of a monoammonium phosphate fertilizer in rats following 30 days of repeated oral exposure *Fresenius Environmental Bulletin*. 31(08): 7861-7868.
- Ayoub N, Kaouthar E B, Soumaya R, Chaimaa M, Nadia I, Souad E A. 2023. Evaluation of the Effects of Three Chemical Fertilizers on *Artemia salina*. *Journal of Ecological Engineering*, 24(5).
- Bailey S A, Zidell R H, Perry R W. 2004. Relationships between organ weight and body/brain weight in the rat: what is the best analytical endpoint?. *Toxicologic pathology*. 32(4) :448-466.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Birk J, Meyer M, Aller I, Hansen H G, Odermatt A, Dick T P, Appenzeller-Herzog C. 2013. Endoplasmic reticulum: reduced and oxidized glutathione revisited. *Journal of Cell Science*. 126(7): 1604-1617.
- Bogacz-Radomska L, Harasym J. 2018. β -Carotene properties and production methods. *Food Quality and Safety*. 2(2): 69-74.
- Borghini T, Schenker M, Kessler D. 2013. Bandelette réactifs urinaires. Centre Suisse de Contrôle de qualité. (Site Internet des Hôpitaux Universitaires de Genève, service de médecine de premier recours <http://www.hug-ge.ch/medecine-de-premier-recours/strategies>)
- Bouayed J, Bohn T. 2010. Exogenous antioxidants—Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 3(4) :228-237.
- Boukerche S, Aouacher W, Saka S. 2007. Les effets toxiques des nitrates : étude biologique chez l'homme et chez l'animal. *Annale de Biologie Clinique*. 65: 385-91.
- Brassea-Pérez E, Hernández-Camacho CJ, Labrada-Martagón V, Vázquez-Medina JP, Gaxiola-Robles R, Zenteno-Savín T. 2022 Oxidative stress induced by phthalates in mammals: State of the art and potential biomarkers *Environmental Research* 206, 112636.
- Brunato F, Garziera M G, Briguglio E. 2003. A severe methemoglobinemia induced by nitrates: case report. *European Journal of Emergency Medicine* 10:326-30.
- Bünemann E K, Schwenke G D, Van Zwieten L. 2006. Impact of agricultural inputs on soil organisms-a review. *Soil Research*.44(4): 379-406.
- Cadet J, Bellon S, Berger M, Bourdat A G, Douki T, Duarte V, Frelon S, Gasparutto D, Muller E, Ravanat J L, Sauvaigo S. 2002. Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. *Biological Chemistry*. 383(6):933-43
- Cao L, Du J, Ding W, Jia R, Liu Y, Xu P, Teraoka H, Yin G. 2016. Hepatoprotective and antioxidant effects of dietary *Angelica sinensis* extract against carbon tetrachloride-induced hepatic injury in Jian Carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquac Res* 47: 1852-1863.
- Carr A C, Maggini S. 2017. Vitamin C and immune function. *Nutrients*. 9 (11) : 1211.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chowdhry V, Kaushik G G. 2017. Study of glycaemic biomarkers in the patients of thyroid disorders. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*. 6 (72) : 5159-5163.
- Conijn J G, Bindraban P S, Schröder J J, Jongschaap R E E. 2018. Can our global food system meet food demand within planetary boundaries. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 251: 244-256.
- Conley D J , Paerl H W, Howarth R W, Boesch D F, Seitzinger S P, Havens, K E, Likens G. 2009. Controlling eutrophication: nitrogen and phosphorus. *Science*. 323(5917): 1014-1015.
- Damian A, Ghita M, Zagrai G, Dumirescu I, Vasilescu C, Nvasilescu C, Paun L, Cotor Research regarding the effect of vitamin E on some hematological parameters in toxic stress conditions in rats. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine*. 2020 : 77(1): 21-24.
- Daum-badouard C. 2006. Les lésions des acides nucléiques: détection par CLHP-SM/SM dans les milieux biologiques humains et intérêt comme biomarqueurs du stress oxydant et de l'inflammation (Doctoral dissertation, thèse doctorat, GRENOBLE).
- Deshmukh U S, Ramteke, P M. 2017. Hematological, biochemical alterations, and changes in histological architecture of some tissue of male Wistar rats exposed to 2, 4-D-herbicide. *European Journal of Environmental Ecology*. 4 :17-21.
- Djeflal A, Messarah M, Boumendjel A, Kadeche L, El Feki A. 2012. Protective effects of vitamin C and selenium supplementation on methomyl-induced tissue oxidative stress in adult rats. *Toxicology and Industrial Health*. 31(1): 31-43.
- Elouardi M, Zair T, Mabrouki J, Fattah G, Benchrifa M, Qisse N, El Belghiti M A. 2022. A review of botanical, biogeographical phytochemical and toxicological aspects of the toxic plants in Morocco. *Toxicologie Analytique et Clinique*. 34(4) :215-228.
- Essakalli M, Atouf O, Bennani N, Benseffaj N, Ouadghiri S, Brick C. 2009 *Toll-like récepteurs Pathologie Biologie* 57 (5) 430-438
- Fan D, Subramanian S, Smith D L. 2020. Plant endophytes promote growth and alleviate salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Scientific reports*, 10(1), 1274

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Feki A, Kammoun I, Naifar M, Ayadi F M, Hakim A, Amara E. 2021. Study of the bio-chemical profile in rats treated with increasing doses of thiamethoxam. *Journal de l'Information Médicale de Sfax*. 37: 55-63.
- Fleseriu M, Auchus R, Bancos I, Ben-Shlomo A, Bertherat J, Biermasz N R, Biller B M. 2021. Consensus on diagnosis and management of Cushing's disease: a guideline update. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 9(12) :847-875.
- Flohe L, Toppo S, Orian L. 2022. The glutathione peroxidase family: Discoveries and mechanism. *Free Radical Biology and Medicine*. 187: 113-122.
- Fouad S S, Mohi-Eldin M M, Haridy M A, Khalil A M. 2017. Ameliorative effects of ascorbic acid (Vit. C) Against sodium nitrite toxicity in albino rats: hematological, biochemical and histopathological Studies. *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences*. 9: 1-6.
- Tahat M M, Alananbeh M, Othman K.A Y, Leskovaar ID. 2020. Soil health and sustainable agriculture. *Sustainability*, 12(12), 4859.
- Geetha B, Nair RH, Kesavachandran C. 2001. Pulmonary function in workers of fertiliser and chemical industry. *Indian journal of physiology and pharmacology*. 45(2): 215-221.
- Ghaffar A, Hussain R, Abbas G, Ali M H, Saleem M, Khan T, Malik R, Ahmad H. (2017a) Cumulative Effects of Sodium Arsenate and Diammonium Phosphate on Growth Performance, Hemato-Biochemistry and Protoplasm in Commercial Layer. *Pakistan Veterinary Journal*. 37(3): 257-262.
- Gouel C, Guimbard H. 2019. Nutrition transition and the structure of global food demand. *American Journal of Agricultural Economics*. 101(2): 383-403.
- Hamdi H, Othmène Y B, Ammar O, Klifi A, Hallara E, Ghali F B, Abid-Essefi S. 2019. Oxidative stress, genotoxicity, biochemical and histopathological modifications induced by epoxiconazole in liver and kidney of Wistar rats. *Environmental Science and Pollution Research*. 26(17):17535-17547.
- Haton C. 2005. Effets des rayonnements ionisants sur la structure et la fonction de la cellule épithéliale intestinale, Thèse de doctorat, Université Paris VI, Pierre et Marie Curie, France.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Hellali I, Mebarki Z, Zérifi F Z. 2022. *Étude de la contamination environnementale par les engrais*. Mémoire de master, Université Larbi Tébessi-Tébessa.
- Hery L, Guidez A, Durand A A, Delannay C, Normandeau-Guimond J, Reynaud Y, Vega-Rúa A. 2021. Natural variation in physicochemical profiles and bacterial communities associated with *Aedes aegypti* breeding sites and larvae on Guadeloupe and French Guiana. *Microbial ecology*. 81 :93-109.
- Ihedioha J I, Idika I K. 2007a. Hematological abnormalities associated with contamination of drinking water with low sub-lethal concentrations of inorganic fertilizers. In Proc 32nd Nigerian Society for Animal Production Conference. 32: 27-30.
- Ihedioha J I, Idika I. 2007b. Contamination of drinking water with low sub-lethal levels of inorganic fertilizers: effects on body weight gain, feed and water consumption and relative organ weight percentages. *Animal Production (NSAP)*. 32 : 31-35.
- Ihedioha JI, Okorie-Kanu C. 2011. Clinicopathologic findings in goats exposed to drinking water experimentally contaminated with varied low percentages of NPK 15–15–15 fertilizer. *Comparative Clinical Pathology* 20(4):349-358
- Kaplan A. 1984. Urea. In: Kaplan et al. *Clinical Chemistry*. The C.V Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton; 1257-1260.
- Karadeniz A, Yildirim A, Simsek N, Kalkan Y, Celebi F. 2008. *Spirulina platensis* protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 22(11) :1506-1510.
- Khaldi T, Rouibah Z, Rouag M, Messarah M, Boumendjel A. (2017). Protective Effects of *Nigella Sativa* Oil on IL-4 and Nitric Oxide Levels in a Model of Experimental Asthma in Wistar Rat. Chapter in Book by Amjad Kallel, Mohamed Ksibi, Hamed Ben Dhia and Nabil Khélifi. *Proceedings of Euro-Mediterranean Conference for Environmental Integration (EMCEI-1), Tunisia 2017. Advances in Science, Technology & Innovation IEREK Interdisciplinary Series for Sustainable Development Recent Advances in Environmental Science from the Euro-Mediterranean and Surrounding Regions (Edition Springer)*. pp 1249-1251. ISBN978-3-319-70547-7.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Khaldi T, Chekchaki N, Boumendjel M, Taibi F, Abdellaoui M, Messarah M, Boumendjel A. 2018. Ameliorating effects of *Nigella sativa* oil on aggravation of inflammation, oxidative stress and cytotoxicity induced by smokeless tobacco extract in an allergic asthma model in Wistar rats. *Allergol Immunopathol (Madr)*46(5) : 472-481.
- Khaldi T, Boughemara K, Khodja YH, Amira A, Messarah M, Boumendjel A. 2023. Smokeless tobacco enhances allergic inflammation, aggravation of asthma and oxidative stress in asthmatic patients from Algeria. *Toxicology and Environmental Health Sciences* 15 (02), 1-13.
- Klibet F, Boumendjel A, Khiari M, El Feki A, Abdennour C, Messarah M. 2016. Oxidative stress-related liver dysfunction by sodium arsenite: Alleviation by *Pistacia lentiscus* oil, *Pharmaceutical Biology*. 5 (2):354-363.
- Klibet F. 2016. Impact du sélénium sur la cytotoxicité induite par l'arsenic chez le rat de la souche Wistar : Exploration des effets protecteurs de *Pistacia lentiscus*. Thèse du doctorat.
- Kowalczyk P, Sulejczak D, Kleczkowska P, Bukowska-Ośko I, Kucia M, Popiel M et Kaczyńska . 2021. Mitochondrial oxidative stress, A causative factor and therapeutic target in many diseases. *International Journal of Molecular Sciences* : 22(24) : 13384.
- Krämer J, Kan R, Grimm L M, De Cola L, Picchetti P, Biedermann F. 2022. Molecular probes, chemosensors, and nanosensors for optical detection of biorelevant molecules and ions in aqueous media and biofluids. *Chemical reviews*, 122(3), 3459-3636.
- Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P and Georgakilas AG. 2011. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 711(1) : 193–201.
- Kumar T S, Rani S, Sujatha K, Purushotham B, Neeraja P. 2017. Toxicity evaluation of ammonium sulfate to albino rat. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 10(1) : 1-4.
- Layachi N, Kechrid Z. 2013. Combined protective effect of vitamins C and E on cadmium induced oxidative liver injury in rats. *African Journal of Biotechnology*. 11(93): 16013-16020.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Lazarov A, Yair M, Lael E. 2002. Airborne irritant contact dermatitis from phosphates in a fertilizer factory. *Contact Dermatitis*. 46(1): 53-54.
- Liguori F, Mascolo E, Verni F. 2021. The genetics of diabetes: What we can learn from *Drosophila*. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(20) : 11295.
- Loukil B, Mallem L, Maamer H, Boulakoud M. 2014. The study of risk associated with handling of fertilizer in workplace on some lipid and hormone parameters. *World Applied Sciences Journal*. 32 (6):1159-1162.
- Mallem L, Loukil et Boulakoud M. 2015. L'effet des engrais sur la santé professionnelle au travail. *Ecophysiologie et toxicologie*. 3(1): 16-21.
- Marage D, Gégout J-C. 2010. Réponses de quelques habitats naturels forestiers et de leurs espèces typiques au changement climatique. *Revue forestière française*. 3 (4): 485-500.
- Mansour S A Mossa A T H. 2010. Oxidative damage, biochemical and histopathological alterations in rats exposed to chlorpyrifos and the antioxidant role of zinc. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 96(1) :14-23.
- Marreiro D, Cruz K, Morais J, Beserra J, Severo J, Oliveira A. 2017. Zinc and oxidative stress: current mechanisms. *Antioxidants*. 6(2) : 24.
- Martinez J, Rosa P T, Menut C, Leydet A, Brat P, Pallet D, Meireles MAA. 2004. Valorization of Brazilian vetiver (*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash ex Small) oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(21), 6578-6584.
- Martinez-Ferran M, Sanchis-Gomar F, Lavie C J, Lippi G, Pareja-Galeano H. 2020. Do antioxidant vitamins prevent exercise-induced muscle damage? A systematic review. *Antioxidants*. 9(5) : 372.
- Maurya GK, Malick C, Mondal R, Gambhir A. 2016. Study of acute toxicity of inorganic fertilizer NPK (15:15:15) on Catfish, *Heteropneustes fossilis*. *International journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. 7(2): 243-253.
- Mélila M, Poutouli W, Amouzou K S, Tchangbédjé G, Thaou M, Doh A. 2012. Évaluation de l'impact du rejet des déchets phosphates dans la mer sur la biodiversité marine dans trois localités côtières au Togo à partir des biomarqueurs du stress oxydatif chez *Sphyraena barracuda* (HECKEL, 1843). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 6(2): 820-831.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Modi M, Kaul R K, Kannan G M, Flora S J. 2006. Co-administration of zinc and n-acetylcysteine prevents arsenic-induced tissue oxidative stress in male rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* : 20(3) : 197-204.
- Morakinyo AT, Adeboye O B, Awogbuyi O T. 2013. Environmental effects of application of fertilizers and pesticides on water and soil in Ibadan, Nigeria. *Journal of Emerging Trends in Engineering and Applied Sciences*. 4(6) : 773-777.
- Mostafa H, Hamam G, El-Waseef D. 2017. The possible protective role of 6-gingerol on a model of hepatic injury induced by carbon tetrachloride in adult male albino rats: Histological and immunohistochemical study. *Egyptian Journal of Histology*. 40(4) : 499-511.
- Nakbi A, Tayeb W, Dabbou S, Belaid Y, Chargui I, Imed C, Nebil A, Hammami M. 2016. Extra virgin olive oil modulates brain docosahexaenoic acid level and oxidative damage caused by 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid in rats. *Journal of food science and technology*. 53 (3) : 1454-1464.
- Naqvi T S, Naqvi M S, Singh R K. 1993. Effect of fertilizer diammonium phosphate on liver, kidney and muscle 5'-nucleotidase activity of fresh water teleost fish *Clarias batrachus*. *Bi-omedical and Environmental Sciences*. 6(4):385-388.
- Nganchamung T, Robson MG, Siritwong W. 2017. Chemical fertilizer use and acute health effects among chili farmers in ubon ratchathani province, Thailand. *Journal of health reserche*. 31(6): 427-437.
- Nimse S B, Pal D. 2015. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC advances*. 5(35) : 27986-28006.
- Nissar S, Sameer A S, Rasool R, Chowdri N A, Rashi F. 2017. Glutathione S transferases: Biochemistry, polymorphism and role in colorectal carcinogenesis. *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis*. 8(2) : 287.
- Obinna V C, Agu G O. 2019. Hematological effect of toluene in Wistar rats. *Journal of Scientific Research & Reports*. 25(4): 1-7.
- Ouro-Sama K, Solitoke H D, Gnandi K, Afiademanyo K M, Bowessidjaou E J. 2014. Évaluation et risques sanitaires de la bioaccumulation de métaux lourds chez des espèces halieutiques du système lagunaire togolais. *VertigO*. 14(2).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Petersen Shay K, Moreau RF, Smith E J, Hagen T M. 2008. Is alpha-lipoic acid a scavenger of reactive oxygen species in vivo? Evidence for its initiation of stress signaling pathways that promote endogenous antioxidant capacity. *Journal of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. 60: 362-367.
- Pham Huy LA, Pham Huy H, Pham CH. 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science*. 4(2) :89.
- Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. 2015. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry* . 30(1) :11-26.
- Piaton E, Fabre M, Goubin-Versini I, Bretz-Grenier M F, Courtade-Saïdi M, Vincent S, Cochand-Priollet B. 2016. Guidelines for May-Grünwald–Giemsa staining in haematology and non-gynaecological cytopathology: recommendations of the French Society of Clinical Cytology (SFCC) and of the French Association for Quality Assurance in Anatomic and Cytologic Pathology (AFAQAP). *Cytopathology*. 27(5) :359-368.
- Pisoschi A M, and Pop A. 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 97: 55-74.
- Powers, S. K., Jackson, M. J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological reviews*. 88(4), 1243-1276.
- Prouillac C.2006. Synthèse et évaluation de nouveaux composés organiques et phosphorés contre les effets des rayonnements ionisants. Etude de leur mécanisme d'action in vitro (Doctoral dissertation, Université Paul Sabatier-Toulouse III).
- Rana A, Sharma N, yagi M. 2019. Impact of Chemical Pesticides vs. Biopesticides on Human Health and Environment. *International Journal Of All Research Writings*. 2(7) : 45-51.
- Rawat S K, Singh R K, Bansode F W, Sing P, Singh RP. 2013. Nitrate induced toxicity on some hematological parameters of Charles Foster rats. *Journal of Recent Advances in Applied Sciences*. 28(7): 35-38.
- Revathy K S, Umasuthan N, Lee , Choi, C Y, Whang I, Lee J. 2012. First molluscan theta-class Glutathione S-Transferase: Identification, cloning, characterization and

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- transcriptional analysis post immune challenges. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 162 (1) : 10-23.
- Rezoug A, Tebboune CEB, Serradj SA, Abdessamed DALI. 2021. Evaluation of the risk of occupational radiological exposure in the dental structures of the municipality of Oran. *Journal de la faculté de médecine d'Oran*. 5 (1) :661-668.
 - Rouag M, Berrouague S, Djaber N, Khaldi T, Boumendjel M, Taibi F, Abdennour C 2020. Pumpkin seed oil alleviates oxidative stress and liver damage induced by sodium nitrate in adult rats: biochemical and histological approach. *African Health Sciences*.; 20(1): 413-25.
 - Sanchez-Echaniz J, Benito-Fernandez J, Mintegui-Raso S. 2001. Methemoglobinemia and consumption of vegetables in infants. *Pediatrics*. 107(5) :1024-1028.
 - Santos-Sánchez N F, Salas-Coronado R, Villanueva-Cañongo C, Hernández-Carlos B. 2019. Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. *Antioxidants*. 10 :1-29.
 - Sato A, Gonmori K, Yoshioka N.1999. A case of fatal intoxication with ammonium sulphate and a toxicological study using rabbits. *Forensic Science International*. 101:141-149.
 - Savci S. 2012. An agricultural pollutant: Chemical fertilizer. *International Journal of Environmental Science and Development*. 3(1): 77-80.
 - Sellers R , Mortan D, Michael B, Roome N, Johnson J K, Yano B L, Schafer, K. 2007. Society of Toxicologic Pathology position paper: organ weight recommendations for toxicology studies. *Toxicologic pathology*. 35(5) :751-755.
 - Sharma A, Chetani R. 2017. A review on the effect of organic and chemical fertilizers on plants. *International Journal for Research in Applied Science & Engineering Technology (IJRASET)*. 5(2): 677-680.
 - Shaviv A. 2000. Advances in controlled release of fertilizers. *Advances in Agronomy* .71:1-49.
 - Singh M, Kapoor A, Bhatnagar A. 2015. Oxidative and reductive metabolism of lipid-peroxidation derived carbonyls. *Chemico-biological interactions*. 234 : 261-273.
 - Sommer SG, Schjoerring J K, Denmead O T. 2004. Ammonia emission from mineral fertilizers and fertilized crops. *Advances in agronomy*. 82(557622), 82008-820084.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Sönmez İ, Kaplan M, Sonmez S. 2007. An investigation of seasonal changes in nitrate contents of soils and irrigation waters in greenhouses located in antalya-demre region. *Asian Journal of Chemistry*. 19(7): 5639.
- Syter O, Kumar A, Latowski D, Kuczynska P, Strzalka K, Prasad M N V. 2013. Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions and detoxification mechanisms in plants. *Acta Physiologica*. 35: 985-999.
- Testud F (2004) Inorganic fertilizers. *EMC-Toxicologie-Pathologie*. 1(1): 21-28.
- Valko M, Rhodes C J B. Moncol J , Izakovic M M, Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 160(1): 1-40.
- Wadhera RK, Steen DL, Khan I, Giugliano RP, Foody SAM. 2016. A review of low-density lipoprotein cholesterol, treatment strategies, and its impact on cardiovascular disease morbidity and mortality. *Journal of Clinical Lipidology* 10 (3): 472-489.
- Wang F, Feng X, Liu Y, Adams C A, Sun Y, Zhang S. 2022. Micro (nano) plastics and terrestrial plants: Up-to-date knowledge on uptake, translocation, and phytotoxicity. *Resources, Conservation and Recycling*. 185 : 106503.
- Wang Y, Xiong H, Chen C. 2022. Agricultural non-point source pollution and health of the elderly in rural China. *Plos one*, 17(10), e0274027.
- Wango T E, Toure M, N'guessan Y M. 2015. Bathymétrie d'une baie lagunaire et son incidence sur la répartition des métaux lourds : cas de la baie d'Abouabou en lagune Ebrié, Côte d'Ivoire. *Afrique Science*.11(3): 37 - 44.
- Yildirim N C, Benzer F, Danabas D. 2011. Evaluation of environmental pollution at Munzur river of Tunceli applying oxidative stress biomarkers in *Cappota trutta* (Heckel, 1843). *Journal of Animal and Plant Sciences*.21(1): 66-71.
- Zhao H, Ruan H, Li H. 2011. Progress in the research of GSH in cells. *Chinese science bulletin*. 56(28) :3057-3063.

ANNEXES

ANNEXE 1

Exemplaire du questionnaire rempli par les travailleurs de notre recherche

Date :

1 - Identification du participant :

Nom et Prénom: **Age:**.....

2 - Pathologies et Traitements médicamenteux (facteur d'exclusion):

2 - 1 - Souffrez vous d'une maladie chronique (veuillez précisez le type de la maladie)

2 - 2 - Prenez-vous régulièrement un médicament ?

2 - 3 - Prenez-vous des remèdes naturels (Plantes médicinales, huile animale/végétale, miel...) ?

2- 4 - Prenez-vous des suppléments alimentaires (vitamines) ?

3 - Activitésdiverses :

3 - 1 - Pratiquez-vous une activité physique ?

3 - 2 - Depuis quand travaillez-vous à l'usine ?

3 - 3 - Combien d'heures travaillez-vous par jour ?

3 - 4 - Quel est votre poste de travail (Type d'activité et zone de travail)?

3 - 5 - Utilisez-vous un moyen de protection ?

Si oui, précisez lequel (gants, masques respiratoires)?

3 - 6 - Quels sont vos antécédents professionnels (Préciser la période)?

4 - Exposition au tabagisme ou à l'alcool (facteur d'exclusion):

4 - 1 - Fumez-vous la cigarette ? Si oui, précisez la période durant laquelle vous avez consommé la cigarette ainsi que la quantité/jour

4 - 2 - Etes-vous exposé régulièrement dans votre entourage au tabagisme passif :

4 - 3 - Consommez-vous du tabac sans fumée (Chema) ?

4 - 4 - Consommez-vous des boissons alcoolisées ?

5 - Autres sources de contamination (facteur d'exclusion):

5 - 1 - Avez-vous consommé du poisson (frais ou en boîte) ces trois dernières semaines ?

5 - 2 - Portez-vous une prothèse médicale ?

5 - 3 - Portez-vous des amalgames dentaires (plombage) ?

ANNEXE 2

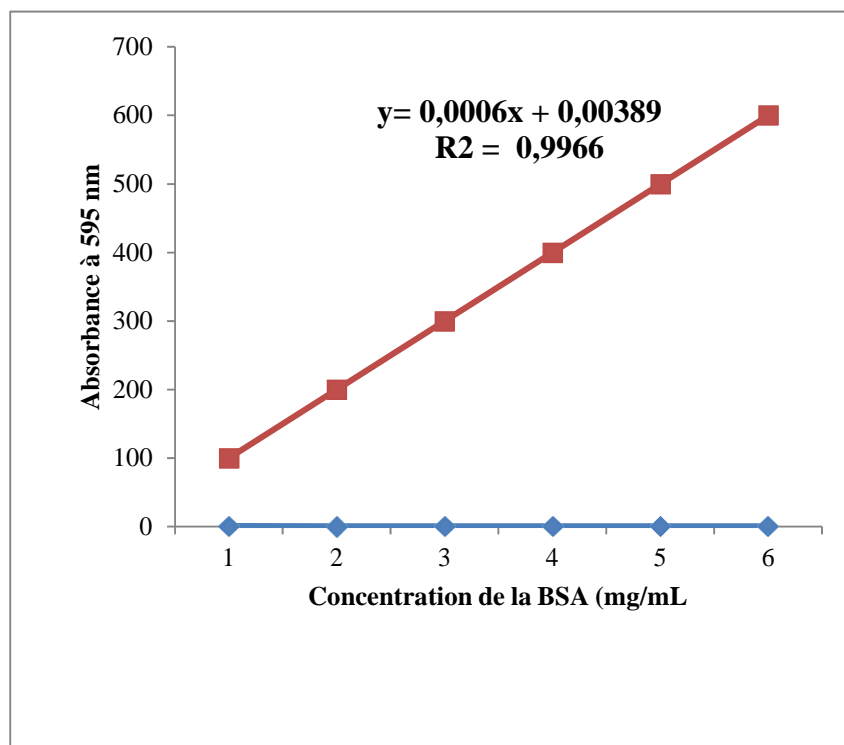
Composition de l'aliment pour une quantité d'un kilogramme (ONAB, Bedjaia) (Nourriture pour les rats wistar)		
Matière alimentaire	g/kg d'aliment	%
Mais	620	62
Soja	260	26
Phosphate	16	1,6
Cellulose	9	0,9
Minéraux	10	1
Vitamines	10	1

ANNEXE 3

Principaux réactifs chimiques utilisés		
Réactifs	Code	Firme
Acide ortho-phosphorique 85 %	----	Sigma Aldrich
BHT	Hydroxy toluénebutylé	Sigma Aldrich
Bleu de Comassie	----	MERCH
BSA	Bovine Serum Albumine lyophilized	Fluka
DTNB	Acide 5-5'-dithiobis-2nitro benzoïque	Sigma Aldrich
GSH		Sigma Aldrich
Méthionine	Gluthathion	Biochem. Chemopharm
NBT	L-Méthionine	Sigma. Aldrich
Rivoflavine	Nitro Bleu Tetrazolium	Biochem. Chemopharm
TBA	----	Sigma. Aldrich
TCA	Acide thiobarbiturique	Sigma. Aldrich
DPPH	Acide trichloroacétique	ALDER
Rivoflavine	2-2- diphenyle-1-picrylhydrazyl	Biochem. Chemopharma
NBT	Nitro blue tetrazolium	Sigma Aldrich

ANNEXE 4

Gomme d'étalonnage



Annexe 4. Réalisation d'une gomme d'étalonnage à partir d'une solution mère de BSA (1mg/mL)

***PRODUCTION
SCIENTIFIQUE***

*COMMUNICATIONS
SCIENTIFIQUES*



Université Saad Dahleb Bida1

Faculté de Technologie-Département Génie des Procédés

GEDD2019-Bida-15 Décembre 2019



Attestation de participation

Le comité scientifique de la 1^{ère} Journée Nationale de Génie de l'Environnement et Développement Durable (GEDD2019), atteste que : **Mr / Mme/Melle MENADI Sara**

A présenté une communication intitulée: QUELS EFFETS TOXIQUES DES ENGRAIS MINÉRAUX DANS LE MILIEU PROFESSIONNEL ?

Co-auteurs : Barkid Fatima Boumerzfel Amed, Messarrah Abdoujalil Hamikhi Nabila

La Présidente du comité d'organisation

Fait à Bida le 15/12/2019

1^{ère} Journée Nationale de Génie
de l'Environnement et Développement Durable
GEDD 2019

DR. LARIBI-HABCHI Nassirba

Association des psychiatres Tlemcen



1^{ère} journée de l'APT
Le 1 Octobre 2022,
Hôtel Renaissance TLEMEN
SCHIZOPHRENIE & COMORBIDITES
« Il est temps d'en parler »

ATTESTATION DE COMMUNICATION ORALE

cette attestation est attribuée :

DR **OS. MREKA**

Titre de la communication : C04 : Implication du système antioxydant dans la
physiopathologie de la schizophrénie (étude

Auteurs : S.MENADI

President ATP

President du congrès

Pr. H Boucif



Association des Psychiatres Tlemcen

Vice-Présidente du congrès

Pr. A. Rahoui



Société Algérienne
de Toxicologie

9^{ème} Rencontre Internationale de Toxicologie

Oran, 16 - 18 novembre 2019



Laboratoire de Recherche
en Santé Environnement

Attestation

La présidente du comité d'organisation atteste que la communication affichée (POSTER) :

Effets des engrais NPK sur les différents systèmes de l'organisme chez les professionnels de l'usine FERTIAL Annaba.

Menadi S.¹, Boubidif F.¹, Aissi R.², Boumendjel A.¹, Messarah M.¹

¹Laboratoire de biochimie et toxicologie environnementale. Faculté des sciences. Université Badji Mokhtar, Annaba.

²Structure médicale, industrie FERTIAL. Annaba, Algérie

A été présentée lors de la 9^{ème} Rencontre Internationale de Toxicologie qui s'est tenue à Oran, du 16 au 18 novembre 2019.

La présidente de la 9^{ème} RIT

Université Oran - 1
LABORATOIRE DE RECHERCHE
EN SANTE ENVIRONNEMENT
PREREZK - KALLAM HECRA
Directrice

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Saad Dahleb Blida1

Faculté de Technologie-Département Génie des Procédés



GEDD2019-Blida-15 Décembre 2019



Attestation de participation

Le comité scientifique de la 1^{ère} Journée Nationale de Génie de l'Environnement et Développement Durable (GEDD2019), atteste que : **Mr / Mme/Melle MENADI Sara**

A présenté une communication intitulée: **QUELS EFFETS TOXIQUES DES ENGRAIS MINÉRAUX DANS LE MILIEU PROFESSIONNEL ?**

Co-auteurs : Bouabdellah Fatima, Boumerzoug Amel, Messarrah Mokdjour, Hamikhi Nabila

La Présidente du comité d'organisation

Fait à Blida le 15/12/2019

1^{ère} Journée Nationale de Génie
de l'Environnement et Développement Durable
GEDD 2019

DR. LARIBI-HABOCHI Hassiba

République Algérienne démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

1^{er} Colloque National de Biotoxicologie et Bioactivité

27 Novembre 2019

Université Oran I, Faculté SNV Oran – Algérie

Site Belgaid



ATTESTATION DE PARTICIPATION

Le Comité d'Organisation Certifie que

Mme/Mr: Sara Menadi

*A participé au Premier Colloque national de Biotoxicologie et Bioactivité, par une communication
Affichée Intitulée: «L'effet des engrais NPK sur la santé des travailleurs dans le milieu professionnel »*

Co-Auteurs : Boubidi Fatima, Aissi Radia, Boumendjel Amel, Messarah Mahfoud





Association nationale Eco-conception , Analyse de Cycle de Vie et
Développement Durable
Affiliée au Réseau des Clubs UNESCO en Algérie
Conservatoire national des formations à l'environnement



ATTESTATION DE PARTICIPATION

Le président de la 1^{ère} journée nationale sur « Analyse de Cycle de Vie, Eco-Conception, Eco-Education, Eco-Innovation au service du développement durable », Organisée le 11 Février 2020, par l'Association nationale, Eco-conception , Analyse de Cycle de Vie et Développement Durable (ANEADD) affiliée au Réseau des Clubs UNESCO en Algérie en partenariat avec le Conservatoire national des formations à l'environnement (CNFE), atteste que :

MENADI Sara

A présenté une communication affichée intitulée : Influence de l'environnement professionnel sur le système biologique : (exemple d'une industrie agricole d'Annaba)
Co-auteurs: BOUBIDI Fadina, BOUMENDJEL Amel, MESARAH Mahfoud

Le président de l'association

المندوبين
ب.د. سارة منادي



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE LA SANTÉ ET DE LA RÉFORME HOSPITALIÈRE
SOCIÉTÉ ALGÉRIENNE DES BIOLOGISTES DE SANTÉ PUBLIQUE



**2ÈME JOURNÉE NATIONALE
DES BIOLOGISTES DE SANTÉ PUBLIQUE**

19 décembre 2019,
INSP Ben aknoun

Thème : L'apport du biologiste dans le contrôle de qualité
Au niveau d'un laboratoire d'analyses médicales

ATTESTATION DE COMMUNICATION

Le président du comité d'organisation de la 2eme journée nationale des biologistes de santé publique atteste que

Docteur : **MENADI SARAH**

A présenté la communication : POSTER THÉMATIQUE

Intitulé : EFFETS TOXIQUE DES ENGRAIS MINÉRAUX SUR LES PARAMÈTRES BIOCHIMIQUES CHEZ LES PROFESSIONNELS DE L'USINE FERTAL D'ANNABA

Établissement : UNIVERSITE BADIJ MOKHTAR ANNABA

Le Président de la SABSP

La présidente du comité scientifique



Université Saad Dahlab Bida 1
Faculté des Sciences
Département de Chimie

Attestation de participation

décernée à
Menadi Sara



En reconnaissance de sa participation au **1^{er} Séminaire National sur la Chimie Analytique, Matériaux et Substances Naturelles CAMSN 2019**, le **17 décembre 2019** à l'Université Bida1 avec une communication
Poster qui s'intitule : Influence des engrais chimiques sur la santé des professionnels de l'industrie FERTIAL d'Annaba

**Co-auteurs : Menadi Sara¹, Boubidi Fatima¹, Boumendjel Amel¹,
Aissi Radia², Messarah Mahfoud¹**

**Présidente du CAMSN 2019
Dr. MEHDAOUI Razika**



***PUBLICATIONS
SCIENTIFIQUES***



Occupational exposure to the dust of chemical fertilizers (NPK 15.15.15): effect on biochemical parameters and oxidative stress status among workers in Annaba

Sara Menadi¹ · Fatima Sara Boubidi¹ · Rim Bouchelaghem^{1,2} · Mahfoud Messarah¹ · Amel Boumendjel¹

Received: 8 November 2023 / Accepted: 19 February 2024

©The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag London Ltd., part of Springer Nature 2024

Abstract

The hazardous elements contained in chemical fertilizers may not only potentially cause adverse health effects to the environment but also to professional health. The current study has been conducted to evaluate the probable effects of chemical fertilizers on occupational health. Forty male participants have been divided into two main groups, the exposed group (workers) includes 20 employees working in the fertilizer industry of Annaba (Algeria) for at least 6 years; the control group includes 20 participants with no history of exposure to any chemical fertilizer. Blood samples have been collected for biochemical, hematological, and hormonal analysis and to evaluate oxidative stress status; urine samples have been used to determine chemical components of urine. Data of biochemical analysis have shown a significant increase in serum cholesterol and triglyceride levels (TG) ($P=0.037$; $P=0.014$, respectively), a very significant increase ($P=0.001$) in liver enzymes aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT); a very significant increase in kidney function markers: creatinine ($P=0.001$) and urea ($P=0.003$). On the other hand, the result of hematological analysis has shown a significant decrease ($P=0.013$) in hemoglobin (Hgb) concentration and a very significant decrease ($P=0.001$) in erythrocyte count. No significant difference has been recorded in hormonal parameters between workers and the control group; concerning oxidative stress status, we have recorded a very significant decrease in antioxidant enzymes (superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx)). Taken together, occupational exposure to chemical fertilizer can induce many adverse health effects, illustrated mainly by kidney and liver function impairments, and can also cause deleterious impacts on the biomarkers of oxidative stress status.

Keywords Occupational exposure · Chemical fertilizers · Biochemical parameters · Oxidative stress

Introduction

The agriculture industry plays a critical role in the survival of nations, therefore maintaining its quantity and quality is essential for feeding the population and economic exports. The industry has undergone various scientific innovations to make it more efficient. Fertilization is one of the most important ways to obtain better quality of product recovery

in agricultural activities (Savci 2012). Fertilizers are substances used to improve soil fertility and to increase crop yield (Chien et al. 2009). They are mainly divided into two main categories: Organic fertilizers are derived from biological or living materials, and take a longer time to release nutrient in the soil; chemical fertilizers are artificially synthesized from non-living materials. Nowadays, the most widely used chemical fertilizer in agriculture is the triple compound fertilizer that consists of potassium chloride (KCl), ammonium dihydrogen phosphate ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), and ammonium nitrate (NH_4NO_3). The triple compound fertilizer increases the growth rate and the plant's overall productivity more rapidly (Sharma and Chetani 2017). The hazardous elements contained in chemical fertilizers may potentially cause adverse health effects even when exposed at low levels (Nganchamung et al. 2017). Due to exposure to different chemical residues, people can be affected by

Sara Menadi
saramenadi234@gmail.com

¹ Biochemistry and Environmental Toxicology Laboratory, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar-Annaba University, Annaba, Algeria

² Local Public Health Establishments (E.P.S.P.) Attoui Salah, El Hadjar, Annaba, Algeria

numerous illnesses and symptoms such as depression, insomnia, oral automatisms (repetitive unconscious gestures such as lip smacking or mastication movements), myoclonus, and hyperreflexia (Ajmal et al. 2018). There have been also reports of acute fertilizer poisoning in humans that led to acute renal failure, hyperkalemia, and methemoglobinemia (Sato et al. 1999; Huang and Lin 2004). During manufacturing of the mineral fertilizers, workers may be exposed to several occupational accidents and injuries (Khan et al. 2006). Occupational injury or occupational accident is generally defined as “an injury arising out of or in the course of employment resulting from the action of a physically or chemically traumatizing agent” (Kamel et al. 2017). Contact dermatitis associated with fertilizer exposure has been observed in fertilizer manufacturing factories and agricultural settings. Decreased lung function has been observed among fertilizer factory workers (Gorman et al. 2013). Several previous studies carried out around the world have shown evidence that farmers exposed to those fertilizers were at risk of giving birth to children with limb defect (Sutton et al. 2012; Gorman et al. 2013). The present study has been conducted to evaluate adverse health effects of occupational exposure to chemical fertilizers on the biological system by the assessment of biochemical, hematological, hormonal, and urinary parameters, in workers of the agricultural industry in Annaba (Algeria).

Materials and methods

Chemical material

Our research has been conducted in one of the most important manufactories in Algeria, producing different types of chemical fertilizers (located at the industrial sites of Annaba, in East of Algeria); the fertilizer type studied in our research was the NPK 15–15–15 fertilizer, a combination of nitrogen (N), phosphorus, and potassium (K) with a concentration of 15%, 15%, and 15%, respectively. We have selected this fertilizer type because it is considered the most frequently used chemical fertilizer in agriculture as an effective fertilizer (Maurya et al. 2016).

Population of the study

A cohort of forty male participants aged between 26 and 58 years old have been selected to participate in the study, the cohort has been subdivided into two main groups:

Exposed group or workers (case group): selected from the manufactory, including 20 workers exposed to the dust of NPK 15–15–15 fertilizers with a history of at least 6 years recent, during the hours of work, workers have been

directly exposed by inhalation and dermal absorption to the dust of NPK fertilizer.

Unexposed group (control group): including 20 participants selected from an analytical laboratory, with no history of exposure to chemical fertilizers.

All participants have signed the informed consent document before completing questionnaires regarding information about their sociodemographic characteristics, occupational activities, smoking habits (or any form of significant exposure to chemicals or dust), clinical characteristics, and health status. The exclusion criteria were participants under treatment with nephrotoxic drugs, participants suffering from chronic kidney, liver, hematological or hormonal disorder diseases, smokers, and people exposed to other types of dust.

Samples collection

Fasting blood collection was carried out in the morning, from the antecubital vein, between 8:00 and 8:30 am by a laboratory technician. Blood samples were immediately collected into two different types of tubes, the first one contained ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and served to evaluate hematological parameters while the second one did not contain any anticoagulant. The blood sample has been firstly centrifuged at 3000 rpm for 10 min, and the obtained serum was used to evaluate biochemical parameters, while the sediment that contains erythrocytes has been used to determine oxidative stress parameters.

Urine samples have been required in sterile recipients in the morning just before analysis. Urinalysis has been conducted just after the collection of samples to protect the formed elements.

Preparation of erythrocytes homogenates

After centrifugation, erythrocytes were suspended two times in phosphate buffer saline [KH_2PO_4 (10 mM), NaCl (150 mM), pH 7.4], then centrifuged at $3000 \times g$ for 15 min at 4°C and at $4000 \times g$ for 30 min at 4°C for the first and the second washing respectively. The resulting hemolysates were aliquoted in sterile tubes and stored at -20°C until there used for determination of lipid peroxidation and the evaluation of antioxidant enzyme activities.

Determination of biochemical parameters

Glucose; total cholesterol, cholesterol low-density lipoprotein (LDL), high-density lipoprotein (HDL), triglyceride (TG), urea, creatinine, and uric acid (UA); total bilirubin; and aspartate aminotransferase (AST), alanine transaminase (ALT), and alkaline phosphatase (ALP) were

estimated by using commercial diagnostic kits from Biomaghreb (Tunisia).

Determination of hematological parameters

The hematological parameters estimated in our study were white blood cell (WBC) including lymphocyte, monocyte, granulocyte, red blood cell (RBC), hemoglobin (Hgb), hematocrit (Htc), mean corpuscular volume (MCV), and mean corpuscular hemoglobin (MCH); mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC); and platelets and mean platelets volume (MPV); these parameters were measured by the Automatic Blood Cell Counter (PCE-210N).

Total proteins in serum

The concentration of total proteins was evaluated by the colorimetric method of Vasconcelos et al. (2021); in this method, 1000 μ l of biuret reagent were mixed with 20 μ l of serum and incubated for 5 min at 37 °C, and finally, we carried out a spectrophotometrically reading at 540 nm.

Determination of oxidative stress parameters

The evaluation of lipid peroxidation in erythrocytes was carried out by the evaluation of malondialdehyde formations using thiobarbituric acid (TBA) according to the method of Esterbauer et al. (1992). The antioxidant enzymes (glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT)) activities were determined by using the following methods. Glutathione peroxidase (GPx) activity was measured at 420 nm by the method of Flohe and Gunzler (1984). The concentration of GPx is expressed in μ mol GSH/mg of protein. The determination of total proteins was determined by the method of Bradford (1976). The superoxide dismutase (SOD) activity was determined using the method of Beyer and Fridovich (1987). It was evaluated by measuring its ability to inhibit the photo-reduction in nitroblue tetrazolium (NBT). The reaction was recorded at 560 nm. Catalase (CAT) activity was measured according to the method of Aebi (1984). This assay is based on the ability of the enzyme to induce the disappearance of hydrogen peroxide monitored by following the decrease in the absorbance at 240 nm for 1 min.

Determination of hormonal parameters

The hormonal parameters evaluated in our study were the thyroid hormones represented by triiodothyronine (T3), tetraiodothyronine (T4), thyroid stimulating hormone (TSH), and sexual hormone (testosterone). Hormones analyses were estimated by the hormones analyzer from Biobase Kings Co. Ltd.

Urinalysis

The urine parameters evaluated in our study were protein, glucose, ketone bodies, erythrocytes, bilirubin, leukocytes, urobilinogen, and nitrites. Those parameters were evaluated by using the dipstick method.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by using Minitab version 2018, data were expressed as mean \pm SEM, the significant difference between control and exposed groups (workers) was evaluated by using Student's *t*-test and a value of *p* 0.05 was considered as statistically significant.

Results

Biochemical parameters

Our results about lipid parameters have shown a significant increase in total cholesterol and TG levels (*p* = 0.037; *p* = 0.014, respectively), whereas there was no significant difference in the rest of lipid parameters between workers and control group. Concerning liver function markers, we have recorded a very significant increase (*p* = 0.001) in both AST and ALT enzymes. A very significant increase has been also recorded in kidney function markers, urea (*p* = 0.003), and creatinine (*p* = 0.001) in workers when compared with the control group. However, no significant differences have been observed in other parameters between exposed (workers) and control group (Table 1).

Table 1 Determination of biochemical parameters in workers (*n* = 20) and control group (*n* = 20)

Parameters	Control group	Exposed group (workers)
GLY (g/l)	0.88 \pm 0.023	0.89 \pm 0.026
CHOL T (g/l)	1.47 \pm 0.085	1.9 \pm 0.18*
HDL (g/l)	1.48 \pm 0.16	1.52 \pm 0.17
LDL (g/l)	0.695 \pm 0.056	0.75 \pm 0.073
TG (g/l)	0.87 \pm 0.061	1.43 \pm 0.2*
UREE (g/l)	0.25 \pm 0.032	0.45 \pm 0.053**
CREA (mg/l)	9.21 \pm 0.35	11.14 \pm 0.4***
AU (mg/l)	47.52 \pm 0.79	47 \pm 1.1
BIL (mg/l)	8.87 \pm 0.37	8.03 \pm 0.38
ASAT (U/L)	35.79 \pm 1.5	45.19 \pm 2.1***
ALAT (U/L)	36.77 \pm 1.6	45.96 \pm 1.8***
PAL (U/L)	91.4 \pm 4.2	90.3 \pm 4.3

p* < 0.05; *p* < 0.01; ****p* < 0.001: significant difference comparing with control group

Table 2 Determination of hematological parameters in workers ($n=20$) and control group ($n=20$)

Parameters	Control group	Exposed group (workers)
WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	6.97 \pm 1.56	7.08 \pm 1.25
Lymph ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	2.795 \pm 0.444	2.78 \pm 0.431
Mid ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0.655 \pm 0.044	0.615 \pm 0.235
Gran ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	4.69 \pm 1.66	4.67 \pm 1.64
RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	5.305 \pm 0.932	4.295 \pm 0.786**
HGB (g/dl)	14.65 \pm 1.04	13.37 \pm 1.33*
HCT %	41.81 \pm 2.74	42.37 \pm 3.73
MCV (μm^3)	87.39 \pm 4.08	87.5 \pm 4.32
MCH (pg)	30.29 \pm 1.36	30.37 \pm 1.68
MCHC (g/dl)	32.12 \pm 0.6	32.09 \pm 0.5
RDW-CV %	12.715 \pm 0.666	12.585 \pm 0.731
PLT ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	240.8 \pm 37	242.1 \pm 39.7
MPV (μm^3)	8.04 \pm 0.754	8.175 \pm 0.861
PDW %	0.262 \pm 0.079	0.243 \pm 0.085

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$: significant difference comparing with control group

Hematological parameters

Our results about hematological parameters have shown a significant decrease ($p=0.001$) in erythrocyte count as well as in total hemoglobin concentration ($p=0.013$) in workers compared with the control group, whereas there was no significant difference in the rest of hematological parameters between exposed and control group (Table 2).

Antioxidant status

Results concerning oxidative stress parameters have shown a very significant decline ($p=0.01$) in all SOD, GPx, and catalase activities in workers when compared with the control group, whereas the evaluation of MDA levels has shown a significant increase in the exposed group when compared with the control one (Table 3).

Hormones

Concerning hormones, our results have not indicated any significant difference in terms of thyroid and sexual

Table 4 Determination of hormonal parameters in workers ($n=20$) and control group ($n=20$)

Parameters	Control group	Exposed group (workers)
Testosterone (ng/dL)	379 \pm 28	316 \pm 31
T3 (Umol/L)	1.489 \pm 0.11	1.422 \pm 0.12
T4 (pmol/L)	1.746 \pm 0.19	1.971 \pm 0.17
TSH ($\mu\text{UI/mL}$)	3.385 \pm 0.16	3.391 \pm 0.16

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$: significant difference comparing with control group

hormones in workers when compared with the control group (Table 4).

Urinalysis

Data from urinalysis have shown the appearance of nitrite in the urine of 20% of workers, erythrocytes, and leucocytes in 15% of them (Fig. 1).

Discussion

Industrial revolution followed by green revolution caused an increase in yield per unit area in crop production, but they also increased the use of synthetic fertilizers in agriculture. Intensive chemical fertilizer usage in agriculture causes so many health problems and unrecoverable environmental pollution (Sharma and Chetani 2017). Several studies conducted worldwide have shown that occupational exposure to chemical fertilizers can be the cause of many types of professional injuries. Whereas all participants of our study have respected 'prevention' standards, we have recorded that 15% of workers have complained about occupational injuries including burns, lesions, and skin allergies. Occupational injuries have been also reported in the study of Nganchamung et al. (2017). In the latter study, some farmers directly exposed to chemical fertilizers have suffered from the following symptoms: cough or sneeze, skin irritation or itching, and rashes irritations. Mallem et al. (2015) have documented that most of the workers in the NPK unit had skin problems on the face and hands and also eye problems, which is in

Table 3 Determination of oxidative stress parameters in workers ($n=20$) and control group ($n=20$)

Parameters	Control group	Exposed group (workers)
Plasma lipid peroxidation (nmol/ml)	2.13 \pm 0.012	7.08 \pm 1.25*
SOD activity (U/mg protein)	59.81 \pm 0.63	2.78 \pm 0.431**
GPx activity (U/mg protein)	2.93 \pm 0.029	1.80 \pm 0.19**
Catalase activity (U/mg protein)	43.26 \pm 0.25	37.00 \pm 2.017**

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$: significant difference comparing with control group

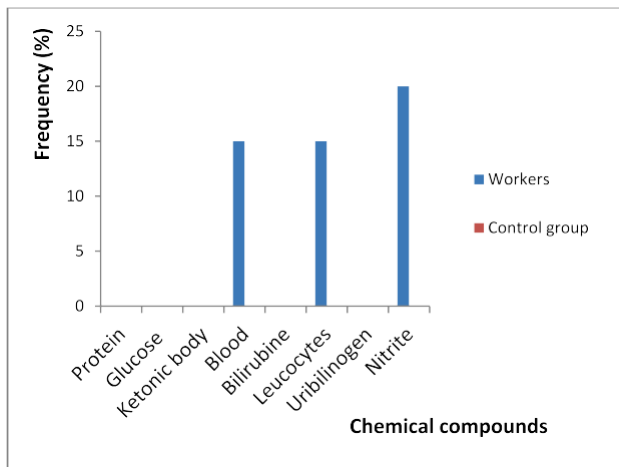


Fig. 1 Frequency of chemical compounds in urin of workers and control group

agreement with the results of Lazarov et al. (2002). This may be due to the fact that manufacturing of fertilizers is usually done at a high temperature and pressure, in the presence of several extremely dangerous chemical compounds (Geetha et al. 2001), indeed above 200 °C, nitrate decomposes by emitting nitrous vapors (NO_x), that can be the cause of eye and respiratory injuries (Testud 2004). Several studies state that high temperature of heating is a risk factor and a cause simultaneously of infertility in men (Olooto 2017; Schnurer and Nordberg 2008).

Concerning the analysis of biochemical parameters, we have observed a significant increase in total cholesterol and TG levels in workers compared to the control group, which is similar to previous research carried out on animals (goats) that received water contaminated with 3% NPK fertilizer (15.15.15) for 4 weeks (Ihedioha and Okorie Kanu 2011). It has been shown that an increase in serum cholesterol could induce triglyceride (TG) accumulation and has been associated with hepatorenal alterations or the formation of severe steatosis (Joshi et al. 2014). On the other hand, high levels of total cholesterol and TG have been included among the main risk factors for circulatory diseases. This is what Poreba et al. (2011) report, in a study carried out among workers exposed to metals. This literature data leads us to suppose that the exposure of our workers may expose them to contract this type of illness in the future. On the other hand, the literature data seems very controversial since other studies indicate that there was no abnormality in lipid parameters despite the chronic exposure of workers (Boukerche et al. 2007; Loukil et al. 2014). As for the results of our study on liver function enzymes and kidney function markers, they showed a very significant increase in liver enzymes AST and ALT, as well as certain markers of kidney function such as urea and creatinine in the exposed group (workers) compared to the

control group. An increase in creatinine and urea concentrations was also reported by Bouaziz et al. (2015) in their experiment carried out on rats treated with sodium nitrate. Elevated levels of serum liver marker enzymes are an indication of liver cell damage and loss of liver cell membrane function (Bhardwj et al. 2020), or it could be due to anemia and methemoglobinemia that induced hypoxic damage to centrilobular hepatocytes which, consequently, caused leakage of enzymes from the hepatic cytosol into the bloodstream; hepatic dysfunction and a defect in the biosynthesis of these enzymes with change in the permeability of the liver membrane occur (Talas et al. 2013; Fouad et al. 2017). The increase in serum urea and creatinine recorded in the workers in our study suggests impaired renal function (Bouaziz et al. 2015). This could also be attributed to changes in tubular reabsorption threshold, renal blood flow, and glomerular filtration rate (Zurovsky and Haber 1995). In any case, the liver is the main metabolic organ of the body and is considered a viable defense system against environmental toxicants (xenobiotics) and metabolic toxins (Manfo et al. 2020) and the kidneys are mainly involved in the excretion of xenobiotics and associated metabolites in urine. These key organs are particularly vulnerable to damage caused by xenobiotics (Manfo et al. 2020). At the same time, these organs serve precisely to detoxify and fight against the body's exposure to xenobiotics. Moreover, once again, Boukerche et al. (2007) as well as Loukil et al. (2014) both reported in their study that there was no correlation between occupational exposure to nitrate derivatives and the alteration of markers of renal and hepatic function.

The literature data remains very controversial concerning the hormonal effect of certain chemical pollutants on the body such as nitrates and nitrites for many reasons linked to the species, age, sex, stages of development, dose, or even duration of exposure. In the present study, no significant changes in the thyroid (T3, T4, TSH) and in sexual hormones (testosterone) between workers and the control group have been recorded in our research, which is similar to the results of Mallem et al. (2015) who have reported that there was no significant difference in the concentration of testosterone in employers of the storage and distribution complex of agricultural fertilizers compared with the unexposed group. This could be explained by developing an adaptive (it proposes a health safety management system) system in the organism. Indeed, there is a form of a long-term adaptation to fertilizer exposure by the body. The latter mechanism is probably generated in response to certain pollutants that can activate xenobiotic receptors, a type of receptors mainly responsible for the adaptation of the organism to the influx of xenobiotics in order to eliminate them by different enzymatic machineries (Willson and Kliewer 2002). Moreover, we observed that protective precautions were applied to the agricultural fertilizer storage and distribution complex

(installation of filters, and sanitary facilities for washing the body after the work or the hands during the day before eating). So, good medical management within the company can also explain why there were no significant changes in hormonal parameters.

A very significant decrease in erythrocyte count and a significant decrease in total hemoglobin concentration have been recorded in workers when compared with the control group, which is in agreement with the result of Ihedioha and Idika (2007) that showed a significant decrease in the hemoglobin concentration in rats giving drinking water contaminated with NPK 15.15.15 fertilizer at levels of (2%, 1%, 0.5%) w/v for a period of 90 days. Conversely, Boukerche et al. (2007) have not reported any significant difference in hematological parameters between workers of the NPK unit and the control group; Neghab et al. (2019) have indicated in their study conducted on male petrochemical workers, that there is no significant difference between exposed and unexposed participants to ammonia in term of hematological parameters. Most studies conducted to evaluate the impact of nitrogen derivatives have concluded that the blood is the main target of these molecules (Beier et al. 1995; Guastadisegni et al. 1989); indeed, nitrate and nitrite oxidize the hemoglobin that will be converted into methemoglobin, and therefore, the hemoglobin concentration will be decreased. Ihedioha and Idika (2007) have concluded from their results that fertilizer contamination of drinking water, especially at the level of 2% w/v of NPK fertilizers led to anemia. The anemia may be a result of either a toxic hypoplasia/aplasia in the bone marrow or a decreased secretion of erythropoietin in damaged renal tissues affected by acute fertilizer poisoning (Aster 2004). The decrease in these hematological parameters is in correlation with the increase recorded in liver enzymes and serum urine because the anemia could be explained by the functional impairment of the kidney and liver. Or it could be explained by the fact that not only the levels of erythropoietin are affected but also the other essential components of erythropoiesis (Damian et al. 2020).

Oxidative stress can be defined as elevated concentrations of reactive oxygen species (ROS) causing molecular damage to vital structures and functions (Rakers et al. 2020). Erythrocytes are particularly susceptible to oxidative stress because they encounter higher oxygen tension than any other cells in the body (Valko et al. 2016). Enzymes and proteins in mature erythrocytes are potential targets for oxidative damage. There are various exogenous factors that can accelerate the production of ROS in the organism like heavy metals, radiation, bacteria, and viruses (Ilieva and Sainova 2022). However, up to now, there is no available research treated the effect of chemical fertilizers on human oxidative stress status. Our study has shown that occupational exposure to chemical fertilizers especially the NPK 15.15.15 fertilizer can induce the reduction of all studied

antioxidant enzymes (SOD, CAT, and GPx), this reduction could lead to chronic illness and more severe inflammatory conditions in workers (Al-Afaleg et al. 2011). Similar results have been recorded in a recent study conducted on animals exposed to the same type of chemical fertilizer (Menadi et al. 2023); other previous research conducted on nitrate derivatives (sodium nitrate and sodium arsenate) has also shown a reduction in antioxidant status in animals (Rouag et al. 2020; Klibet et al. 2016). The reduction of the studied antioxidant enzymes observed in our study could explain the failure of antioxidant defense system to remove the ROS generated by the chemical fertilizer NPK 15.15.15 accumulated in body workers. On the other hand, we have recorded a significant elevation of MDA in workers' erythrocytes which is considered as the lipid peroxidation markers, so the elevated concentration of MDA recorded in the present study could be due to the lipid peroxidation provoked by the studied fertilizer. It has been reported that the rise of MDA concentrations was an index of enhanced lipid peroxidation (Kamalakkanan and Prince 2004). In addition, according to Klibet et al. (2016), the increase of MDA is possibly related to the decline in the GPx activity, which scavenges hydroperoxides and lipid peroxides.

Concerning urinalysis, nitrite, leucocyte, and blood are detected in urine of workers, which is similar to results obtained from the study of Boukerche et al. (2007) that have shown kidney damages illustrated by appearance of leucocytes and blood in urine of about 50% of workers. The urologic hematuria illustrated in our study by the presence of blood in urine can be explained by urinary tract infection. Indeed, the causes of hematuria differ depending on age, but overall the most common are urinary infections, prostatitis, and cancers. However, the latter two are a matter of concern mainly at ages over 50. We explained this by the presence of bacterial infections, knowing that certain bacterial organisms transform nitrate into nitrite, we find the latter in workers via a positive nitrite test on the dipstick. And finally, the presence of white blood cells in urine (leucocyturia) can be the result of inflammatory processes in the kidney (Filiopoulos and Vlassopoulos 2009). Jayasumana et al. (2015) have highlighted that chemical fertilizer especially phosphate fertilizers is the main source of arsenic which is considered as a cause of chronic kidney disease of unknown etiology in Sri Lanka.

Conclusion

Based on our results, we can conclude that occupational exposure to chemical fertilizers especially NPK 15–15–15 fertilizer can cause the development of metabolic disease by altering the kidney and liver functions and induce hematological abnormalities illustrated mainly by anemia;

moreover, the present data provide the antioxidant capacity of the studied fertilizers and confirm their inflammatory effect on workers' organism.

Compliance with ethical standards

Funding This study was not supported by any funding.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent Informed consent was obtained from all individual in the study.

Consent for publication For this type of study, consent for publication is not required.

References

- Aebi H (1984) Catalase in Vitro Methods Enzymology 105:121–126
- Ajmal M, Ali HI, Saeed R, Akhtar A, Tahir M et al (2018) Biofertilizer as an alternative for chemical fertilizers. Journal of Agriculture and Allied Sciences 7(1):1–7
- Al-Afaleg NO, Al-Senaïdy A, El-Ansary A (2011) Oxidative stress and antioxidant status in Saudi asthmatic patients. Clin Biochem 44(8–9):612–617
- Aster JC (2004) Anaemias of diminished erythropoiesis. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N (eds) Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease. Saunders, Philadelphia, pp 638–649
- Beier S, Classen HG, Loeffler K, Schumacher E, Thöni H (1995) Antihypertensive effect of oral nitrite uptake in the spontaneously hypertensive rat. Arzneimittelforschung 45(3):258–261
- Beyer WF, Fridovich I (1987) Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. Anal Biochem 161(2):559–566
- Bhardwaj H, Singh C, Nayyar S (2020) Assessment of adverse effects of lead, nickel and cadmium on biochemical parameters, antioxidants status and metallothionein expression in buffaloes slaughtered at local abattoir. Indian J Anim Res 56(2):145–152
- Bouaziz H, Rafrafi M, Ben Salah G, Marrekchi R, Boudawara O (2015) Nitrate provoked kidney toxicity and DNA impairment in adult rats: alleviation by *Hyparrhenia hirta*. Pak Vet J 35:397–402
- Boukerche S, Aouacheri W, Saka S (2007) Toxicological effects of nitrate: biological study in human and animals. Ann Biol Clin 65(4):385–391
- Bradford MA (1976) Rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. Anal Biochem 72:248–254
- Chien SH, Prochnow LI, Cantarella H (2009) Recent development of fertilizer production and use to improve nutrient efficiency and minimize environmental impacts. Adv Agron 102:267–322
- Damian A, Ghita M, Zagrai G, Dumitrescu I, Vasilescu C et al (2020) Research regarding the effect of vitamin E on some hematological parameters in toxic stress conditions in rats. Bulletin UASVM Veterinary Medicine 77:21–24
- Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G (1992) The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. Free Radical Biol Med 13(4):341–390
- Filiopoulos V, Vlassopoulos D (2009) Inflammatory syndrome in chronic kidney disease: pathogenesis and influence on outcomes. Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy) (Discontinued) 8(5):369–382
- Flohé L, Günzler WA (1984) Assays of glutathione peroxidase. Methods Enzymol 105:114–121
- Fouad SS, Mohi-Eldin MM, Haridy MA, Khalil KM (2017) Ameliorative effects of ascorbic acid (Vit. C) against sodium nitrite toxicity in albino rats: hematological, biochemical and histopathological Studies. AEJTS 9:01–06
- Geetha B, Nair RH, Kesavachandran C, Chandy S, Shashidhar S (2001) Pulmonary function in workers of fertilizer and chemical industry. Indian J Physiol Pharmacol 45(2):215–221
- Gorman NGM, Stjernberg E, Koehoorn M, Demers PA, Winters M et al (2013) Fertilizer use and self-reported respiratory and dermal symptoms among tree planters. J Occup Environ Hyg 10(1):36–45
- Guastadisegni C, Mantovani A, Ricciardi C, Stazi AV, Maffi D et al (1989) Hematotoxic effect in the rat of a toluenedinitro derivate after short-term exposure. Ecotoxicol Environ Saf 17(1):21–29
- Huang WH, Lin JL (2004) Acute renal failure following ingestion of manganese containing fertilizer. J Toxicol Clin Toxicol 42:305–307
- Ihedioha JI and Idika IK (2007) Hematological abnormalities associated with contamination of drinking water with low sub-lethal concentrations of inorganic fertilizers. Proceedings of 32nd Annual Conference of Nigerian Society for Animal Production, (Eds Agiang EA, Agwunobi LN and Olawoyin OO) March 18–21, 2003, Calabar, Nigeria, pp. 27–30
- Ihedioha JI, Okorie Kanu CO (2011) Clinicopathologic findings in goats exposed to drinking water experimentally contaminated with varied low percentages of NPK 15-15-15 fertilizer. Comp Clin Pathol 20:349–358
- Ilieva I, Sainova I (2022) Free radicals and oxidative stress as the main mechanism of heavy metal toxicity in the male reproductive system. Acta Morphologica Et Anthropologica 29:1–2
- Jayasumana Ch, Fonseka S, Fernando A, Jayalath K, Amarasinghe M et al (2015) Phosphate fertilizer is a main source of arsenic in areas affected with chronic kidney disease of unknown etiology in Sri Lanka. Springer plus 4(90):2–8
- Joshi D, Kumar Md, Kumar SA, Sangeeta S (2014) Reversal of methylmercury-induced oxidative stress, lipid peroxidation, and DNA damage by the treatment of N-acetyl cysteine: a protective approach. J Environ Pathol Toxicol Oncol 33(2):167–182
- Kamalakkanan N, Prince PSM (2004) Antidiabetic and anti-oxidant activity of Aegle marmelos extract in streptozotocin-induced diabetic rats. Pharm Biol 42:125–130
- Kamel NM, Abou El-Wafa HS, Al-Wehedy A (2017) Occupational injuries among workers in a nitrogenous fertilizers company, Egypt. Egypt J Occup Med 41(1):1–17
- Khan MMA, Halim ZI, Iqbal M (2006) Attributes of occupational injury among workers in the chemical industry and safety issues. Int J Occup Saf Ergon 12(3):327–341
- Klibet F, Boumendjel A, Khiari M, El Feki A, Abdenour C, Messarah M (2016) Oxidative stress-related liver dysfunction by sodium arsenite: alleviation by *Pistacia lentiscus* soil. Pharm Biol 54(2):354–363
- Lazarov A, Yair M, Lael E, Baitelman L (2002) Airborne irritant contact dermatitis from phosphates in a fertilizer factory. Contact Dermatitis 46(1):53–54
- Loukil B, Mallem L, Maamer H, Boulakoud MS (2014) The study of risk associated with handling of fertilizer in workplace on some lipid and hormone parameters. World Appl Sci J 32(6):1159–1162
- Mallem L, Loukil B, Boulakoud MS (2015) L'effet des engrais sur la santé professionnelle au travail. Ecophysiologie Et Toxicologie 3(1):16–21

- Manfo FPT, Mboe SA, Nantia EA, Ngoula F, Telefo PB et al (2020) Evaluation of the effects of agro pesticides use on liver and kidney function in farmers from Buea, Cameroon. *J Toxicol* 2020:1–10
- Maurya GK, Malick C, Mondal R, Gambhir L (2016) Study of acute toxicity of inorganic fertilizer NPK (15:15:15) on catfish, *Heteropneustes fossilis*. *Int J Appl Biol Pharm Technol* 7:243–253
- Menadi S, Boubidi FS, Messarah M, Boumendjel A (2023) Biochemical, hematological and histopathological alterations in liver and lung of rats due to sub-chronic inhalation exposure to NPK 15.15.15 fertilizer. *Utter Pradesh Journal of Zoology* 44(15):1–12
- Neghab M, Mirzaei A, Jalilian H, Jahangiri M, Zahedi J (2019) Effects of low-level occupational exposure to ammonia on hematological parameters and kidney function. *Int J Occup Environ Med* 10(2):80–88
- Nganchamung T, Robson MG, Siriwong W (2017) Chemical fertilizer use and acute health effects among chili farmers in Ubon Ratchathani province. *Thailand Journal of Health Research* 31(6):427–437
- Olooto WE (2017) Infertility in male; risk factors, causes and management. *A Review J Microbial Biotechnol Res* 2:641–645
- Poreba R, Gac P, Poreba M, Andrzejak R (2011) Environmental and occupational exposure to lead as a potential risk factor for cardiovascular disease. *Environ Toxicol Pharmacol* 3(1):267–277
- Rakers F, Rupprecht S, Dreiling M, Bergmeier C, Witte OW et al (2020) Transfer of maternal psychosocial stress to the fetus. *Neurosci Biobehav Rev* 117:185–197
- Rouag M, Berrouague S, Djaber N, Khaldi T, Boumendjel M, Taibi F, Abdennour C, Boumendjel A, Messarah M (2020) Pumpkin seed oil alleviates oxidative stress and liver damage induced by sodium nitrate in adult rats: biochemical and histological approach. *Afr Health Sci* 20(1):413–425
- Sato A, Gonmori K, Yoshioka N (1999) A case of fatal intoxication with ammonium sulfate and a toxicological study using rabbits. *Forensic Sci Int* 101:141–149
- Savci S (2012) An agricultural pollutant: chemical fertilizer. *Int J Environ Sci Dev* 3(1):77–80
- Schnurer A, Norberg A (2008) Ammonia, a selective agent for methane production by syntrophic acetate oxidation at mesophilic temperature. *Water Sci Technol* 57:735–740
- Sharma A, Chetani R (2017) A review on the effect of organic and chemical fertilizers on plants. *IJRASET* 5(2):677–680
- Sutton P, Woodruff TJ, Perron J, Stotland N, Conry JA et al (2012) Toxic environmental chemicals, the role of reproductive health professionals in preventing harmful exposures. *Am J Obstet Gynecol* 207(3):164–173
- Talas ZS, Gogebakan A, Orun I (2013) Effects of propolis on blood biochemical and hematological parameters in nitric oxide synthase inhibited rats by N-Nitro-L-argininemethyl ester. *Pak J Pharm Sci* 26:915–919
- Testud F (2004) Inorganic Fertilizers. *EMC-Toxicologie-Pathologie* 1(1):21–28
- Valko M, Jomova K, Rhodes CJ, Ku a K, Musilek K (2016) Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch Toxicol* 90:1–37
- Vasconcelos LH, Ferreira SR, Silva MDC, Ferreira PB, Souza IL et al. (2021) Uncovering the role of oxidative imbalance in the development and progression of bronchial asthma. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2021.
- Willson TM, Kliever SA (2002) PXR, CAR and drug metabolism. *Nat Rev Drug Discov* 1:259–266
- Zurovsky Y, Haber C (1995) Antioxidants attenuate endotoxin-generation induced acute renal failure in rats. *Scand J Urol Nephrol* 29:147–154

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.



Biochemical, Hematological and Histopathological Alterations in Liver and Lung of Rats Due to Sub-chronic Inhalation Exposure to NPK 15.15.15 Fertilizer

Menadi Sara ^{a*}, Boubidi Sara Fatima ^a, Messarah Mahfoud ^a
and Boumendjel Amel ^a

^a *Biochemistry and Environmental Toxicology Laboratory, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar-Annaba University, Algeria.*

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration among all authors. All authors read and approved the final manuscript.

Article Information

DOI: 10.56557/UPJOZ/2023/v44i153562

Editor(s):

(1) Dr. P. P. Dubey, Guru Angad Dev Veterinary and Animal Sciences University, India.

Reviewers:

- (1) Rashmi Sharma, MDSU, India.
(2) Veeravan Lekskulchai, Srinakharinwirot University, Thailand.
(3) Durgaprasad Kemisetti, Assam Down Town University, India.

Original Research Article

Received: 05/05/2023

Accepted: 09/07/2023

Published: 21/07/2023

ABSTRACT

The current study has been conducted to evaluate biochemical, hematological and histopathological alterations in rats following one month of inhalation exposure to NPK (nitrate, phosphate, potassium) 15.15.15 fertilizer. 24 male Wistar rats were randomly divided into four groups (A, B, C and D). Group A was served as control, whereas B, C and D groups have been

*Corresponding author: Email: menadi.sarra@univ-annaba.org;

exposed to aerosol of different doses (10 mg/m³, 30 mg/m³ and 50 mg/m³, respectively) of NPK 15.15.15 fertilizer during 30 min/day for one month. At the end of the experiment, rats were sacrificed. Blood samples were collected to evaluate biochemical and hematological parameters. Liver and lung tissues were served to evaluate oxidative stress statue and histopathological alterations.

Our results showed that inhalation exposure of rats to NPK 15.15.15 fertilizers, especially at high dose (50 mg/m³) resulted in a significant ($P = 0,05$) elevation of biochemical hepatic markers: Aspartate aminotransferase and Alanine transaminase, and a highly significant ($P = 0,01$) elevation of alkaline phosphatase. In addition, there were significant changes in hematological parameters revealed mainly by a highly significant ($P = 0,01$) increase of lymphocytes in both groups C and D groups, and significant decreases ($P = 0,05$) in all of: red blood cells, hematocrit, and hemoglobin in rats of group D compared to control. Furthermore, the inhalation exposure of rats to NPK 15.15.15 fertilizers induced lung oxidative stress revealed by the reduction of anti-oxidant enzymes (Glutathione peroxidase, reduced glutathione and superoxide dismutase); besides we have observed significant histopathological alterations revealed mainly by inflammatory cell infiltration in liver and lung tissues.

The inhalation exposure to important doses of NPK 15.15.15 fertilizer can damage the liver and lung tissues by altering biochemical, hematological and oxidative stress parameters.

Keywords: Biochemical; hematological; oxidative stress; histopathological; NPK; fertilizers.

1. INTRODUCTION

Fertilizers are substances providing nutrients to plants to increase or sustain optimal crop yield [9]. They are broadly divided into organic and inorganic. Organic fertilizers may be suitable for commercial uses are by-products of livestock, fish, food and other processing industries [16]. Inorganic (Chemical) fertilizers compose of principal nutrients requiring for plant growths such as nitrogen (N), phosphorous (P), and potassium (K), as well as micronutrients such as copper (Cu), iron (Fe), manganese (Mn), zinc (Zn) and heavy metal contaminants such as arsenic (As), cadmium (Cd), chromium (Cr), and lead (Pb) [29,33]. Chemical fertilizers have no doubt increased crop yields using required quantities based on the land but at the same time, overutilization of any inorganic substance is becoming a potent pollutant of the environment causing environmental pollution with undesirable effects on living organisms [27]. Triple compound fertilizer NPK (Nitrogen. Phosphorous. Potassium) is the mineral fertilizer the most widely used in agriculture as an economical, balanced and effective fertilizer. Its efficacy in promoting growth of plants and increasing production is uncontested. However, accidental poisoning with inorganic fertilizers that led to mortalities and various pathological conditions had been reported in various animals including cattle [42,18 and 46], sheep, goats [8,41], and birds [7, 39]. Indeed, in animals it is responsible for the manifestation of multiple disorders ranging from inhibition of growth to mortality [31].

Some repeat dose toxicity studies in which varied low percentages of inorganic fertilizers were given to albino rats in drinking water reported anemia, leukopenia, liver and kidney damage, and adverse reproductive outcomes [22,35]. There had also been reports of acute fertilizer poisoning in humans that led to acute renal failure, hyperkalemia, and methemoglobinemia [22,3]. It has been estimated that about 50% of the fertilizer leaches down into the soil and also ground water has started showing its effects on human health in the form of diseases such as methemoglobinemia in children [19,30].

Therefore, the present study aimed to investigate the potential toxicity of chemical fertilizers "NPK 15.15.15" on liver and lung tissues of Wistar rats, mainly through the dosage of some biochemical and hematological parameters as well as the evaluation of oxidative stress statue and histopathological analysis. Formula 15:15:15 was chosen because it is the most common formula in agriculture today, especially in our country.

2. MATERIALS AND METHODS

Chemicals

NPK 15.15.15 fertilizer (which has a mean particle size of 3.2 μm) was obtained from "FERTIAL", the Algerian Company of Fertilizers located at the industrial sites of Annaba (Algeria). Diagnostic kits for determination of biochemical parameters were purchased from Biomaghreb (Tunisia). All other chemicals used in our study

were obtained from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO).

Animals

A total of Twenty-Four adult Wistar albino male rats, weighing approximately 200 g, purchased from Pasteur institute (Algiers, Algeria) were used for the study. Prior to the experiment, animals were exposed to adaptation period for 2 weeks under standard laboratory conditions (Temperature, 25 ± 1 °C, 12 h light-dark cycles and relative humidity of $50\pm 2\%$). They were fed a standard laboratory diet and had access to water ad libitum (standard food were furnished by the "ONAB of Bejaia", Algeria). The rats were manipulated according to guidelines of the Committee on Use of Laboratory Animals and approved under the PNR project (33/DFPR/ATRSS) by the Ethical Committee of Thematic Agency for Research in Health Sciences.

Experimental Design

After acclimatization period, rats were placed in a plexiglass exposure chamber with the following dimensions: 45 x 30 x 20 cm connected to the outlet of an ultrasound aerosol generator (OMRON, NE-C29-E) and were exposed, for 30 min/day during 30 days, to the following treatments:

Group A: (Control group) exposed to aerosol of saline solution (0, 9%).

Group B: Exposed to NPK 15.15.15 fertilizer aerosol at dose of 10 mg/m³

Group C: Exposed to NPK 15.15.15 fertilizer aerosol at dose of 30 mg/m³

Group D: Exposed to NPK 15.15.15 fertilizer aerosol at dose of 50 mg/m³

NPK 15.15.15 fertilizer challenges were performed with an output of 3 mL/min. It was dissolved in mineral water at dose of 1g/100µ mL, to obtain an initial solution of NPK fertilizer. The latter was evaporated through an unheated nebulizer compressor (OMRON NE-C29-E), in which the fertilizer was dissolved in water and evaporated through the nebulizer to facilitate inhalation by rats. The doses of NPK used in our study were chosen according to PETROKEMIJA [38], with some modifications.

Blood Collection

After 48h from the last treatment, rats were fasted overnight and scarified by cervical

decapitation, Blood samples were immediately collected into two different types of tubes, the first one contained ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA), served to evaluate hematological parameters and the second one contained heparin and was centrifuged at 3000 rpm for 10 min at 4°C then used to evaluate biochemical parameters. Obtained plasma was stored at -20°C until analysis.

Tissue Preparation

Liver and lung samples were quickly removed, washed in 0.9% NaCl solution and weighed after the careful removal of the surrounding connective tissues. Then, 1 g of every organ was homogenized in solution of phosphate-buffered saline 1:2 (w/v: 1 g tissue with 2mL PBS, pH 7.4) in ice-cold conditions. Homogenates were centrifuged at 10000 g for 15 min at 4°C. The resulting supernatants were divided into aliquots and stored at -20°C until the use for determination of oxidative stress parameters.

Determination of Biochemical Parameters

Glucose, total bilirubin, aspartate aminotransferase (AST), alanine transaminase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) levels were estimated by using commercial diagnostic kits from Biomaghreb (Tunisia).

Determination of Hematological Parameters

The hematological parameters estimated in our study were: White Blood Cell (WBC) (including lymphocytes, monocytes, granulocytes), red blood cell (RBC), hemoglobin (Hgb), hematocrit (Htc), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), mean platelets volume (MPV) and platelets. These parameters were measured by Automate Blood Cell Counter (PCE-210N) by ERMA (Japan).

Lipid Peroxidation

The lipid peroxidation was estimated by measuring malondialdehyde (MDA) levels in liver and lung tissues homogenates. The MDA reacts with thiobarbituric acid (TBA) to produce a red colored complex. Absorbance was recorded at 532 nm according to the method described by Khatana et al. [25].

Reduced Glutathione

The glutathione content of liver and lung tissues homogenates was determined according to the method described by Ogata et al. [36]. In this assay, the optical absorbance of the 2-nitro-5-mercapturic resulting from the redaction of 5, 5-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) by groups (SH) of glutathione was measured. The absorbance was recorded at 412 nm.

Glutathione Peroxidase

The activity of GPX in liver and lung tissues was measured using the method of Flohe and Gunzler [14]. Absorbance was recorded at 420 nm.

Superoxide Dismutase

Superoxide dismutase (SOD) activity in lung and liver tissues was determined by measuring its ability to inhibit the photo-reduction of nitro-bleu tetrazolium according to the method described by Shuang et al. [45]. Changes in absorbance were recorded at 560 nm after 20 min.

Histopathological Analysis

For the histopathological analysis, liver and lung tissues were dissected and immediately fixed in formalin solution, embedded in paraffin. The paraffin sections were cut into 5 µm thick slices using microtome (LEICA RM2235) and stained with hematoxylin and eosin (H&E) for light microscopic examination [28]. The sections were viewed and photographed by a binocular light microscope (LEICA DM 1000LED).

Statistical Analysis

Statistical analysis was done by using Minitab version 2018. Data were expressed as mean ±

SEM, the significant difference between control and treated groups was evaluated by using t student test and a value of $P \leq 0.05$ was considered as statistically significant.

3. RESULTS

Effects of Treatment on Body Weight, Relative and Absolute Liver and Lung Weights

Changes in total body weight, absolute and relative liver and lung weights are presented in Table 1. Our results have shown that absolute final body weight of C and D groups were highly significantly decreased by -2,93% and -3,42% respectively. The absolute and relative liver weights of group D rats were significantly decreased by -13,67% and -11,64% respectively when compared with control group. In the other hand, there were no significant changes in both of absolute and relative lung weights of all treated groups.

Biochemical Parameters

Comparing with control group, our results about biochemical parameters have shown that the treatment of rats with a dose of 30 mg/m³ have caused a significant increase in ALT and PAL enzymes by + 48,39 % and +18,19 %, respectively. Whereas, the treatment with a dose of 50 mg/m³ resulted in a significant increase in both of ALT and AST enzymes by + 40,81 % and + 41,79 %, respectively. In addition, a highly significant increase in PAL (+ 36,69 %) has been recorded in treated rats with 50 mg/m³. However, no significant change has been recorded in blood glucose level in treated groups when compared with control (Table 2).

Table 1. Body weight, absolute and relative liver and lung weights of control and exposed rats to different doses of NPK 15.15.15 fertilizer

Parameters and doses	Control A (n=6)	B (n=6)	C (n=6)	D (n=6)
Initial body weight (g)	199,00±1,21	200,33± 1,51	200,00±0,63	200,67±1,21
Final body weight (g)	213,33±1,51	210,59±5,16	203,33±3,19**	203,14±2,94**
Absolute liver weight (g)	5,78±0,27	5,83±0,21	5,93±0,13	6,99±0,11*
Relative liver weight	2,70±0,11	2,67±0,12	2,96±0,09	2,45±0,05*
Absolute lung weight (g)	1,17±0,04	1,19±0,15	1,24±0,20	1,32±0,14
Relative lung weight	0,55±0,03	0,81±0,05	0,62±0,10	0,65±0,06

The values are exposed as means ± SEM.

n: number of animals in the group.

* (P = 0,05) and ** (P= 0,01): significant differences compared to control group.

Table 2. Variation of biochemical parameters in control and exposed rats to different dose of NPK 15.15.15 fertilizer

Parameters and doses	Control (group A)	Dose 1 (Group B)	Dose 2 (Group C)	Dose 3 (Group D)
Glucose (g/L)	0,94 ± 0,14	0,94 ± 0,12	1,02 ± 0,17	1,40 ± 0,09
Total bilirubin (mg/L)	7,67 ± 2,07	7,83 ± 1,94	8,33 ± 3,08	6,33 ± 1,63
AST (IU/L)	33,50 ± 8,31	39,00 ± 9,21	47,17 ± 12,60*	47,50 ± 7,34*
ALT (IU/L)	37,20 ± 11,40	40,30 ± 12,60	52,80 ± 17,70	55,20 ± 12,60*
PAL (IU/L)	96,20 ± 14,30	113,00 ± 15,40	113,70 ± 10,70*	131,5 ± 16,20**

The values are exposed as means ± SEM.

* (P= 0,05) and ** (P= 0,01): significant differences compared to control group.

Table 3. Variation of hematological parameters in control and exposed rats to different doses of NPK 15.15.15 fertilizer

Parameters and doses	Control (group A)	Dose 1 (group B)	Dose 2 (group C)	Dose 3 (group D)
WCB (x10 ³ /μL)	6,38 ± 1,97	7,67 ± 0,794	10,43 ± 3,84	6,60 ± 2,03
Lymphocytes (x10 ³ /μL)	1,20 ± 0,50	3,87 ± 2,71	5,38 ± 2,06**	6,13 ± 2,27**
Monocytes (x10 ³ /μL)	0,92 ± 0,232	1,80 ± 0,60	1,92 ± 0,56**	2,15 ± 0,69**
Granulocytes (x10 ³ /μL)	2,68 ± 0,55	3,35 ± 1,57	2,92 ± 1,77	3,58 ± 2,06
RCB (x10 ⁶ /μL)	5,92 ± 0,62	4,93 ± 0,92	4,94 ± 0,90	4,10 ± 0,82*
Hgb (g/dL)	16,02 ± 1,94	15,42 ± 1,63	13,50 ± 2,70	11,03 ± 2,27**
Htc (%)	45,65 ± 4,46	50,52 ± 4,89	38,57 ± 7,82	32,37 ± 8,58*
MCV (fL)	86,82 ± 4,54	88,23 ± 4,95	90,75 ± 6,44	86,96 ± 6,60
MCH (pg)	30,71 ± 1,63	31,03 ± 2,36	30,12 ± 2,46	29,65 ± 2,58
MCHC (g/dL)	33,70 ± 1,33	33,52 ± 1,44	33,12 ± 1,34	33,202 ± 0,82
PLT (x10 ³ /μL)	322,50 ± 75,60	313,00 ± 74,60	348,00 ± 170,00	371,00 ± 134,00
MPV (fL)	7,13 ± 0,52	7,53 ± 1,19	7,67 ± 1,51	6,62 ± 0,53

The values are exposed as means ± SEM.

* (P= 0,05) and ** (P= 0,01): significant differences compared to control group

Table 4. Variation of oxidative stress parameters in control and exposed rats to different doses of NPK 15.15.15 fertilizer

Parameters and doses	Organs	Control (group A)	Dose 1 (group B)	Dose 2 (group C)	Dose 3 (group D)
MDA (nmol/mg prot.)	Liver	2,40 ± 0,59	2,97 ± 0,61	3,82 ± 0,95	5,10 ± 1,10
	Lung	3,00 ± 0,31	3,32 ± 0,74	4,30 ± 0,79	3,01 ± 0,31
GSH (nmol/mg prot.)	Liver	1,37 ± 0,23	1,29 ± 0,12	1,07 ± 0,06	0,99 ± 0,24
	Lung	0,72 ± 0,11	0,65 ± 0,01	0,49 ± 0,01	0,38 ± 0,05*
GPX (μmol GSH/mg prot.)	Liver	1,03 ± 0,14	0,94 ± 0,02	0,93 ± 0,24	0,65 ± 0,12
	Lung	0,97 ± 0,04	0,80 ± 0,26	0,72 ± 0,01	0,59 ± 0,17**
SOD (U/mg prot.)	Liver	335,80 ± 41,00	302,30 ± 39,00	213,90 ± 37,00	164,5 ± 34,00*
	Lung	10,47 ± 2,20	9,34 ± 2,30	8,41 ± 1,16	4,63 ± 0,86*

The values are exposed as means ± SEM.

* (P= 0,05) and ** (P= 0,01): significant differences compared to control group

Hematological Parameters

In rats treated with a dose of 30 mg/m³ and 50 mg/m³ of NPK fertilizers, we have recorded a highly significant dose-dependent increase in levels of: lymphocytes (+380% and +447,32%, respectively) and monocytes (+108,7%; +175% respectively) when compared with control group. In the other hand, a significant decrease has

been recorded in RBC (-30,74%) and Htc (-29,09%) levels of group D rats. The Hgb have been highly significantly decreased in group D by -31,15% when compared with control group. However, no significant differences have been recorded in the rest of analyzed hematological parameters between treated and control groups (Table 3).

Oxidative Stress Statue

Data concerning oxidative stress statue in lung and liver tissues are presented in Table 4. Thus, animals treated with a dose of 50 mg/m³ of NPK fertilizers have shown a significant decrease in GSH content by - 47,91 % and a highly significant decrease in GPx content in lung tissue by - 39,18 %. The SOD activity has been significantly decreased in both liver and lung tissues of group D by -51,01 % and - 55,78 %, respectively when compared with control group.

Histological Study

Liver tissue

Liver tissues of control and A groups revealed a normal hepatic parenchyma structure with slight sinusoidal enlargement in A group. The lobular architecture was respected with consecutive structure. Hepatocytes were systematically arranged with a regular central vein. Samples

collected from group C rats revealed slight histological alterations such as some vascular congestions and inflammatory cells infiltration. However, in rats of group D, we have observed major degenerative changes in hepatic parenchyma, hepatocytes appeared swollen and infiltrated by lymphocytes with ballooning degeneration and vessel congestion (Fig. 1).

Lung tissue

The microscopic study of control group showed pulmonary parenchyma with normal alveoli's morphology. Bronchial walls were limited by a pseudostratified epithelium. In group B, we have observed that pulmonary parenchyma was near to normal with no pathological alterations. Whereas, in C and D groups the microscopic observation exhibited significant histological alterations. Alveoli appeared dissociated with thickened epithelium associated with inflammatory cells and slight lesions of interstitial alveoli and pneumocyte hyperplasia (Fig. 2).

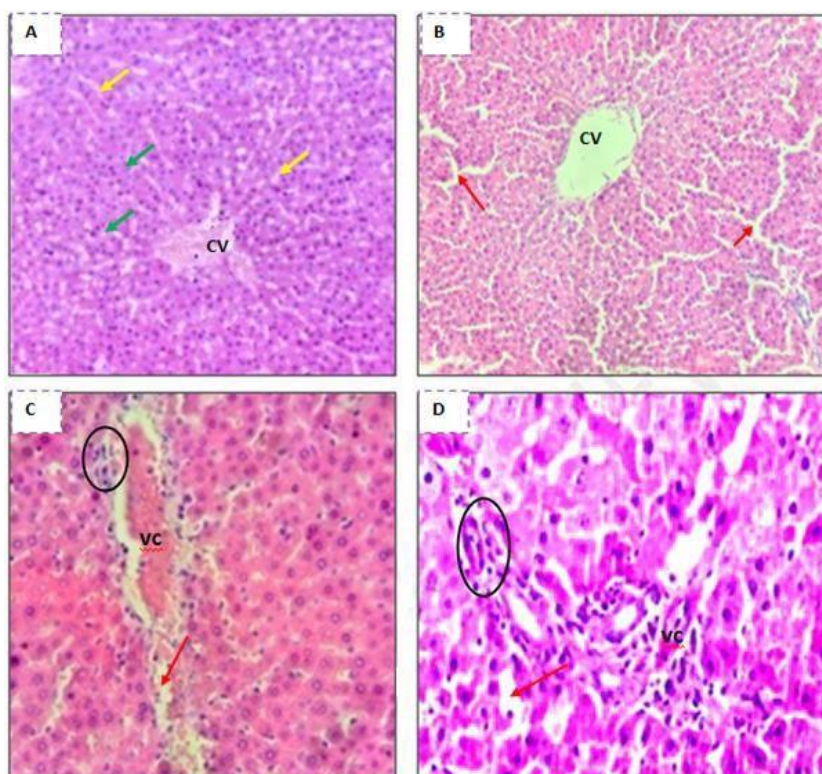


Fig. 1. Histological liver sections in rats treated with different doses of NPK 15.15.15 fertilizers
 (A): Liver of a control rat, with normal architecture. CV: central vein; green arrows: hepatocyte; yellow arrows: sinusoids. (B): liver of a treated rat with dose of 10 mg/m³ showing some sinusoidal enlargements (red arrows); (C) and (D): liver of a treated rats with a dose of 30 mg/m³ and 50 mg/m³ respectively, showing a vascular congestion(VC), sinusoidal enlargement (red arrows) and inflammatory cell infiltration (circle). (X400, H&E stained)

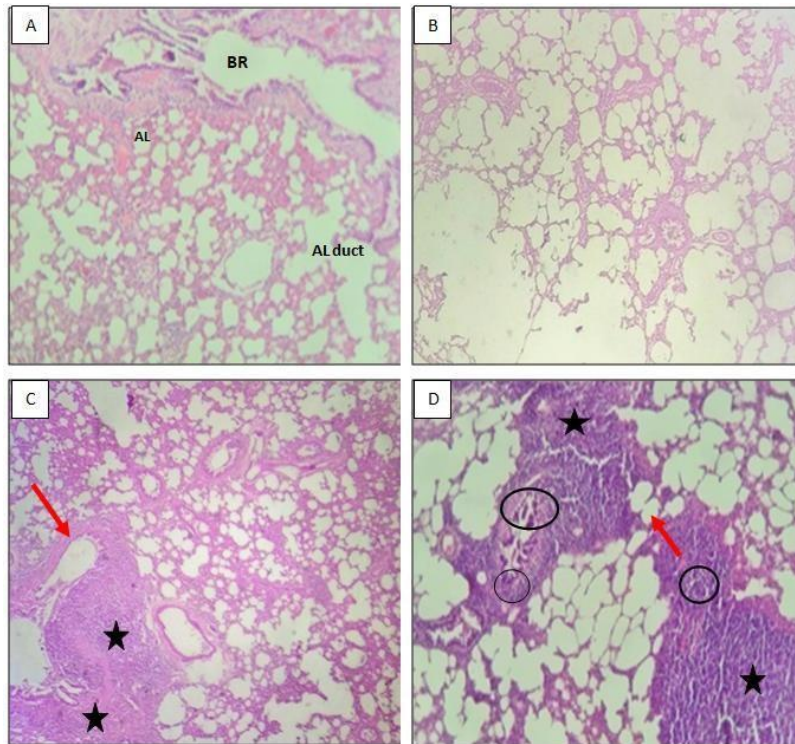


Fig. 2. Histological lung sections in rats treated with different dose of NPK 15.15.15

(A): lung of a control rat. AL: alveoli; BR: bronchioles; AL duct: alveolar duct. (B): treated rat with a dose of 10 mg/m³ Both groups have normal morphology and no pathological abnormalities. (C): lung of a treated rat with a dose of 30 mg/m³, showing thickening in interstitial tissue (red arrow) and hyperplasia (stars). (D): treated rats with a dose of 50 mg/m³, showing a significant thickening in interstitial tissue, inflammatory cells infiltration (circles) and important goblet cells hyperplasia. (X400, H&E stained)

4. DISCUSSION

Effect on Body Weight

Our study has shown a significant dose dependent decrease in final body weight of all treated groups; which may be due to the toxicity of NPK fertilizer, the result obtained in this study is in agreement with many previous studies [4,6,12 and 43] conducted on toxicity of nitrate or its derivatives. These studies suggested that the decrease in body weight of animals may be explained by a decrease of food consumption or by a rise in the protein catabolism [6]. The absolute and relative liver weight of rats treated by a dose of 50 mg/m³ of NPK 15.15.15 fertilizers have been significantly decreased when compared with control group, this may be due to the alterations inducing by NPK fertilizers in this organ.

Biochemical Parameters

A significant increase in AST and ALP enzymes has been recorded in group C and D. Whereas, the ALT enzyme has been increased only in

group D comparing with control. These changes in liver enzymes are comparable to findings reported by Fouad et al. [15], where a significant increase has been recorded in AST, ALT and ALP enzymes in rats given sodium nitrate at 1.5 mg/rat dissolved in distilled water. The significant increase of liver enzymes might be due to anemia and methemoglobinemia which induced hypoxic injury to centrilobular hepatocytes that consequently cause enzyme leakage from the liver cytosol into the blood stream [15]. Thus, hepatic dysfunction and defect in the biosynthesis of these enzymes with change in the permeability of liver membrane takes place [48]. However, there was no significant change in the serum biochemistry indicators of liver damage in goats treated by water contaminated with different doses of NPK 15.15.15 fertilizer when compared with control group in the study bylhedioha and Okorie [20].

Hematological Parameters

Hematological studies are important because the blood is the major transport system of the body,

the evaluations of the hematological profile usually furnishes vital information on the body's response to injury of all forms, including toxic injury [21].

The current study indicates that there was a significant increase in lymphocyte count in group C and D rats when compared with control. This is comparable to findings of previous research [34], where a significant increase of lymphocyte blood level has been recorded in rats given a toluene at a dose of 127.2mg/kg for duration of 21 days, this could be an indication that the body is dealing with the inflammatory conditions. A significant dose-dependent increase of monocytes count has been recorded in all treated groups. The findings in this study are in agreement with the findings of Rawat et al. [40], who have observed a significant increase in monocytes count in Charles foster rats given orally various doses (45 mgL⁻¹, 90 mgL⁻¹ and 135 mgL⁻¹) of nitrate dissolved in water. Rawat et al [40], explained this high production of monocytes by possible allergic reactions occurring that may be caused by the pollutant to which they were exposed.

On the other hand, according to Bouaziz et al. [6], the treatment of adult rats with dose of 400 mg/kg BW of sodium nitrate can induce a significant reduction in RBC count and Hgb concentration. Indeed, in our study, the results about RBC, Hgb and Htc have shown a significant decrease in group D rats when compared with control. Similar results have been recorded in previous studies [20,22], carried out on animals in order to evaluate the toxicity of NPK 15.15.15 fertilizer (dissolved in water) at different concentrations. The significant decrease of RBC, Hgb, and Htc observed in our study could be an indication of anemia as reported by Ihedioha and Idika [22].

The decrease in these hematological parameters is in correlation with the increase recorded in liver enzymes, because the anemia could be explained by the functional impairment of liver of the intoxicated animals, or it could be explained by the fact that the levels of erythropoietin are affected, but also other essential components of erythropoiesis [10].

Oxidative Stress

Several authors who have studied the effect of contaminants on rats have indicated that oxidative stress status is very influenced by

xenobiotics [24], however no research work is available showing effects of inhalation exposure to NPK fertilizers on biological system. Our study has shown that the inhalation exposure to higher dose (50mg/m³) of NPK fertilizers can significantly decreased pulmonary content of GSH. The latter is required for the maintenance and regulation of tissues redox homeostasis, its multi-faceted functions include contributions to key pathways, the detoxification of many endogenous compounds [47], and suppressing the toxic effects of reactive oxygen species (ROS) [17]. Its function includes removal of free radicals such as H₂O₂ and superoxide anions, maintenance of membrane protein thiols and acting as a substrate of GPx and glutathione reductase (GR) [32]. Thus the decrease of pulmonary GSH content recorded in our study can be the cause of the decrease in effectiveness of enzymatic anti-oxidant system which makes the cells more vulnerable to ROS. Oxidative damage is aggravated by the decrease in antioxidant enzymes activities such as SOD, CAT, GPx and GST, which act as free radicals scavengers in conditions associated with oxidative stress [5]. Thus in our study, we have recorded a highly significant decline in GPx levels in lung of group D rats, and also a significant decrease in SOD content in both liver and lung tissues in the same treated groups compared to the control one. SOD is the first line of enzymatic antioxidant defense, it catalysis the redaction of super oxide anion to hydrogen peroxide H₂O₂ [13]. Nevertheless, GPx plays a pivotal role in H₂O₂ catabolism [43]. Moreover, the functions of these antioxidant enzymes are interconnected because the hydrogen peroxide produced by SOD is cleaned by GPx [44]. Therefore, the decline of oxidative stress parameters activities in rats treated by higher levels of NPK fertilizers recorded in our study may be due to the accumulation of ROS in studied tissues caused by the toxicity of NPK fertilizers.

Histopathological Analysis

Liver tissue

Results concerning liver histopathological analysis are in accordance with the findings about biochemical parameters. Histopathological liver alterations were revealed mainly by inflammatory cells infiltration and vessels congestion in 50 mg/m³ of NPK treated group. These may be due to the formation of ROS which could have induced cytotoxicity associated with

membrane phospholipids peroxidation [26]. Our findings are in agreement with many previous studies [2,11,37and43], conducted on agents causing oxidative stress like nitrate, arsenic and cadmium suggesting histopathological injuries characterized mainly by hepatocytes necrosis, hepatomegaly, an infiltration of inflammatory cells and vein congestion.

Lung tissue

Microscopic observation in the lung of 50 mg/m³ of NPK treated group showed significant histopathological alterations resulted mainly in hyperplasia, thickening in epithelium, lymphocytes infiltration and vascular congestion. Our results are in agreement with previous studies, conducted on the effect of pesticide [1], and smokeless tobacco on rats [23], the authors of which explain these variations may be due to oxidative damage revealed by the decrease of oxidative stress parameters in the same organ, or it may be due to the breakdown of the alveolar epithelial/endothelial barrier and the educative inflammatory infiltrate into the lungs [1].

5. CONCLUSION

The findings of the present study indicate that sub-chronic inhalation exposure to 50 mg/m³ of NPK 15.15.15 fertilizer induced disruption of biochemical, hematological and oxidative stress parameters which resulted in liver and lung's injuries revealed mainly by inflammation. The inhalation exposure was chosen because, unlike oral ingestion, this has not been previously addressed in the scientific literature. On the other hand, in the city where the study was carried out (Annaba, Algeria), is installed one of the most important agricultural industries, which is considered as one of the most polluting of the environment. Many workers are exposed by inhalation to dust from this pesticide in the workplace. Thus, we initially wish to demonstrate its effect by inhalation in animals in order to justify a future study in humans (workers).The recorded toxicity of the studied chemical fertilizer could prompt the authorities to enact more restrictive regulations about this compound's levels and manipulations.

ETHICAL APPROVAL

All authors hereby declare that Principles of laboratory animal care" (NIH Publications No. 80-23, revised 1996.) were followed. All experiments have been examined and approved by the appropriate ethics committee.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are gratefully acknowledged for support of this work, we would thank all the people who have contributed to make this work well done.

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

1. Ahmed MS, Massoud AH, Derbalah AS, Al-Brakati A, Al-Abdawani MA, Eltahir HA Elmahallawy E K et al., Biochemical and Histopathological alterations in different tissues of rats due to repeated oral dose toxicity of cymoxanil. *Animals*. 2020; 10(12):2205.
2. Allen T and Rana SVS. Effect of n-propylthiouracil or thyroxine on arsenic trioxide toxicity in the liver of rat. *Journal of trace Element in Medicine and Biology*. 2007;21(3):194-203.
3. Amorim M L, Soares J, Coimbra JS DR, Leite MDO, Albino LFT and Martins MA. Microalgae proteins: Production, separation, isolation, quantification, and application in food and feed. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2021; 61(12): 1976-2002.
4. Baş H and Kalender Y. Nephrotoxic effects of lead nitrate exposure in diabetic and non diabetic rats: involvement of oxidative stress and the protective role of sodium selenite. *Environmental Toxicology*. 2016; 31(10): 1229-1240.
5. Blokhina O, Virolainen E and Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*. 2003; 91(2): 179-194.
6. Bouaziz-Ketata H, Ben Salah G, Ben Salah H, Marrekchi R, Jamoussi K, Boudawara T, Fakhfekh F et al., Nitrate-induced biochemical and histopathological changes in the liver of rats: ameliorative effect of *Hyparrhenia hirta*. *Biomedical and Environmental Sciences*. 2014;27(9): 695-706.
7. Cabodevilla X, Estrada A, Mougeot F, Jimenez J and Arroyo B. Farmland composition and farming practices explain spatio-temporal variations in red-legged partridge density in central Spain. *Science of the Total Environment*. 2021;799: 149406.

8. Campagnolo ER, Kasten S and Benerjee M. Accidental ammonia exposure to county fair show livestock due to contaminated drinking water. *Veterinary and Human Toxicology*. 2002;44(5):282-285.
9. Chien SH, Prochnow LI and Cantarella H. Chapter 8 Recent Developments of Fertilizer Production and Use to Improve Nutrient Efficiency and Minimize Environmental Impacts. *Advances in Agronomy*. 2009;102: 267-322.
10. Damian A, Ghita M, Zagrai G, Dumirescu I, Vasilescu C, NVASILESCU C, Paun L and Cotor G. Research regarding the effect of vitamin E on some hematological parameters in toxic stress conditions in rats. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine*. 2020;77(1): 21-24.
11. El Heni J, Messaoudi I, Hamouda F and Kerkeni A, Protective effects of selenium (Se) and zinc (Zn) on cadmium (Cd) toxicity in the liver and kidney of the rat: Histology and Cd accumulation. *Food and Chemical Toxicology*. 2008;46 5(11): 3522-3527.
12. El-Wakf AM, Elhabiby EM, El-kholy WM and E Abd El-Ghany. Use of tumeric and curcumin to alleviate adverse reproductive outcomes of water nitrate pollution in male rats. *Nature and Science*. 2011; 9(7): 229-239.
13. Elwej A, Ghorbel I, Chaabane M, Soudani N, Mnif H, Boudawara T, Zeghal N et al., Zinc and selenium modulate barium-induced oxidative stress, cellular injury and membrane-bound ATPase in the cerebellum of adult rats and their offspring during late pregnancy and early postnatal periods. *Archive of Physiology and Biochemistry*. 2017;124(3) 237-246.
14. Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*. 1984;105:114-21.
15. Fouad SS, Mohi-Eldin MM, Haridy MA and Khalil AM. Ameliorative effects of ascorbic acid (Vit. C) Against sodium nitrite toxicity in albino rats: hematological, biochemical and histopathological Studies. *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences*. 2017; 9(1): 01-06.
16. Gaskell M and Smith R. Nitrogen sources for organic vegetable crops. *Hort Technology*. 2007;17(4):431-441.
17. Gilmore WJ, Kirby GM. Endoplasmic reticulum stress due to altered cellular redox status positively regulates murine hepatic CYP2A5 expression. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2004; 308(2):600-8.
18. Gutty B, Leskiv K, Shcherbatyy A, Pritsak V, Fedorovych V, Fedorovych O and Kolomiiets I. The influence of Metisevit on biochemical and morphological indicators of blood of piglets under nitrate loading. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2017;3(8):427-432.
19. Huang WH and Lin JL. Acute renal failure following ingestion of manganese containing fertilizer. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*. 2004;42(3):305-307.
20. Ihedioha JI and Okorie Kanu CO. Clinicopathologic findings in goats exposed to drinking water experimentally contaminated with varied low percentages of NPK 15-15-15 fertilizer. *Comparative Clinical Pathology*. 2011; 20: 349- 58.
21. Ihedioha JI, Okafor C and Ihedioha TE. The hematological profile of the Sprague-Dawley out-bred albino rat in Nsukka, Nigeria. *Animal Research International*. 2004; 1(2):125-132.
22. Ihedioha, J I and Idika I K. Hematological abnormalities associated with contamination of drinking water with low sub-lethal concentrations of inorganic fertilizers. In Proc 32nd Nigerian Society for Animal Production Conference. 2007; 32: 27-30.
23. Khaldi T, Chekchaki N, Boumendjel A, Taibi F, Messarah M and Abdellaoui M. Ameliorating effects of *Nigella sativa* oil on aggravation of inflammation, oxidative stress and cytotoxicity induced by smokeless tobacco extract in an allergic asthma model in Wistar rats. *Allergologia et Immunopathologia*. 2018;46(5): 472- 481.
24. Khaldi T, Messarah M and Boumendjel A. *Nigella sativa* oil effects on the non-enzymatic defense statute and the histopathological changes induced by smokeless tobacco in a model of allergic asthma in Wistar rats. *Archives of the International Society of Antioxidants in Nutrition and Health*. 2017; 5(1):13-17.
25. Khatana C, Saini NK, Chakrabarti S, Saini V, Sharma A, Saini RV and Saini AK. Mechanistic insights into the oxidized low-density lipoprotein-induced atherosclerosis. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2020; 2020.

26. Klibet F, Boumendjel A, Khiari M, El Feki A, Abdennour C, Messarah M. Oxidative stress-related liver dysfunction by sodium arsenite: Alleviation by *Pistacia lentiscus* oil. *Pharmaceutical Biology*. 2016; 54(2): 354-63.
27. Kumar T S, Rani S, Sujatha K, Purushotham B, Neeraja P. Toxicity evaluation of ammonium sulfate to albino rat. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2017; 10(1): 1-4.
28. Laouar A, Klibet F, Bourogaa E, Benamara A, Boumendjel A, Chefrour A and Messarah M. Potential antioxidant properties and hepatoprotective effects of *Juniperus phoenicea* berries against CCl₄ induced hepatic damage in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2017;10(3): 263-269.
29. Loukil B, Mallem L, Maamer H and Boulakoud M. The study of risk associated with handling of fertilizer in workplace on some lipid and hormone parameters. *World Applied Sciences Journal*. 2014; 32 (6):1159-1162.
30. Majumdar D, Gupta N. Nitrate pollution of groundwater and associated human health disorders. *Indian journal of environmental health*. 2000; 42(1), 28-39.
31. Maurya GK, Malick C, Mondal R and Gambhir. Study of acute toxicity of inorganic fertilizer NPK (15:15:15) on Catfish, *Heteropneustes fossilis*. *International journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. 2016; 7(2): 243-253.
32. Naik SR, Panda VS. Antioxidant and hepatoprotective effects of ginkgo biloba phytosomes in carbon tetrachloride-induced liver injury in rodents. *Liver International*. 2007;27 (3):393-399.
33. Nganchamung T, Robson MG and Siritwong W. Chemical fertilizer: use and acute health effects among chili farmers in Ubon Ratchathani province, Thailand *Journal of Health Research*. 2017;31(6): 427-437.
34. Obinna VC and Agu GO. Hematological effect of toluene in Wistar rats. *Journal of Scientific Research & Reports*. 2019;25(4): 1-7.
35. Ochiogu IS, Ihedioha JI and Okafor NS. Contamination of drinking water with inorganic fertilizer: Effects on reproductive performance. *Proceedings of the 32nd Annual Conference of the Nigerian Society for Animal Production*. 2008;33:63-66.
36. Ogata FT, Branco V, Vale FF and Coppo L. Glutaredoxin: Discovery, redox defense and much more. *Redox Biology*. 2021;43:101975.
37. Ogur R, Coskun O, Korkmaz A, Oter S, Yaren H and Hasde M. High nitrate intake impairs liver functions and morphology in rats; protective effects of α -tocopherol. *Environmental toxicology and Pharmacology*. 2005; 20(1): 161- 166.
38. Petrokemija. Safety data sheet, No. 07-04-5-1000/0002; 2021. [Accessed 2021 May 1]. Available:<https://petrokemija.hr/Portals/0/Engleski/NPKandNPwithAN.pdf>
39. Radial SR and Jaensch SM. Acute poisoning of silver gulls (*Larus argentatus*) following urea fertilizer spillage. *Avian Pathology*. 2006; 35(1):38-41.
40. Rawat SK, Singh RK, Bansode FW, Sing P and Singh RP. Nitrate induced toxicity on some hematological parameters of Charles Foster rats. *Journal of Recent Advances in Applied Sciences*. 2013; 28(7): 35-38.
41. Rice NC, Rauscher NA, Langston JL and Myers TM. Behavioral toxicity of sodium cyanide following oral ingestion in rats: Dose-dependent onset, severity, survival, and recovery. *Food and Chemical Toxicology*. 2018; 114: 145-154.
42. Rosal J, Solania C, Agan MQ, Mondea D, Villa B and Sanchez D. Effects of Prenatal Exposure to Urea Fertilizer on the Angiogenesis, Body Growth, and Liver Structure of Duck (*Anas platyrhynchos*) Embryos. *Pollution*. 2021;7(2):367-375.
43. Rouag M, Berrouague S, Djaber N, Khaldi T, Boumendjel M, Taibi F, Abdennour C et al., Pumpkin seed oil alleviates oxidative stress and liver damage induced by sodium nitrate in adult rats: biochemical and histological approach. *African Health Sciences*. 2020; 20(1): 413-25.
44. Sekiou O, Boumendjel M, Taibi F, Boumendjel A and Messarah M. Mitigating effects of antioxidant properties of *Artemisia herba alba* aqueous extract on hyperlipidemia and oxidative damage in alloxan-induced diabetic rats, *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2019;125:2, 163-173.
45. Shuang Z, Guangchao Z, Huawen L, Nan W, Shangjun C, Colm D, Guoming X, Huixue W. Recent advances of

- electrochemical sensors for detecting and monitoring ROS/RNS. *Biosensors and Bioelectronics*. 2021;179: 113052.
46. Soodaeva S, Klimanov I, Kubysheva N, Popova N and Batyrshin I. The state of the nitric oxide cycle in respiratory tract diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020; 2020.
47. Sreekumar PG, Ferrington DA and Kannan R. Glutathione Metabolism and the Novel Role of Mitochondrial GSH in Retinal Degeneration. *Antioxidants*. 2021;10(5): 661.
48. Talas ZS, Gogebakan A and Orun I. Effects of propolis on blood biochemical and hematological parameters in nitric oxide synthase inhibited rats by N-Nitro-L-argininemethyl ester. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Science*. 2013;26(5): 915-919.