

Abréviation

2,5-HD: 2,5-Hexanedione

ALAT: ALanine AminoTransférase

Apo B-48: Apolipoprotéine B-48

ASAT: ASpartate AminoTransférase

C: Concentration

CCMH: Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine

CHU: Centre Hospitalier Universitaire

CL50: Concentration Létale 50

DI H₂O: Eau Désionisée

DL50: Dose Létale 50

DTNB: 5,5'-DiThiobis-(2-NitroBenzoic acid)

EDTA: acide Ethylène Diamine Tétra-Acétique

EOS: Eosinophile

FNS: formule de numération sanguine

GB: Globule Blanc

GR: Globule Rouge

GRA: Granulocytes

GSH: Glutathion

HB: Hémoglobine

H-E: Hématoxyline-Eosine

HTC: Hématocrite

LH: Luteinizing Hormone

LOAEL: *Lowest Observed Adverse Effect Level*

LYM: Lymphocyte

MDA: Malondialdéhyde

NOAEL: No Observable Adverse Effect Level

IPCS: Programme International sur la Sécurité des Substances Chimiques

PAL: *Phosphatase ALcaline*

PAS: Periodic Acid Schiff

PLT: Plaquette

SHBG: Sex Hormone-Binding Globulin

SSA: Acide Sulfo-Salycilique

TBA: Acide ThioBarbiturique

TCA: Acide TriChloracétique

TGO: Glutamyl-Oxaloacétate-Transférase

TGP: Glutamate-Pyruvate-Transaminase

VGM: Volume Globulaire Moyen des hématies

Liste des figures

Figure 1: Structure chimique du n-hexane	9
Figure 2: La métabolisation du n-hexane chez l'Homme et le rat dans le foie	14
Figure 3: Schéma récapitulatif du protocole expérimental	27
Figure 4: Variation de nombre des globules blanc chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et contrôle positif	41
Figure 5: Variation de nombre de lymphocytes chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et contrôle positif	41
Figure 6: Variation de nombre de granulocytes chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et contrôle positif	41
Figure 7: Variation de nombre de éosinophiles chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et contrôle positif	42
Figure 8: Variation de l'activité de l'aspartate aminotransférase chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et contrôle positif	42
Figure 9: Variation de l'activité de lalanine aminotransférase chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et contrôle positif	43
Figure 10: Variation de l'activité de la phosphatase alcaline chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et contrôle positif	43
Figure 11: Variation du taux des protéines totales chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et contrôle positif	44
Figure 12: Variation du taux de glucose chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et contrôle positif	44

Figure 13: Taux de GSH dans le foie chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et contrôle positif	45
Figure 14: Photographie des coupes histologiques du foie à coloration H-E des rats Wistar mâles des trois groupes traités avec le n-hexane (B), (C), (D) groupe traité par n-hexane à la dose 1200 mg/kg et des groupes contrôles (A), (A*)	46
Figure 15: Photographie des coupes histologiques de foie à coloration trichrome de Masson des rats Wistar mâles des trois groupes traités avec le n-hexane (B), (C), (D) groupe traité par n-hexane à la dose 1200 mg/kg et des groupes contrôles (A), (A*)	47
Figure 16: Photographie des coupes histologiques du foie à coloration periodic acid schiff (PAS) des rats Wistar mâles des trois groupes traités avec le n-hexane (B), (C), (D) groupe traité par n-hexane à la dose 1200 mg/kg et des groupes contrôles (A), (A*)	48
Figure 17: Variation du taux des triglycérides chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et contrôle positif	49
Figure 18: Variation du taux de cholestérol chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et contrôle positif	49
Figure 19: Variation du taux d'urée chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et contrôle positif	50
Figure 20: Variation du taux d'acide urique chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et contrôle positif	50
Figure 21: Variation du taux de la créatinine chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et contrôle positif	51
Figure 22: Taux de GSH dans les reins chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et contrôle positif	51
Figure 23: Photographies des coupes histologiques des reins à coloration H-E des rats Wistar mâles des trois groupes traités avec le n-hexane (B), (C), (D) groupe traité par n-hexane à la dose 1200 mg/kg et des groupes contrôles (A), (A*)	53

Figure 24: Photographies des coupes histologiques des reins à coloration trichrome de Masson des rats Wistar mâles des trois groupes traités avec le n-hexane (B), (C), (D) groupe traité par n-hexane à la dose 1200 mg/kg et des groupes contrôles (A), (A*)	54
Figure 25: Taux de MDA dans les poumons chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et contrôle positif	55
Figure 26: Taux de GSH dans les poumons chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et contrôle positif	56
Figure 27: Photographie des coupes histologiques des reins à coloration HE des rats Wistar mâles des trois groupes traités avec le n-hexane (B), (C), (D) groupe traité par n-hexane à la dose 1200 mg/kg et des groupes contrôles (A), (A*)	58
Figure 28: Photographie des coupes histologiques des poumons à coloration trichrome de Masson des rats Wistar mâles des trois groupes traités avec le n-hexane (B), (C), (D) groupe traité par n-hexane à la dose 1200 mg/kg et des groupes contrôles (A), (A*)	59
Figure 29: Photographies des coupes histologiques de poumons des rats Wistar mâles des trois groupes traités avec le n-hexane (B), (C), (D) groupe traité par n-hexane à la dose 1200 mg/kg et des groupes contrôles (A), (A*)	60
Figure 30: Variation du taux de la testostérone chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et contrôle positif	61
Figure 31: Variation du taux de l'hormone lutéinisante (LH) chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et contrôle positif	62
Figure 32: Taux de GSH dans les testicules chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et contrôle positif	62
Figure 33: Variation du taux de nombre de spermatozoïdes chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et contrôle positif	63
Figure 34: Evaluation de la mobilité de spermatozoïdes chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et contrôle positif	63

Figure 35: Photographie des coupes histologiques des testicules à coloration H-E des rats Wistar mâles des des trois groupes traités avec le n-hexane (B), (C), (D) groupe traité par n-hexane à la dose 1200 mg/kg et des groupes contrôles (A), (A*)64

Liste des tableaux

Tableau 1: Propriétés physico-chimiques du n-hexane	8
Tableau 2: Les valeurs de la toxicité aiguë du n-hexane	17
Tableau 3: Doses des substances utilisées	25
Tableau 4: Poids corporel initial et final des rats, aliment consommé, après le traitement avec le n-hexane comparés aux groupes contrôles	38
Tableau 5: Poids relatif des organes, après l'exposition au n-hexane comparés aux groupes contrôles	39
Tableau 6: Variation des paramètres hématologiques (RG, HB, HCT, VGM, PLT), après l'exposition au n-hexane comparé aux groupes contrôles	40

Résumé

Les études sur la toxicité induite par l'exposition orale au n-hexane sont très peu nombreuses, contrairement à celles qui étudient l'exposition par inhalation. Cette recherche aborde l'effet toxique oral de solvant n-hexane sur la fonction reproductrice mâle, hématologique, hépatique, rénale et pulmonaire après une exposition sub-chronique de rats mâles Wistar à des faibles doses de 300 mg/kg, 600 mg/kg et 1200 mg/kg, respectivement, chaque jour pendant huit (08) semaines comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif. La toxicité observée dans cette étude était caractérisée par une réduction significative du poids corporel et de la consommation alimentaire; une augmentation significative du poids relative du foie, des reins et des poumons. Également, l'évaluation de l'effet du n-hexane sur les paramètres hématologiques et biochimiques a été marquée par une augmentation significative du taux des globules blancs, des lymphocytes, des granulocytes et des éosinophiles; du taux sérique des transaminases, de la phosphatase alcaline et des protéines totales; du taux sérique de la créatinine, l'acide urique et l'urée, ainsi que par une augmentation du taux tissulaire de GSH (testiculaire, hépatique, rénal et pulmonaire) et du taux tissulaire de MDA pulmonaire. Tandis que, le taux de glucose, de cholestérol et des triglycérides a diminué significativement. En outre, nous avons noté que le n-hexane provoque une diminution significative de la concentration et de la mobilité des spermatozoïdes; une diminution non significative de la testostérone avec une élévation non significative de l'hormone lutéinisante (LH). Sur le profil histologique et histochimique des dommages tissulaires dans les testicules, le foie, les reins et les poumons ont été constatés chez les rats traités au n-hexane comparé au groupe contrôle et contrôle positif, ce qui a confirmé les observations biochimiques. Nos résultats prouvent que l'exposition par voie orale et même à des doses faibles du n-hexane provoquerait des dommages physiologiques dans le corps

Mots clés: solvants, n-hexane, toxicité, reproduction, physiologie, administration orale.

Abstract

Studies on the toxicity induced by oral exposure to n-hexane are very few, in contrast to those studying the exposure by inhalation. This research tackles the oral toxic effect of n-hexane solvent on the Male reproductive, hematologic, hepatic, renal and pulmonary function after sub-chronic exposure of Wistar male rats at 300, 600, and 1200 mg/kg, respectively, every day for eight (08) weeks compared to control groups. The toxicity observed in this study was characterized by a significant reduction in body weight and food consumption; a significant increase in the relative weight of the liver, kidneys and lungs. Also, the evaluation of the effect of n-hexane on hematological and biochemical parameters was marked by a significant increase in the level of white blood cells, lymphocytes, granulocytes and eosinophils; serum transaminase, alkaline phosphatase and total protein levels; serum creatinine levels, uric acid and urea, as well as an increase in the tissue level of GSH (testicular, hepatic, renal and pulmonary) and the tissue level of pulmonary MDA. While, the glucose, cholesterol and triglyceride levels decreased significantly. In addition, we noted that n-hexane causes a significant decrease in the concentration and mobility of spermatozoa; a non-significant decrease in testosterone with a non-significant elevation of luteinizing hormone (LH). On the histological and histochemical profile, tissue damage in the testes, liver, kidneys and lungs was observed in rats treated with n-hexane compared to control groups. This confirmed the biochemical observations. Our results show that oral and even low doses of n-hexane would cause physiological damage in the body

Keywords: solvents, n-hexane, toxicity, reproduction, physiology, oral administration.

الملخص

الدراسات العلمية المتعلقة بالتسممات الناتجة عن التعرض للهكسان عن طريق الفم قليلة جداً، على عكس الدراسات التي تدرس هذا التعرض عن طريق التنفس. يهدف هذا البحث لدراسة تأثير الهكسان عن طريق الفم على الوظيفة التناسلية للذكور، الكبد، الكلى والرئة عند ثلاثة مجموعات من ذكور الفئران التي تلقت جرعتين من الهكسان: 300 و 600 و 1200 مجم / كجم على التوالي، كل يوم لمدة ثمانية (08) أسابيع مقارنة بالمجموعات الشاهدة. أظهرت النتائج أن المعاملة باستخدام الهكسان تسبب في انخفاض كبير في وزن الجسم واستهلاك الطعام؛ بالمقابل سجلنا زيادة كبيرة في الوزن النسبي للكبد والكلى والرئتين. فيما يتعلق بالمؤشرات الدموية والكيمياء الحيوية اظهرت النتائج زيادة كبيرة في مستويات خلايا الدم البيضاء (globules blancs) والخلايا الليمفاوية (lymphocytes) والخلايا الحبيبية (granulocytes) والإيزينوفيل (éosinophile)؛ وكذلك تغيرات في القياسات المتعلقة بالكبد، الرئة والوظيفة الكلوية (phosphatase ASAT, ALAT)، الفوسفاتيز القلوي (acide urique)، حمض البوريك (urée) ومستويات البروتين الكلي؛ مستويات الكرياتينين (créatinine)، الكبد، الكلى والرئة) ومستوى الأنسجة من MDA (الخصية، الكبد، الكلى والرئة) ومستوى الكوليستيرون والدهون الثلاثية بشكل ملحوظ بالنسبة لنفس المجموعات. بالإضافة إلى ذلك، لاحظنا أن الهكسان يسبب انخفاضاً كبيراً في تركيز وحركية وحيوية الحيوانات المنوية؛ وكذا انخفاض في هرمون التستوستيرون (testostérone) مع ارتفاع الهرمون (LH). على المستوى النسيجي لوحظ أن الهكسان تسبب في تلف أنسجة الخصية، الكبد، الكلى و الرئة؛ الذي أكد الملاحظات البيوكيميائية. تظهر نتائجنا أن الجرعات المأخوذة عن طريق الفم والمنخفضة من الهيكسين n تسببت في تلفٌ فسيولوجيٌ في الجسم.

الكلمات المفتاحية : المذيبات، الهكسان، السمية، التكاثر، علم وظائف الأعضاء، تعرض عن طريق الفم.

Table des matières

Introduction 1

Chapitre 1: Étude bibliographique

I.	La toxicologie	4
II.	Les solvants organiques	4
1.	Historique	4
2.	Définition	5
3.	Classification des solvants	6
4.	Pénétration des solvants dans l'organisme	6
III.	Les hydrocarbures	6
1.	Les hydrocarbures aromatiques	7
2.	Les hydrocarbures aliphatiques	7
2.1.	Les hydrocarbures aliphatiques insaturés	7
2.2.	Les hydrocarbures aliphatiques saturés	7
IV.	Le n-hexane	8
1.	Définition	8
2.	Utilisation	9
3.	Classification toxicologique	9
4.	Source d'exposition	10
5.	Toxicité cinétique	10
5.1.	Absorption	10
5.1.1.	Absorption pulmonaire	10
5.1.2.	Absorption cutanée	11
5.1.3.	Absorption digestive	12
5.2.	Distribution	13
5.3.	Métabolisme	14
5.4.	Élimination	15
6.	Mode d'action	15
7.	Le n-hexane dans l'environnement	17
8.	Toxicité	17
8.1.	Toxicité aiguë	17
8.1.1.	Toxicité aiguë par inhalation	17
8.1.2.	Toxicité aiguë cutanée	18
8.1.3.	Toxicité aiguë par ingestion	18
8.2.	Toxicité sub-chronique et chronique	18
8.2.1.	Études sur la santé humaine	19
8.2.1.1.	Effets sur le système nerveux	20
8.2.1.2.	Effets sur la reproduction	21
8.2.2.	Études expérimentales sur les animaux de laboratoire	21

8.2.2.1.Effets sur le système nerveux	21
8.2.2.2.Effets sur la reproduction	22

Chapitre 2: Étude expérimentale

I. Matériel et méthodes	24
1. Matériel	24
1.1.Choix du produit utilisé	24
1.2.Animal de laboratoire utilisé	24
2. Méthodes	25
2.1.Protocol expérimental	25
2.2.Prélèvement sanguin	25
2.3.Prélèvement des organes	26
2.4.Paramètres étudiés	27
2.4.1. Paramètres hématologiques	27
2.4.2. Paramètres biochimiques.....	28
2.4.2.1.Paramètres biochimiques hépatiques	28
2.4.2.1.1. L'aspartate aminotransférase	28
2.4.2.1.2. L'alanine aminotransférase	28
2.4.2.1.3. La phosphatase alcaline.....	29
2.4.2.1.4. Le glucose	29
2.4.2.1.5. Les protéines totales	29
2.4.2.2.Paramètres biochimiques rénaux.....	30
2.4.2.2.1. La créatinine	30
2.4.2.2.2. L'urée	30
2.4.2.2.3. L'acide urique	31
2.4.2.3 Paramètres biochimiques lipidiques	31
2.4.2.3.1. Le cholestérol	31
2.4.2.3.2. Les triglycérides	32
2.4.2.4. Paramètres biochimiques tissulaires	33
2.4.2.4.1. Glutathion	33
2.4.2.4.2. Malondialdéhyde	33
2.4.2.5. Paramètres hormonaux mâle	34
2.4.2.5.1. L'hormone lutéinisante	34
2.4.2.5.2. La testostérone	34
2.4.3. Spermogramme	35
2.4.3.1. Le nombre des spermatozoïdes	35
2.4.3.2. La mobilité des spermatozoïdes	36
2.4.4. Etude histologique	36
2.4.5. Etude histochimique	36
2.4.6. Etude statistique	37
II. Résultats	38
1. Effet du n-hexane sur quelques paramètres physiologiques	38
1.1.Apparences générales	38

1.2.Effet du n-hexane sur le poids corporel et la consommation d'aliment	38
1.3.Effet du n-hexane sur le poids relatif des organes	39
2. Effet du n-hexane sur les paramètres hématologiques	39
3. Effet du n-hexane sur la fonction hépatique	42
3.1.Effet du n-hexane sur quelques paramètres biochimiques du foie	42
3.1.1. Effet du n-hexane sur le taux des aminotransaminases	42
3.1.2. Effet du n-hexane sur le taux de phosphatase alcaline	43
3.1.3. Effet du n-hexane sur le taux de protéine totales	43
3.1.4. Effet du n-hexane sur le taux de glucose	44
3.1.5. Effet du n-hexane sur le taux de glutathion	44
3.2.Effet du n-hexane sur l'histologie et l'histochimie hépatique	45
3.2.1. Coloration hématoxyline-éosine	45
3.2.2. Coloration histochimique trichrome de Masson	45
3.2.3. Coloration histochimique periodic acid schiff	46
4. Effet du n-hexane sur le bilan lipidique	49
4.1.Effet du n-hexane sur le taux des triglycérides et le taux de cholestérol	49
5. Effet du n-hexane sur la fonction rénale	50
5.1.Effet du n-hexane sur quelques paramètres biochimiques des reins	50
5.1.1. Effet du n-hexane sur le taux d'urée	50
5.1.2. Effet du n-hexane sur le taux de l'acide urique	50
5.1.3. Effet du n-hexane sur le taux de créatinine	51
5.1.4. Effet du n-hexane sur le taux de glutathion	51
5.2.Effet du n-hexane sur l'histologie et l'histochimie rénale	52
5.2.1. Coloration hématoxyline-éosine	52
5.2.2. Coloration histochimique trichrome de Masson	52
6. Effet du n-hexane sur la fonction pulmonaire	55
6.1.Effet du n-hexane sur le taux de MDA et de GSH dans les tissus pulmonaires	55
6.2.Effet du n-hexane sur l'histologie et l'histochimie pulmonaire	56
6.2.1. Coloration hématoxyline-éosine	56
6.2.2. Coloration histochimique trichrome de Masson	56
6.2.3. Coloration histochimique Movat pentachrom	57
7. Effet du n-hexane sur la fertilité masculine	61
7.1.Effet du n-hexane sur quelques paramètres biochimiques de la reproduction mâle	61
7.1.1. Effet du n-hexane sur le taux de la testostérone et de l'hormone lutéinisante	61
7.1.2. Effet du n-hexane sur le taux de GSH dans les tissus testiculaires	62
7.2.Effet du n-hexane sur le spermogramme	63
7.2.1. Effet du n-hexane sur le nombre et la concentration des spermatozoïdes	63
7.2.2. Effet du n-hexane sur la mobilité des spermatozoïdes	63
7.3.Effet du n-hexane sur l'histologie testiculaire (coloration H-E)	64
Discussion	66
Conclusion et perspective.....	84

Références bibliographiques 86

Annexe *i*

INTRODUCTION

Introduction

La chimie a une tâche majeure dans le développement des pays en fournissant une grande variété de produits (**Hathaway et Proctor, 2014**). Dans ce monde contemporain moderne et évolué, la fabrication et l'application des produits chimiques ne cessent pas d'augmenter et de croître, elles se sont multipliées par dix (10) entre 1970 et 2010 (**OMS, 2017**).

L'être humain est exposé quotidiennement et d'une façon directe ou indirecte à une large gamme de substances chimiques présentes dans l'environnement contaminé (**Asante-Duah, 2017**), les produits consommés (alimentaires, cosmétiques, pharmaceutiques...) et les industries. De nos jours, l'exposition à ces produits chimiques est devenue inévitable, ils représentent une menace pour l'écosystème, la santé et le bien-être des humains (**Myers et Patz, 2009**). Parmi les produits chimiques qui provoquent un risque sur la santé humaine se trouvent les solvants organiques (**INRS, 2017**).

Les solvants organiques définis comme un groupe varié de produits chimiques qui a la capacité de dissoudre, séparer et diluer d'autres produits chimiques (**Wexler, 2014**). Les solvants organiques sont essentiellement appliqués dans le nettoyage et le dégraissage des métaux, la peinture, l'impression, le nettoyage à sec, les adhésifs, les carburants et les additifs pour carburants. Ainsi ils sont également courants dans les colles et les ingrédients inertes, dans les formulations de pesticides (**Boyes, 2009**). L'exposition aux solvants organiques se fait par inhalation, en contacte cutané et par voie orale. Des troubles neurologiques sont observés après une exposition aiguë ou à court terme à ces solvants organiques, des exemples de solvants organiques contenant du toluène, n-hexane, méthyl n-butyl cétone, ont provoqué de nombreux cas de neuropathie professionnelle (**Viaene et al., 2009**), les rapports de cas impliquant à la fois l'exposition professionnelle, et les données expérimentales sur les animaux qui ont été examinés comme des éléments à l'appui (**Ridgway et al., 2003**). Des maladies d'alzheimer et de parkinson ont été suggérées, après une exposition professionnelle aux solvants organiques en général (**El-Fawal, 2011**). Toutefois, plusieurs études ont démontré que les solvants organiques peuvent causer aussi

INTRODUCTION

une hépatotoxicité, néphrotoxicité, hématotoxicité (**Oduola et al., 2015**), pneumotoxicité et reprotoxicité.

Les solvants organiques sont répartis selon leur structure chimique et les groupes fonctionnels attachés (**Hall, 1996**):

- Les groupes fonctionnels comprennent les halogènes, les alcools, les cétones, les éthers, les esters, les amines et autres.
- Les structures de base sont des hydrocarbures aromatiques, alicycliques et aliphatiques.

Les solvants hydrocarbonés, aliphatiques dérivent des distillés pétrolières, sont des substances complexes contenant uniquement des atomes de carbone et d'hydrogène (**McKee et al., 2015**). n-hexane est un hydrocarbure aliphatique soluble dans les huiles. Il est considéré comme le meilleur solvant utilisé pour l'extraction des éléments naturels lipophiles tels que les arômes, les caroténoïdes et les huiles végétales (**Chemat et al., 2010; Filly et al., 2014**).

La toxicité du n-hexane est en relation avec sa nature lipophiles et sa grande volatilité. Les produits lipophiles se diffusent et se répartissent facilement dans les membranes biologiques, y compris les voies d'entrées communes (poumon, intestin, peau) (**Boyes, 2009**). Le n-hexane est reconnu par sa neurotoxicité périphérique (**El Mellakh et al., 2016**), l'exposition chronique provoque une polyneuropathie périphérique (**Hashizume et al., 2011**), qui est le résultat des dommages des nerfs périphériques (**Sunil et Pai, 2018**), cette dernière est considérée comme l'effet le plus sensible causé par le n-hexane. En outre le n-hexane peut entraîner des dommages respiratoires, une pneumopathie a été observée chez des travailleurs qui ont inhalé chroniquement la vapeur de n-hexane (**INRS, 2019**). Les données sur l'hépatotoxicité et la néphrotoxicité causées par le n-hexane sont limitées et très anciennes. En (**1992**) le **laboratoire de pathologie expérimentale** a révélé que l'exposition des rats au n-hexane à des doses de 125 et 500 ppm a provoqué une augmentation du poids absolu et relatif du foie et des reins chez les rats exposé à la forte dose avec la présence de lésions tissulaires. Concernant la reprotoxicité, des effets sur la fertilité illustrés par une diminution de poids des testicules et une atrophie des tubes

INTRODUCTION

séminifères après une exposition chronique à de fortes doses au n-hexane que ce soit par inhalation ou par voie orale (**ANSES, 2014**). En outre, des lésions pulmonaires ont été signalées après une exposition chronique au n-hexane pendant deux (02) ans chez des rats F344 (**Biodynamics, 1993a**). Il n'est pas classé comme un perturbateur endocrinien. Toutefois, une étude récente réalisée par **Liu et al. (2012)** sur des souris femelles, où ils ont montré une diminution significative du taux de la progestérone après une exposition au n-hexane par inhalation. En revanche, aucune étude à ce jour ne nous permet de dire que le n-hexane affecte le système endocrinien mâle.

La majorité des recherches et résultats précédents ont été obtenus après une exposition au n-hexane par inhalation. En effet, l'exposition orale au n-hexane est possible dans les huiles extraites. Des résidus du n-hexane ont été retrouvés dans les huiles végétales (**CCME, 2011**).

Overton et Manura (1995) ont signalé la présence du n-hexane à des quantités de 19,1 et 95,3 mg dans l'huile d'olive vierge.

Il est devenu primordial de prendre en compte les effets nocifs des polluants qui nous entourent, pour augmenter l'espérance de vie et protéger notre santé (**Picot et Montandon, 2013**).

L'objectif de cette étude est d'évaluer la toxicité sub-chronique du n-hexane à faible dose par voie orale sur le système reproducteur mâle, le système hépatique, le système rénal et le système pulmonaire.

Le premier chapitre qui est la synthèse bibliographique, accompagne l'avancement de notre recherche, des tous premiers travaux effectués jusqu'à la rédaction finale de la thèse. Le second chapitre détaille les protocoles et le matériel scientifique utilisé dans notre recherche, finalement la partie résultat et discussion qui illustre l'effet de n-hexane sur quelques marqueurs hépatiques, rénaux, pulmonaires et reproducteurs mâle par la réalisation d'un dosage biochimique au niveau du laboratoire d'écophysiologie animale, renforcé avec une étude histologique et histo chimique. Nos résultats ont été discutés et interprétés par rapport à ceux déjà réalisés, pour donner une valeur et évaluer nos résultats.

I. La toxicologie

La toxicologie étudie les effets toxiques, provoqués par les polluants naturels ou synthétiques sur les écosystèmes et les animaux y compris les humains. Cette discipline nous a permis de comprendre l'influence et les menaces des produits chimiques sur la biodiversité et la santé (**Tarazona et Ramos-Peralonse, 2014**).

II. Les solvants organiques

1. Historique

Les solvants organiques sont apparus dans l'industrie du goudron de houille au cours de la seconde moitié du XIXe siècle. Leur application est devenue large et diversifiée dans les pays développés et en développement (**Firestone et al., 2009**).

Les solvants sont utilisés sous diverses formes depuis l'antiquité. La valeur des solvants organiques réside dans leur capacité à rester chimiquement stable lors de la dissolution de diverses substances utiles, telles que les graisses, les cires et les résines. Leur facilité de combustion a toujours été une faveur. Les alchimistes expérimentant le briquetage de la houille ont été les premiers à purifier et à caractériser divers constituants des solvants. Il convient de noter que leur utilisation d'isolats bruts reste quelque peu la norme de nos jours, de nombreux produits constituant des mélanges enrichis de plusieurs composés chimiquement liés (par exemple l'essence) et des schémas d'exposition de la population impliquant un assortiment complexe de solvants, y compris non seulement les résidus indésirables de la contamination industrielle d'une époque antérieure (par exemple, le trichloréthylène dans les eaux souterraines), mais également en tant que complément souvent recherché à notre vie quotidienne (par exemple, l'éthanol dans un verre à vin) (**Firestone et al., 2009**).

D'innombrables applications pratiques des solvants ont été développées au cours de l'industrialisation du XIXe siècle et ont donné lieu à des rapports sur la neurotoxicité des solvants, tels que les études neuro-épidémiologiques réalisées auprès des travailleurs de la mi-année (**Firestone et al., 2009**).

Au XIXe siècle, la distillation du goudron de houille, puis du pétrole, a conduit à la production à grande échelle de nouveaux composés organiques, dont plusieurs ont été utilisés à des fins médicinales comme anesthésiques par inhalation et de nombreux autres qui ont été utilisés dans une myriade d'applications industrielles (**Beauchamp et al., 1984; Graham et al., 1995**).

Au début du XXe siècle, de nombreuses recherches ont permis de caractériser diverses expositions aux solvants et divers effets correspondants sur la santé, définissant la toxicologie des solvants organiques et les problèmes de santé au travail et d'hygiène industrielle. Au cours des années 1970, le nombre de publications scientifiques et non scientifiques a augmenté, suite aux inquiétudes suscitées, d'une part, par les effets sub-cliniques démontrés par les progrès techniques de la surveillance biologique et d'autre part, par la reconnaissance des effets neuro-psychosociaux de l'exposition volontaire à des concentrations extrêmement élevées de toluène et d'autres substances volatiles (**Sharp et al., 2005**).

2. Définition

Les solvants organiques sont des substances chimiques utilisés fréquemment dans les industries (**Lafon et al., 2006**). Ce sont des liquides lipophiles, volatils, appelés composés organiques volatils (COV) (**HSE, 2014**). Ils contiennent un atome de carbone et un atome d'hydrogène au moins avec un poids moléculaire faible. L'importance des solvants se trouve dans leur capacité de dissoudre les huiles, les graisses, les résines, le caoutchouc et les plastiques (**Rutchik, 2018**).

Les solvants forment une communauté variée de substances chimiques qui sont présents dans toutes les sociétés modernes et industrialisées. Le contact avec ces solvants se fait usuellement sur le lieu du travail et dans les environnements (**Jacob et al., 2008**).

L'empoisonnement aux solvants est souvent illustré par des effets neurologiques (**ANSES, 2011**) aigus et chroniques, touchant le système nerveux central et périphérique. (**Firestone et al., 2009**).

Les caractéristiques physico-chimiques des solvants (volatilité, solubilité) déterminent leurs aspects toxico-cinétiques (absorption tissulaire, distribution dans les tissus, biotransformation et l'élimination) (**Firestone et al., 2009**).

3. Classification des solvants

Les solvants organiques peuvent être classés par structure chimique (**EC, 2007**):

- Solvants halogénés
- Solvants oxygénés
- Solvants hydrocarbons
 - Aromatiques
 - Aliphatiques

4. Pénétration des solvants dans l'organisme

Les solvants peuvent entrer dans le corps par plusieurs façons et voies (**OSH, 2014**):

- Par voie respiratoire: inhalation de la vapeur des solvants dégagés par les colles, les peintures, les vapeurs des solvants dans les industries et les laboratoires.
- Par voie cutanée.
- Par voie orale: absorption des solvants présents dans les aliments contaminés, l'eau et les cigarettes.

III. Les hydrocarbures

Les hydrocarbures sont des composés chimiques organiques composés que des atomes de carbones (C) et d'hydrogène (H) de formule chimique C_nH_m (**Benyahia et Mahdaoui, 2011**). Les hydrocarbures regroupent un grand nombre de composés toxiques, on distingue deux (02) grandes familles des hydrocarbures (aromatiques et aliphatiques) (**Ayadim, 2014**).

1. Les hydrocarbures aromatiques

Ce sont des composés cycliques insaturés de formule chimique C_nH_{2n} possédant une liaison simple. Les hydrocarbures aromatiques sont à l'origine des anneaux formés par les alcanes (Ayadim, 2014).

2. Les hydrocarbures aliphatiques

2.1. Les hydrocarbures aliphatiques insaturés

Ce sont des hydrocarbures non cycliques, il y a deux (02) catégories, les alcènes à double liaison de formule C_nH_{2n} et les alcynes à triples liaison de formule C_nH_{2n-2} (Ayadim, 2014).

2.2. Les hydrocarbures aliphatiques saturés

Les hydrocarbures aliphatiques saturés font partie de la famille des alcanes paraffinés, ont la formule chimique générale C_nH_{2n+2} et peuvent être à chaîne linéaire ou à chaîne ramifiée. L'alcane le plus simple est le méthane (CH_4).

La solubilité des lipides augmente progressivement et la volatilité diminue progressivement avec l'addition progressive d'atomes de carbone. Le méthane, l'éthane, le propane et le butane (un, deux, trois, quatre atomes de carbone, respectivement) sont des gaz à température ambiante, et tous sont extrêmement inflammables et peuvent former des mélanges explosifs. Le pentane, l'hexane, l'heptane, l'octane, le nonane et le décane (cinq, six, sept, huit, neuf et dix atomes de carbone, respectivement) sont considérés comme volatils (Abou-Donia, 2015).

Les hydrocarbures aliphatiques sont des solvants organiques et sont couramment présents dans les mélanges complexes : essence, diesel, carburéacteurs et les essences minérales (Makhloifi et Matmer, 2018).

IV. Le n-hexane

1. Définition

Le n-hexane est un hydrocarbure aliphatique saturé de la famille des alcanes à chaîne linéaire, et qui possède six (06) carbones (C_6H_{14}). Le 2,5-hexanedione est le principal métabolite actif du n-hexane. Il est peu soluble dans l'eau mais soluble dans les huiles (Gagné, 2008).

Le n-hexane est considéré comme le solvant le plus toxique des hydrocarbures saturés à six (06) carbones, en raison de ces propriétés physico-chimiques (ANSES, 2014) (Tableau 1).

Tableau 1: Propriétés physico-chimiques du n-hexane.

Aspect	Liquide
Couleur	Incolore
Odeur	Agréable (comme l'essence)
Changement d'état Point de fusion	-95°C
Point d'ébullition	69°C
Point d'inflammation	-26°C
Température d'auto inflammation	240°C
Danger d'explosion	<ul style="list-style-type: none">• Limites d'explosion inférieure• Limites d'explosion supérieure <p>1,2 Vol % 7,4 Vol %</p>
Densité	0,66 g/cm ³ à 20°C
Densité de vapeur	2,79 (air = 1)
Miscibilité	<ul style="list-style-type: none">• L'eau• Solvants organiques <p>0,01 g/l à 20°C 84%</p>
Viscosité	<ul style="list-style-type: none">• viscosité cinématique• viscosité dynamique <p>0,5 mm²/s à 20 °C 0,326 mPa-s à 20 °C</p>

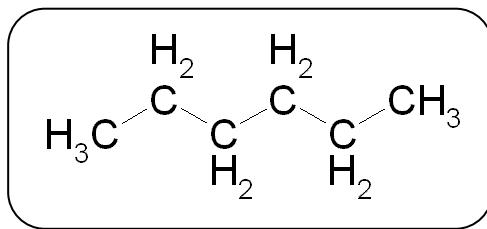


Figure 1: Structure chimique du n-hexane (**Carreón et Herrick, 2012**).

2. Utilisation

Le n-hexane est un excellent solvant organique qui a été utilisé dans (**HSDB, 2004; Hayes, 2007**):

- L'extraction des huiles végétales.
- Agent réactionnel et solvant dans la fabrication des polyoléfines, caoutchoucs synthétiques et produits pharmaceutiques et comme agent dénaturant pour l'alcool.
- Formulation de divers produits notamment les colles, les peintures les encres d'imprimerie et les produits de nettoyage.
- Un composant de quelques carburants et solvants pétroliers, spécialement dans les essences et les kérosènes.
- Utilisé pour le dégraissage, le nettoyage, en imprimerie, dans les industries du textile, du vêtement et de la chaussure.
- Réactif ou étalon d'analyse en laboratoire.

3. Classification toxicologique

La Commission Européenne (CE) a classé le n-hexane en tant que solvant (**INRS, 2019**) :

- Reprotoxique de catégorie 2, ce qui veut dire qu'il y a une forte supposition que le n-hexane provoque une altération de la fertilité chez l'homme.
- Irritant pour la peau de catégorie 2.

- Effets narcotiques de catégorie 3, il agit sur le système nerveux en provoquant le sommeil.
- Danger chronique de catégorie 2 pour le milieu aquatique.
- Dangereux pour les organismes et les milieux aquatiques (R 51-53), il est toxique, nuisible pour les organismes aquatiques et cause des dommages à long terme dans l'environnement aquatique, respectivement.
- Liquide facilement inflammable, catégorie 2.
- Dangereux après aspiration, danger de catégorie 1.

4. Source d'exposition

Le n-hexane est présent dans l'essence, quasiment l'être humain est souvent exposé à l'essence dans les stations service, les rejets des automobiles et les industries qui utilisent des substances qui le contiennent (**Teixeira et al., 2001**) (exposition principalement pulmonaire).

En raison des propriétés chimiques du n-hexane les gens s'exposent spécialement à ce dernier par respiration. L'exposition cutanée peut se faire en renversant du n-hexane sur la peau (**NJDH, 2012**) dans les endroits où le n-hexane est présent, tels que les stations d'essence (**INERIS, 2002**), les industries chimiques et les laboratoires (**US EPA, 2019**). Comme le n-hexane est utilisé pour les extractions des huiles végétales parmi elles les huiles de cuisson, de faibles quantités peuvent être présentes dans ces huiles de cuisson (**Fine et al., 2013**). De plus le n-hexane peut s'introduire dans l'eau et le sol lors de fuites de réservoirs ou dans les décharges de déchets. La présence du n-hexane dans l'eau a été détectée par chromatographie en phase gazeuse (**Puyear et al., 1981; Franke et al., 1988**).

5. Toxicité cinétique

5.1. Absorption

5.1.1. Absorption pulmonaire

Le n-hexane passe dans le corps par voie respiratoire, il est rapidement absorbé. Les données de l'absorption de cette substance sont limitées (**US EPA, 2005**).

Le n-hexane inhalé et expiré a été mesuré par **Mutti et al. (1984)** chez dix (10) travailleurs qui ont été exposés régulièrement à 69 ppm (243 mg/m³) pendant 8h dans le cadre du travail, le taux du n-hexane absorbé par le poumon a été estimé à 17%. Selon l'**INRS (2019)** l'absorption du n-hexane est de 28% chez l'être humain, après une exposition par inhalation ou cutanée.

La concentration du n-hexane dans le sang est en corrélation avec sa concentration dans l'air et dans l'air alvéolaire (**Brugnone et al., 1978**). D'après **Veulemans et al. (1982)**, la concentration du n-hexane atteint le pic après 15 minutes d'exposition.

Les recherches ont montré que le taux d'absorption pulmonaire, prend en considération la rétention (différence entre air inspiré et air expiré), la ventilation alvéolaire, la fraction d'exposition spécifique (coefficient de partage sang/air de la substance), le temps d'absorption et le poids corporel (**Krishnan et Carrier, 2008**).

$$\text{Dose inhalée (mg/kg/jour)} = \frac{C \times Q \times t \times F}{PC}$$

C : Concentration de l'air (mg/L)

Q : Débit alvéolaire (L/h)

t : Temps de l'exposition (h)

F : Fraction d'absorption

PC : Poids corporel (kg)

5.1.2. Absorption cutanée

La majorité des solvants hydrocarbonés sont mal absorbés par la peau. Des études menées par **Tsuruta (1982)** sur les taux d'absorption du n-pentane, de 2-méthylpentane, du n-hexane, du n-heptane et du n-octane en utilisant des lambeaux cutanés abdominaux excisés de rats. Les résultats ont révélé que le taux d'absorption était inversement proportionnel au nombre d'atomes de carbone, le pentane ayant le taux d'absorption

percutanée le plus élevé (0,519 nmoles/min/cm² de peau) et le n-octane le plus bas ($0,0817 \times 10^{-3}$ nmoles/min/cm²). Un taux de pénétration équivalente a été enregistré pour le n-hexane et son isomère 2-méthylpentane, à 0,0118 et 0,0209 nmoles/min/cm² respectivement. Le taux d'absorption cutanée général du n-hexane a été estimé à $\leq 0,1$ µg/h/cm².

L'absorption cutanée du n-hexane est faible, les d'études sur les humains et les animaux ont montré que les alcanes en C5 - C12 sont mal absorbés après une exposition cutanée. Comme les taux d'absorption percutanée en relation inverse avec le nombre d'atomes de carbone dans les molécules, et logiquement il a été supposé que les taux d'absorption percutanée pour les composants aliphatiques avec > 12 carbones seraient encore inférieurs à ceux mesurés pour les composants à C10 - C12 (**McKee et al., 2015**).

5.1.3. Absorption digestive

Le n-hexane est absorbé par le tractus digestif tout au long du tube gastro-intestinal, l'absorption dépend du pH et de la forme ionisée/non-ionisée des substances ingérées. Le n-hexane est un solvant liposoluble donc non-ionisé ce qu'il lui donne l'avantage d'être absorbé rapidement dans l'estomac (**Gagné, 2008**).

La dose du n-hexane absorbée par ingestion n'a pas été indiquée ni chez l'être humain ni les animaux de laboratoire (**US EPA, 2005**).

Les solvants hydrocarbonés sont bien absorbés après une exposition orale, mais l'augmentation du poids moléculaire baisse l'absorption des solvants hydrocarbonés ingérés (**McKee et al., 2015**). Des rats mâles ont reçu certains hydrocarbures aliphatiques saturés et insaturés plus précisément des alcanes dans le but de comprendre leur phénomène d'absorption orale, les résultats ont montré que l'absorption des hydrocarbures se fait essentiellement dans l'intestin grêle et qu'il n'y avait aucune différence dans les taux d'absorption des hydrocarbures aliphatiques saturés et insaturés ayant le même nombre de carbones (**Albro et Fishbein, 1970**).

Il a été conclu que le nombre de carbone était le déterminant le plus important de l'absorption avec une relation inversement proportionnelle entre le nombre de carbone et la fraction absorbée, représentée par la formule empirique :

$$\text{Pourcentage d'absorption} = 115,9 - 3,94 \times \text{nombre d'atomes de carbone.}$$

Selon cette formule, le pourcentage d'absorption du n-hexane administré par voie orale est de 92,26 % (**Mckee et al., 2015**).

5.2. Distribution

Le n-hexane est un solvant liposoluble. Une fois le n-hexane absorbé, il passe dans le sang où il atteint son pic dans une heure et quarante minutes (1 h 40), le taux dans le sang reste stable jusqu'à la fin de l'exposition puis diminue. La moyenne de la demi-vie du n-hexane dans le sang est de 1,5 h à 2 h (**Vermeulen et al., 2006**). En premier lieu le n-hexane est transporté dans le foie, l'organe de métabolisation. Le n-hexane est décomposé en métabolites qui sont après distribués par ordre d'affinité (graisses, foie, cerveau, muscle, rein, cœur et poumon). La demi-vie du n-hexane dans les tissus adipeux est de 64 h (**INRS, 2019**).

Des études faites par **Bus et al. (1979)** sur des rates femelles gestantes et des rats mâles exposés au n-hexane par inhalation à 1000 ppm pendant 6 heures. Les résultats obtenus ont montré la présence du n-hexane dans le sang, le foie, le rein, le cerveau et le fœtus.

Les mêmes chercheurs ont indiqué que la substance et deux (02) de ses métabolites (méthyl-n-butyl cétone et 2,5-hexanedione) traversent la barrière placentaire chez les rats exposés par inhalation (1000 ppm, 6 h/j, 15 à 18 j de gestation). Le taux de ces trois (03) substances dans le sang maternel et les fœtaux est similaire.

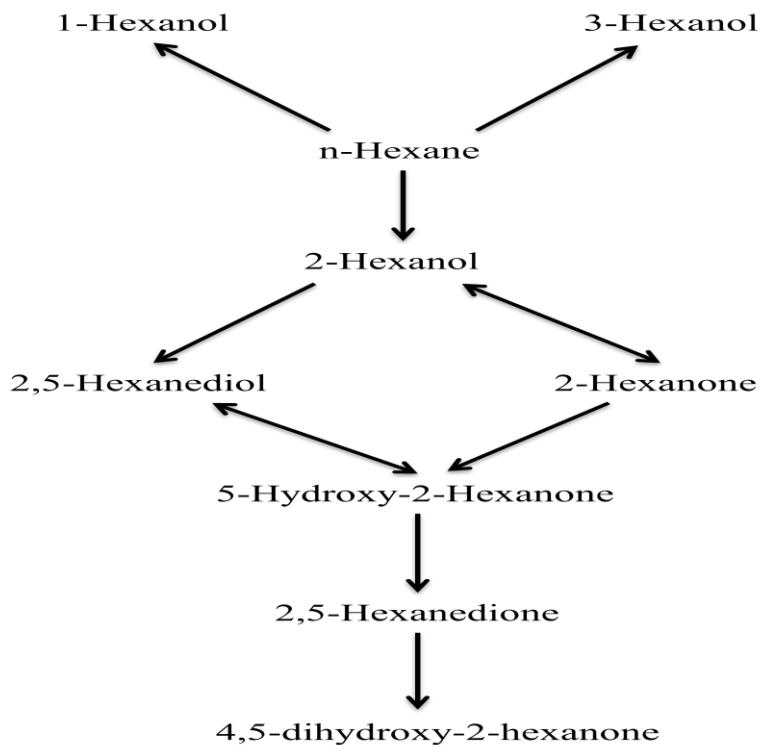
Aucune étude n'est disponible sur la distribution du n-hexane suite à une ingestion chez l'homme ou l'animal (**ANSES, 2014**).

5.3. Métabolisme

Le métabolisme des substances se fait dans le foie en utilisant des enzymes hépatiques. Le n-hexane est dégradé par les oxygénases à cytochrome P450 en substances alcooliques et cétoniques (**INRS, 2019**).

L’oxydation du n-hexane nous permet de distinguer deux (02) voies de transformation. La première voie emmène à une détoxicification, une quantité du n-hexane se métabolise et donne deux (02) composés non toxiques (1-hexanol et 3-hexanol), alors que la seconde voie conduit à la transformation du n-hexane en un métabolite toxique (2-hexanol). Ce dernier est décomposé en 2-hexanone et 2,5-hexanediol qui se métabolisent finalement en 5-hydroxy-2-hexanone, 2,5-hexanedione et 4,5-dihydroxy-2-hexanone (Figure 1). La 2,5-hexanedione est le principal métabolite toxique (**Walker *et al.*, 2006**).

Van Engelen *et al.* (1997) ont déterminé le temps de la métabolisation du n-hexane, après faire exposer des volontaires à 60 ppm pendant 15,5 minutes le matin et l’après-midi. Un sommet de 2,5-hexanedione dans le sang a été enregistré entre 16,2 et 19,8 minutes au début de l’exposition.



ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure 2: La métabolisation du n-hexane chez l'homme et le rat dans le foie (**Walker et al., 2006**).

5.4. Élimination

Beaucoup d'études humaines ont examiné l'élimination du n-hexane dans les urines, ils ont montré la présence de la 2,5-hexanedione, 2,5- dimethylfurane, 2-hexanol et la γ -valerolactone dans l'urine des travailleurs (**Mayan et al., 2001; Dos Santos et al., 2002; Prieto et al., 2003**).

Chez l'être humain, 10 % du n-hexane absorbé est éliminé sous forme inchangée dans l'air expiré. La demi-vie d'excrétion des métabolites est de 13h à 14 h (**INRS, 2019**).

Plusieurs études expérimentales ont expliqué l'excrétion urinaire après une exposition au n-hexane par inhalation, ils ont détecté des quantités de la 2-hexanone, la 2,5-hexanedione, la 5-hydroxy-2-hexanone, le 2-hexanol, le diméthylfurane, le 3-hexanol et la γ -valerolactone dans les urines des animaux exposés au n-hexane (**Baker et Rickert, 1981; Frontali et al., 1981**).

Pour suivre le passage du n-hexane, des rats ont été exposés au n-hexane marqué au carbone 14 par inhalation. 12 % à 500 ppm a été excrété par les poumons et de 60 % à 70 % par excréition urinaire où le métabolite majeur est le 2-hexanol (**ECSC, 2009**).

Une seule étude chez l'homme suite à une exposition des volontaires au n-hexane par voie orale a été explorée par **Baelum et al. (1998)**. Ils ont montré l'existence de la 2,5-hexanedione dans les urines des volontaires.

6. Mode d'action

La toxicité du n-hexane touche principalement le système nerveux périphérique. Des travaux faites sur des rats ont révélé que l'exposition au n-hexane baisse le taux des protéines marqueurs spécifiques des nerfs dans la partie distale du nerf sciatique, tandis que le taux de ces protéines n'a pas été changé dans les parties des nerfs sciatique proximal et dans le cerveau (**Huang et al., 1992**). La 2,5-hexanedione est le métabolite du n-hexane,

qui est un composé neurotoxique (**Abou-Donia et al., 1982**). La neurotoxicité de 2,5-hexanedione est trente huit (38) fois plus toxique que la molécule mère "n-hexane" (**Krasavage et al., 1980**). **Spencer et Schaumburg (1976)** ont montré que la 2,5-hexanedione a provoqué une neuropathie chez les rats traités. La 2,5-hexanedione fait de la famille des γ -dicétones qui sont neurotoxiques, par contre la famille des α - et β -dicétones qui ne le sont pas (**DeCaprio et al., 1982**).

Decaprio et al. (1982); LaPachin et Gavin (2015) supposent que la neurotoxicité de 2,5-hexanedione peut être due à sa liaison avec des composants axonaux, il se fixe sur des groupes amino fonctionnels (NH₂) des protéines axonales produisant des groupes pyrroles substitués (**DeCaprio et O'Neill, 1985; Genter et al., 1987**). Les α - et β -dicétones se lient à ces amino fonctionnels (NH₂), mais ne forment pas les groupes pyrrole, seuls les γ -dicétones forment ces pyrrole (**DeCaprio et al., 1982**).

Des neurofilaments ont été accumulés après une neuropathie causée par le n-hexane (**Decaprio et O'Neill, 1985**). Trois (03) hypothèses ont été proposées pour expliquer cette accumulation des neurofilaments :

- Les changements physico-chimiques déclenchés par l'addituit pyrrole hydrophobe entraînant une perturbation de la fonction ou du transport des neurofilaments (**Decaprio et O'Neill, 1985**).
- L'auto-oxydation des produits d'addition de pyrrole entraînant une réticulation entre les neurofilaments (**Graham et al., 1982a; Graham et al., 1995; Anthony et al., 2009**).
- Perturbation des relations normales entre les neurofilaments et les composants du cytosquelette, en particulier les microtubules (**Griffin et al., 1984**).

Quelle que soit la cause de l'accumulation de neurofilaments, **Decaprio et O'Neill (1985)** pensent que l'effet extrême de ces changements est le blocage physique du flux d'éléments nutritifs axonaux et la dégénérescence nerveuse subséquente.

7. Le n-hexane dans l'environnement

Les rejets totaux du *n*-hexane dans l'environnement en 2006 se situaient entre 1 000 et 5 000 tonnes (1 à 5 millions de kilogrammes), dont la majeure partie était rejetée dans le compartiment atmosphérique vers 99,7 % de la quantité totale des rejets déclarés (**LCPE, 1999**). Des concentrations de 0,25% et 0,05% des rejets ont été mesurés dans l'eau et la terre, respectivement (**ECSC, 2009**). 4,438 millions de kg du *n*-hexane dans l'air a été signalé dans l'inventaire national des rejets de polluants (INRP), tandis que, des rejets de 855 kg dans l'eau et de 1200 kg dans la terre ont été déclarés en 2006 (**INRP, 2009**).

L'absorption du *n*-hexane dans la terre et les sédiments est faible relativement. Principalement le *n*-hexane résidera dans l'air et dans l'eau (**EQC, 2003**).

8. Toxicité

En général on distingue trois (03) types d'intoxication. Cette dernière prend en compte, la dose, la durée d'exposition (**Lauwerys, 2007**).

8.1. Toxicité aiguë

C'est une intoxication causée par une exposition à une dose unique forte sur une période courte généralement 24 h. La dose aiguë est définie aussi comme la dose qui tue 50 % de la population exposée à cette dose (**Lauwerys, 2007**). La toxicité aiguë du *n*-hexane est représentée dans le tableau 2.

Tableau 2: Les valeurs de la toxicité aiguë du *n*-hexane (**Sigma-Aldrich, 2017**).

Voie d'administration	Espèce	CL50/DL50
Inhalation	Rat	73680 ppm/4h
Ingestion	Rat	28700 mg/kg
Cutanée	Lapin	3000 mg/kg

8.1.1. Toxicité aiguë par inhalation

L'inhalation et/ou l'absorption cutanée de fortes concentrations du *n*-hexane induisent chez le rat des symptômes de dépression du système nerveux central (incoordination

musculaire, prostration, coma) et une irritation du système respiratoire réversibles après l'exposition. Chez des souris, l'exposition à 32 000 ppm pendant cinq minutes déclenche une anesthésie profonde et une exposition à 64 000 ppm, un arrêt respiratoire dans les 4 à 5 minutes (**ATSDR, 1999**).

8.1.2. Toxicité aiguë cutanée

L'usage cutané du n-hexane à 45 %, 4 h sous occlusion sur des lapins (1 320 - 3 300 mg/kg) cause une incoordination et la mort, à la plus forte dose, 5 jours après l'exposition.

L'usage cutané occlusif unique de 0,5 ml du n-hexane pendant 24 h provoque sur la peau une irritation chez les lapins, qui devient plus intense en cas d'application répétée (10 jours de suite). L'instillation dans l'œil de lapin de 0,1 ml du produit pur ou de qualité commerciale n'entraîne qu'une légère irritation (**WHO, 1991**).

8.1.3. Toxicité aiguë par ingestion

L'exposition à une forte dose du n-hexane par voie orale peut induire des effets néfastes. Les signes d'une intoxication aiguë par le n-hexane sont manifestés par des nausées, des vomissements, des étourdissements, de somnolence, ainsi il peut entraîner une dépression du système nerveux central. En cas de vomissement, le n-hexane peut être aspiré dans les poumons, avec un risque de provoquer une pneumonie chimique (**Sigma-Aldrich, 2017**).

8.2. Toxicité sub-chronique et chronique

C'est une intoxication induite après des expositions répétées à des faibles doses durant une longue durée (pendant quelques semaines, mois et années) (**Lauwerys, 2007**).

Les effets toxiques dans ce type d'exposition se développent soit car il y a une accumulation de la substance toxique dans le corps où sa concentration augmente graduellement jusqu'à il arrive à une concentration capable d'entrainer des effets toxiques, soit car les effets engendrés par des expositions répétées s'additionnent sans que le toxique ne s'accumule dans le corps comme le cas du n-hexane (**Lauwerys, 2007**).

La 2,5-hexanedione est le principal métabolite trouvée après une exposition au n-hexane et la substance soupçonnée d'être responsable de la neurotoxicité de la substance et des effets toxiques sur les testicules. Les effets testiculaires observés chez le rat n'ont pas été bien documentés chez l'homme (**US EPA, 2005**).

Aussi, une pneumopathie a été détectée après une exposition au n-hexane (**US EPA, 2005**).

8.2.1. Études sur la santé humaine

Les effets critiques d'une exposition chronique au n-hexane semblent être une toxicité testiculaire et une neurotoxicité à la fois pour le système nerveux central et périphérique (**Alhyan, 2014**).

La neuropathie périphérique est bien décrite après une exposition industrielle au n-hexane, la neuropathie au n-hexane se caractérise par un gonflement axonal et une accumulation de neurofilaments (**Alhyan, 2014**).

Les effets testiculaires observés chez le rat n'ont pas été bien documentés chez l'homme. D'autre part une atteinte pulmonaire peut être induite par le n-hexane à type d'une pneumopathie (**US EPA, 2005**).

La 2,5-hexanedione est le principal métabolite trouvée chez l'homme exposé au n-hexane et la substance soupçonnée d'être responsable de la neurotoxicité et des effets toxiques sur les testicules (**US EPA, 2005**).

Les premiers symptômes de neurotoxicité sont généralement sensoriels et consistent-en des picotements, un engourdissement, des sensations de brûlure ou des picotements dans les pieds ou les orteils, suivis d'une faiblesse musculaire progressive d'abord dans les extrémités inférieures et supérieures. Les nerfs distaux sont plus souvent touchés (**US EPA, 2005**).

8.2.1.1. Effets sur le système nerveux

Plusieurs études épidémiologiques ont confirmé que l'exposition professionnelle au n-hexane provoque une polyneuropathie chez l'homme, spécifiquement chez les travailleurs de chaussures.

Chaqda et al. (2019) ont signalé une neuropathie sensorimotrice chez des sniffeurs après l'inhalation addictive de n-hexane dans de colle. Aussi, une neuropathie a été révélée chez des employés dans les usines de chaussures et de sacs (**Sendur et al., 2009**).

Chez dix huit (18) patients qui travaillaient dans une usine de fabricant de chaussures, une diminution des vitesses de conduction motrice et sensorielle après une exposition au n-hexane d'une durée entre neuf (09) et douze (12) mois a été signalé (**Kutlu et al., 2009**). Également, un ralentissement de la conduction nerveuse et sensorielle a été signalé chez quatre vingt douze 92 patients atteints d'intoxication chronique au n-hexane (**Huang et al., 2010**).

Lésions des nerfs moteurs et sensoriels ont été enregistrées à l'aide d'un examen électromyogramme qui examine la vitesse de conduction nerveuse chez vingt cinq (25) travailleurs d'une société de produits électroniques (**Wang et al., 2015**).

Certaines études ont aussi investigué les fonctions visuelles et les altérations possibles de la vision des couleurs chez les travailleurs exposés à des solvants contenant du n-hexane (**Gobba et Cavalleri, 2003; Iregren et al., 2002; Issever et al., 2002**).

En Algérie, une étude épidémiologique réalisée par le service universitaire de la médecine du travail au niveau de l'établissement public hospitalier de Rouiba a enregistré des intoxications chez des travailleurs exposés au n-hexane dans les usines fabricants spécialement le cuir et le plastique (**Kamen-Bouhadiba et al., 2014**).

Les humains peuvent se rétablir de la neuropathie causée par le n-hexane dans un délai de trois (03) ans suivant la fin de l'exposition, mais une détérioration de la force musculaire et des sens est habituellement aggravée dans les deux (02) à cinq (05) mois suivant la fin de l'exposition avant qu'un lent rétablissement prenne place. Toutefois, certains effets

neurotoxiques peuvent persister dans des cas d'exposition très élevée. Le mécanisme de progression continue des effets après la fin de l'exposition n'est pas clair (**Huang, 2008**).

8.2.1.2. Effets sur la reproduction

Aucune étude sur l'homme n'a été référencée dans la littérature concernant spécifiquement la toxicité du n-hexane sur la reproduction (**ANSES, 2014**).

Avant 2017, le n-hexane était classé parmi les substances reprotoxiques de catégorie 2, où sa reprotoxicité sur l'homme est incertaine. Mais, en 2017 et plus précisément le 15 Décembre, des experts qualifiés de l'office californien d'évaluation des dangers pour la santé qui sont les représentants du comité d'identification des substances reprotoxiques, ont classé définitivement le n-hexane dans la liste des substances chimiques causant une toxicité sur la reproduction masculine, sur la base de la proposition 65 (**OEHHA, 2017**).

Dans l'étude de **Sallmen et al. (2008)** un indice de fécondité réduit a été enregistré chez 197 femmes travaillant au Portugal exposées à des solvants dans une fabrique de chaussures, par rapport aux femmes non exposées. Les auteurs suggèrent qu'il y a un lien entre l'exposition à des solvants dont le n-hexane et la diminution de l'indice de fécondité.

8.2.2. Études expérimentales sur les animaux de laboratoire

8.2.2.1. Effets sur le système nerveux

Beaucoup d'études et recherches scientifiques sur des modèles des animaux de laboratoire ont révélé que l'exposition au n-hexane provoque une neuropathie périphérique.

Les résultats les plus rapportés dans les données animales après une exposition au n-hexane au sujet de la neuropathie périphérique, sont caractérisés par une dilatation et une dégénérescence des axones (**ANSES, 2014**).

Dans une étude sur des rats mâles adultes Sprague–Dawley exposés au 2,5-hexanedione à des doses de 175 mg/kg pendant 101 jours et 400 mg/kg pendant 26 jours, a démontré une neuropathie périphérique manifestée par une atrophie axonale dans les nerfs périphériques (**LoPachin et al., 2005**).

Des changements neurologiques ont été signalés chez des rats *Sprague-Dawley* exposés au n-hexane par gavage à une dose de 2700 mg/kg pendant 8 semaines (5 jours/semaine), les observations ont montré une diminution des vitesses de conduction motrice des nerfs; une paralysie des membres postérieurs (**Ma et al., 2006**).

8.2.2.2. Effets sur la reproduction

Le n-hexane a été classifié par la commission européenne comme un solvant préoccupant pour la reproduction humaine (**ECSC, 2009**). Cette répartition a été faite en basant sur les résultats observés chez le rat mâle après une inhalation ou une exposition orale au *n*-hexane ou à son métabolite 2,5-hexanedione, qui déchifrent des atteintes histologiques testiculaires et des changements des paramètres du sperme (**CE, 2004**).

Chez des rats, une toxicité testiculaire a été observée dans un nombre limité d'études, à des doses fortes, par inhalation et par ingestion. Lorsqu'ils surviennent à l'issue d'une exposition courte (< 24h), ces effets sont réversibles (**Boekelheide, 1988**).

L'exposition au n-hexane induit une altération testiculaire par son métabolite la 2,5-hexanedione. La cellule cible de la 2,5-hexanedione est la cellule de Sertoli, spécifiquement touche les cellules de soutien de l'épithélium séminifère (**Boekelheide, 1988**).

Siracusa et al. (1992) ont révélé que l'exposition au métabolite du n-hexane provoque une diminution du nombre d'ovocytes en croissance après 42 jours d'exposition.

Dans une étude réalisée par **DeMartino et al. (1987)** sur des rats mâles a révélé que l'exposition de ces rats au n-hexane par inhalation pendant un (01) jour à six (06) semaines entraîne des altérations au niveau des testicules. Ces dommages ont été définis par une dégénérescence des cellules germinales et une inflammation dégénérative dans les tubes séminifères.

Des rats mâles ont été exposés au n-hexane par gavage à raison de 0, 570, 1140 et 4 000 mg/kg 5 jours/semaine pendant 90 jours et 120 jours pour la dose la plus élevée. Les résultats obtenus ont constaté une atrophie de l'épithélium germinal testiculaire à la dose la plus forte (**Krasavage et al., 1980**). Des résultats similaires ont été observés par **Nylen et**

al. (1989) après avoir exposé des rats mâles Sprague Dawley au n-hexane par inhalation pendant dix mois (10) à une dose de 1 000 ppm, 18 heures/jours 7 jours/7 jours pendant 61 jours.

Concernant l'effet du n-hexane sur la fertilité féminine, une réduction significative du nombre d'ovules avec une altération des ovocytes menant à l'apoptose chez des souris femelles exposés au n-hexane par inhalation à des doses de 0, 5.7, 22.5, et 90.9 ml/m³ 8 heures/jour (**Liu et al., 2013**).

Également, une perturbation des hormones sexuelles ovariennes a été rapportée dans une étude réalisée par **Liu et al. (2012)** sur quarante (40) souris femelles exposées au n-hexane par inhalation à des doses de 0, 3.0, 15.1 et 75.8 ml/m³ 4 heures /jour pendant cinq (05) semaines. Les résultats ont démontré une diminution du taux d'œstrogène à la dose la plus forte (75.8 ml/m³). Pareil pour le taux de progestérone les résultats ont montré aussi une diminution mais aux doses 15.1 et 75.8 ml/ m³

I. Matériels et méthodes

1. Matériels

1.1. Choix du produit utilisé

Le solvant utilisé est le n-hexane commercial avec une pureté de 95% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (**Sigma-Aldrich, 2017**).

Formule	C6H14
Poids moléculaire	86,18 g/mol

Ce doctorat a pour but scientifique d'étudier l'effet sub-chronique des faibles doses du n-hexane par voie orale.

Le choix du solvant, n-hexane et le type d'administration a été fait particulièrement pour les raisons suivantes:

- Le passage du n-hexane par ingestion est possible, des quantités du n-hexane étaient détectées dans les huiles extrayaient par le n-hexane (**Overton et Manura, 1995**).
- Évaluer l'effet de faibles doses du n-hexane sur la reproduction masculine. Selon la fiche toxicologique publié sur Library Wiley le n-hexane ne provoque pas un effet reprotoxique chez l'homme et les rats mâles qu'après une exposition à de fortes doses (**Library Wiley, 1996**).

Un LOAEL à 1000 ppm par inhalation et un LOAEL/NOAEL de 1140/4000 mg/kg/j par voie orale ont été identifiés. Ils correspondent aux valeurs les plus basses retrouvées dans les études ayant mis en évidence des effets sur la fertilité (**CE, 2004**).

1.2. Animal de laboratoire utilisé

L'expérience a été réalisée sur trente cinq (35) rats Wistar mâles adultes provenant de l'institut Pasteur en Algérie, d'un poids corporel moyen de 300 ± 18 g. Les rats ont été

MATÉRIELS ET MÉTHODES

soumis à une période d'adaptation d'un mois et ont été maintenus dans l'établissement dans un environnement et conditions naturelles. Ils ont été nourris avec de l'eau ad libitum et avec un aliment sous forme de croquettes 20 g pour chaque rat à base de blé, maïs et orge acheté du complexe agro-alimentaire (El-Kseur, Béjaia).

2. Méthodes

2.1. Protocole expérimental

Afin d'étudier l'effet toxique du n-hexane sur la physiologie et la reproduction chez un modèle d'animal de laboratoire (rat Wistar), les rats ont été repartis en cinq groupes, dans chaque groupe sept rats ($n=7$), deux (02) groupes contrôles (groupe contrôle et groupe contrôle positif) et trois (03) groupes traités qui ont reçu du n-hexane dissout dans 0,5 ml d'huile de coton, à des doses de 300 mg/kg, 600 mg/kg et 1200 mg/kg par gavage chaque jour pendant huit (8) semaines. Après la période d'expérimentation, les rats ont été sacrifiés par décapitation, le sang a été recueilli, aussi les organes (foie, rein, poumon, testicule) de chaque animal ont été prélevés, pesés et conservés immédiatement dans le formol ($C=10\%$). Les doses administrées pour chaque lot de rat sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Doses des substances utilisées.

Contrôle	Contrôle positif	Dose 1 (mg/kg/j)	Dose 2 (mg/kg/j)	Dose 3 (mg/kg/j)
Eau de robinet	Huile de Coton (ml/j)			
Lot 1	1 ml	-	-	-
Lot 2	-	0,5 ml	-	-
Lot 3	-	-	300 mg/kg	-
Lot 4	-	-	-	600 mg/kg
Lot 5	-	-	-	1200 mg/kg

2.2. Prélèvement sanguin

MATÉRIELS ET MÉTHODES

A la fin de l'étude expérimentale, les rats ont été mis à jeun pendant 24h. Ils ont été sacrifiés après par décapitation, la glycémie a été mesurée par glucomètre et le sang a été immédiatement recueilli dans des tubes:

Tubes à EDTA: pour la détermination de la formule de numération sanguine (FNS).

Tubes secs: le sang recueilli a subit une centrifugation à 5000 tours/min pendant 15 minutes, le sérum résultant est conservé à -20 °C pour le dosage des paramètres biochimiques.

Tubes à héparines: le sang recueilli a subi une centrifugation à 5000 tours / minute pendant 15 minutes; le plasma récupéré a été utilisé pour le dosage de l'hormone gonadotrophine (LH) et stéroïdienne (Testostérone).

2.3. Prélèvement des organes

Les organes (foie, rein, poumon, testicule, épididyme) ont été récupérés par dissection après une ouverture abdominale des rats sacrifiés. Une fois débarrassés de leurs tissus adipeux, les organes ont été pesés pour déterminer le poids relatif et conservés dans le formol (C= 10%) pour l'étude histologique.

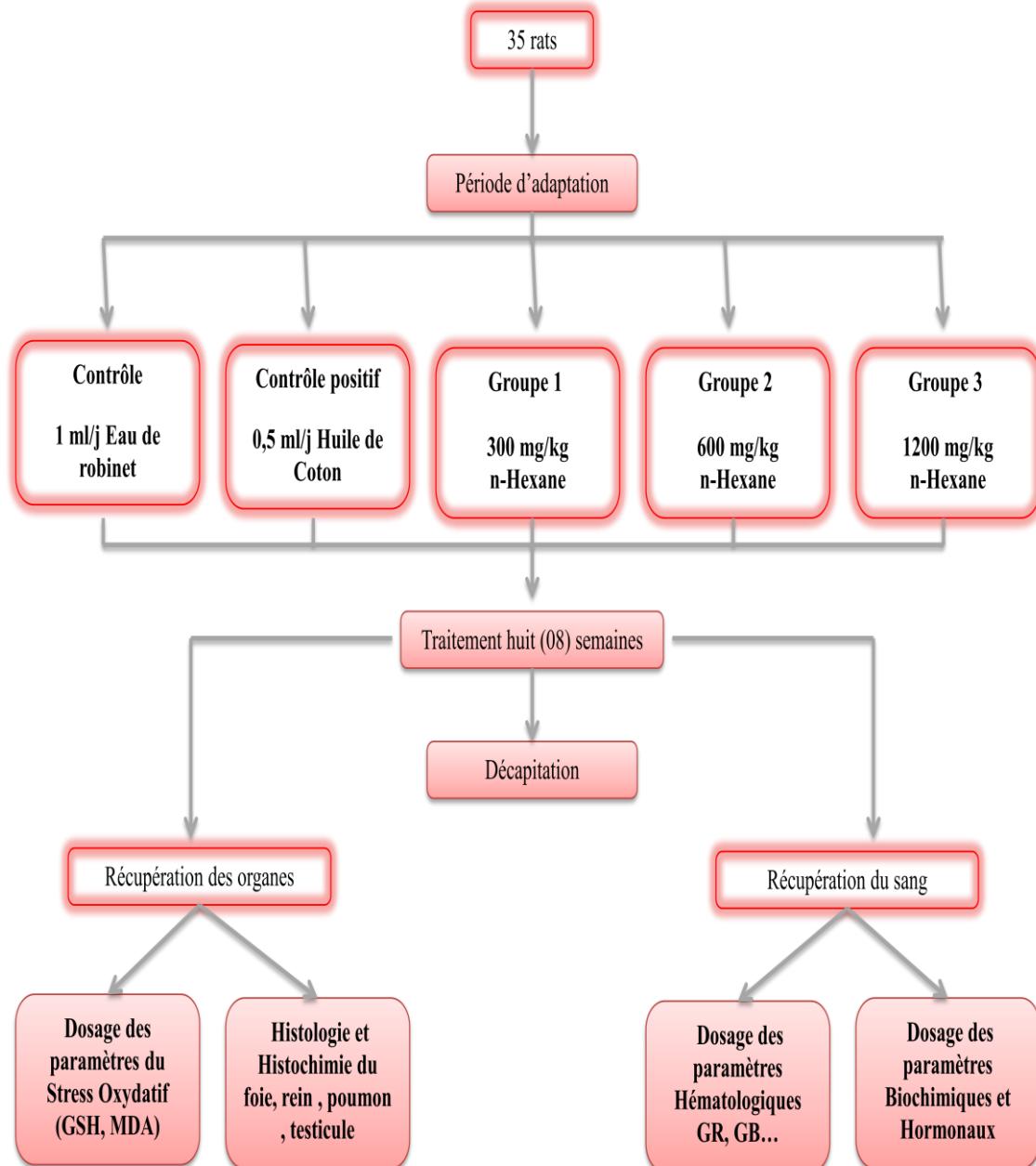


Figure 3: Schéma récapitulatif du protocole expérimental.

2.4. Paramètres étudiés

2.4.1. Paramètres hématologiques

La formule de numération sanguine (FNS) du sang recueille dans des tubes EDTA (anticoagulant) a été mesurée à l'aide d'un analyseur d'hématologie (Abacus 4). Les paramètres déterminés sont: globules rouges (GR), globules blancs (GB), hémoglobines (HB), hématocrites (HTC), plaquettes (PLT), lymphocytes (LYM), éosinophiles (EOS),

MATÉRIELS ET MÉTHODES

granulocytes (GRA), volume globulaire moyen des hématies (VGM) et la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH).

2.4.2. Paramètres biochimiques

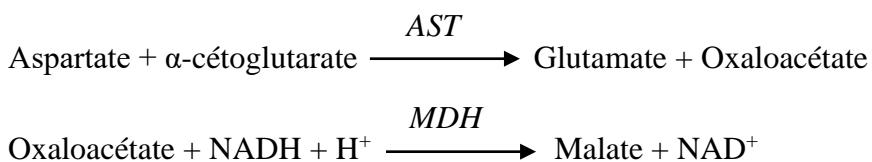
2.4.2.1. Paramètres biochimiques hépatiques

2.4.2.1.1. L'aspartate aminotransférase

Le dosage de l'aspartate aminotransférase a été réalisé par la méthode cinétique selon la fiche technique du Kit Spinréact.

➤ Principe:

L'aspartate aminotransférase (ASAT) appelée aussi oxaloacétate de glutamate (GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'aspartate au α -cétoglutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate est réduit en malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH, H^+ (**Murray, 1984b**).



Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité de l'aspartate aminotransférase dans l'échantillon (sérum).

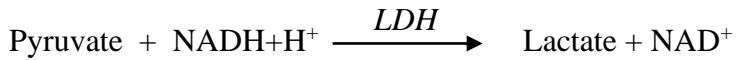
2.4.2.1.2. Lalanine aminotransférase

Le dosage de lalanine aminotransférase a été réalisé par la méthode cinétique selon la fiche technique du Kit Spinréact.

➤ Principe:

Lalanine aminotransférase (ALAT) appelée aussi la glutamate-pyruvate transaminase (GPT) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de lalanine au α -cétoglutarate formant le glutamate et le pyruvate. Le pyruvate est réduit au lactate par la lactate- déshydrogénase (LDH) et le NADH (**Murray, 1984c**) selon les réactions suivantes:

MATÉRIELS ET MÉTHODES



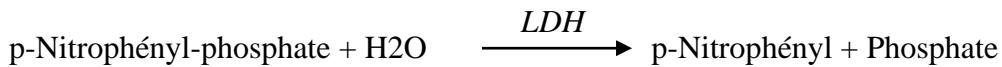
Le taux de diminution de la concentration en NADH+H+, mesuré par photométrie, est proportionnel à l'activité catalytique de l'alanine aminotransférase.

2.4.2.1.3. La phosphatase alcaline

Le dosage de la phosphatase alcaline a été réalisé par la méthode cinétique selon la fiche technique du Kit Spinréact.

➤ Principe:

La phosphatase alcaline (PAL) catalyse l'hydrolyse du p-nitrophényl phosphate à pH 10,4, libérant le p-nitrophénol et le phosphate (**Wenger, 1984**), selon la réaction suivante:



Le taux de la diminution de la concentration en NADH+H+, mesuré par photométrie, est proportionnel à l'activité catalytique de la phosphatase alcaline.

2.4.2.1.4. Le glucose

➤ Principe:

Le dosage du glucose sanguin a été effectué par un glucomètre qui utilise des bandelettes réactives. Ces dernières sont destinées à un usage diagnostique *in vitro* pour le test de la glycémie. Elles sont conçues pour mesurer le glucose dans le sang total capillaire. La bandelette réactive contient de la glucose-oxydase, une enzyme qui oxyde le glucose dans le sang et qui produit de l'acide d-gluconique et du peroxyde d'hydrogène.

2.4.2.1.5. Les protéines totales

Le dosage des protéines totales a été réalisé par la méthode cinétique colorimétrique selon la fiche technique du Kit Spinréact.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

➤ Principe:

En milieu alcalin, les protéines donnent une couleur violette/bleue en présence de sels de cuivre ; ces sels contiennent de l'iodure qui agit comme un antioxydant.

L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de protéines totales dans l'échantillon testé (**Koller, 1984 ; Burtis, 1999**).

2.4.2.2. Paramètres biochimiques rénaux

2.4.2.2.1. La créatinine

Le dosage de la créatinine a été réalisé par la méthode cinétique colorimétrique selon la fiche technique du Kit Spinréact.

➤ Principe:

L'essai est basé sur la réaction de la créatinine avec le picrate de sodium comme décrit par Jaffé. La créatinine réagit avec le picrate alcalin formant un complexe rouge. L'intervalle de temps est choisi pour les mesures de telle sorte qu'il évite des interférences avec d'autres constituants de sérum. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration en créatinine dans l'échantillon (**Murray, 1984a**).

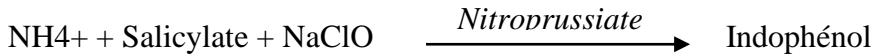
2.4.2.2.2. L'urée

Le dosage de l'urée a été réalisé par la méthode enzymatique colorimétrique selon la fiche technique du Kit Spinréact.

➤ Principe:

L'uréase hydrolyse l'urée en ammonium (NH_4^+) et dioxyde de carbone (CO_2). Les ions ammonium formés réagissent avec le salicylate et l'hypochlorite en présence du nitroprussiate, pour former un indophénol vert (**Kaplan, 1984**), selon les réactions ci-dessous:

MATÉRIELS ET MÉTHODES



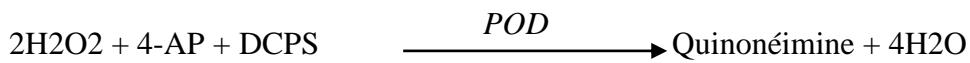
L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration de l'urée dans l'échantillon.

2.4.2.2.3. L'acide urique

Le dosage de l'acide urique a été réalisé par la méthode enzymatique colorimétrique selon la fiche technique du Kit Spinréact.

➤ Principe:

L'acide urique est oxydé par l'uricase en allantoïne et peroxyde d'hydrogène ($2\text{H}_2\text{O}_2$) qui, sous l'influence de la peroxydase, du 4-aminophénazole (4-AP), et du 2-4 dichlorophénol-sulfonate (DCPS), forme un composé rouge de quinonéimine (Schultz, 1984) donné par les réactions suivantes:



L'intensité de la coloration rouge formée est proportionnelle à la concentration de l'acide urique dans l'échantillon.

2.4.2.3. Paramètres biochimiques lipidiques

2.4.2.3.1. Le cholestérol

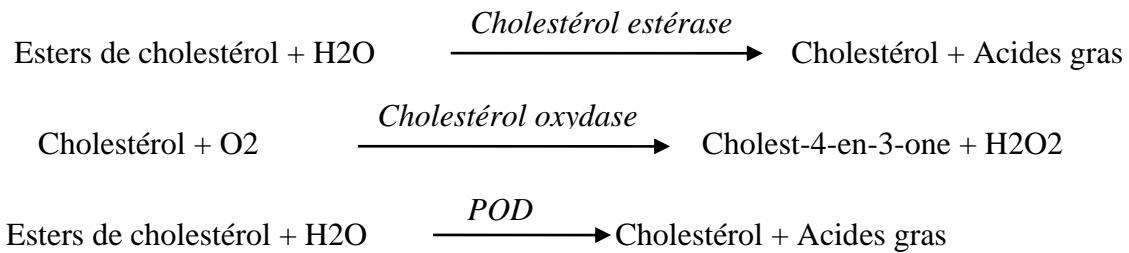
Le dosage du cholestérol a été réalisé par la méthode enzymatique colorimétrique selon la fiche technique du Kit Spinréact.

➤ Principe:

Le cholestérol et ses esters sont libérés à partir des lipoprotéines par des détergents. La cholestérol estérase hydrolyse les esters et le H_2O_2 est formé dans la réaction d'oxydation enzymatique du cholestérol sous l'action de la cholestérol oxydase. Le peroxyde

MATÉRIELS ET MÉTHODES

d'hydrogène réagit avec le phénol pour produire le quinonéimine (**Naito, 1984**), selon les réactions suivantes:



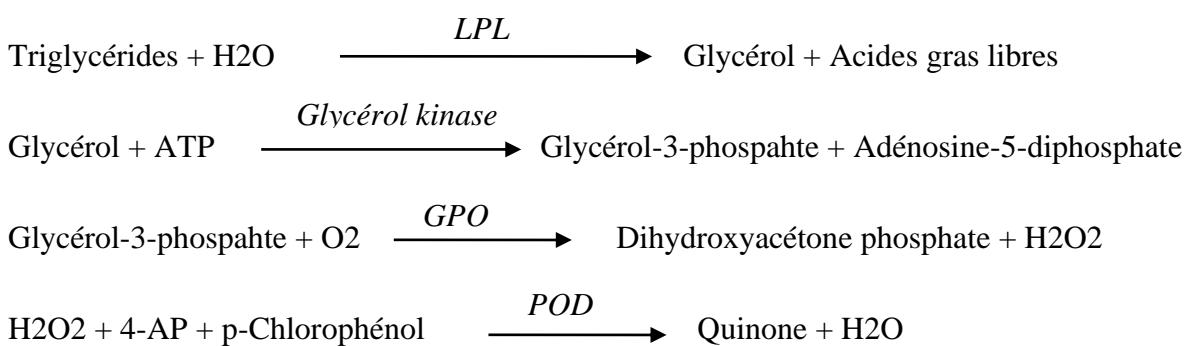
L'intensité de la coloration rouge formée est proportionnelle à la concentration du cholestérol dans l'échantillon.

2.4.2.3.2. Les triglycérides

Le dosage des triglycérides a été réalisé par la méthode enzymatique colorimétrique selon la fiche technique du Kit Spinréact.

➤ Principe:

Les triglycérides incubés avec la lipoprotéinlipase (LPL), libèrent le glycérol et les acides gras libres. Le glycérol est converti en glycérol-3-phosphate (G3P) et adénosine-5-diphosphate (ADP) par la glycérol kinase et l'adénosine triphosphate (ATP). Le glycérol-3-phosphate (G3P) est alors converti par la glycérol déshydrogénase (GPO) en dihydroxyacétone phosphate (DAP) et peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Dans la dernière réaction, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) réagit avec 4-aminophénazone (4-AP) et p-chlorophénol en présence de la peroxydase (POD) pour donner une coloration rouge (**Buccolo et al., 1973**). Le protocole comprend donc les réactions suivantes:



MATÉRIELS ET MÉTHODES

L'intensité de la coloration rouge formée est proportionnelle à la concentration des triglycérides dans l'échantillon.

2.4.2.4. Paramètres biochimiques tissulaires

2.4.2.4.1. Glutathion

Le dosage du glutathion (GSH) a été effectué au niveau du foie, des reins, du poumon et des testicules selon la méthode de **Weckbecker et Cory (1988)** et exprimé en $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines. 200 mg de chaque tissu a été homogénéisé dans 8 ml d'une solution d'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) à 0,02 M, puis il a été mélangé par l'acide sulfo-salicylique (SSA) 0,25%. Après une centrifugation de 1000 tours/min pendant 5 minutes en rajoutant 25 μl de DTNB et 1 ml de Tris-EDTA, l'absorbance a été mesurée à 412 nm.

2.4.2.4.2. Malondialdéhyde

La concentration du malondialdéhyde (MDA) est l'indice de peroxydation lipidique. Cette dernière a été déterminée dans le poumon selon la méthode de **Draper et Hadley (1990)** qui est basée sur la mesure colorimétrique de la réaction entre l'acide thiobarbiturique (TBA) et le dialdéhyde malonique (MDA).

Le dosage de MDA a été fait au niveau du poumon. 500 mg de ce dernier a été homogénéisé dans 5 ml d'une solution de tampon phosphate (0,1 M, pH 7,4), puis ont été broyés à froid (4 °C) en utilisant un broyeur pendant 30 secondes pour obtenir un homogénat.

Une quantité de 500 μl d'aliquote de surnageant d'extrait du poumon a été mélangé dans 0,5 ml TCA (20 %) et 1 ml TBA (0,67 %) et incubé pendant 30 minutes à 95 °C. Après centrifugation de 10 minutes à 5000 tours/minute, l'absorbance du mélange réactionnel est déterminée à 532 nm. La quantité du MDA dans le poumon est obtenue en utilisant une courbe standard réalisée avec du 1,1',3,3'-tetraethoxypropane.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

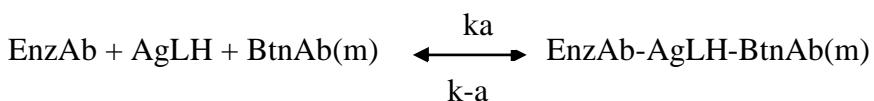
2.4.2.5. Paramètres hormonaux mâle

2.4.2.5.1. L'hormone lutéinisante

Le dosage de l'hormone lutéinisante (*LH*) a été réalisé par une méthode immuno-enzymatique selon la fiche technique du Kit ELISA Diametra.

➤ Principe:

Dans cette méthode de calibrage, des échantillons et / ou des contrôles (contenant l'antigène LH natif) sont ajoutés aux puits de micro-titration revêtus de streptavidine. Ensuite, des anticorps biotinylés monoclonaux anti-LH et des anticorps conjugués à l'enzyme sont ajoutés dans les puits, les deux types d'anticorps ont une affinité et une spécificité élevées et reconnaissent différents épitopes. Dans les puits de micro-titrage, la réaction entre l'antigène natif et les anticorps a lieu sans compétition ni empêchement stérique, et un complexe sandwich soluble est formé (**Kosasa, 1981**). L'interaction est illustrée par l'équation suivante:



- BtnAb (m) = anticorps monoclonal biotinylé (en excès)
- AgLH = antigène natif (quantité variable)
- EnzAb = anticorps marqué par une enzyme (en excès) EnzAb-AgLH-BtnAb (m) = complexe sandwich antigène-anticorps
- k_a = constante d'association k_a = constante de dissociation.

2.4.2.5.2. La testostérone

Le dosage de la Testostérone a été réalisé selon la fiche technique du Kit ELISA Diametra.

➤ Principe:

La testostérone dans le sang est liée à SHBG (60%) et en moindre quantité à d'autres protéines (par exemple l'albumine), la testostérone non liée (< 1% de la testostérone totale) est connue sous le nom de «testostérone libre». La formulation chimique de ce test permet

MATÉRIELS ET MÉTHODES

de libérer complètement la testostérone des protéines liées. Le kit Diametra testostérone permet donc de mesurer la concentration de testostérone totale (liée + libre) dans l'échantillon. La testostérone (antigène) de l'échantillon entre en compétition avec la testostérone antigénique conjuguée à la peroxydase de raifort (HRP) présente dans le conjugué pour la liaison aux anticorps anti-testostérone revêtus sur les microplaques (phase solide). Après l'incubation, la séparation liée / libre est réalisée par un simple lavage en phase solide. L'enzyme HRP dans la fraction liée réagit avec le Substrat (H_2O_2) et le Substrat TMB et développe une couleur bleue qui devient jaune lorsque la Solution d'Arrêt (H_2SO_4) est ajoutée. L'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la concentration de testostérone dans l'échantillon. La concentration de testostérone dans l'échantillon est calculée à l'aide d'une courbe d'étalonnage (**Joshi et al., 1979**).

2.4.3. Spermogramme

Le spermogramme est l'analyse qui consiste à évaluer la qualité du sperme en basant sur les caractéristiques des spermatozoïdes: la concentration, la mobilité, la vitesse et la viabilité. Le sperme a été prélevé à partir d'une ouverture faite au niveau de la queue de l'épididyme et il a été dilué dans de l'eau physiologique (Nacl 0.9%).

2.4.3.1. Le nombre des spermatozoïdes

Le nombre des spermatozoïdes a été mesuré à l'aide d'une cellule de Malassez (**OMS, 1993**). Après avoir mélangé l'échantillon de sperme dilué, nous introduisons une goutte dans la cellule de Malassez, puis recouverte d'une lamelle. Cette étude est basée sur le comptage des spermatozoïdes dans 05 carrés à un grossissement ($\times 40$) au microscope. Le nombre de spermatozoïdes calculé par l'équation suivante:

$$\text{Concentration } (\times 10^6 / \text{ml}) = \frac{\text{D.V.n}}{N}$$

D : coefficient de dilution (50).

V : volume de la cellule de Malassez.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

n : le nombre de spermatozoïdes comptés dans 05 champs.

N : le nombre de petits carrés de la lame.

2.4.3.2. La mobilité des spermatozoïdes

La mobilité a été déterminée par le nombre des spermatozoïdes mobiles dans trois (03) champs à l'aide du microscope optique après avoir mis une goutte de sperme entre une lame et une lamelle. Ensuite, le pourcentage moyen de spermatozoïdes mobiles est calculé (**OMS, 1993**).

2.4.4. Étude histologique

Les coupes histologiques simples à coloration hématoxyline-éosine (H-E) ont été réalisées à l'hôpital Ibn Rochd et l'hôpital El-Bouni/CHU –Annaba-, service d'anatomie pathologique, en suivant la technique décrite par (**Houlot ,1984**). La technique comporte les étapes expliquées dans l'annexe

➤ Coloration

La technique de coloration à l'hématoxyline et à l'éosine fonctionne pour reconnaître différents types de tissus et leurs changements morphologiques. L'hématoxyline a une couleur bleu-violet foncé et colore les acides nucléiques. L'éosine est rose et tache les protéines de manière non spécifique. Dans un tissu typique, les noyaux sont colorés en bleu, tandis que le cytoplasme et la matrice extracellulaire ont des degrés variables de coloration rose.

2.4.5. Étude histochimique

Les coupes histochimiques spécifiques à coloration trichrome de Masson et periodic acid Schiff (PAS) ont été réalisées en Tunisie à la faculté de médecine de Sfax, au niveau de laboratoire d'histologie-embryologie. Cependant, les coupes à coloration pentachrome de Movat ont été effectuées en France au laboratoire ALTHISIA, Troyes. Les techniques comportent les mêmes étapes de l'étude histologique simple. Néanmoins, l'étude histochimique est caractérisée par une coloration spécifique et avec une lecture à l'aide d'un

MATÉRIELS ET MÉTHODES

microscope optique Leica et d'un scanner Hamamatsu Nanozoomer 2.0 HT qui a permis d'identifier différentes structures et anomalies présentes dans le poumon. La technique comporte les étapes expliquées dans l'annexe

➤ Coloration trichrome de Masson

Le trichrome de Masson colore le noyau, le cytoplasme et le collagène (Masson, 1929),

➤ Coloration PAS

La coloration PAS est utilisées pour la mise en évidence de glycogène (oxydation suivie de coloration par le réactif de shiff) (**Drochmans, 1960**).

➤ Coloration pentachrome Movat

La coloration pentachrome Movat modifiée par Russel a l'avantage de mettre en évidence plusieurs éléments tissulaires dans une même coupe histologique. Elle est obtenue par l'action combinée de cinq (05) colorants (**Russell, 1972**). Cette coloration est souvent utilisée pour étudier le cœur, les vaisseaux sanguins et les tissus conjonctifs. Elle peut être utile en diagnostic dans les cas de pathologies vasculaires ou pulmonaires.

2.4.6. Étude statistique

Les résultats obtenus sont exprimés en moyenne plus ou moins l'écart type (Moyenne \pm SD) et ont été soumises à une analyse de variance (ANOVA) à sens unique, suivi d'un test de Tukey pour comparaison multiple. Le logiciel Graphpad Prism (Version 7) a été utilisé. Des différences significatives ont été établies à $*P \leq 0,05$, $** P \leq 0,01$ et $***P \leq 0,001$.

- Significatives lorsque ($*P \leq 0,05$).
- Hautement significative comparant au témoin ($**P \leq 0,01$).
- Très hautement significative comparant au témoin ($***P \leq 0,001$).

P: Seuil de signification.

RÉSULTATS

II. Résultats

1. Effet du n-hexane sur quelques paramètres physiologiques

1.1. Apparences générales

Chute des poils, saignement du nez, essoufflement et diminution d'appétit ont été observés chez les rats exposés à la dose 1200 mg/kg du n-hexane, avec la mort de deux rats du lot expérimental.

1.2. Effet du n-hexane sur le poids corporel et la consommation d'aliment

Le poids corporel des rats était surveillé chaque semaine pendant les huit (08) semaines de traitement. Ainsi, la consommation d'aliment était suivie chaque jour durant la période expérimentale. Les résultats de leur pesée ont enregistré une diminution significative du poids corporel et de la consommation alimentaire ($*P \leq 0,05$ et $**P \leq 0,01$) respectivement, chez les groupes exposés au n-hexane à 600 mg/kg et 1200 mg/kg, par rapport au groupe contrôle et au groupe contrôle positif (Tableau 4).

Tableau 4 : Poids corporel initial et final des rats; aliment consommé, après le traitement avec le n-hexane comparés aux groupes contrôles.

Paramètre	Contrôle	Contrôle Positif	Groupe 1 (300 mg/kg)	Groupe 2 (600 mg/kg)	Groupe 3 (1200 mg/kg)
Poids corporel initial (g)	308.6±5.1	311.7±7.1	303.7±9.1	314±10.0	318.5±11.4
Poids corporel final (g)	315.5±8.5	323.6±12.6	306.5±9.7	277.5±15.1*	266.3±13.1**
Aliment consommé g/j	137,29±3,54	137,47±2,32	132,05±5,74	113,30±3,26*	96,91±2,22**

Les valeurs représentent la moyenne±écart-type pour chaque groupe. (n = 7). Comparaison avec les rats contrôle (C) et contrôle positif (C*): * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01.

RÉSULTATS

1.3. Effet du n-hexane sur le poids relatif des organes

L'évaluation du poids relatif du foie et du poumon a révélé une augmentation significative ($*P \leq 0,05$, $**P \leq 0,01$ et $***P \leq 0,001$) respectivement, chez les rats traités par le n-hexane à la dose 600 mg/kg et 1200 mg/kg, et une augmentation significative ($*P \leq 0,05$) du poids relatif des reins, seulement chez les rats exposés au n-hexane à la dose 1200 mg/kg, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif. Cependant, le poids relatif des testicules et de l'épididyme n'a enregistré aucun changement significatif chez tous les groupes traités (Tableau 5).

Tableau 5 : Poids relatif des organes, après l'exposition au n-hexane comparés aux groupes contrôles.

Organes (g/100g)	Contrôle	Contrôle Positif	Groupe1 (300mg/kg)	Groupe2 (600mg/kg)	Groupe3 (1200mg/kg)
Foie	2,78±0,07	2,66±0,05	2,84±0,10	3,30±0,14*	3,44±0,08**
Rein	0,281±0,02	0,282±0,01	0,284±0,02	0,285±0,009	0,327±0,01*
Poumon	0,40±0,03	0,42±0,04	0,48±0,02	0,78±0,04*	1,26±0,03***
Testicule	0,515±0,05	0,498±0,03	0,483±0,02	0,482±0,02	0,482±0,03
Epididyme	0,182±0,02	0,184±0,01	0,181±0,01	0,174±0,01	0,171±0,02

Les valeurs représentent la moyenne±écart-type pour chaque groupe. (n = 7). Comparaison avec les rats contrôle (C) et contrôle positif (C*): * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$.

2. Effet du n-hexane sur les paramètres hématologiques

L'évaluation de l'effet du n-hexane sur le taux des globules rouges (GR), hémoglobines (HB), hématocrites (HTC) et sur le volume globulaire moyen (VGM) n'a montré aucun changement significatif comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif.

RÉSULTATS

En ce qui concerne le taux des plaquettes (PLT) chez les rats exposés au n-hexane à la dose 600 mg/kg et 1200 mg/kg a révélé une diminution significative ($**P \leq 0,01$ et $***P \leq 0,001$) respectivement, comparativement au groupe contrôle et au groupe contrôle positif (Tableau 6).

En outre, les résultats obtenus pour les globules blancs (GB) ($*P \leq 0,05$, $**P \leq 0,01$ et $***P \leq 0,001$) respectivement, les lymphocytes (LYM), les granulocytes (GRA) et l'éosinophile (EOS) ($**P \leq 0,01$ et $***P \leq 0,001$) respectivement, ont montré une augmentation significative chez tous les groupes traités au n-hexane comparés au groupe contrôle et au groupe contrôle positif. (Figure 4-7).

Tableau 6: Variation des paramètres hématologiques (GR, HB, HTC, VGM, PLT), après l'exposition au n-hexane comparé aux groupes contrôles.

Paramètres	Contrôle	Contrôle Positif	Groupe 1 (300 mg/kg)	Groupe 2 (600 mg/kg)	Groupe 3 (1200 mg/kg)
GR ($10^{12}/l$)	9,126±0,02	9,134±0,02	9,128±0,008	9,138±0,01	9,936±0,01
HB (g/l)	148,8±4,65	148,2±5,31	149,2±5,76	151,8±11,62	154,2±8,25
HTC (%)	40,344±2,44	40,018±1,84	41,032±1,36	42,192±1,478	45,758±2,84
VGM (μm^3)	45,4±1,02	44±2	44,8±0,74	44,2±0,74	45,2±1,47
PLT ($10^9/l$)	420,8±20,53	411,2±32,90	404,46±22,34	230±22,22**	193±24,92***

Les valeurs représentent la moyenne±écart-type pour chaque groupe. (n = 7). Comparaison avec les rats contrôle (C) et contrôle positif (C*): ** P ≤ 0,01; ***P ≤ 0,001.

RÉSULTATS

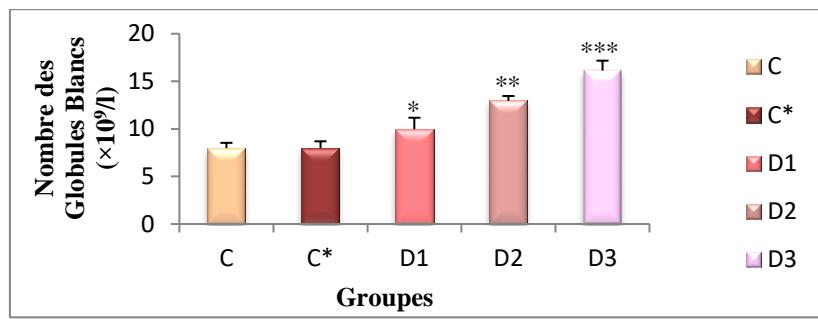


Figure 4: Variation du nombre des globules blancs chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif.

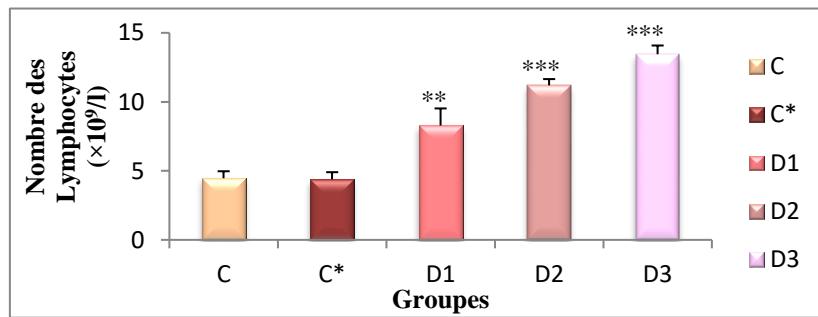


Figure 5: Variation du nombre des lymphocytes chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif.

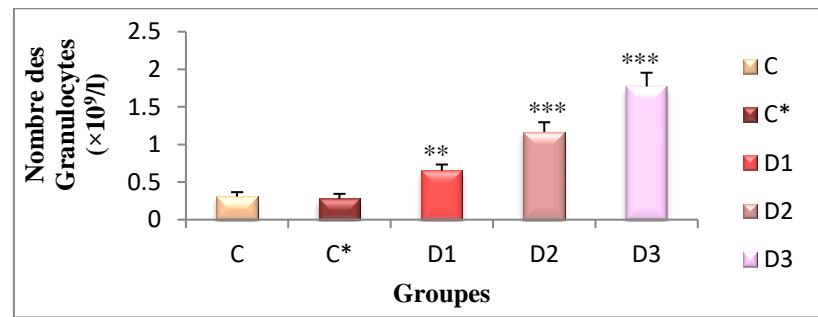


Figure 6: Variation du nombre des granulocytes chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif.

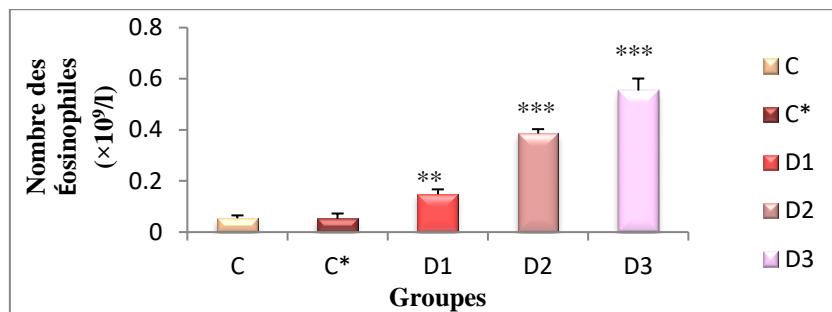


Figure 7: Variation du nombre des éosinophiles chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif.

3. Effet du n-hexane sur la fonction hépatique

3.1. Effet du n-hexane sur quelques paramètres biochimiques du foie

3.1.1. Effet du n-hexane sur le taux des aminotransaminases

Les rats traités au n-hexane aux doses 600 mg/kg et 1200 mg/kg ont montré une augmentation statistiquement significative ($*P \leq 0,05$ et $**P \leq 0,01$) respectivement, de l'activité enzymatique de l'aspartate aminotransférase (ASAT), tandis que le groupe traité à la dose 300 mg/kg n'a montré aucun changement significatif, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif. Pour lalanine aminotransférase (ALAT) nos résultats ont enregistré aussi une augmentation significative ($*P \leq 0,05$, $**P \leq 0,01$ et $***P \leq 0,001$) respectivement, mais chez les trois (03) groupes traités au n-hexane, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif (Figure 8, 9).

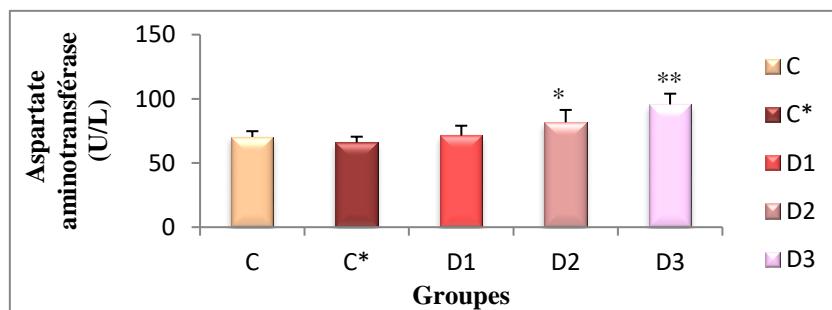


Figure 8: Variation de l'activité de l'aspartate aminotransférase chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif.

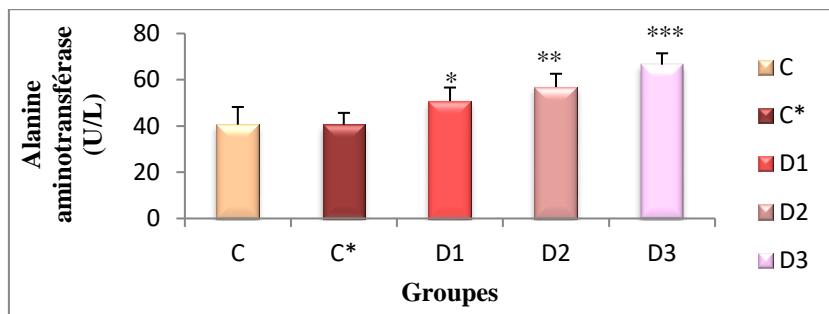


Figure 9: Variation de l'activité de l'alanine aminotransférase chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif.

3.1.2. Effet du n-hexane sur le taux de phosphatase alcaline

Les résultats de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline (PAL) ont révélé une augmentation significative ($*P \leq 0,05$ et $***P \leq 0,001$) respectivement, chez tous les groupes traités par apport au groupe contrôle et au groupe contrôle positif (Figure 10).

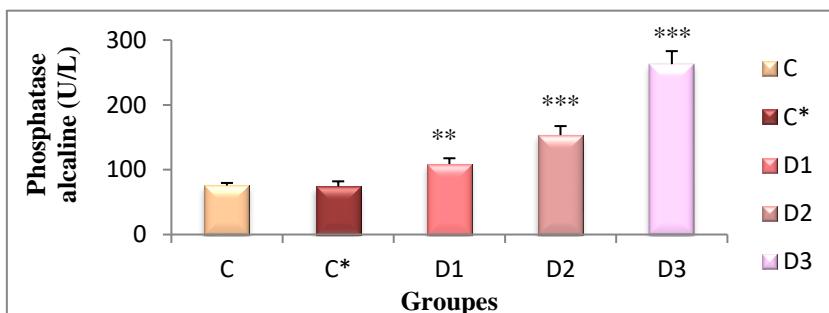


Figure 10: Variation de l'activité de la phosphatase alcaline chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif.

3.1.3. Effet du n-hexane sur le taux de protéines totales

Les taux sériques en protéines totales ont enregistré une augmentation significative ($*P \leq 0,05$, $**P \leq 0,01$ et $***P \leq 0,001$) respectivement, chez les trois groupes des rats traités en comparaison avec le groupe contrôle et au groupe contrôle positif (Figure 11).

RÉSULTATS

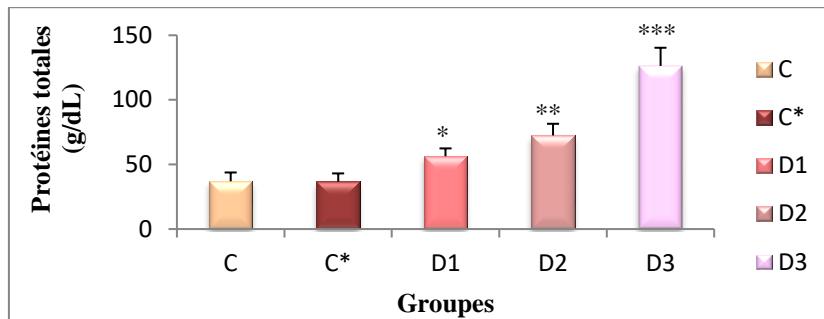


Figure 11: Variation du taux des protéines totales chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif.

3.1.4. Effet du n-hexane sur le taux de glucose

Un taux significativement diminué ($*P \leq 0,05$ et $**P \leq 0,01$) respectivement, de glucose a été démontré dans cette étude chez les groupes traités au n-hexane à la dose 600 mg/kg et 1200 mg/kg, par contre la dose 300 mg/kg n'a montré aucun changement significatif, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif (Figure 12).

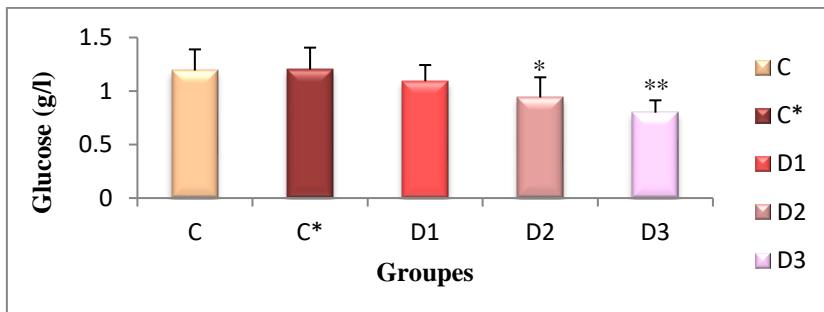


Figure 12 : Variation du taux de glucose chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif.

3.1.5. Effet du n-hexane sur le taux de glutathion

Le taux tissulaire de GSH dans le foie a révélé une diminution significative ($*P \leq 0,05$ et $**P \leq 0,01$) respectivement chez les groupes traités à la dose 600 mg/kg et 1200 mg/kg, alors que les rats traité à la dose 300 mg/kg n'ont montré aucune différence significative, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif (Figure 13).

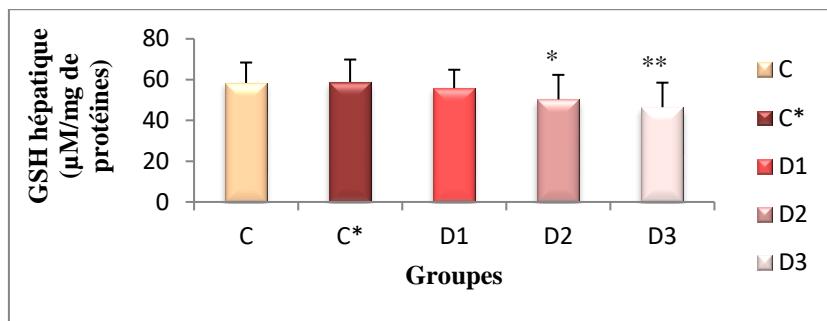


Figure 13: Taux de GSH dans le foie chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif.

3.2. Effet du n-hexane sur l'histologie et l'histochimie hépatique

3.2.1. Coloration hématoxyline-éosine

Les dommages enregistrés après une coloration simple (coloration H-E) dans le foie chez les rats exposés au n-hexane aux trois (03) doses étudiées 300 mg/kg groupe (B), 600 mg/kg groupe (C) et 1200 mg/kg groupe (D) ont été indiqués par l'existence des foyers de nécroses hépatocellulaires, congestion et une inflammation polynucléaire, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif. (Figure 14).

3.2.2. Coloration histochimique trichrome de Masson

Les coupes histologiques du foie à coloration trichrome de Masson ont montré la présence de plusieurs foyers nécrotico-inflammatoires des hépatocytes chez les rats exposés à la dose 300 mg/kg groupe (B). Les altérations observées chez les rats exposés aux deux plus fortes doses 600 mg/kg groupe (C1 C2) et 1200 mg/kg groupe (D) ont été un peu plus sévères que la dose 300 mg/kg groupe (B). Elles sont caractérisées par des foyers nécrotico-inflammatoires des hépatocytes et la dilatation de la veine centro-lobulaire, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif. Aucun effet sur les fibres de collagène n'a été observé dans le foie des rats traités par le n-hexane à la dose 300 mg/kg et 600 mg/kg. La représentation histologique de ces deux (02) groupes présentait des caractéristiques identiques en collagène. Tandis que, le foie des rats exposés au n-hexane à la dose 1200 mg/kg montrait l'apparition des fibres de collagènes autour de la veine centro-lobulaire (couleur verte) (Figure 15).

3.2.3. Coloration histochimique periodic acid Schiff

Les coupes histologiques à coloration periodic acid Schiff (PAS) nous a permis d'étudier la présence de glycogène dans le cytoplasme des hépatocytes du foie. Les observations microscopiques chez les rats exposés au n-hexane aux trois (03) doses traitées 300 mg/kg groupe (B), 600 mg/kg groupe (C) et 1200 mg/kg groupe (D) ont monté une apparence négative de la coloration periodic acid Schiff (PAS) dans les hépatocytes périveineux et périportales, déterminée par une dégranulation cellulaire et la disparition des pigments roses de glycogène. L'examen histologique a montré aussi une inflammation nécrotique des hépatocytes avec une dégénération cellulaire chez les trois (03) groupes des rats exposés au n-hexane aux doses 300 mg/kg groupe (B), 600 mg/kg groupe (C) mais plus étendues à la dose 1200 mg/kg groupe (D), comparé au groupe contrôle et contrôle positif. (Figure 16).

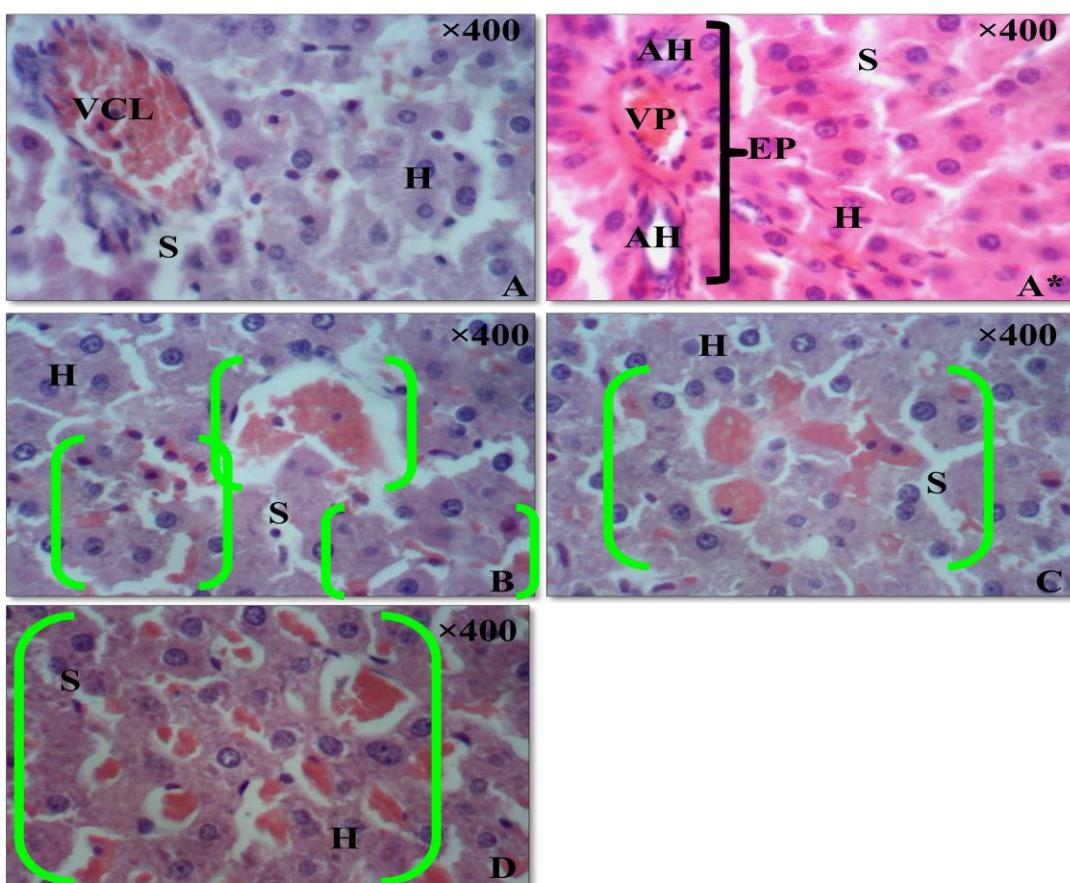


Figure 14: Photographie des coupes histologiques du foie à coloration H-E des rats Wistar mâles des trois (03) groupes traités avec le n-hexane comparés au groupe contrôle et au

RÉSULTATS

groupe contrôle positif. (A) Groupe contrôle. (A*) Groupe contrôle positif -architecture et aspect histologique normal du foie-. (B) Groupe traité par le n-hexane à la dose 300 mg/kg. (C) Groupe traité par le n-hexane à la dose 600 mg/kg. (D) groupe traité par le n-hexane à la dose 1200 mg/kg. () Foyers de nécroses cellulaires avec une inflammation polynucléaire.

Coloration H-E, grossissement $\times 400$. VCL: Veine Centro-Lobulaire; H: Hépatocyte; S: Sinusoïde; PV: Veine Porte; AH: Artère Hépatique; EP: Espace Porte.

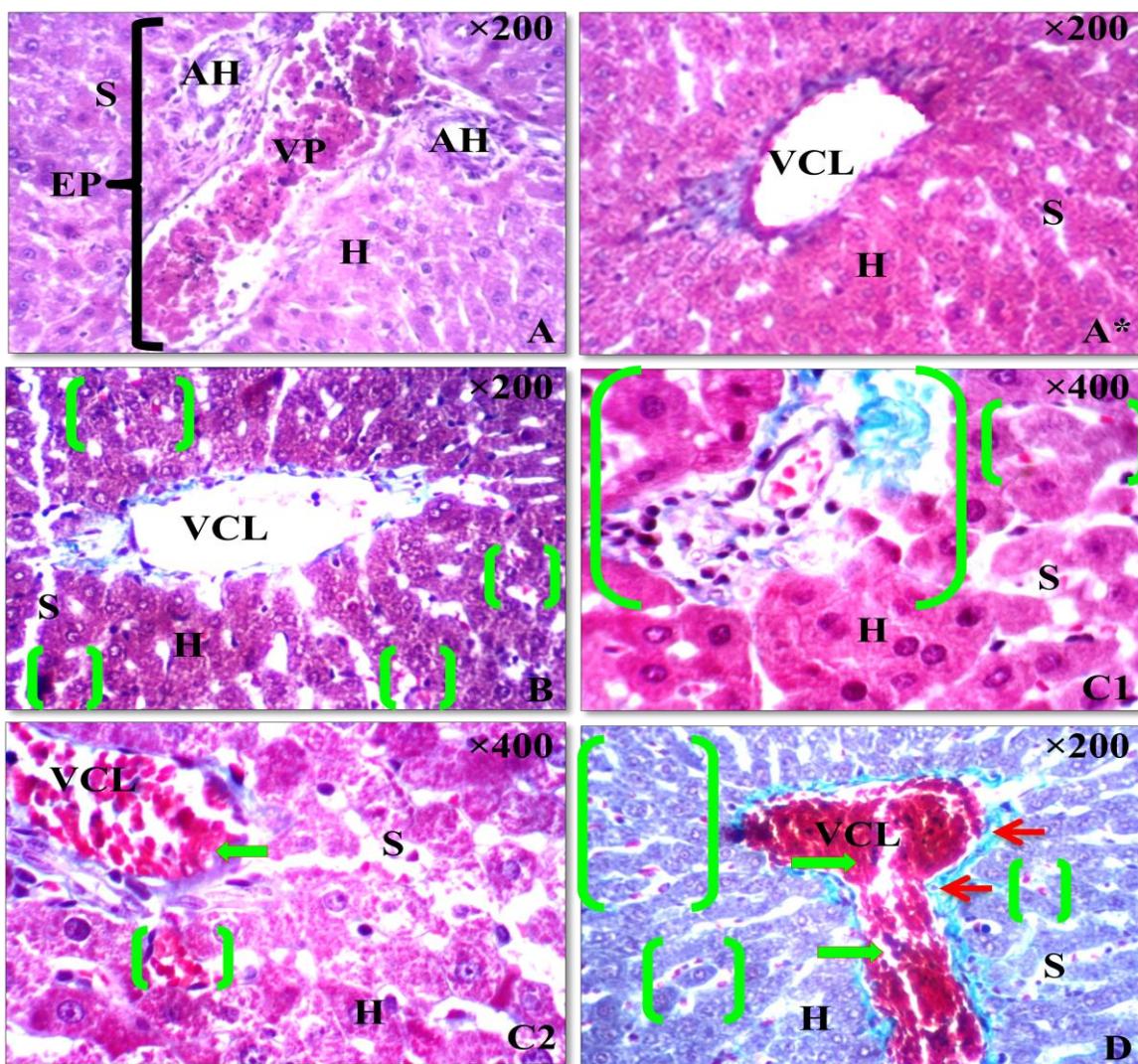


Figure 15: Photographie des coupes histologiques du foie à coloration trichrome de Masson des rats Wistar mâles des trois (03) groupes traités avec le n-hexane comparés au groupe contrôle et au groupe contrôle positif. (A) Groupe contrôle. (A*) Groupe contrôle

RÉSULTATS

positif-architecture et aspect histologique normal du foie -. (B) Groupe traité par n-hexane à la dose 300 mg/kg. (C1 C2) Groupe traité par le n-hexane à la dose 600 mg/kg. (D) Groupe traité par le n-hexane à la dose 1200 mg/kg. () Plusieurs foyers nécrotico-inflammatoires. () Dilatation de la veine centro-lobulaire. () Fibres de collagènes.

Coloration trichrome de Masson, grossissement $\times 200$ et $\times 400$. VCL: Veine Centro-Lobulaire; H: Hépatocyte; S: Sinusoïde; PV: Veine Porte; AH: Artère Hépatique; EP: Espace Porte.

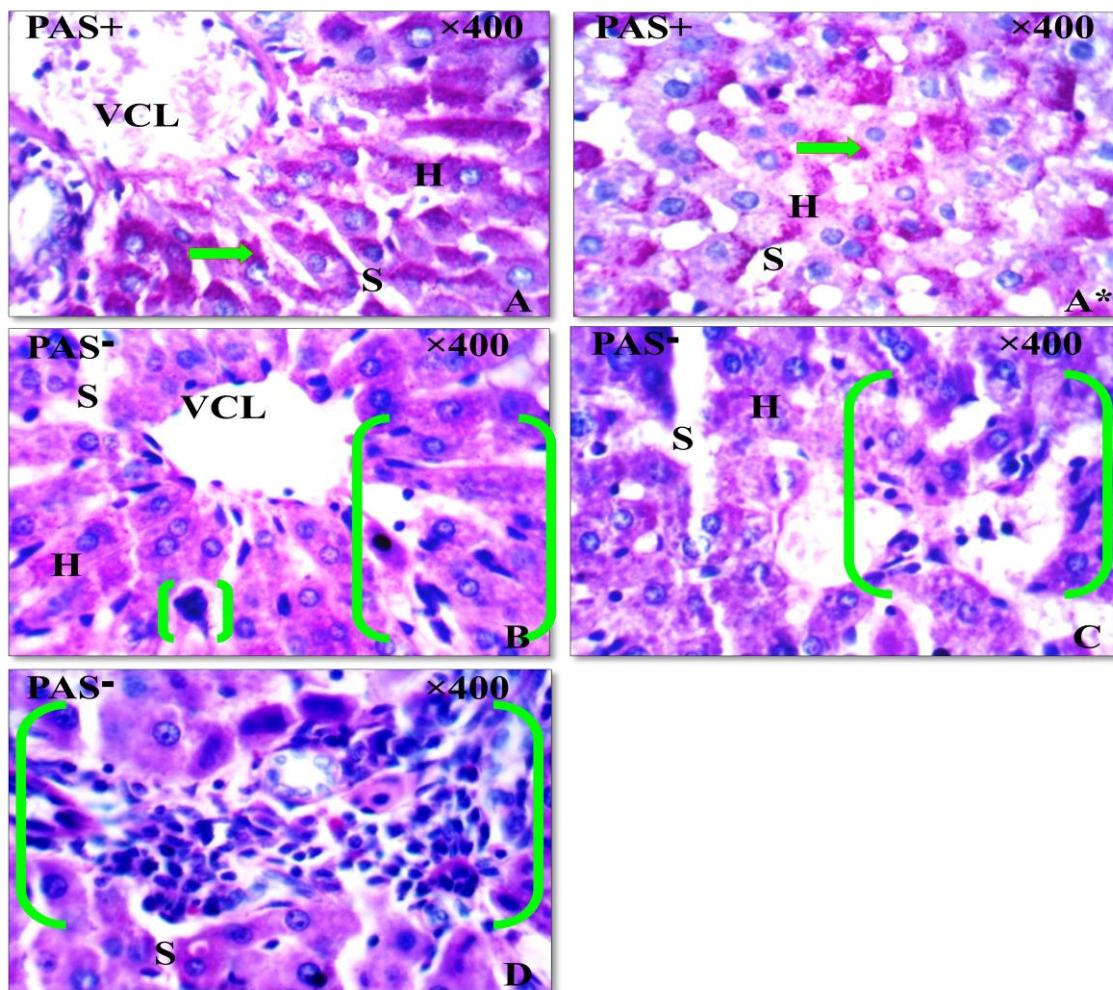


Figure 16: Photographie des coupes histologiques du foie à coloration periodic acid Schiff (PAS) des rats Wistar mâles des trois (03) groupes traités avec le n-hexane comparés au groupe contrôle et au groupe contrôle positif. (A) Groupe contrôle. (A*) Groupe contrôle – architecture et aspect histologique normal du foie. (B) Groupe traité par le n-hexane à la dose 300 mg/kg. (C) Groupe traité par le n-hexane à la dose 600 mg/kg. (D)

RÉSULTATS

Groupe traité par le n-hexane à la dose 1200 mg/kg. (➡) Coloration PAS positive. (��) Coloration PAS négative et une inflammation nécrotique des hépatocytes avec une dégénération cellulaire.

Coloration periodic acid Schiff, grossissement $\times 400$. VC: Veine Centro-Lobulaire; H: Hépatocyte; S: Sinusoïde.

4. Effet du n-hexane sur le bilan lipidique

4.1. Effet du n-hexane sur le taux des triglycérides et le taux de cholestérol

Le traitement des rats par le n-hexane à la dose 600 mg/kg et 1200 mg/kg a induit une diminution significative du taux des triglycérides et de cholestérol (* $P \leq 0,05$ et ** $P \leq 0,01$) respectivement par rapport au groupe contrôle et au groupe contrôle positif (Figure 17, 18).

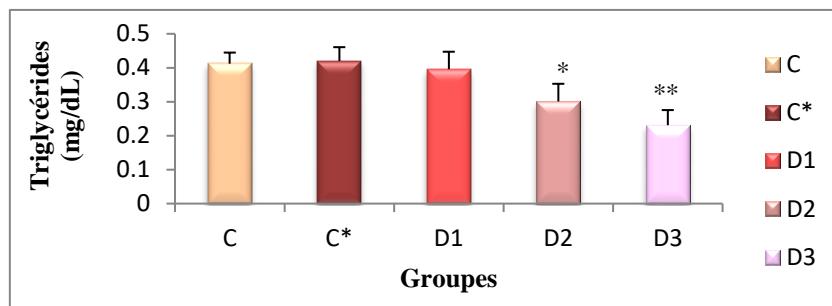


Figure 17: Variation du taux des triglycérides chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif.

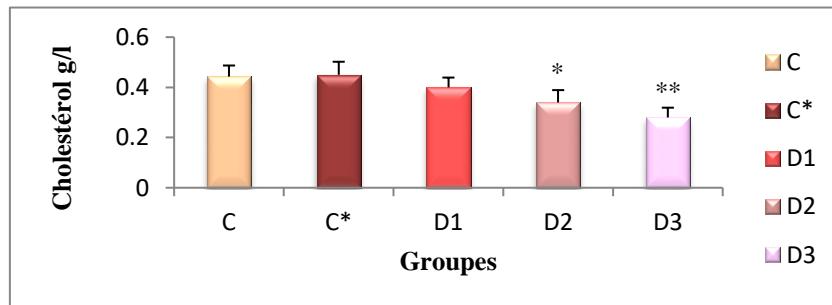


Figure 18: Variation du taux de cholestérol chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif.

RÉSULTATS

5. Effet du n-hexane sur la fonction rénale

5.1. Effet du n-hexane sur quelques paramètres biochimiques des reins

5.1.1. Effet du n-hexane sur le taux d'urée

D'après la (Figure 19), nous avons constaté que le n-hexane a provoqué une augmentation significative ($*P \leq 0,05$ et $**P \leq 0,01$) respectivement, du taux d'urée chez les rats traités à la dose 600 mg/kg et 1200 mg/kg, alors que les rats traité à la dose 300 mg/kg n'ont enregistré aucune différence significative, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif.

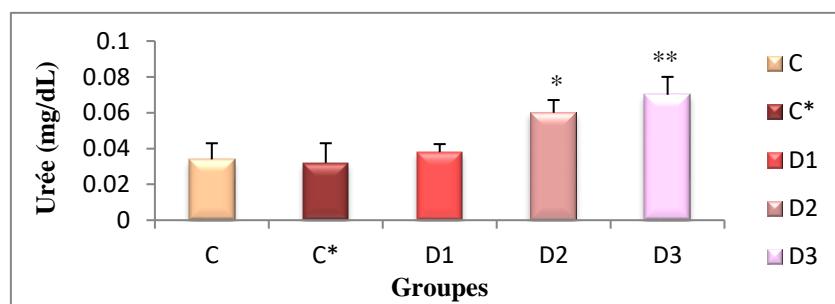


Figure 19: Variation du taux d'urée chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif.

5.1.2. Effet du n-hexane sur le taux d'acide urique

Le traitement des rats au n-hexane a causé une augmentation significative du taux d'acide urique chez tous les groupes traités ($*P \leq 0,05$, $**P \leq 0,01$ et $***P \leq 0,001$) respectivement, par rapport au groupe contrôle et au groupe contrôle positif (Figure 20).

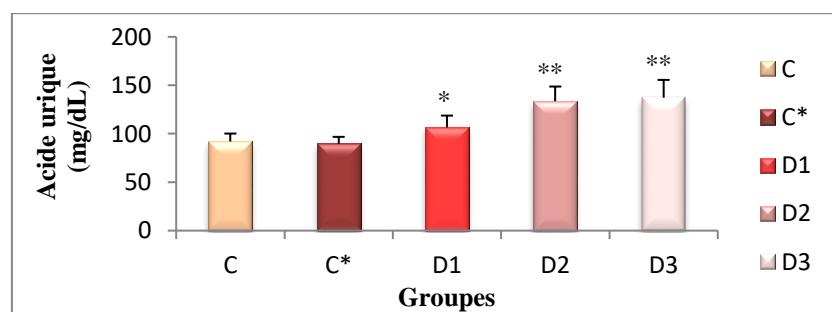


Figure 20: Variation du taux d'acide urique chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif.

RÉSULTATS

5.1.3. Effet du n-hexane sur le taux de créatinine

Nos résultats ont montré une augmentation significative du taux de créatinine chez tous les groupes traités par le n-hexane ($*P \leq 0,05$, $**P \leq 0,01$ et $***P \leq 0,001$) respectivement, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif (Figure 21).

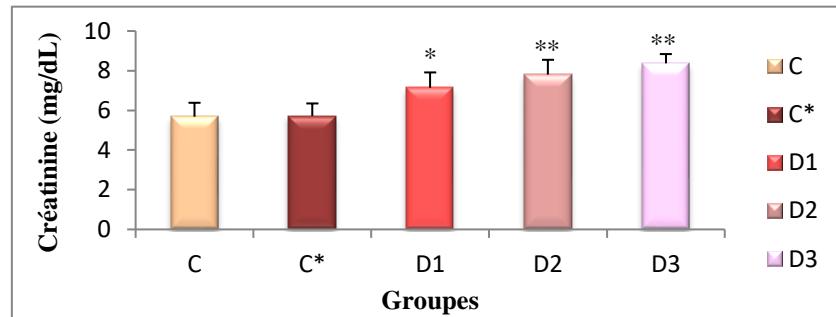


Figure 21: Variation du taux de créatinine chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif.

5.1.4. Effet du n-hexane sur le taux de glutathion

Le n-hexane a provoqué une diminution significative du taux de GSH chez tous les groupes traités ($*P \leq 0,05$ et $**P \leq 0,01$) respectivement, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif (Figure 22).

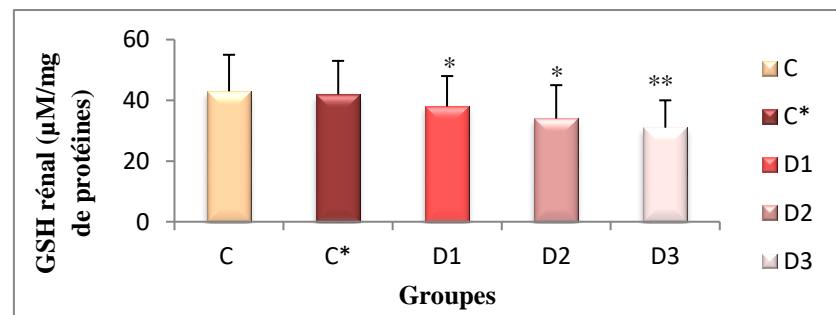


Figure 22 : Taux de GSH dans les reins chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif.

RÉSULTATS

5.2. Effet du n-hexane sur l'histologie et l'histochimie rénale

5.2.1. Coloration hématoxyline-éosine

Les observations des coupes histologiques des reins à coloration H-E ont montré la présence des lésions définis par exfoliation et dégénérescence de tubules rénaux proximaux et distaux et une diminution de l'espace des bordures en brosses chez les rats exposés au n-hexane à la dose 300 mg/kg et la dose 600 mg/kg. Les altérations observées chez les rats traités à la dose la plus forte du n-hexane 1200 mg/kg sont semblables à celles enregistrées dans le groupe exposé aux deux (02) doses les plus faibles 300 mg/kg et 600 mg/kg, mais avec la présence des autres effets où ont a noté des dommages définis par un ensemble de lésions tubulaires et rétraction de flocculus glomérulaires. Aucune réponse inflammatoire n'a été observé après l'exposition au n-hexane, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif (Figure 23).

5.2.2. Coloration histochimique trichrome de Masson

Concernant l'examen microscopique des coupes histologiques à coloration trichrome de Masson les observations ont montré des résultats similaires à celles observés dans les coupes histologiques à coloration H-E, nous avons enregistré une desquamation et une dégénérescence de tubules rénaux proximaux et distaux, des lésions de la bordure en brosse illustrées et représentées par la diminution de cette bordure avec l'absence de l'accumulation de fibres de collagènes chez tous les groupes exposés au n-hexane aux trois (03) doses étudiées, 300 mg/kg, 600 mg/kg et 1200 mg/kg. Aucune réponse inflammatoire n'a été observée après l'exposition au n-hexane, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif (Figure 24).

RÉSULTATS

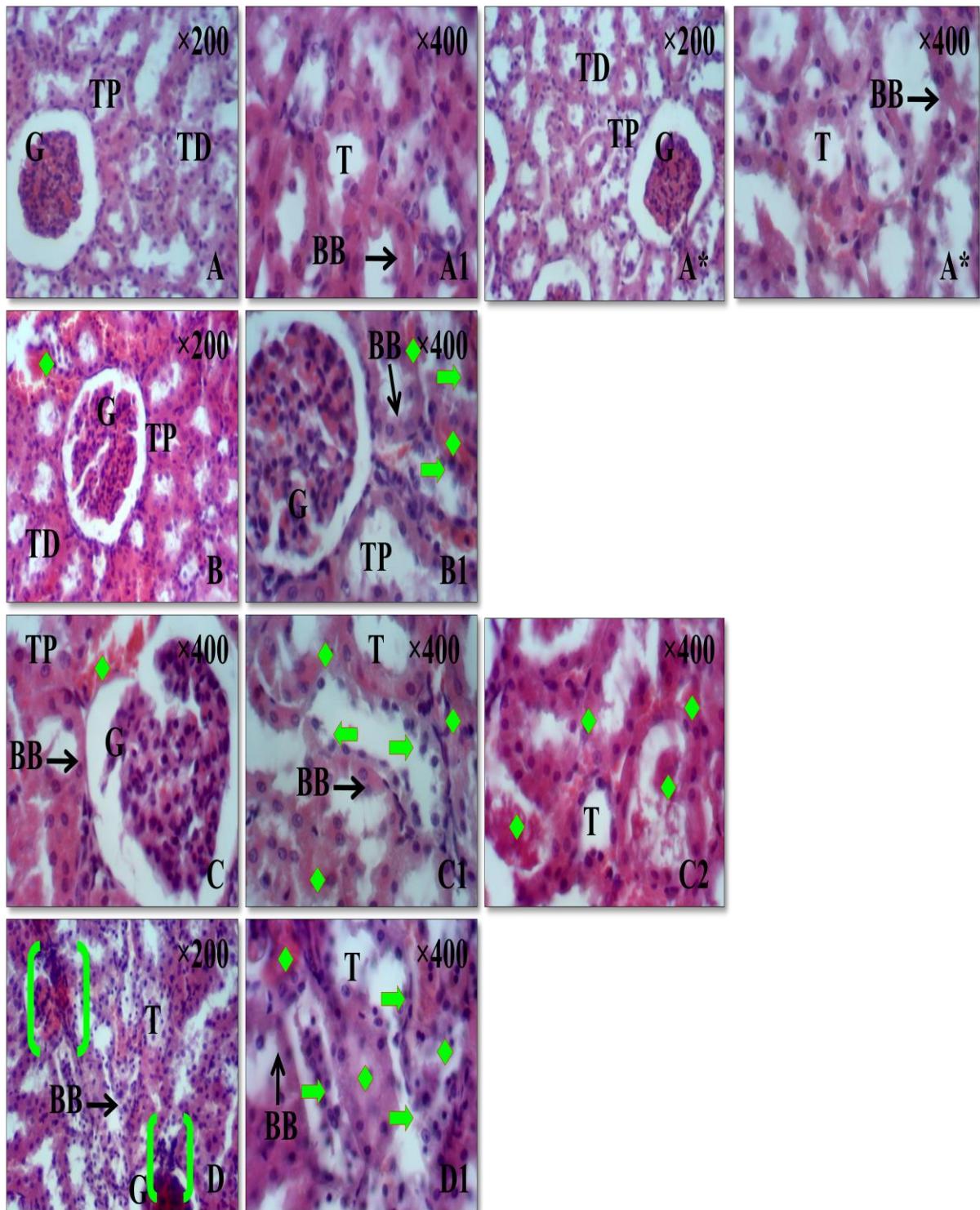


Figure 23: Photographie des coupes histologiques des reins à coloration H-E des rats Wistar mâles des trois (03) groupes traités avec le n-hexane comparés au groupe contrôle et au groupe contrôle positif. (A) Groupe contrôle. (A*) Groupe contrôle positif -architecture et aspect histologique normal de glomérule, des tubules proximaux et distaux-. (B, B1)

RÉSULTATS

Groupe traité par le n-hexane à la dose 300 mg/kg. (C, C1, C2) Groupe traité par le n-hexane à la dose 600 mg/kg. (D, D1) Groupe traité par le n-hexane à la dose 1200 mg/kg. (◆) Exfoliation et dégénérescence de tubules rénaux proximaux et distaux. (→) Diminution de l'espace des bordures en brosses. () Rétraction de flocculus glomérulaires.

Coloration H-E, grossissement $\times 200$ et $\times 400$. G: Glomérule; TP: Tubule Proximal; TD: Tubule Distal; T: Tubule rénal; BB: Bordure en Brosses.

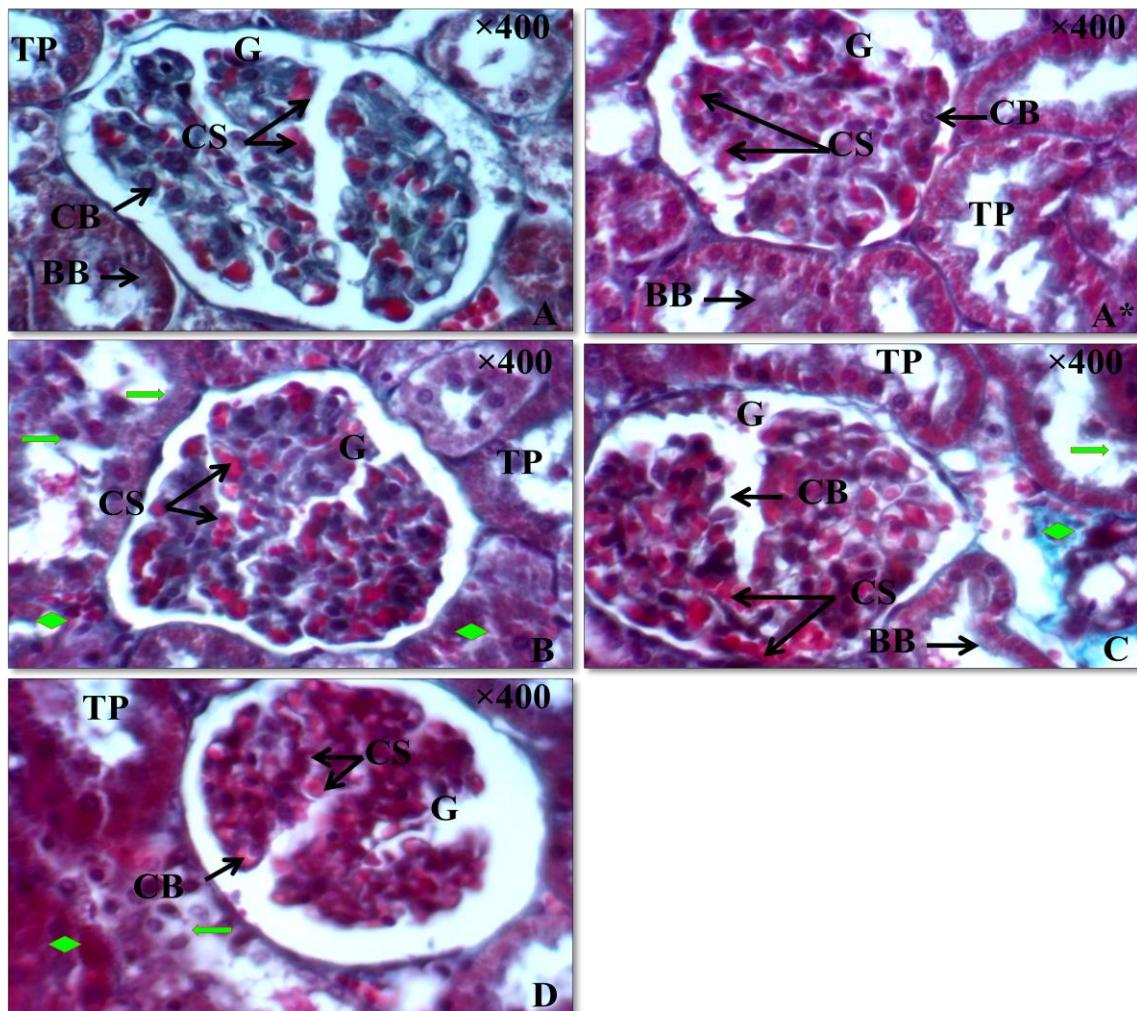


Figure 24: Photographies des coupes histologiques des reins à coloration trichrome de Masson des rats Wistar mâles des trois (03) groupes traités avec le n-hexane comparés au groupe contrôle et au groupe contrôle positif. (A) Groupe contrôle. (A*) Groupe contrôle positif -architecture et aspect histologique normal de glomérule, de capsules de Bowman et de tubules proximaux et distaux-. (B) Groupe traité par le n-hexane à la dose 300 mg/kg.

RÉSULTATS

(C) Groupe traité par le n-hexane à la dose 600 mg/kg. (D) Groupe traité par le n-hexane à la dose 1200 mg/kg. (◆) Exfoliation et dégénérescence de tubules rénaux proximaux et distaux. (→) Diminution de l'espace des bordures en brosses.

Coloration trichrome de Masson, grossissement $\times 400$. G: Glomérule; TP: Tubule Proximal; TD : Tubule Distal; CB: Capsule de Bowman; CS: Capillaires Sanguins; BB: Bordure en Brosse.

6. Effet du n-hexane sur la fonction pulmonaire

6.1. Effet du n-hexane sur le taux de MDA et de GSH dans les tissus pulmonaires

L'évaluation de l'effet du n-hexane sur la peroxydation lipidique dans le poumon a révélé une augmentation significative ($*P \leq 0,05$, $**P \leq 0,01$ et $***P \leq 0,001$) dans les trois (03) groupes traités à 300 mg/kg, 600 mg/kg et 1200 mg/kg respectivement, comparés au groupe contrôle et au groupe contrôle positif. Ainsi, le traitement par le n-hexane à 600 mg/kg et 1200 mg/kg a provoqué une diminution significative ($*P \leq 0,05$ et $**P \leq 0,01$) du taux de GSH pulmonaire par rapport aux groupes contrôle et au groupe contrôle positif (Figure 25, 26).

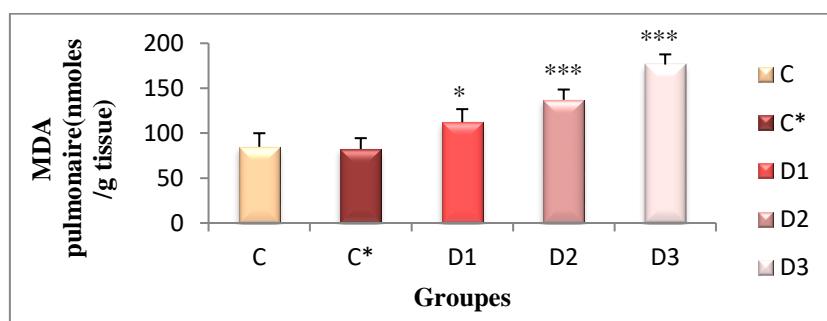


Figure 25: Taux de MDA dans les poumons chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif.

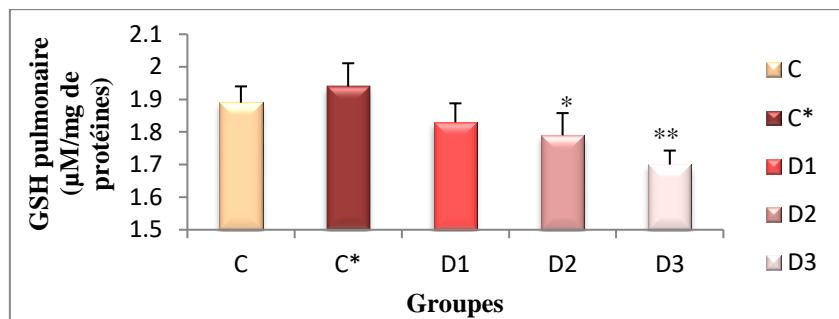


Figure 26: Taux de GSH dans les poumons chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif.

6.2. Effet du n-hexane sur l'histologie et l'histo chimie pulmonaire

6.2.1. Coloration hématoxyline-éosine

L'étude des altérations morphologiques des coupes histologiques des poumons des rats traités au n-hexane à coloration H-E a montré un effet hémorragique des bronchioles respiratoires avec œdème alvéolaire chez les rats exposés à la dose 300 mg/kg. Les résultats enregistrés à la dose 600 mg/kg sont similaires à celle observés à la dose 300 mg/kg, elles sont néanmoins plus massives en distribution et sévérité. L'examen des coupes histologiques des rats reçus la dose 1200 mg/kg a révélé des poumons hémorragiques abondant, comparé au groupe contrôle et contrôle positif. (Figure 27).

6.2.2. Coloration histo chimique trichrome de Masson

Pour ce qui concerne les coupes histologiques colorées au trichrome de Masson les interprétations microscopiques ont montré l'absence des fibres de collagènes et la présence des lésions concordantes avec une bronchopneumonie chez les trois (03) groupes des rats traités au n-hexane aux doses 300 mg/kg, 600 mg/kg et 1200 mg/kg. Elles sont minimales à sévères d'une dose à l'autre, plus la dose est élevée plus l'effet est important. Elles sont marquées par une congestion des bronches respiratoires et la présence des cellules inflammatoires, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif. (Figure 28).

RÉSULTATS

6.2.3. Coloration histochimique Movat pentachrom

Les altérations pulmonaires observées après une coloration Movat pentachrom chez les rats traités par le n-hexane à la dose 300 mg/kg ont été définies par l'expression des lésions compatibles avec une pneumonie interstitielle aigüe. Elles sont légères à modérées et multifocales en distribution. Elles sont caractérisées par des foyers plus ou moins coalescents d'alvéoles remplies d'érythrocytes, d'une faible quantité de fibrine et d'un peu de sérum. Très peu de cellules inflammatoires sont présentes, elles se limitent à quelques macrophages et neutrophiles intra-alvéolaires. Ce qui concerne le groupe traité par le n-hexane à la dose 600 mg/kg les observations ont montré des lésions de broncho-pneumonie et fibrino-nécrotique multifocale modérée. Dans les zones affectées les bronchioles présentent de la nécrose de l'épithélium bronchiolaire et leur lumière contient de la fibrine et des débris nécrotiques. Une légère hyperplasie du tissu lymphoïde péri-bronchiolaire est aussi notée. Les alvéoles sont affectées et remplies d'un exsudat composé de sérum, fibrine, érythrocytes, quelques cellules nécrotiques, et un petit nombre de cellules inflammatoires diverses incluant les macrophages et les neutrophiles. Les dommages pulmonaires observés chez les rats exposés au n-hexane à la dose 1200 mg/kg, sont similaires à ceux énoncés pour le groupe traité à la dose 600 mg/kg. Ils sont cependant plus étendus en distribution et plus marqués en sévérité, un poumon fortement dilatée et remplie de débris cellulaire, fibrine, et d'érythrocytes, le tout correspondant à exsudat fibrino-nécrotique et hémorragique abondant. Les sections des lobes pulmonaires présentent des lésions de bronchopneumonie diffuse et relativement sévères, caractérisées par un exsudat bronchiolo-alvéolaire contenant de nombreux macrophages et neutrophiles ainsi qu'une quantité non-négligeable de sérum et de mucus. Une légère hyperplasie multifocale des pneumocytes de type II est aussi observée. Une congestion diffuse légère à modérée est aussi observée. Les lésions sont compatibles avec une bronchopneumonie nécrotique sub-aigüe à chronique (Figure 29).

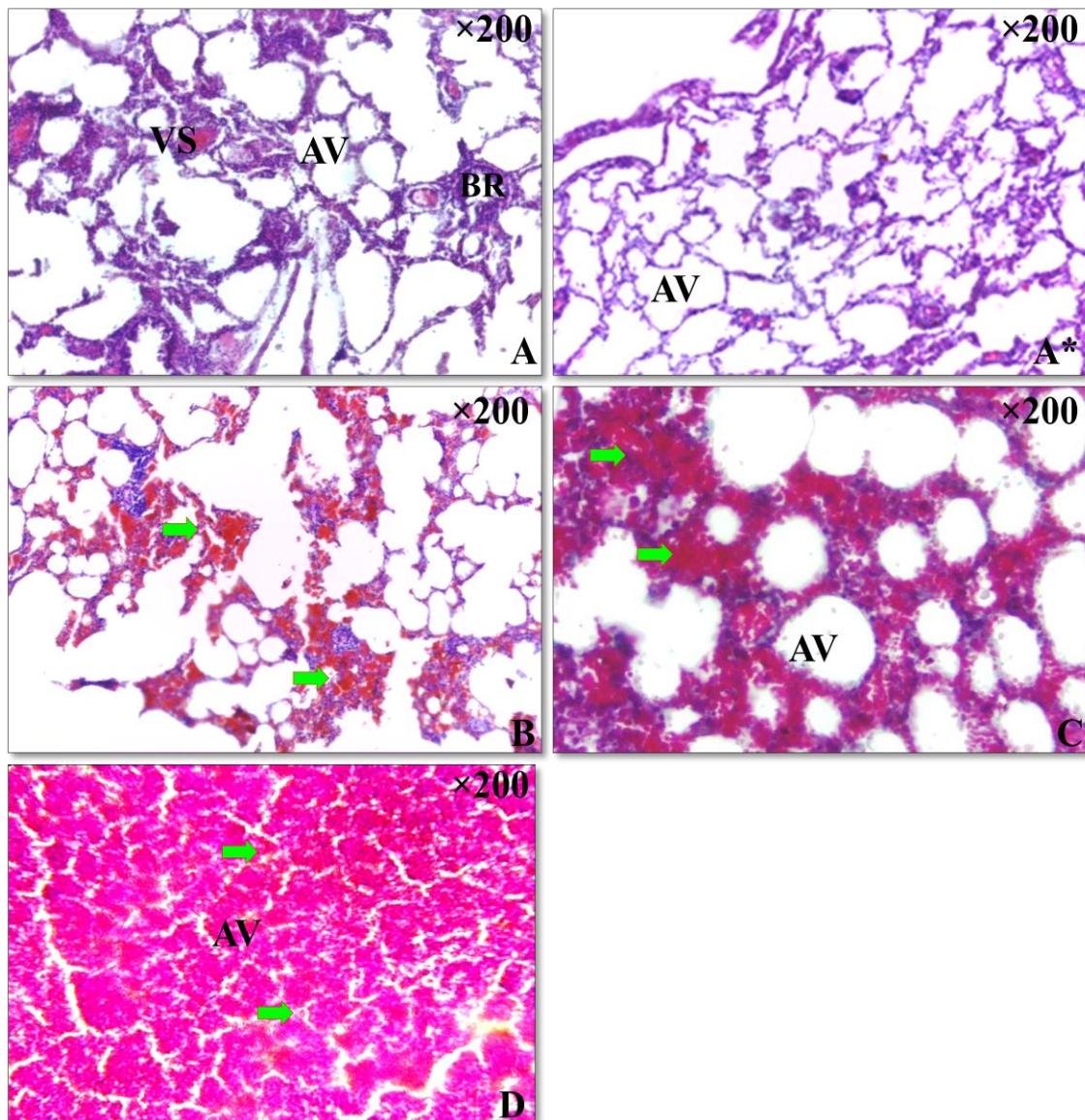


Figure 27: Photographie des coupes histologiques des poumons à coloration H-E des rats Wistar mâles des trois (03) groupes traités avec le n-hexane comparés au groupe contrôle et au groupe contrôle positif. (A) Groupe contrôle. (A*) groupe contrôle positif - architecture et aspect histologique normal des alvéoles et des bronchioles -. (B) groupe traité par le n-hexane à la dose 300 mg/kg. (C) groupe traité par le n-hexane à la dose 600 mg/kg. (D) groupe traité par le n-hexane à la dose 1200 mg/kg. (→) Hémorragie des bronchioles respiratoires avec œdème alvéolaire.

Coloration H-E, grossissement $\times 200$. BR : Bronchiale Respiratoire; AV : Alvéole; VS : Vaisseau Sanguin.

RÉSULTATS

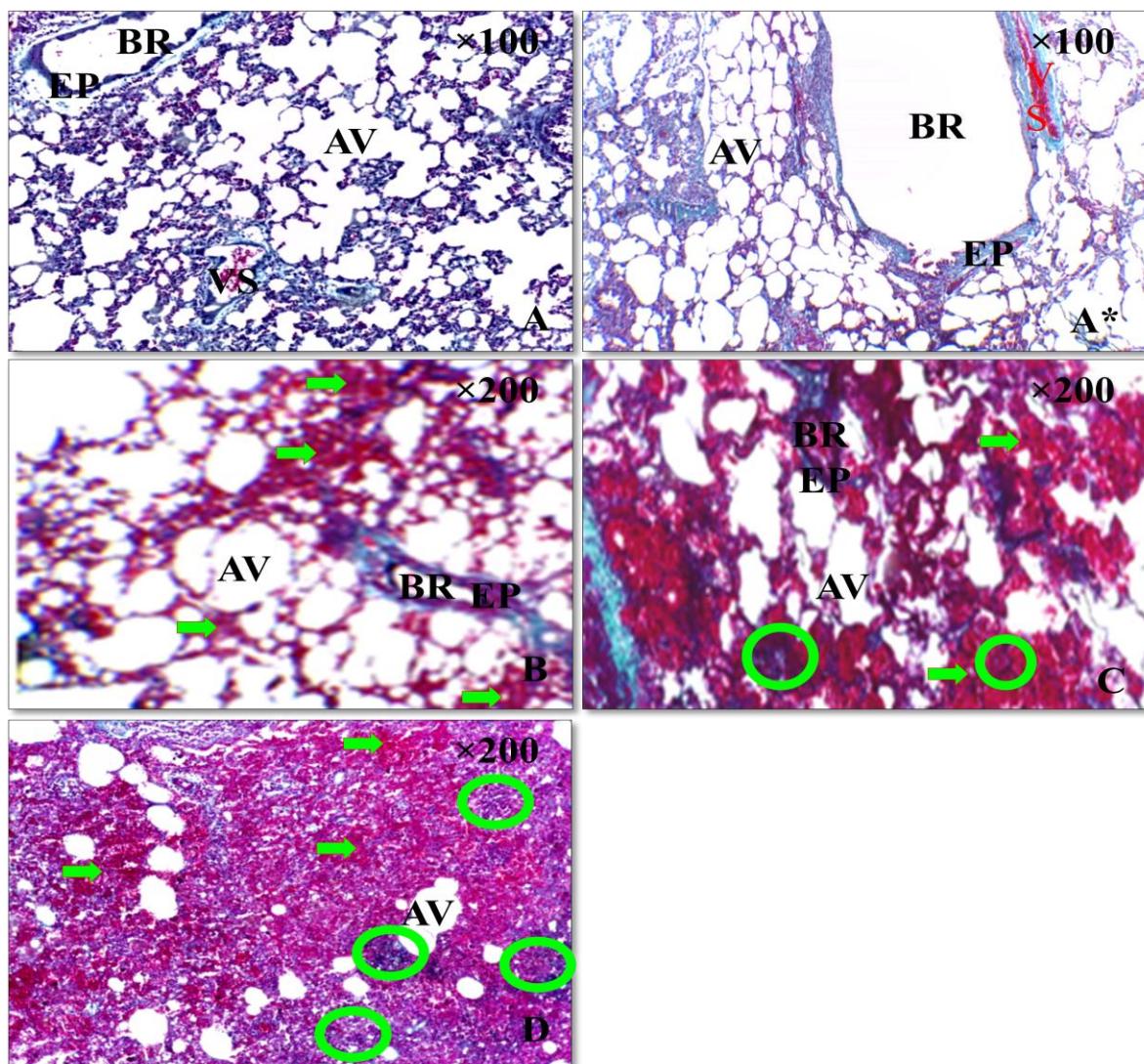


Figure 28: Photographie des coupes histologiques des poumons à coloration trichrome de Masson des rats Wistar mâles des trois (03) groupes traités avec le n-hexane comparés au groupe contrôle et au groupe contrôle positif. (A) Groupe contrôle. (A*) Groupe contrôle positif -architecture et aspect histologique normal des alvéoles et des bronchioles -. (B) Groupe traité par le n-hexane à la dose 300 mg/kg. (C) Groupe traité par le n-hexane à la dose 600 mg/kg. (D) Groupe traité par le n-hexane à la dose 1200 mg/kg. (→) Congestion des bronches respiratoires. (○) Cellules inflammatoires.

Coloration trichrome de Masson, grossissement $\times 200$. BR: Bronchiale Respiratoire; EP: Epithélium bronchiolaire AV: Alvéole; VS: Vaisseau Sanguin.

RÉSULTATS

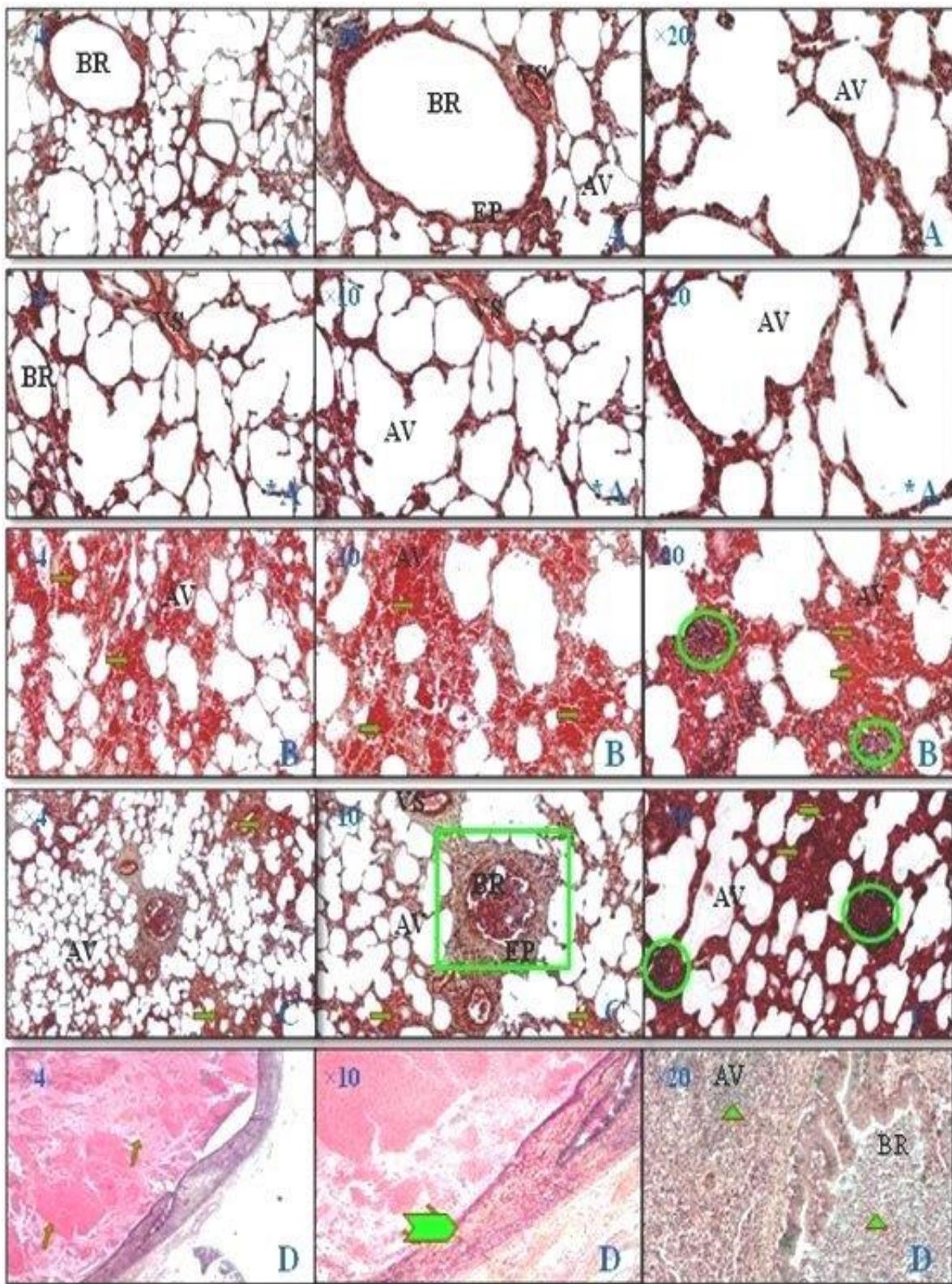


Figure 29: Photographie des coupes histologiques des poumons des rats Wistar mâles des trois (03) groupes traités avec le n-hexane comparés au groupe contrôle et au groupe contrôle positif. (A) Groupe contrôle. (A*) Groupe contrôle positif-architecture et aspect histologique normal des alvéoles et des bronchioles -. (B) Groupe traité par le n-hexane à la

RÉSULTATS

dose 300 mg/kg. (C) Groupe traité par le n-hexane à la dose 600 mg/kg. (D) Groupe traité par le n-hexane à la dose 1200 mg/kg. (➡) Présence des foyers d'alvéoles remplies d'érythrocytes et des fibrines. (○) Cellules inflammatoires incluant des macrophages et des neutrophiles. (□) Nécrose de l'épithélium bronchiolaire et leur lumière contient des débris nécrotiques et la fibrine avec une hyperplasie du tissu lymphoïde péri-bronchiolaire. (➤) Épithélium bronchique érodé. (▲) Lésions bronchiolo-alvéolaires contenant de nombreux macrophages et neutrophiles.

Coloration Movat pentachrom, grossissement $\times 4$, $\times 10$ et $\times 20$. BR: Bronchiole; AV: Alvéole; EP: Epithélium bronchiolaire; VS: Vaisseau Sanguin.

7. Effet du n-hexane sur la fertilité masculine

7.1. Effet du n-hexane sur quelques paramètres biochimiques de la reproduction mâles

7.1.1. Effet du n-hexane sur le taux de testostérone et d'hormone lutéinisante

Aucun changement significatif n'a été détecté au niveau du taux de testostérone et d'hormone lutéinisante (LH) chez tous les groupes exposés au n-hexane, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif (Figure 30, 31).

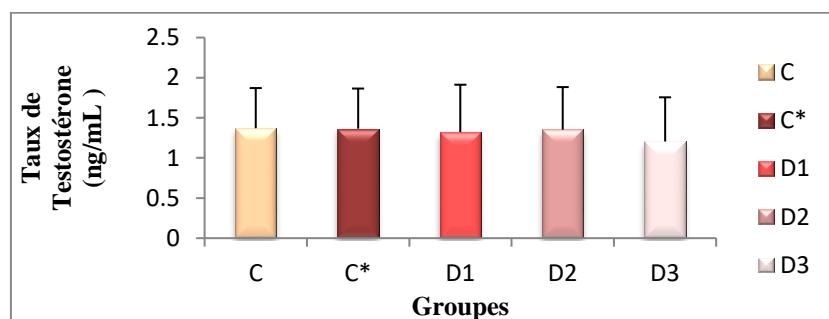


Figure 30 : Variation du taux de testostérone chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif.

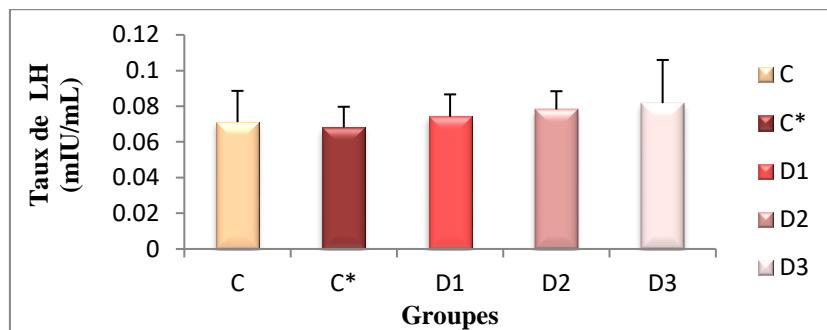


Figure 31 : Variation du taux d'hormone lutéinisante (LH) chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif.

7.1.2. Effet du n-hexane sur le taux de GSH dans les tissus testiculaires

Le taux de GSH testiculaire a enregistré une diminution significative (* $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$ et *** $P \leq 0,001$) dans les trois (03) groupes traités au n-hexane à 300 mg/kg, 600 mg/kg et 1200 mg/kg respectivement, comparés au groupe contrôle et au groupe contrôle positif (Figure 32).

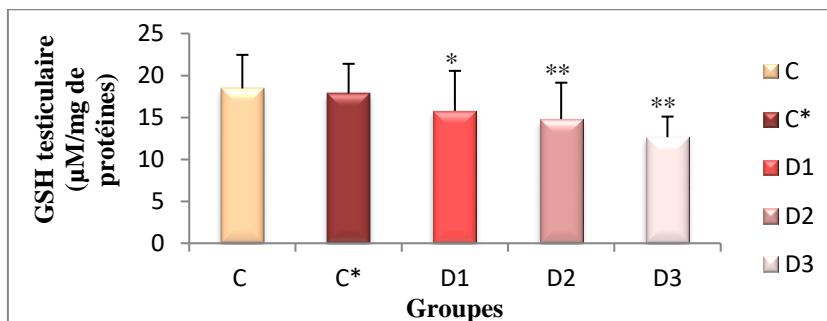


Figure 32 : Taux de GSH dans les testicules chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif.

7.2. Effet du n-hexane sur le spermogramme

7.2.1. Effet du n-hexane sur le nombre et la concentration des spermatozoïdes

Les rats exposés au n-hexane ont démonté une diminution significative ($**P \leq 0,01$ et $***P \leq 0,001$) respectivement, dans le nombre des spermatozoïdes chez tous les groupes traités comparativement au groupe contrôle et au groupe contrôle positif (Figure 33).

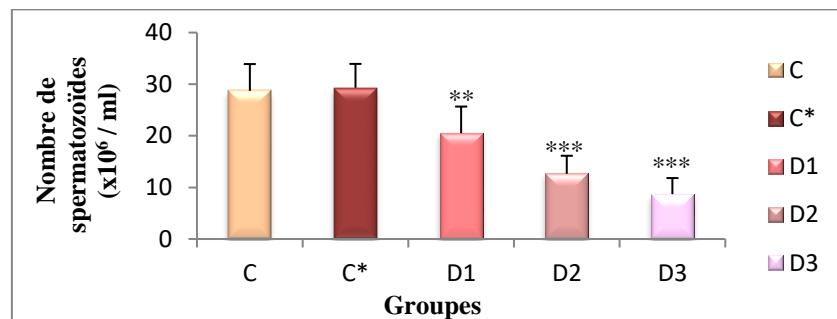


Figure 33: Variation du nombre de spermatozoïdes chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif.

7.2.2. Effet du n-hexane sur la mobilité des spermatozoïdes

Notre étude a révélé une diminution statistiquement significative ($**P \leq 0,01$ et $***P \leq 0,001$) respectivement, chez les trois (03) groupes des rats traités par le n-hexane, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif (Figure 34).

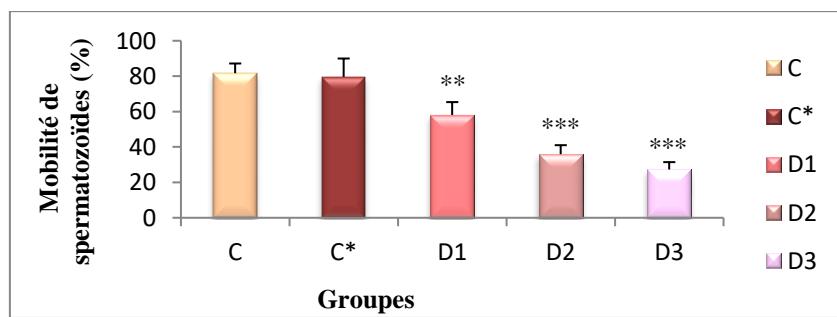


Figure 34 : Évaluation de la mobilité de spermatozoïdes chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif.

7.3. Effet du n-hexane sur l'histologie testiculaire (Coloration hématoxyline-éosine)

Les observations des coupes histologiques des testicules à coloration H-E ont montré que le n-hexane a un effet délétère sur les testicules. Les résultats observés chez les rats exposés au n-hexane aux trois (03) doses traités (300 mg/kg, 600 mg/kg et 1200 mg/kg) ont révélé un aspect vide des lumières des tubes séminifères, une diminution des spermatogonies dans les cellules de Sertoli et de la maturité des cellules germinales avec une diminution de l'espace de l'épithélium testiculaire, comparé au groupe contrôle et au groupe contrôle positif. (Figure 35)

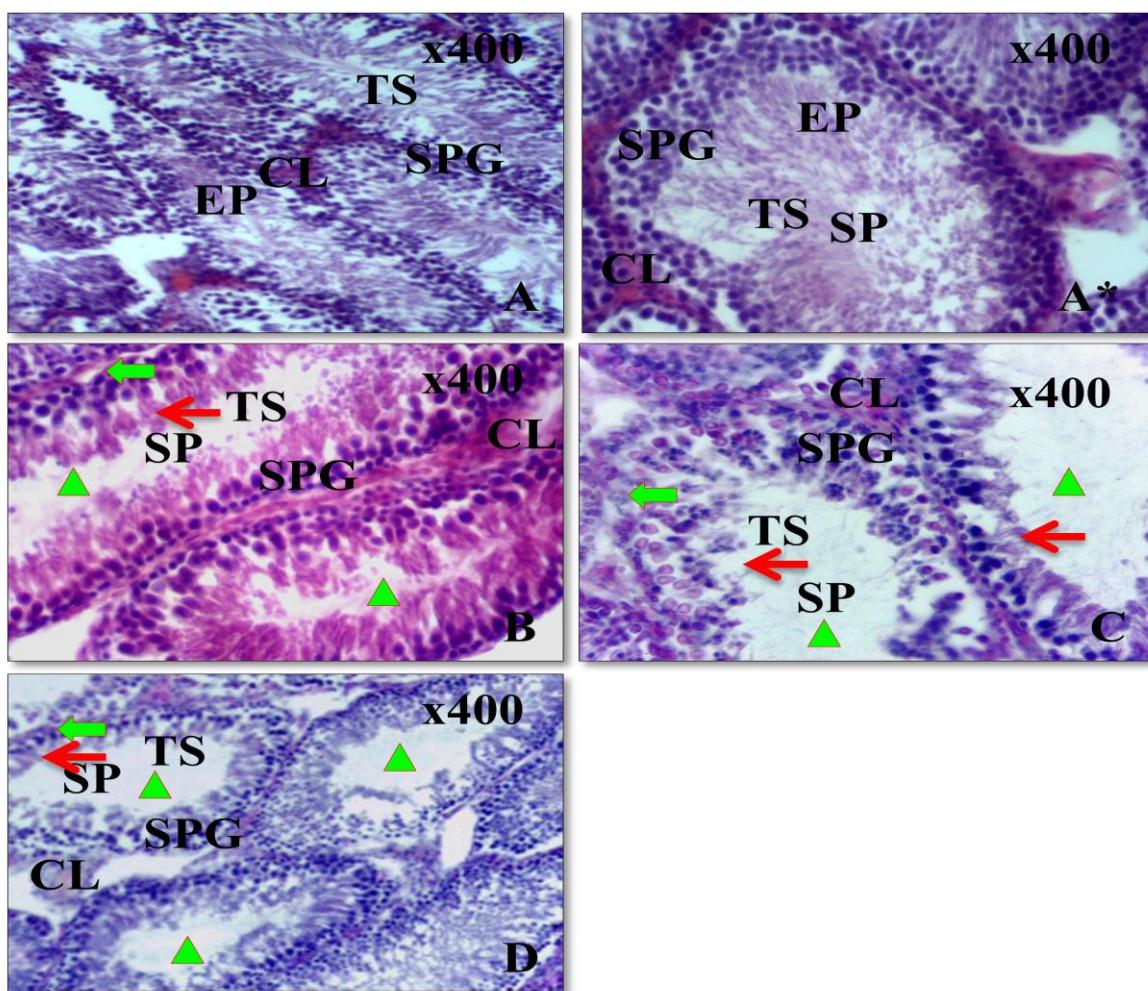


Figure 35: Photographie des coupes histologiques des testicules à coloration H-E des rats Wistar mâles des trois (03) groupes traités avec le n-hexane comparés au groupe contrôle et contrôle positif. (A) Groupe contrôle. (A*) Groupe contrôle positif -architecture et aspect histologique normal des testicules -. (B) Groupe traité par le n-hexane à la dose 300 mg/kg.

RÉSULTATS

(C) Groupe traité par le n-hexane à la dose 600 mg/kg. (D) Groupe traité par le n-hexane à la dose 1200 mg/kg. (▲) Lumières des tubes séminifères vides. (→) Diminution des spermatogonies et de la maturité des cellules germinales. (←) Diminution de l'espace de l'épithélium testiculaire

Coloration H-E, grossissement $\times 400$. TS: Tube Séminifère; CL: Cellule de Leydig; EP: Epithélium Testiculaire; SPG: Spermatogonies.

DISCUSSION

Discussion

Les produits toxiques peuvent atteindre l'organisme de plusieurs manières. Ils franchissent de nombreux systèmes du corps. Raisonnement, l'organisme essaie de se défendre contre ces substances dangereuses pour les abattre et diminuer leurs impacts nuisibles sur les organes cibles. Bien que ces organes soient susceptibles de résister aux toxines, leurs fonctionnements peuvent être attaquées par ces toxines et causés des dommages cellulaires.

Dans la présente étude des effets physiologiques, hématologiques, biochimiques, histologiques et la reproduction, ont été rapportés après une exposition sub-chronique des rats mâles Wistar au n-hexane à de faibles doses pendant huit (8) semaines par voie orale.

Lors de l'évaluation du poids corporel et de la consommation d'aliment, les groupes exposés aux deux (02) fortes doses du n-hexane ont montré une diminution significative avec une augmentation du poids relatif du foie, des reins et des poumons. Aucun changement significatif n'était présent dans le poids relatif des testicules et de l'épididyme. Nos résultats se concordent avec les résultats obtenus par **Adedara et al. (2014)** et **Linder et al. (1992)** qui ont enregistré une diminution du poids corporel après une exposition au n-hexane dans l'eau potable et par gavage respectivement. La perte du poids corporel est considérée comme un symptôme clinique de toxicité (**Sai et al., 2013**). Cela est probablement dû au manque d'appétit provoqué par l'effet neurotoxique et par l'irritation buccale du n-hexane. Des neurones sympathiques qui innervent les organes internes et contrôlent leur activité, par exemple la motilité intestinale, la salivation, sont affectées par les neurotoxines (**Furlan et al., 2013**). Selon les études d'**Adedara et al. (2014), (2016)** la diminution du poids corporel induite après une exposition au métabolite du n-hexane, la 2,5-HD, pourrait être due aux troubles métaboliques (perturbation du métabolisme) et à une incapacité d'organe.

La réduction de la consommation de nourriture chez les rats exposés au n-hexane, peut être due à l'ingestion de ce dernier, où il provoque une irritation gastro-intestinale et une anorexie (**Bingham et al., 2001**). Le manque d'appétit peut affecter l'activité métabolique et par conséquent une perte de la masse corporelle se présente.

DISCUSSION

En outre, **Adenuga et al. (2014b)** et **Dunnick (1991)** ont révélé que l'exposition aux solvants hydrocarburés et au n-hexane induit une augmentation du poids relatif du foie, des reins et des poumons. L'augmentation du poids relatif représente une inflammation et un gonflement des organes (**Moore et Dalley, 1999; Amresh et al., 2008**), ce qui est l'indice d'une toxicité générale et organique. Aussi, l'augmentation du poids des organes peut être due à l'accumulation du n-hexane dans les organes. Le poids relatif des testicules et d'épididymes est un critère important de repotoxicité (**Moffit et al., 2007**). Dans notre travail on n'a pas enregistré un changement significatif du poids relatif des organes masculins et ça pourrait être dépendant de l'effet dose-réponse, de la période (Saison) et de la durée (Temps) du traitement.

Des rats mâles Sprague-Dawley ont été exposés à 2,5-HD à des doses de 250, 500 et 600 mg/kg/jour pendant quatre (04), cinq (05), sept (07) semaines, respectivement. Les résultats obtenus ont montré que le métabolite du n-hexane a entraîné une diminution du poids relatif des testicules chez la dose la plus forte de 2,5-HD (**Horimoto et al., 2000**).

Pour le profil sanguin des globules rouges, des hémoglobines, d'hématocrite, de volume globulaire moyen et des plaquettes. Il n'y avait pas de différence significative dans le taux des globules rouges, des hémoglobines, d'hématocrite et de volume globulaire moyen. Néanmoins, une légère élévation non significative des globules rouges, des hémoglobines et d'hématocrite était observée dans notre étude chez les rats exposés au n-hexane à la dose la plus forte (1200 mg/kg). **Goel et al. (2009)** ont rapporté dans leur étude une augmentation non significative des globules rouges et des hémoglobines. Selon ces chercheurs le n-hexane n'induit pas un effet toxique sur le processus hématopoïétique. La volatilité du n-hexane est relativement rapide, de ce fait, le n-hexane ne s'accumule pas en quantité suffisante dans la moelle osseuse. L'évaluation de l'effet hémato-toxique du benzène chez des travailleurs bulgares de la pétrochimie n'a montré aucun changement du nombre des globules rouges, des hémoglobines et d'hématocrite entre les travailleurs exposés et non exposés (**Pesatori, 2009**). Également, aucune modification significative du nombre des globules rouges, des hémoglobines et d'hématocrite n'a été observée dans l'étude de **Kim et al. (2012)**, qui ont exposé des rats Sprague-Dawley mâles et femelles au n-heptane par inhalation pendant treize (13) semaines.

DISCUSSION

Uzma et al. (2008) ont évalué l'exposition des travailleurs de stations d'essence aux solvants organiques. Les résultats obtenus ont révélé une augmentation significative du nombre des globules rouges et des hémoglobines. Pareillement, **Upreti et Shanker (1987)** ont observé une augmentation du nombre des globules rouges et des hémoglobines suite à une exposition des souris au métabolite du n-hexane, la 2,5-hexanedione (2,5-HD). Des observations similaires ont été rapportées après avoir exposé trente (30) souris NMRI albinos au toluène à des doses de 1700 mg/kg et 1000 mg/kg par injection pendant vingt cinq (25) jours (**Naeimi et al., 2017**).

L'effet du n-hexane sur le système hématopoïétique peut être indirect. Nous pensons que l'élévation du nombre des globules rouges et des hémoglobines est la conséquence de l'effet toxique du n-hexane sur les poumons. Dans notre étude un essoufflement a été remarqué chez les rats traités au n-hexane. L'essaie d'augmenter le rythme respiratoire chez ces rats traités prouve qu'il y a un manque d'oxygène circulant dans le sang et donc une hypoxie cellulaire se produise. Selon cette hypothèse l'anoxie stimule la production des globules rouges et des hémoglobines afin de capter plus d'oxygène et le distribuer aux tissus. Les globules rouges ont la capacité de détecter les manques cellulaires en oxygène *par des médiateurs vasodilatateurs* qui régulent le flux sanguin dans le cas d'une hypoxie (**Jensen, 2009**).

En revanche, d'autres études antécédentes ont rapporté dans leurs résultats une anémie chez les espèces exposées au n-hexane et à l'essence. **Egeli et al. (2000)** ont observé une baisse dans le nombre des globules rouges, des hémoglobines, d'hématocrite et de volume globulaire moyen chez des rats albinos suisses qui ont été exposés au n-hexane par voie intra-péritonéale à des doses de 0.125 ml/kg et 0.250 ml/kg pendant vingt quatre (24) semaines. Mêmement, une diminution du nombre des globules rouges et des hémoglobines a été observée chez des rats femelles exposées à la vapeur d'essence à une dose de 17,8 ppm et par voie orale à une dose de 2 mg/kg et 4 mg/kg (**Ubboh et al., 2010**). **Amarnath et al. (1991); Valentine et al. (1993)** ont constaté que la 2,5-hexanedione (2,5-HD) le métabolite du n-hexane, altère les protéines de la membrane axonale des globules rouges.

DISCUSSION

À propos des plaquettes une diminution significative a été rapportée dans notre étude chez les groupes exposés aux deux (02) fortes doses 600 mg/kg et 1200 mg/kg. Les plaquettes sont des cellules sanguines appelées aussi des thrombocytes, elles ont un rôle clé dans la coagulation du sang. Une exposition des travailleurs au benzène, toluène, xylène, éthyle-benzène et au n-hexane dans les usines pétrochimiques a mené à une baisse dans le nombre des plaquettes (**Neghab et al., 2014**). Autre étude a été menée sur des travailleurs de stations d'essence a dévoilé une diminution du nombre des plaquettes (**Uzma et al., 2008**). Aussi, **Hooshmand et al. (2014)** ont montré que l'exposition des rats mâles Wistar à la vapeur et à l'odeur de peinture a provoqué une baisse du nombre des plaquettes. Selon **Zhang et al. (2010)** la diminution du nombre des plaquettes peut être due à l'altération des cellules myéloïdes progénitrices par les solvants.

Contrairement, le nombre des plaquettes était significativement augmenté chez des lapins mâles *Oryctolagus Cuniculus* à des concentrations de 20%, 25% et 30% d'éthanol chaque jour pendant six (6) semaines par voie orale (**Saihia, 2014**).

Un système de protection complexe se déclenche face aux substances exotiques qui attaquent et menacent notre corps.

Les globules blancs, les lymphocytes, les granulocytes et les éosinophiles sont des cellules de défenses dans l'organisme contre les corps étrangers. L'augmentation du taux de globules blancs chez les groupes traités constatés dans notre travail est en accord avec les résultats d'**Akpan et al. (2014)**. Ces derniers ont déclaré que l'exposition des souris à l'essence pendant soixante (60) jours a provoqué une hyperleucocytose. L'élévation en globules blancs est expliquée par le déclenchement du système immunitaire face aux xénobiotiques (**Akpan et al., 2014**). Cela peut être dû à certains syndromes inflammatoires.

Les globules blancs jouent un rôle important dans l'activation de la réponse inflammatoire (**Kamal et Malik, 2012; Wirth et al., 2017**). **Uboh et al. (2010)** ont étudié les effets toxiques de l'exposition des vapeurs d'essence chez des rats femelles Wistar 6 h/j, 6 j/semaine, pendant vingt (20) semaines à une dose de 17,8 ppm et par voie orale à une dose de 2 mg/kg et 4 mg/kg. Une augmentation significative du taux des globules blancs a été signalée. L'hyperleucocytose observée peut être le résultat d'une réponse

DISCUSSION

immunologique aux produits chimiques étrangers introduits dans l'organisme. L'augmentation du nombre des lymphocytes, granulocytes et des éosinophiles est également rapportée dans notre travail. Ces résultats sont cohérents avec les donnés de **Uboh et al. (2010)**, sur le nombre des lymphocytes suite à une exposition des rats mâles au diluant à la nitrocellulose par voie orale. L'augmentation décelée des lymphocytes pourrait être due à une lymphopoïèse, les agents chimiques stimulent les tissus myéloïde lymphatique a libéré excessivement les lymphocytes (**Das et Mukherjee, 2003**). On peut également supposer que l'augmentation des granulocytes et des éosinophiles est peut être associée à l'introduction du n-hexane dans l'organisme. Les granulocytes sont des phagocytes qui captent et avalent les agents étrangers. Les éosinophiles jouent un rôle important dans l'inflammation, elles libèrent des médiateurs cytotoxiques pour attaquer contre les xénobiotiques (**Decot et Capron, 2006**). L'augmentation des éosinophiles peut être le résultat d'une pneumopathie (**Dacosta-Noble et Traclet, 2016**) provoqué par le n-hexane.

Absence des donnés de l'effet précis du n-hexane sur le nombre des cellules immunitaires, les granulocytes et les éosinophiles.

En contre partie, il n'y avait aucun changement significatif touchant les lymphocytes et les éosinophiles dans les résultats obtenus par **Ashmawy et al. (2007)** qui ont exposé par voie sous-cutanée des rats albinos à 5 mg/kg du n-hexane dans l'huile d'olive 6 j/7 j pendant huit (8) semaines. **Fayed et al. (2018)** ont observé une diminution dans le nombre des globules blancs et des lymphocytes chez trente (30) travailleurs des stations service d'automobiles. Aussi, **Goel et al. (2009)** ont enregistré une diminution du nombre des globules blancs suite à une exposition des rats au métabolite du n-hexane.

En premier lieu, les substances toxiques passent par un processus de détoxicification dans le foie appelé la métabolisation qui réduit l'action toxicologique par un système enzymatique. Le foie est considéré comme un filtre dans l'organisme, qui à la capacité à métaboliser les toxines pour réduire leur effet et leur toxicité.

Les analyses des paramètres biochimiques hépatiques ont montré des changements importants chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (08) semaines de la période

DISCUSSION

expérimentale. Le n-hexane a provoqué une augmentation dans la valeur des enzymes hépatiques, l'*aspartate aminotransférase* (ASAT, GOT) chez les groupes des rats exposés aux deux (02) fortes doses du n-hexane, l'*alanine aminotransférase* (ALAT, GPT) et la phosphatase alcaline (PAL) chez tous les groupes des rats exposés au n-hexane. Ainsi, une augmentation des protéines totales a été enregistrée chez tous les groupes des rats exposés au n-hexane. Toutefois, le n-hexane a induit une baisse du taux de glucose, de cholestérol et des triglycérides. **Adedara et al. (2014)** ont révélé une augmentation significative dans le taux des bio-marqueurs hépatiques (ASAT, ALAT, PAL) après une exposition de vingt un (21) jours au métabolite du n-hexane, la 2,5-hexanedione (2,5-HD) à des concentrations de 0,025, 0,5 et 1% dans l'eau potable. Dans une étude qui vise à évaluer le taux d'essence apte de causer une toxicité, des rats mâles ont reçu 0,5 ml/kg d'essence. Les résultats ont enregistré une élévation significative de l'ALAT, l'ASAT et de la PAL (**Momoh et Oshin, 2015**).

Dans le foie les transaminases, l'ALAT et l'ASAT jouent un rôle nécessaire dans le métabolisme hépatique (**Baba Ahmed et al., 2010**). L'alanine aminotransférase (ALAT) est présente essentiellement dans le foie. Alors que, l'aspartate aminotransférase (ASAT) et la phosphatase alcaline (PAL) sont des enzymes présentes dans plusieurs organes.

L'augmentation du taux de ces enzymes dévoile des lésions tissulaires et cellulaires et plus particulièrement l'élévation de l'enzyme ALAT signale la présence des nécroses hépatiques, les cellules hépatiques altérées libèrent ces enzymes pour avertir un dysfonctionnement du foie (**Ennulat et al., 2010; Contreras-Zentella et Hernández-Muñoz, 2016**).

Également, une élévation des protéines totales a été signalée chez les rats exposés au n-hexane. Nos résultats sont en accord avec les résultats obtenus par **Ogunneye et al. (2014)** qui ont révélé une augmentation du taux des protéines totales chez trente (30) travailleurs exposés à des émissions de pétrole et dix (10) personnes comme témoins, une enquête qui a été réalisée au Nigéria. Le dosage des protéines totales a enregistré une augmentation chez les travailleurs exposés au vapeur de pétrole, par rapport aux dix (10) personnes témoins.

DISCUSSION

Les protéines totales sont constituées de deux grandes classes de protéinés, 60 % d'albumine qui est synthétisées par le foie et 40 % de globulines. Les protéines sont présentes dans presque toutes les cellules animales. L'augmentation du taux de protéines totales chez les groupes traités par le n-hexane, comparé au groupe témoin, suggère que le n-hexane a provoqué des lésions cellulaires. Il est important de noter que toute atteinte de produits chimiques peut libérer des molécules biochimiques pour des raisons défensives. Les protéines contiennent des groupements thiols (-CH₂-SH) qui ont un rôle de défense dans l'organisme (**Haleng et al., 2007**). Selon **Sahu et al. (1982)**, l'augmentation du taux de protéines totales chez les groupes traités par le n-hexane, comparé au groupe témoin, suggère que le n-hexane a provoqué des lésions cellulaires, qui jouent un rôle dans la production et le stockage des substances de maintien.

À propos de glucose, l'administration du n-hexane aux rats a induit une réduction du taux de glucose. Les travaux réalisés par **Khedun (1988)** ont révélé une diminution de glucose chez les rats exposés au n-hexane. Aussi **Adenuga et al. (2014)** ont montré que l'exposition des rats Spragu-Dawley (mâles et femelles) aux solvants hydrocarbonés aliphatiques par voie orale à raison de 0, 500, 2500 et 5000 mg kg/jour pendant 90 jours a provoqué une baisse du taux de glucose. Les causes de la réduction du taux de glucose peuvent être dues au dysfonctionnement des processus d'absorption intestinale des nutriments et de la consommation alimentaire (**Smith et al., 2002**) ou de l'utilisation de glucose lors des conditions stressantes (**Pathan et al., 2009**). Également, une des caractéristiques toxicologiques des solvants hydrocarbures aliphatiques est l'inhibition des enzymes engagées dans le phénomène de la gluconéogenèse (**Ukolova et al., 2017**).

Tandis que, aucun changement significatif du taux de glucose entre les personnes témoins et les fabricants de chaussures, qui ont été exposés aux plusieurs solvants organiques (le benzène, le toluène, le xylène et le n-hexane) (**Khan et al., 2013**).

Aussi, une diminution du taux de cholestérol était signalée dans notre travail chez les rats exposés aux deux (02) doses les plus fortes du n-hexane. Le cholestérol total se synthétise surtout dans le foie et les intestins (**Pearson et al., 2004**). Il est un constituant des membranes cellulaires des mammifères et il est un constituant indispensable dans la

DISCUSSION

fabrication des hormones stéroïdiennes, des acides biliaires et des plusieurs vitamines liposolubles (**Leah, 2009**).

Nos résultats sont en accord avec les observations obtenues par **Goel et al. (1982)** qui ont mentionné une diminution du taux sérique de cholestérol chez des ratten après une exposition au n-hexane et n-heptane par voie intra-péritonéale pendant quarante cinq (45) jours pour une quantité de 1ml/kg. Ces chercheurs ont expliqué cette diminution de cholestérol par la présence d'une anomalie dans le fonctionnement des activités enzymatiques spécifiques, provoqué par le n-hexane et le n-heptane. Une autre étude faite sur des lapins *Oryctolagus cuniculus* a enregistré une baisse de cholestérol sous l'effet de solvant, l'éthylène glycol monométhyl éther (EGME) par voie orale cinq (05) jours/semaine pendant quatre (04) semaines (**Djabali, 2011**). Il a été présumé que la réduction du taux de cholestérol sérique peut être expliquée par un dysfonctionnement dans le métabolisme et la production de l'enzyme lipases (**Rihani, 2014**).

La réduction du niveau de cholestérol selon **Peretti (2012)** est due à une malabsorption intestinale des lipides, illustrée par une diminution de la surface d'absorption, par une altération de l'épithélium intestinale dans le cas des inflammations intestinales. D'ailleurs, il a expliqué aussi que la malabsorption de cholestérol peut être d'une origine génétique. L'absorption intestinale est sous le contrôle des chylomicrons, la synthèse et le fonctionnement de ces dernières demandes la présence de l'apolipoprotéine B de type Apo B-48 qui est une partie intégrante de la structure des chylomicrons. Ils ont les deux un rôle dans l'absorption et le transport de cholestérol La mutation du gène ApoB provoque une malabsorption de cholestérol.

Dans un magazine de santé le docteur **Amselem (2013)** a publié un article explicatif sur les causes menant à une diminution du niveau de cholestérol, hypcholestérolémie. Selon ce médecin la baisse sérique en cholestérol peut être due à des troubles intestinaux et à des insuffisances hépatiques.

Cependant, nos résultats ne concordent pas les observations révélées dans l'étude d'**Adedara et al. (2014)** qui ont noté une augmentation du taux de cholestérol suite à l'exposition des rats mâles au métabolite du n-hexane, la 2,5-hexanedione (2,5-HD). Un

DISCUSSION

autre travail a été réalisé pour évaluer quelques paramètres biochimiques et hématologiques après une exposition des travailleurs aux solvants organiques tels que le benzène, le toluène, le xylène et le n-hexane lors de la fabrication de chaussures comparé au groupe contrôle a signalé une augmentation des niveaux sanguins de cholestérol (**Khan et al., 2013**).

De plus, une réduction significative des niveaux sériques des triglycérides a été remarquée chez les deux lots de rats exposés aux deux (02) fortes doses du n-hexane. Rare études ont été portées sur l'évaluation du taux des triglycérides et aucune étude n'a enregistré une diminution du taux des triglycérides après une exposition au n-hexane (**Layeghkhavidaki, 2014**). Bien que, le glucose soit la première source d'énergie, de même les triglycérides sont considérés comme une réserve d'énergie. Ces derniers proviennent d'aliments et du foie (**Dzoyem et al., 2014**). La diminution du taux des triglycérides peut être due à son utilisation comme source énergétique (**Pigneret et al., 2016**).

En revanche, une augmentation sérieuse en triglycérides a été observée chez des rats Wistar, qui ont été exposés au n-hexane par voie orale à des doses de 0,2 à 5 g/kg pendant treize (13) semaines (**Sheftel, 2000**).

L'analyse histologique du foie a prouvé les endommages hépatiques induites par le n-hexane. Trois (03) types de colorations (hématoxyline-éosine, trichrome de Masson et periodic acid Schiff) ont été effectuées dans notre étude afin de bien diagnostiquer l'effet toxique du n-hexane sur les tissus hépatiques.

Nos résultats montraient que le n-hexane affectait le tissu hépatique. Des foyers de nécroses cellulaires avec une congestion et une inflammation polynucléaire ont été observés dans le foie des rats traités par le n-hexane après une coloration hématoxyline-éosine. De même, plusieurs foyers nécrotico-inflammatoires des hépatocytes ont été notés dans le foie chez tous les groupes des rats exposés au n-hexane, avec dilatation et la présence des fibres de collagènes autour de la veine centro-lobulaire dans le foie des rats exposés au n-hexane à la dose 1200 mg/kg après une coloration trichrome de Masson.

DISCUSSION

Les altérations tissulaires observées confirmant les observations biochimiques indiquées dans notre étude. Les lésions hépatiques peuvent être dues à l'accumulation du n-hexane ou son métabolite, la 2,5-hexanedione (2,5-HD) dans le foie. Nos résultats sont en conformité avec les recherches faite par **Ashmawy et al. (2007)** qui ont indiqué que le n-hexane a induit des dommages hépatiques marqués par de nécroses hépatocellulaires focales. L'exposition des rats mâles Sprague-Dawley par voie orale au n-hexane à une dose de 15 mmol/kg et à une dose de 10 ml/kg de 2,5-hexanedione (2,5-HD) a causé une lésion centrolobulaire, gonflement cellulaire, l'apparition des noyaux pycnotiques et une dégénérescence des hépatocytes (**Hewitt et al., 1980**). Aussi, **Adedara et al. (2014)** ont mentionné que la 2,5-hexanedione (2,5-HD) métabolite du n-hexane provoquait une inflammation avec une congestion hépatique. Les endommages observés dans le foie des rats traités, suggèrent que le n-hexane affecte la structure et la fonction du foie.

Les lésions hépatiques signalées peuvent être dues au stress oxydatif induit par le n-hexane. Selon **Ratziu et al. (2010)** et **Marra et al. (2008)** le stress oxydatif altère le tissu hépatique. L'intoxication par le n-hexane pourrait interférer avec les protéines et les enzymes hépatiques en déclenchant un système de défense anti-oxydant qui conduit à une réponse inflammatoire (**Johar et al., 2004**). D'autres résultats rapportés sur l'effet d'essence (**Momoh et al., 2015**) et sur l'effet de solvant DBP (**Rihani, 2014**) ont montré la présence des atteintes hépatique illustrées par une inflammation cellulaire et de nécroses hépatocellulaires respectivement.

En outre, la formation des fibres de collagènes observés sur les coupes histochimiques des rats exposés au n-hexane à la forte dose (1200 mg/kg) peut être due à l'inflammation et les lésions induites par le n-hexane. Ces réactions entraînent un apport sanguin accru à la partie affectée, ce qui renforce les effets bénéfiques des cellules du système immunitaire. Les fibres de collagènes se constituent lors d'une lésion tissulaire où elles interviennent pour régénérer le tissu endommagé (**Stramer et al., 2007**). Les altérations tissulaires graves peuvent être accompagnées d'une cicatrisation des tissus altérés. Ces fibres jouent un rôle essentiel dans la guérison des tissus blessés, elles les renforcent (**Klaas et al., 2016**).

DISCUSSION

Pour mettre en évidence le stockage de glycogène hépatique, une coloration PAS a été réalisée dans notre étude. L'observation histochimique a montré la diminution de la teneur en glycogène avec une inflammation nécrotique et une dégénération cellulaire chez les rats exposés aux n-hexane aux trois (03) doses traités.

D'après **Cullen (2010)** le manque en glycogène suggère une anorexie. L'abaissement en glycogène pourrait être dû à la malabsorption du glucose au niveau des intestins ou à l'altération des enzymes impliquées dans le processus de glycogénèse / glycolyse. La coloration négative des hépatocytes des zones péri-portales pourrait indiquer que la glycogénèse était affectée (**Jarrar et Taib, 2012**).

Aucune étude n'a été décrite sur l'évaluation des effets du n-hexane sur le plan histochimique des organes.

Après le rôle du foie dans la détoxicification des toxines on a besoin de faire sortir ces dernières de l'organisme, ici viennent les reins, ils interviennent pour filtrer le sang et éliminer ses toxines dans les urines.

L'effet toxique du n-hexane sur les reins est diagnostiqué par le dosage des paramètres biochimiques de la fonction rénale, la créatinine et l'acide urique. Une augmentation de ces marqueurs a été indiquée dans notre étude chez les rats exposés au n-hexane pendant huit (8) semaines. Des études similaires ont été publiées par (**Adedara et al., 2014; Ahmadizadeh et al., 2014; Momoh et al., 2015; Wang et al., 2015**). Les résultats obtenus ont révélé que l'exposition au métabolite du n-hexane, la 2,5-hexanedione, toluène, pétrole et aux alcanes a entraîné une altération de la fonction rénale illustrée par l'élévation des niveaux de ses marqueurs sérique (urée, créatinine).

Les reins peuvent être attaqués si des doses suffisantes de substances toxiques sont administrées, ce qui peut affecter leur activité d'excrétion et rendre l'organisme incapable de se débarrasser de ces produits toxiques et leurs métabolites (**Winder et Stacey, 2004**). L'augmentation sérique en créatinine et en acide urique observé dans notre étude chez les rats des groupes exposés au n-hexane suggère que ce dernier est responsable d'un dysfonctionnement rénal et d'une néphrotoxicité. Cette néphrotoxicité est peut être due à la

DISCUSSION

diminution de l'activité rénale pour le débit de filtration glomérulaire illustré par un taux sérique élevé de la créatinine, l'urée et l'acide urique chez les rats traités avec le n-hexane. L'élévation de l'urée et de l'acide urique peut être due à une baisse de la réabsorption rénale au niveau de l'épithélium (**Adedara et al., 2012 ; Khan et al., 2013**). Le métabolite du n-hexane, la 2,5-hexanedione interagit avec les membranes cellulaires en augmentant la peroxydation lipidique ce qui conduit à la modification et la réduction de la fonction rénale (**Adedara et al., 2014**).

L'évaluation histologique et histochimique des reins dans notre étude a signalé la présence de lésions tissulaires rénales après l'exposition au n-hexane comparé aux groupes contrôles. Les endommages tissulaires ont été manifestés par exfoliation et dégénérescence des tubules rénaux proximaux et distaux; diminution de l'espace des bordures en brosses et rétraction des floculus glomérulaires. Une dose de 15 mmol/kg du n-hexane par voie orale a entraîné de lésions minimales des tubules rénaux chez des rats Sprague-Dawley mâles (**Hewitt et al., 1980**). **Adedara et al. (2014)** ont montré que l'exposition au métabolite du n-hexane, la 2,5-hexanedione induit une lésion des tubules proximaux avec un léger saignement. Les modifications et les atteintes tissulaires rénales, confirmant donc les observations biochimiques obtenues dans notre travail. Les dommages histologiques observés peuvent être dus à l'absorption et au stockage du n-hexane dans les tubules rénaux qui a été filtré par les glomérules (**Adewole et al., 2007; Carrillo et al., 2018**).

Un système de défense antioxydant est établi pour combattre l'effet préjudiciable du n-hexane.

L'administration du n-hexane a induit une augmentation de la peroxydation lipidique surveillée par un produit final nommé, malondialdéhyde « MDA » dans les poumons, et une diminution du glutathion (GSH) dans les poumons, les reins, le foie et les testicules.

Le stress oxydatif est la conséquence des radicaux libres qui attaquent les cellules. Nos résultats sont en corrélation avec ceux d'**Ezzat et al. (2011)**, qui ont étudié l'effet toxique de l'essence sur le système de défense antioxydant respiratoire, suite à une exposition aiguë et chronique dont ils ont démontré une augmentation de la peroxydation lipidique avec une diminution de glutathion. Également, **Adedara et al. (2014), (2016)** ont révélé une

DISCUSSION

réduction de glutathion dans le foie, les reins et les testicules après une exposition de vingt un (21) jours des rats mâles au métabolite du n-hexane, la 2,5-HD. Aussi, **Kamel et Shehata (2008)** ont enregistré une diminution de glutathion (GSH) dans le foie, les reins et les testicules chez des rats exposés au toluène pendant une période de 15, 30 et 45 jours. La réduction observée du taux de GSH peut suggérer une augmentation de la demande ou une sur-utilisation de GSH par les tissus, pour lutter contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (**Adedara et al., 2014**).

La peroxydation lipidique est l'origine d'une oxydation lipidique membranaire; la membrane cellulaire est riche en lipides et la peroxydation induit des anomalies dans leur fonctionnement (**Cillard J et Cillard P, 2006**). Cette élévation de MDA indique que le n-hexane a altéré les tissus en augmentant le stress oxydatif (**Teixeira-Clerc, 2015**), les radicaux libres créent des hydroperoxydes lipidiques sur les résidus d'acides gras polyinsaturés des phospholipides en formant finalement un malondialdéhyde qui est capable de provoquer des mutations génétiques et le cancer (**Scibior et al., 2006**).

D'autre part, le glutathion (GSH) joue un rôle de défense essentiel contre le stress oxydatif extra et intracellulaire qui provoque des lésions cellulaires. Dans le poumon, le GSH protège les cellules épithéliales et calme l'inflammation pulmonaire (**Rahman et al., 1999**). Dans certains maladies pulmonaires telles que les maladies inflammatoires, la fibrose kystique, le syndrome de détresse respiratoire aiguë et l'asthme, le taux de GSH se diminue (**Ezzat et al., 2011**).

Le stress oxydatif causé par le n-hexane stimule les antioxydants présents dans les cellules des organes pour détruire les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (**Farhat et al., 2018**). La raison de la diminution du GSH dans les tissus est due à la consommation de ce dernier pour se défendre contre les composants de l'essence (**Travis et al., 1990**).

L'essoufflement observé chez les rats traités au n-hexane entraîne une augmentation de la fréquence respiratoire afin d'augmenter l'apport en oxygène, ce qui prouve que le n-hexane a provoqué des difficultés respiratoires. La même chose a été remarquée par **Lungarella et al. (1984)** après l'exposition de lapins au n-hexane par inhalation pendant 24

DISCUSSION

semaines. Le n-hexane provoque une déconcentration de l'air alvéolaire et une diminution marquée du taux d'oxygène (**NIOSH, 1994**).

L'étude histologique et histo chimique des poumons a montré que le n-hexane a provoqué de dommages pulmonaires chez les rats exposés aux trois (03) doses (300 mg/kg, 600 mg/kg et 1200 mg/kg) respectivement. Les changements histologiques des poumons dans cette étude sont signifiés par une pneumopathie interstitielle: des lésions bronchopneumonie, fibrino-nécrotique, congestion, hémorragie, hyperplasie des pneumocytes de type II, des lésions alvéolaires, érosion de l'épithélium bronchique et une inflammation pulmonaire comprenant l'infiltration de macrophages et de neutrophiles. Des effets similaires ont été observés par **Parasuraman et al. (2014)** qui ont démontré que l'exposition des rats Sprague-Dawley à l'éther de pétrole (250 mg/kg.i.p et 500 mg/kg.i.p) par voie intra-péritonéale a induit une pneumonie interstitielle exprimée par une fibrose et une inflammation pulmonaire, incluant de neutrophiles et de lymphocytes.

Une étude histo-pathologique des poumons réalisée par **Ashmawy et al. (2007)** après une exposition sous-cutanée et sub-chronique des rats albinos au 5 mg/kg du n-hexane, a démontré que ce dernier a provoqué des dommages pulmonaires. Ces dommages sont manifestés par une congestion et hémorragie pulmonaire avec la présence des macrophages. D'autre part, l'exposition au n-hexane induit une dégradation de l'épithélium bronchiolaire, hyperplasie des pneumocytes de type II et de lésions alvéolaires (**Barni-Comparini et al., 1982**). L'altération morphologique des poumons est due à l'agissement directe du n-hexane sur le poumon qui est un de ces organes cibles (**Ashmawy et al., 2007**). Les modifications pulmonaires causées par le n-hexane sont les conséquences directes de la peroxydation lipidique des cellules pulmonaires et les réponses inflammatoires (**Sprong et al., 1998**). En outre, l'hyperplasie de pneumocytes II observée chez les rats traités par le n-hexane à la dose la plus forte (1200 kg/kg), est le résultat des dommages des pneumocytes I (**Bachofen et al., 1974; Kapanci et al., 1969**).

. En revanche, Aucune lésion histo-pathologique des poumons ou des testicules n'a été révélée ni chez les quinze (15) rats Fischer-344 mâles ni chez les quinze (15) rats femelles après une exposition au n-hexane pendant treize (13) semaines par inhalation (**Cavender et**

DISCUSSION

al., 1984). Aussi, **Schnoy et al. (1982)** et **Schmidt et al. (1984)** n'ont constaté aucun changement dans les poumons après une exposition au n-hexane.

Plusieurs travaux scientifiques précédents ont dévoilé qu'une élévation des polluants et des toxines environnementales pouvait affecter la spermatogénèse et les cellules testiculaires, en menant à une infertilité. Tandis que, il existe des données limitées sur l'effet reprotoxique du n-hexane et ses métabolites (**ATSDR, 2018**).

Dans notre étude, l'administration du n-hexane aux rats a provoqué un effet reprotoxique, dont il a été illustré par une diminution de la qualité et la quantité du sperme, une altération des tissus testiculaires (diminution des spermatogonies, de la maturité des cellules germinales et de l'espace de l'épithélium testiculaire) avec une perturbation non significative des hormones mâles.

Dans nos résultats on a enregistré une réduction dans le nombre et la mobilité des spermatozoïdes chez tous les groupes traités par le n-hexane. Ces effets sont en accord avec ceux obtenus par **Adedara et al. (2016)** qui ont démontré que l'exposition au métabolite du n-hexane, la 2,5-HD des rats mâles pendant vingt un (21) jours a induit une diminution de la mobilité et du nombre des spermatozoïdes. Les mêmes résultats avec la présence de syndrome des cellules de Sertoli (SCOS), la destruction des tubes séminifères avec la carence de cellules germinales ont été observées par **Kihale et al. (2005)** après une exposition des rats mâles au métabolite du n-hexane à des doses de 100, 200 et 400 mg/kg/jour pendant douze (12) semaines par voie cutanée. La réduction du nombre des spermatozoïdes et leur mobilité est associée à des effets spermato-toxiques, causés par l'exposition au solvant n-hexane. Cette spermato-toxicité peut-être due à une production excessive des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (**Adedara et al., 2016**).

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des dérivés indispensables dans la fécondation des spermatozoïdes, elles participent dans le processus de la condensation chromatinienne et la réaction acrosomique des spermatozoïdes. Toutefois, une production abusive de ces dérivés après une exposition aux substances étrangères provoque un déséquilibre de l'activité testiculaire (**Gil-Guzman et al., 2001; Pons-Rejraji et al., 2009; Morielli et O'Flaherty, 2015; Agarwal et al., 2017**). L'excès en espèces réactives de

DISCUSSION

l'oxygène induit un stress oxydatif en réduisant les défenses anti-oxydantes dans les testicules, diminue la mobilité des spermatozoïdes et altère leur ADN (**Adedara et al., 2013**). Le métabolite du n-hexane pourrait provoquer un dysfonctionnement du mécanisme anti-oxydant qui conduit à une accumulation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (**Mishra et al., 2006; Jiang et al., 2008**). Le dérèglement signalé de la maturation des cellules germinales dans notre étude après l'exposition au n-hexane peut être dû à la diminution du nombre et de la longueur des microtubules des cellules de Sertoli qui risquent son activité (**Markelewicz et al., 2004**), en perturbant le transport, le déplacement des spermatides vers l'épithélium et des sécrétions de fluide séminal vers les tubes séminifères tout le long des cellules de Sertoli par les microtubules (**Johnson, 2014**). Cette altération des microtubules provoque une insuffisance de soutenir et nourrir les cellules germinales (**Boekelheide et al., 2003**).

Des résultats similaires avec une baisse du taux de testostérone ont été observés par **Djemil et al. (2015)** après l'exposition des lapins mâles *Cuniculus lepus* aux deux (02) solvants, le toluène et le xylène à des doses de 50, 100 et 150 ppm respectivement pendant 24 jours. Le toluène et le xylène ont induit un effet reprotoxique chez les lapins mâles *Cuniculus lepus* en attaquant les fonctions de reproduction. La réduction du nombre des spermatozoïdes est peut être due aussi à la diminution du taux de testostérone et l'apoptose des cellules germinales. Des changements morphologiques de spermatozoïdes ont été révélés dans une étude réalisée par **Xiao et al. (2001)** chez des travailleurs exposés à court et à long terme au benzène, au toluène et au xylène. Selon ces chercheurs, les changements dans la morphologie de spermatozoïdes entravent leur passage dans les cellules de Sertoli, et par conséquence, une réduction du nombre de spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères a été enregistrée.

Aucun changement n'a été enregistré par **Linder et al. (1992)** dans la mobilité, la concentration et dans les tissus testiculaires après une exposition des rats Sprague-Dawley mâles, au n-hexane non dilué par voie orale à des doses de 10 000 mg/kg/j pendant cinq (05) jours et de 10 000 mg/kg en une seule dose.

DISCUSSION

Afin de déterminer si la reprotoxicité du n-hexane était aussi en relation avec l'effet néfaste de ce dernier sur l'axe hypothalamo-hypophysio-testiculaire, nous avons mesuré les niveaux des deux (02) hormones, l'hormone lutéinisante (LH) et la testostérone. Les résultats ont révélé une perturbation non significative du taux des hormones étudiés, où nous avons observé une augmentation non significative de l'hormone lutéinisante (LH) avec une baisse non significative aussi du taux de testostérone. Ces résultats sont plus remarquables chez les rats exposés à la dose la plus forte du n-hexane. L'exposition des souris femelles au n-hexane par inhalation à des doses de 0, 3, 15,1 et 75,8 ml/m³ pendant cinq (05) semaines n'a pas entraîné un changement dans les niveaux de l'hormone lutéinisante (LH) chez tous les groupes traités par le n-hexane (**Liu et al., 2012**). Tandis que, une élévation du taux de l'hormone lutéinisante (LH) a été enregistré chez des ratte exposées au métabolite du n-hexane à la dose la plus forte 1% dans de l'eau pendant vingt un (21) jours (**Amos et al., 2014**). L'hormone lutéinisante (LH) stimule la sécrétion des hormones stéroïdiennes, un changement dans le taux de cette hormone peut provoquer un dysfonctionnement du système de reproduction.

Boekelheide et Hall (1991) ont administré 1% de 2,5-hexanedione (2,5-HD) à des rats mâles Charles River CD. Après vingt sept (27) semaines l'évaluation du taux de testostérone a montré une diminution non significative, tandis que le taux de l'hormone lutéinisante et de l'hormone folliculo-stimulante ont révélé une augmentation significative.

L'explication de l'augmentation du taux de l'hormone lutéinisante après l'exposition au n-hexane ou à son métabolite, la 2,5-hexanedione (2,5-HD) n'est pas bien définie.

L'exposition au n-hexane dans notre travail a dévoilé une réduction non significative du taux de testostérone, plus remarquable à la dose 1200 mg/kg. L'effet du n-hexane sur la concentration de testostérone n'est pas clair, que peu d'études précédentes qui ont étudié l'effet du n-hexane sur le taux de testostérone, de plus, pas d'études récentes sur cet effet.

Selon **Setchell et Galil (1983)** une diminution dans le flux sanguin testiculaire se produit à cause de la perte des cellules germinales, le changement de l'hémodynamique testiculaire réduit le taux de testostérone abandonnant le testicule et la stimulation de la sécrétion de l'hormone lutéinisante s'augmente. Aussi, la diminution des niveaux sériques

DISCUSSION

de testostérone peut être due à la baisse du taux sérique de ses précurseurs, le cholestérol qui rentre dans la synthèse des hormones stéroïdiennes, processus de la stéroidogénèse (Djabali, 2011)

Conclusion et perspective

Dans le cadre de cette thèse doctorale nous avons visé à étudier l'effet toxique de faibles doses du n-hexane chez des rats mâles Wistar après une exposition orale sub-chronique.

Pour mettre en évidence la toxicité du n-hexane dans le corps sur le fonctionnement des systèmes internes notamment sur le système reproducteur mâle, des analyses biochimiques, histologiques et histochimiques ont été effectués au sein du laboratoire de recherche d'écophysiologie animale, laboratoire d'histologie et d'embryologie et laboratoire althisia-histologie.

Les résultats rapportés dans notre recherche ont dévoilé que le n-hexane provoque des effets nocifs dans l'organisme, qui ont été manifestés par un manque d'appétit avec une diminution de la masse corporelle; Augmentation du poids relative des organes (foie, rein et poumon); Augmentation des paramètres hématologiques de défense (globules blanc, lymphocytes, granulocytes et éosinophiles); Augmentation des bio-marqueurs du stress oxydatif, le *malondialdéhyde* (MDA) dans les poumons et le glutathion (GSH) dans le foie, les reins, les testicules et les poumons; Augmentation des niveaux sériques des paramètres biochimiques hépatiques et rénaux (ASAT, ALAT, PAL, protéines totales, créatinine, acide urique, urée) alors que les taux sériques lipidiques (cholestérol, triglycérides) et le glucose ont diminué; Diminution de la mobilité et la concentration des spermatozoïdes avec une perturbation non significative de l'hormone *stéroïdienne*, la testostérone et de l'hormone gonadotrope, la LH; Altération des tissus hépatiques, rénaux, pulmonaires (une pneumonie a été signalée) et testiculaires.

En conclusion et en réponse à la question de cette thèse, les résultats obtenus dans notre recherche ont bien montré et affirmé que l'exposition à de faibles doses au n-hexane par voie orale induit une hématotoxicité, une hépatotoxicité, une néphrotoxicité, et une pneumotoxicité, et essentiellement une reprotoxicité masculine.

CONCLUSION ET PERSPECTIVE

En perspective, il sera intéressant d'améliorer les résultats et approfondir les recherches pour mieux approuver l'effet toxique de faibles doses du n-hexane par voie orale. Nous souhaitons de prolonger la période de traitement par le n-hexane pour bien confirmer si le n-hexane est un perturbateur endocrinien ou non. Il serait important d'évaluer l'effet des quantités du n-hexane présentes dans les huiles extraites. Aussi, il serait bien d'étudier la possibilité de *détoxification par des plantes médicinales* contre la toxicité du n-hexane.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



Références bibliographiques

- Adedara IA, Teberen AR, Ebokaiwe AP, Ehwerhemuepha T, Farombi EO.** Induction of oxidative stress in liver and kidney of rats exposed to Nigerian bonny light crude oil. Environmental Toxicology. 2012; 27(6): 372–379.
- Adedara IA, Vaithinathan S, Jubendradass R, Mathur PP, Farombi EO.** Kolaviron prevents carbendazim-induced steroidogenic dysfunction and apoptosis in testes of rats. Environmental Toxicology and Pharmacology. 2013; 35: 444-453.
- Adedara IA, Abolaji AO, Odion BE, Okwudi IJ, Omoloja AA, Farombi EO.** Impairment of hepatic and renal functions by 2,5-hexanedione is accompanied by oxidative stress in rats. Journal of Toxicology. 2014; 1-9.
- Adedara IA, Abolaji AO, Odion BE, Omoloja AA, Okwudi IJ, Farombi EO.** Redox status of the testes and sperm of rats following exposure to 2,5-hexanedione. Redox Report. 2016; 21(6): 239-247.
- Abou-Donia MB, Makka YHM, Graham DG.** The relative neurotoxicities of n-hexane, methyl n-butyl ketone, 2,5-hexanediol, and 2,5-hexanedione following oral or intraperitoneal administration in hens. Toxicology and Applied Pharmacology. 1982; 62: 369-389.
- Abou-Donia MB.** Mammalian toxicology. 1st Edition. USA: John Wiley. 2015; 720p.
- Adenuga D, McKee R, Carrillo JC.** The sub-chronic toxicity of complex dearomatized hydrocarbon solvents in Sprague-Dawley rats. Regul Toxicol Pharmacol. 2014b; 70: 659-672.
- Adewole SO, Salako AA, Doherty OW, Naicker T.** Effect of melatonin on carbon tetrachloride-induced kidney injury in Wistar Rats. African Journal of Biomedical Research. 2007; 10: 153-164.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



Agarwal A, Sharma R, Gupta S, Harley A, Ahmad G, du Plessis SS, Esteves SC, Wang SM, Durairajanayagam D. Oxidative stress in human reproduction. Allemagne: Springer International Publishing AG. 2017; 200p.

Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES). Profil toxicologique. n-Hexane. 2014.
<https://www.anses.fr/fr/system/files/CHIM2009sa0331Ra-03-An02.pdf>

Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES). Profil toxicologique. Exposition aux solvants organiques en milieu professionnel: quel risque pour le cerveau?. 2011.
<https://bvs.anses.fr/sites/default/files/BVS-mg-014-Schroeder.pdf>

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for n-hexane, U.S. Department of health and human services. Public health service. 1999.
<https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp113.html>

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for 2-hexanone, U.S. Department of health and human services. Public health service. 2018.
<https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp44.pdf>

Ahmadiزاده M, Amirmoezy S, Pole T. Effects of toluene on rat kidney. Jundishapur Journal of Health Sciences. 2014; 6(1): 281-287.

Akpan KV, Sogbanmu TO, Otitoloju AA. Effects of volatile organic solvents inhalation on hematological and histological indices of Mus musculus. Curr Advanc Journal of Environmental Sciences. 2014; 2(2): 46–51.

Albro, PW, Fishbein L. Absorption of aliphatic hydrocarbons by rats. Biochem Biophys Acta. 1970; 219: 437-446.

Alhyan M, Birouk N, Regragui W, Benabdeljlil M, Yahyaoui M, El Alaoui Faris M, Ouazzani R. Polyneuropathie démyélinisante secondaire à une intoxication au n-hexane: étude ENMG de 3 observations. Revue Neurologique. 2014; 170: 33-46.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



Alloway BJ, Ayres DC. Chemical principles of environmental pollution. 2nd Edition. USA: CRC Press. 1997; 379p.

Amarnath V, Anothony DC, Valentine WM, Graham DG. The molecular mechanism of the carbon disulphide mediated cross-linking of proteins. Chemical Research in Toxicology. 1991; 4: 148-150.

Amos OA, Adedara IA, Soladogun A, Veronica Salau V, Maureen Oguaka M, Farombi EO. Exposure to 2,5-hexanedione is accompanied by ovarian and uterine oxidative stress and disruption of endocrine balance in rats. Drug Chemical Toxicology. 2014; 38(4):400-407.

Amresh G, Singh PN, Rao CV. Toxicological screening of traditional medicine Laghu Patha (Cissampelos pareira) in experimental animals. Journal Ethnopharmacol. 2008; 116(3): 454-460.

Amselem J. L'hypocholestérolémie, un trouble méconnu. Santé magazine. Ugecam ile-de France. 2013. <https://www.santemagazine.fr/sante/maladies/maladies-endocriniennes-et-metaboliques/lhypcholesterolemie-un-trouble-meconnu-171464>

Anthony PD, Elizabeth AK, Richard ML. Comparative Covalent Protein Binding of 2,5-Hexanedione and 3-Acetyl-2,5-Hexanedione in the Rat. Journal of Toxicology and Environmental Health. 2009; 72: 861–869.

Asante-Duah F. Public health risk assessment for human exposure to chemicals. 2nd Edition. Netherlands: Springer Dordrecht. 2017; 603p.

Ashmawy MM, Abdullatif MH, Mohamed KS. Hematological, biochemical and histological effects of prolonged exposure to n-hexane in albino rats. Sebha Medical Journal. 2007; 6(1): 8-16.

Ayadim M. Chimie organique structural, manipuler les molécules pour les comprendre. Belgique: Presses Universitaires de Louvain. 2014; 162p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- Baba Ahmed FZ, Merzouk H, Bouanane S, Benkalfat NB, Merzouk SA, Mulengi JK, Narce M.** Évaluation de la toxicité aiguë de la 2-hydroxy-méthyl-1 (N-phtaloyltryptophyl) aziridine chez le rat Wistar. Annales de Toxicologie Analytique. 2010; 22: 115-121.
- Bachofen M, Weibel ER.** Basic pattern of tissue repair in human lungs following unspecific injury. Chest. 1974; 65(4): 14-21.
- Baelum J, Molhave L, Hansen SH, et al.** Metabolic interaction between toluene, trichloroethylene and n-hexane in humans. Scandinavian Journal of Work, Environment & Health. 1998; 24: 30-37.
- Baker TS, Rickert DE.** Dose-dependent uptake, distribution and elimination of inhaled n-hexane in the Fischer344 rat. Toxicol. Appl Pharmacol. 1981; 61: 414-422.
- Barni-Comparini I, Lungarella G, Fonzi L.** Response of lung enzyme activities in rabbits following short-term exposure to n-hexane: Correlation between morphological and biochemical changes. Agents Actions. 1982; 12(5): 737-742.
- Beauchamp RO, Bus JS, Popp JA, Boreiko CJ, Andjelkovich DA.** A critical review of the literature on carbon disulfide toxicity. Critical Reviews in Toxicology. 1984; 13(1): 25-97.
- Benyahia N et Mahdaoui K.** La pollution des sols par les hydrocarbures. Diplôme d'ingénieur d'état en écologie et environnement. Algérie. Université Abderrahmane Mira –Bejaia-. 2011; 87p.
- Bingham E, Cohrssen B, Powell CH.** Patty's toxicology. 5th Edition. New York: John Wiley & Sons. 2001; 978p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



Biodynamics Inc. EPA regarding an inhalation oncogenicity study of commercial hexane in rats and mice. USA: Letter from American petroleum institute. 1993a.

Boekelheide K. Rat testis during 2,5-hexanedione intoxication and recovery. II. Dynamics of pyrrole reactivity, tubulin content, and microtubule assembly. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1988; 92: 28-33.

Boekelheide K, Hall SJ. 2,5-hexanedione exposure in the rat results in long-term testicular atrophy despite the presence of residual spermatogonia. *Journal Andrology*. 1991; 12(1): 18-26.

Boekelheide K, Fleming SL, Allio T, Embree-Ku ME, Hall SJ, Johnson KJ, Kwon EJ, Patel SR, Rasoulpour RJ, Schoenfeld HA, Thompson S. 2,5-hexanedione-induced testicular injury. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2003; 43: 125-147.

Boyes WK. **Chemicals: Solvents.** In : **Hakkinen PJ, Mohapatra A, Gilbert SG.** Information resources in toxicology. 4th Édition. USA: National Library of Medicine. 2009; 167-173p.

Brugnone F, Perbellini I, Grigolini I, Apostoli P. Solvent exposure in a shoe upper factory. *International Archives of Occupational and Environmental Health*. 1978; 42: 51-62.

Buccolo G et al. Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes. *Clin Chem*. 1973; 19(5): 476-482.

Burtis A et al. Tietz Textbook of clinical chemistry, 3rd Edition. AACC. 1999.

Bus J, White E, Tyler R et al. Perinatal toxicity and metabolism of n-hexane in Fischer-344 rats after inhalation exposure during gestation. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1979; 51: 295-302.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME).** Canadian soil quality guidelines for n-hexane. 2011.
https://www.ccme.ca/files/Resources/supporting_scientific_documents/pn_1454_hexane_sqg_supp_doc.pdf
- Carrillo JC, Adenuga MD, Momin, F McKee RH.** The sub-chronic toxicity of a naphthenic hydrocarbon solvent in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2018; 95: 323-332.
- Cavender FL, Casey HW, Salem H, Graham DG, Swenberg JA, Gralla EJ.** A 13-week vapor inhalation study of n-hexane in rats with emphasis on neurotoxic effects. *Fundamental and Applied Toxicology*. 1984; 4(2): 191-220p.
- Carreón T, Herrick RL.** Patty's toxicology. Chapter 27: Aliphatic Hydrocarbons 6th Edition. New York: John Wiley & Sons. 2012; 102p.
- Chemat-Djenni Z, Ferhat MA, Tomao V, Chemat F.** Carotenoid extraction from tomato using a green solvent resulting from orange processing waste. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2010; 13: 139-147.
- Cillard J, Cillard P.** Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oilseeds and Fats Crops and Lipids*. 2006; 13(1): 24-29.
- Commission Européenne (CE).** n-Hexane. Directive de la commission. *Journal officiel de l'Union européenne*. 2004. http://ecb.jrc.it/documents/Classification-Labeling/DIRECTIVE_67-548-EEC/ATPS_OF_DIRECTIVE_67-548-EEC/29th_ATP.pdf.
- Contreras-Zentella ML, Hernández-Muñoz R.** Is liver enzyme release really associated with cell necrosis induced by oxidant stress?. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016; 1-12.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- Cullen JM.** Histologic Patterns of Hepatotoxic Injury. In: McQueen CA. Comprehensive toxicology. 2nd Edition. USA: Elsevier. 2010; 97-136p.
- Dacosta-Noble P, Traclet J.** Pneumopathie aiguë à éosinophiles. Revue des Maladies Respiratoires Actualités. 2016; 8(2): 105-107p.
- Das BK, Mukherjee SC.** Toxicity of cypermethrin in Labeo rohita fingerlings: Biochemical, enzymatic and haematological consequences. Comparative Biochemistry and Physiology. 2003; 134: 109-121.
- DeCaprio AP, O'Neill EA.** Alterations in rat axonal cytoskeletal proteins induced by in vitro and in vivo 2,5-hexanedione exposure. Toxicology and Applied Pharmacology. 1985; 78: 235-247.
- DeCaprio AP, Olajos EJ, Weber, P.** Covalent binding of a neurotoxic n-hexane metabolite: conversion of primary amines to substituted pyrrole adducts by 2,5-hexanedione. Toxicology and Applied Pharmacology. 1982; 65: 440-450.
- Decot V, Capron M.** Le polynucléaire éosinophile, structure et fonctions. Presse Médical. 2006; 35: 113-124.
- Djabali N.** Effets d'un solvant : Ethylène glycol monométhyl éther (EGME) sur la fertilité masculine et quelques paramètres biochimiques et cellulaires du sang chez le lapin Oryctolagus cuniculus. Thèse de doctorat en biologie et physiologie animale. Algérie. Université Badji Mokhtar -Annaba-. 2011; 158p.
- Djemil R, Khelili K, Cherif A, Boulakoud MS.** Evaluation of toluene and xylene toxicity on reproductive function in male rabbits. Advances in Environmental Biology. 2015; 9(14): 104-111.
- DeMartino C, Malorni W, Amantini MC et al.** Effects of respiratory treatment with n-hexane on rat testis morphology. A light microscopic study. Exp Mol Pathol. 1987; 46: 199-216.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- Dos-Santos CR, Meyer Passarelli MM, de Souza Nascimento E.** Evaluation of 2,5-hexanedione in urine of workers exposed to n-hexane in Brazilian shoe factories. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. 2002; 778(1): 237-244.
- Draper HH, Hadley M.** Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Methods Enzymol. 1990; 186: 421-431.
- Drochmans P.** Mise en evidence de glycogene dans la cellule hepatique par microscopie electronique. Journal of Biophysical and Biochemical Cytology. 1960; 8: 553-558.
- Dunnick JK.** Toxicity studies of n-Hexane in B6C3F1 (inhalation studies) national toxicology program. research triangle park. US Department of Health and Human Services. Public Health Service. National Institutes of Health. 1991.
- Dzoyem JP, Kuete V, Eloff JN.** Biochemical Parameters in toxicological studies in Africa: significance, principle of methods, data interpretation, and use in plant screenings. In: Kuete V. Toxicological Survey of African Medicinal Plants. USA: Elsevier. 2014; 659-715p.
- Egeli Ü, Tunca B, Tuncel P, Kahraman M, Sevinir B, Çeçener G, Batmaz H, Akpinar G, Çimen Ç, Cangül T, Bilaloglu R.** Genotoxic, hemotoxic, pathological, and biochemical effects of hexane on swiss albino rats. Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis. 2000; 20: 329-340.
- El Mellakh M, Louhab N, Najib Kissani N.** Étude clinique et électrophysiologique de neuropathies toxiques au n-hexane : à propos de 3 cas. Revue Neurologique. 2016; 172: 36-37.
- El-Fawal H. Neurotoxicology.** In: Nriagu JO. Encyclopedia of environmental health. 4th Edition. USA: Elsevier. 2011; 87-106p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



Ennulat D, Walker D, Clemo F, Magid-Slav M, Ledieu D, Graham M, Botts S, Boone L.

Effects of hepatic drug-metabolizing enzyme induction on clinical pathology parameters in animals and man. *Toxicologic Pathology*. 2010; 38(5): 810-28.

Environnement Canada Santé Canada (ECSC). Évaluation préalable pour le défi concernant le n-hexane. 2009; 56p. https://www.ec.gc.ca/ese-ees/C6B06789-93CE-445C-8552-9566A35A610D/batch4_110-54-3_fr.pdf

EQuilibrium Criterion model (EQC). Version 2.02. Peterborough Ontario Trent University, Canadian Environmental Modelling Centre. 2003.

European Commission (EC). Surface treatment using organic solvents. 2007; 668p. https://eippcb.jrc.ec.europa.eu/reference/BREF/sts_bref_0807.pdf

Experimental Pathology Laboratories (EPL). 6-month continuous inhalation exposure of rats to hexane mixtures (re-evaluation of renal pathology). 1992.

Ezzat AR, Riad NHA, Fares NH, Hegazy HG, Alrefadi MA. Gasoline inhalation induces perturbation in the rat lung antioxidant defense system and tissue structure. *International Journal of Environmental Science and Engineering*. 2011; 1: 1-14.

Farhata Z, Browneb RW, Bonnera MR, Tianc L, Dengd F, Swanson M, Mu L. How do glutathione antioxidant enzymes and total antioxidant status respond to air pollution exposure?. *Environment International*. 2018; 112: 287-293.

Fayed HM, Aly SS, Saleh SM, Ebeid M, Ahmed YA. Phenotype analysis of lymphocytes in workers with chronic benzene exposure. *Egyptian Journal of Haematology*. 2018; 42(4): 161-168.

Filly A, Fabiano-Tixier AS, Lemasson Y, Roy C, Fernandez X, Chemat F. Extraction of aroma compounds in blackcurrant buds by alternative solvents: Theoretical and experimental solubility study. *Comptes Rendus Chimie*. 2014; 17: 1268-1275.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



Fine F, Vian MA, Tixier F, Carre P, Pages X, Chemat F. Les agro-solvants pour l'extraction des huiles végétales issues de graines oléagineuses. Oilseeds and fats, Crops and Lipids. 2013; 20(5): 1-6.

Firestone JA, Gospo Jr SM. Organic solvents. In: Dobbs MR. Clinical Neurotoxicology. 1st Edition. USA: Elsevier. 2009; 401-414p.

Franke JP, Wijsbeek J et al. Systematic analysis of solvents and other volatile substances by gas chromatography. Journal of Analytic Toxicology. 1988; 12: 20-24.

Frontali N, Amantini MC, Spagnolo A et al. Experimental neurotoxicity and urinary metabolites of the C5-C7 aliphatic hydrocarbons used as glue solvents in shoe manufacture. Clinical Toxicology. 1981; 18: 1357-1367.

Furlan A, Lübke M, Adameyko I, Lallemend F, Ernfors P. The transcription factor Hmx1 and growth factor receptor activities control sympathetic neurons diversification. EMBO Journal. 2013; 32(11): 1613–1625.

Gagné M. Caractérisation de la pharmacocinétique suite à l'exposition multivoie au toluène, au n-hexane et au cyclohexane chez le rat. Mémoire d'obtention du grade de Maître ès sciences en santé environnementale et santé au travail. Canada. Université de Montréal. 2008; 97p.

Genter MB, Szakal-Quin G, Anderson CW et al. Evidence that pyrrole formation is a pathogenetic step in γ -diketone neuropathy. Toxicology and Applied Pharmacology. 1987; 87: 351-362.

Gil-Guzman E, Ollero M, Lopez MC, Sharma RK, Alvarez JG, Thomas AJ, Agarwal A. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. Human Reprod. 2001; 16: 1922-1930.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- Gobba F, Cavalleri A.** Color vision impairment in workers exposed to neurotoxic chemicals. Neurotoxicology. 2003; 24: 693-702.
- Goel SK, Rao GS, Krishnamurti CR.** Toxicity of n-hexane and 2,5-hexanediol to the haemopoietic system: A preliminary report. Xenobiotica. 2009; 17(2): 217-222p.
- Goel SK, Rao GS, Pandya KP.** Toxicity of n-hexane and n-heptane: Some biochemical changes in liver and serum. Toxicology Letters. 1982; 14: 169- 174.
- Graham D, Anthony DC, Boekelheide K et al.** Studies of the molecular pathogenesis of hexane neuropathy. II. Evidence that pyrrole derivatization of lysyl residues leads to protein cross-linking. Toxicology and Applied Pharmacology. 1982a; 64: 415-422.
- Graham DG, Amarnath V, Valentine WM, Pyle SJ, Anthony DC.** Pathogenetic studies of hexane and carbon disulfide neurotoxicity. Critical Reviews in Toxicology. 1995; 25(2): 91-112.
- Griffin JW, Anthony DC, Fahnstock KE et al.** 3,4-Dimethyl-2,5-hexanedione impairs the axonal transport of neurofilament proteins. Journal Neuroscience. 1984; 4: 1516-1526.
- Haleng J, Pincemail J, Defraigne JO, Charlier C, Chapelle JP.** Le stress oxydant. Revue Médicale de Liège. 2007; 62(10): 628-638.
- Hall SK.** Chemical exposure and toxic responses. 1st Edition. USA: CRC Press. 1996; 304p.
- Hathaway GJ, Proctor NH.** Chemical hazards of the workplace. 5th Edition. Canada: John Wiley & Sons. 2014; 769p.
- Hashizume A, Koike H, Kawagashira Y, Banno H, Suzuki K, Ito M, Katsuno M, Watanabe H, Tanaka F, Naganawa S, Kaneko R, Ishii A, Sobue G.** Central nervous system involvement in n-hexane polyneuropathy demonstrated by MRI and proton MR spectroscopy. Clinical Neurology and Neurosurgery. 2011; 113: 493-495.
- Hayes AW.** Principles and methods of toxicology. Chapter: Solvents and industrial hygiene. 5th Edition. USA: CRC Press. 2007; 2296p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



Hazardous Substances Data Bank (HSDB). Information from the Hazardous Substances Data Bank. n-Hexane. Toxicology data network system. National Library of Medicine. 2004.

Health and Safety Executive (HSE). Construction hazardous substances: Solvents. 2014.
<http://www.hse.gov.uk/construction/healthrisks/hazardous-substances/solvents.htm>

Hewitt WR, Miyajima H, Côté MG, Plaa GL. Acute alteration of chloroform-induced hepato- and nephrotoxicity by n-hexane, methyl n-butyl ketone, and 2,5-hexanedione. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1980; 53(2): 230-248.

Hooshmand M, Ahmadi R, Siavashi M, Mohammadi S. The Effects of oil paint vapor on leukocytes and platelet count and MCV, MCH and MCHC in rat. International conference on Earth Environment and Life Sciences (EELS). December, 23-24. Dubai. 2014; 3-5p.

Horimoto M, Isobe Y, Isogai Y, Tachibana M. Rat epididymal sperm motion changes induced by ethylene glycol monoethyl ether, sulfasalazine, and 2,5-hexandione. *Reproductive Toxicology*. 2000; 14: 55-63.

Houlot R. Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. Paris: Maloine. 1984; 225-227p.

Huang J, Shibata E, Kato K et al. Chronic exposure to n-hexane induces changes in nerve-specific marker proteins in the distal peripheral nerve of the rat. *Human & Experimental Toxicology*. 1992; 11: 323-327.

Huang CC. Polyneuropathy induced by n-hexane intoxication in Taiwan. *Acta Neurol Taiwan*. 2008; 17 (1): 3-10.

Hang L, Chen S, Li M, Yang L, Lin J. Study on nerve electromyogram in 92 patients with chronic n-hexane intoxication. CNKI Journal. 2010.
http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotal-XYXX201002012.htm

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS). Étude de scénarios dangereux en stations-service. 2002; 78p.
<https://www.ineris.fr/sites/ineris.fr/files/contribution/Documents/52.pdf>

Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS). Santé et sécurité au travail. Risques chimiques. 2017; 67p. <http://www.inrs.fr/risques/chimiques/effets-sante-securite.html>

Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS). Fiche toxicologique. n-Hexane. 2019; 15p.
http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_113

Inventaire National des Rejets de Polluants (INRP). Rapport du commissaire à l'environnement et au développement durable. Bureau du vérificateur général du Canada. 2009. http://www.oag-bvg.gc.ca/internet/Francais/parl_cesd_200911_03_f_33198.html

Iregren A, Andersson M, Nylen P. Color vision and occupational chemical exposures: I. An overview of tests and effects. Neurotoxicology. 2002; 23: 719-733.

Issever H, Malat G, Sabuncu HH et al. Impairment of colour vision in patients with n-hexane exposuredependent toxic polyneuropathy. Occup Med. 2002; 52: 183-186.

Jacob S, Hery M, Stengel B. Exposition aux solvants organiques. Risque de progression des maladies rénales chroniques vers l'insuffisance rénale terminale. INRS. 2008; TF 170: 233-241p. <http://www.inrs.fr/media.html?refINRS=TF%20170>

Jarrar BM, Taib NT. Histological and histochemical alterations in the liver induced by lead chronic toxicity. Saudi Journal of Biological Sciences. 2012; 19(2): 203-210.

Jensen RL. Brain tumor hypoxia: tumorigenesis, angiogenesis, imaging, pseudoprogression, and as a therapeutic target. Journal of Neuro-Oncology. 2009; 92(3): 317-335.

Jiang G, Xu L, Song S, Zhu C, Wu Q, Zhang L, Wu L. Effects of long-term low-dose cadmium exposure on genomic DNA methylation in human embryo lung fibroblast cells. Toxicology. 2008; 244: 49-55.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- Johar D, Roth JC, Bay GH, Walker JN, Krocak TJ, Los M.** Inflammatory response, reactive oxygen species, programmed (necrotic-like and apoptotic) cell death and cancer. Roczn. Akad. Med. Bialymst. 2004; 49: 31-39.
- Johnson KJ.** Testicular histopathology associated with disruption of the Sertoli cell cytoskeleton. Spermatogenesis. 2014; 4(2): 1-8p.
- Joshi UM et al.** Steroids. 1979; 34(1): 35p.
- Kamal A, Malik RN.** Hematological evidence of occupational exposure to chemicals and other factors among auto-repair workers in Rawalpindi, Pakistan. Osong Public Health Research Perspectives. 2012; 3(4): 229-238.
- Kamel E-N, Shehata M.** Effect of toluene exposure on the antioxidant status and apoptotic pathway in organs of the rat. British Journal of Biomedical Science. 2008; 65(2): 75-79.
- Kamen-Bouhadiba F, Ayad F, Mohammed-Brahim B, Belhadj M.** Troubles hématologiques chez les travailleurs d'une manufacture de chaussures. Journal de la Médecine du Travail. 2014.
- Kapanci, Y, Wemel, ER, Kaplan, HP, Robinson, FR.** Pathogenesis and reversibility of the pulmonary lesions of oxygen toxicity in monkeys. II. Ultra-structural and morphometric studies. Lab Invest. 1969; 20(1): 101–11p.
- Kaplan A, Kaplan A et al.** Urea. Clin Chem the C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton. 1984; 1257-1260p.
- Khan AA, Sultan R, Zamani GY, Rahman SU.** Biochemical and hematological analysis after exposure to hazardous materials during shoe making. Journal of Biology and Life Science. 2013; 4(2): 116-138.
- Khedun SM.** The effect of alcohol, isoniazid, rifampicin, paracetamol and hexane on hepatique gluconeogenesis and bromosulphthalein clearance. Master en sciences médicales en médecine du département de pharmacologie expérimentale et clinique. Brésil. Université de Natal. 1988; 182p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- Kihaile PE, Aoki K, Kimura N, Pei W, Misumi J.** Are Sperm Parameters the best indicator of 2,5-hexanedione Reproductive Toxicity in male Rats. *Reproductive Toxicity*. 2005; 20: 515-519.
- Kim JK, Cho HW, Han JH, Lee SB, Chung YH, Rim KT, Yang JS.** Subchronic inhalation toxicity study of n-pentane in rats. *Safety and Health at Work*. 2012; 3: 224-234.
- Klaas M, Kangur T, Viil J, Mäemets-Allas K, Minajeva A, Vadi K, Antsov M, Lapidus N, Järvekülg M, Jaks V.** The alterations in the extracellular matrix composition guide the repair of damaged liver tissue. *Scientific Reports*. 2016; 6(1): 1-12.
- Koller A, Kaplan A et al.** Total serum protein. *Clin Chem the C.V. Mosby Co. St Louis*. Toronto. Princeton. 1984; 1316-1324.
- Kosasa TS.** Measurement of human luteinizing hormone. *Journal of Reproductive Medicine*. 1981; 26: 201-206.
- Krasavage WJ, O'Donoghue JL, DiVincenzo GD et al.** The relative neurotoxicity of methyl-n-butyl ketone, n-hexane and their metabolites. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1980; 52: 433-441.
- Krishnan, K, Carrier, R.** Exposure source and multiroute exposure considerations for risk assessment of drinking water contaminants. In: Howd RA, Fan AM. *Risk assessment for chemicals in drinking water*. 1st Edition. USA: John Wiley & Sons. 2008; 67-89p.
- Kutlu G, Gomceli YB, Sonmez T, İnan LE.** Peripheral neuropathy and visual evoked potential changes in workers exposed to n-hexane. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2009; 16(10):1296-1299.
- Lafon D, Triolet J, Falcy M, Durand E.** Actualités sur les solvants. 29e congrès de médecine et santé au travail. 1^{er} Juin. Lyon. INRS. 2006; TD 148: 337-351p.
- Lan Q, Zharg L, Li G, Rappaport SM, Sher M, Alter BP, Wo Y, Kopp W, Waidyanatha S, Rabkin C, Guo W.** Hematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene. *Science*. 2004; 306: 1774-1776.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



Lauwerys R. Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles. USA: Elsevier Masson. 2007. 1252p.

Layeghkavidaki H. Effet des polluants de type hydrocarbures aromatiques polycycliques sur l'homéostasie lipidique et les récepteurs des lipoprotéines hépatiques. Thèse de doctorat en procédés biotechnologiques et alimentaires. Lorraine. Université de Lorraine. 2014; 205p.

Leah E. Cholesterol. Lipidomics Gateway. 2009; 10.1038. <http://dx.doi.org/10.1038/lipidmaps.2009.3>

Library Wiley. n-Hexane. Toxicological sheet. Volume 14. 1996.

Linder RE, Strader LF, Slott VL, Suarez JD. Endpoints of spermatotoxicity in the rat after short duration exposures to fourteen reproductive toxicants. *Reproductive Toxicology*. 1992; 6(6): 491-505.

Liu J, Huang HL, Pang F, Zhang WC. The effect of n-hexane on the gonad toxicity of female mice. *Biomedical and Environmental Sciences*. 2012; 25:189-196.

Liu J, Huang L, Sun Y, Li YC, Zhu JL, Wang WX, Zhang WC. n-Hexane alters the maturation of oocytes and induces apoptosis in mice. *Biomedical and Environmental Sciences*. 2013; 26(9): 735-741.

Loi Canadienne sur la Protection de l'Environnement (LCPE). Règlement sur la bioaccumulation. 1999.

LoPachin RH, He D, Reid ML. 2,5-Hexanedione-induced changes in the neurofilament subunit pools of rat peripheral nerve. *Neuro Toxicology*. 2005; 26(2): 229-240.

LaPachin RM et Gavin T. Toxic Neuropathies: Mechanistic Insights Based On A Chemical Perspective. *Neuroscience letters*. 2015; 596: 78–83.

Lungarella G, Barni-Comparini I, Fonzi L. Pulmonary changes induced in rabbits by long-term exposure to n-hexane. *Archives Toxicology*. 1984; 55(4): 224-228.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



Ma Z, Huang L, Huang J et al. Analysis on the features of peripheral neuropathy in rats subchronically intoxicated with oral n-hexane exposure. CNKI Journal. 2006. http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotal-XYYX200602004.htm

Makhloifi H, Matmer R. Étude de l'effet de la contamination du sol par les carburants sur des propriétés biologiques. Diplôme de master en écologie et environnement. Algérie. Université Mouloud Mammeri -Tizi-Ouzou-. 2018; 93p. <https://dl.ummto.dz/bitstream/handle/ummto/2865/Makhloifi%20Hadjer%20%26%20Matmer%20Ryma.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Markelewiecz RJ, Hall SJ, Boekelheide K. 2,5-hexanedione and carbendazim coexposure synergistically disrupts rat spermatogenesis despite opposing molecular effects on microtubules. Toxicological Sciences. 2004; 80: 92-100.

Marra F, Gastaldelli A, Baroni GS, Tell G, Tiribelli C. Molecular basis and mechanisms of progression of nonalcoholic steatohepatitis. Trends in Molecular Medicine. 2008; 14: 72-81.

Masson P. Some histological methods. Trichrome stainings and their preliminary technique. Journal Technology Methods. 1929; 12: 75-90.

Mayan O, Teixeira JP, Pires AF. Biological monitoring of n-hexane exposure in Portuguese shoe manufacturing workers. Applied Occupational and Environmental Hygiene. 2001; 16(7): 736-741.

McKee RH, Adenuga MD, Carrillo JC. Characterization of the toxicological hazards of hydrocarbon solvents. Critical Reviews Toxicology. 2015; 45(4): 273-365.

Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, Govindarajan R, Kuriakose SV, Prasad MNV. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in Bacopa monnieri L. Plant Physiology and Biochemistry. 2006; 44: 25-37.

Moffit JS, Bryant BH, Hall SJ, Boekelheide K. Dose-dependent effects of sertoli cell toxicants 2,5-hexanedione, carbendazim, and mono-(2-ethylhexyl) phthalate in adult rat testis. Toxicol Pathol. 2007; 35: 719-27.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- Momoh J, Oshin TT.** Severe hepatotoxicity and nephrotoxicity of gasoline (petrol) on some biochemical parameters in Wistar male albino rats. American Journal of Biochemistry. 2015; 5(1): 6-14.
- Moore KL, Dalley AF.** Clinically oriented anatomy. 4th Edition. New York: Lippincott Williams & Wilkins. 1999; 393p.
- Morielli T, O'Flaherty C.** Oxidative stress impairs function and increases redox protein modifications in human spermatozoa. Reproduction. 2015; 149(1):113-123.
- Murray R, Kaplan A et al.** Alanine aminotransferase. Clin Chem the C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton. 1984c; 1088-1090p.
- Murray R, Kaplan A et al.** Aspartate aminotransferase. Clin Chem the C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton. 1984b; 1112-1116p.
- Murray R, Kaplan A et al.** Creatinine. Clin Chem the C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton. 1984a; 1261-1266p.
- Mutti A, Falzoi M, Lucertini S, Arfini G, Zignani M, Lombardi S, Franchini I.** n-Hexane metabolism in occupationally exposed workers. British Journal of Industrial Medicine. 1984; 41(4): 533-538.
- Myers SS, Patz JA.** Emerging threats to human health from global environmental change. Annual Review of Environment and Resources. 2009; 34: 223-252.
- Naeimi N, Adeli HR, Zare K.** Study of toluene effect on blood parameters and spleen tissue in NMRI albino male mice. Journal of North Khorasan University of Medical Sciences. 2017; 8(3): 481-495.
- Naito HK, Kaplan A et al.** Cholesterol. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1194-11206p.
- National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH).** Manual of Analytical Methods. Hydrocarbons. 1994.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



Neghab M, Rahimian JT, Jahangiri M, Karimi A, Nasiri G, Aghabeigi M, Hassanzadeah J, Podonak SDB, Safaiyan A. Evaluation of hematotoxic potential of benzene, toluene, xylene, ethyl benzene and n-hexane in petrochemical industries. *Journal of Safety Promotion and Injury Prevention*. 2014; 2(4): 2345-2455.

New Jersey Department of Health (NJDH). Hazardous substance fact sheet. n-Hexane. 2012; 6p. <https://nj.gov/health/eoh/rtkweb/documents/fs/1340.pdf>

Nylen P, Ebendal T, Eriksdotter-Nilsson M et al. Testicular atrophy and loss of nerve growth factor-immunoreactive germ cell line in rats exposed to n-hexane and a protective effect of simultaneous exposure to toluene or xylene. *Arch Toxicol*. 1989; 63: 296-307.

Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHA). Proposition 65. 2017.

Occupational Safety and Health (OSH). Solvents and the workplace. 2014; No 5. https://www.ilo.org/wcmsp5/groups/public/---americas/---ro-lima/---sro-report_of_spain/documents/presentation/wcms_250196.pdf

Ogunneye AL, Banjoko, OO, Jabr JM, Shomoye OF. Extraction and characterization of oil from Thevetia peruviana seeds (yellow oleander) using n-hexane as a solvent, proceedings of the international conference on science, technology, education, arts, management and social sciences. iSTEAMS Research Nexus. Afe Babalola University. Ado Ekiti, Nigeria. 2014; 195-202p.

Oduola T, Raheem GO, Oke OT, Adeosun OG, Dallatu MK, Mainasara AS. Organic solvent exposure: hepatotoxicity, nephrotoxicity, and haematotoxicity assessment amongst vehicle spray painters in Ile-Ife, Nigeria. *American Journal of Environmental Protection*. 2015; 3(3): 95-99.

Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Analyse du sperme humain et de l'interaction des spermatozoïdes avec le mucus cervical. INSERM. Paris. 1993; 55-56p.

Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Boîte à outils d'évaluation des risques pour la santé humaine: dangers chimiques. IPCS. 2017. 84p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- Overton SV, Manura JJ.** Analysis of volatile organics in cooking oils by thermal desorption-gas chromatographymass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1995; 43(5): 1314-1320.
- Parasuraman S, Sujithra J, Syamittra B et al.** Evaluation of sub-chronic toxic effects of petroleum ether, a laboratory solvent in Sprague-Dawley rats. *Journal of Basic Clinical Pharmacy*. 2014; 5(4): 89-97p.
- Pathan TS, Thete PB, Shinde SE, Sonawane DL, Khillare YK.** Histochemical changes in the liver of freshwater fish, *Rasbora daniconius*, exposed to paper mill effluent. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 2009; 21(2): 71-78.
- Pearson A Budin M, Brocks JJ.** Phylogenetic and biochemical evidence for sterol synthesis in the bacterium *Gemmata obscuriglobus*. *Proceeding of the National Accademy of Science of the United State of America*. 2004; 101(11): 15352-15357.
- Pesatori AC, Garte S, Popov T, Georgieva T, Panev T, Bonzini M, Consonni D, Carugno M, Goldstein BD, Taioli E, Fontana V, Stagi E, Bertazzi PA, Merlo DF.** Early effects of low benzene exposure on blood cell counts in Bulgarian petrochemical workers. *Medicina del Lavoro*. 2009; 100(2): 83-90.
- Peretti N.** Conséquences métaboliques des malabsorptions lipidiques: apports de l'étude des hypcholestérolémies familiales. *Oilseeds and fats, Crops and Lipids*. 2012; 19(4): 228-231.
- Picot A, Montandon F.** Écotoxicochimie des hydrocarbures. Paris: Lavoisier. 2013; 407p.
- Pigneret M, Mermillod-Blondin F, Volatier L, Romestaing C, Maire E, Adrien J, Guillard L, Roussel D, Hervant F.** Urban pollution of sediments: Impact on the physiology and burrowing activity of Tubificid worms and consequences on biogeochemical processes. *Science of the Total Environment*. 2016; 568: 196-207p.
- Pons-Rejraji H, Sion B, Saez F, Brugnon F.** Rôle des dérivés actifs de l'oxygène (DAO) sur les spermatozoïdes humains et infertilité masculine. *Gynécologie Obstétrique et Fertilité*. 2009; 37: 529-535p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- Prieto MJ, Marhuenda D, Roel J, Cardona A.** Free and total 2,5-hexanedione in biological monitoring of workers exposed to n-hexane in the shoe industry. *Toxicology Letters*. 2003; 145: 249-260p.
- Puyear RL, Fleckenstein KJ et al.** Use of reverse phase C-18 minicolumns for concentrating water-soluble hydrocarbons. *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*. 1981; 27: 790-797p.
- Rahman Q, Abidi P, Afaq F et al.** Glutathione redox system in oxidative lung injury. *Critical Reviews Toxicology*. 1999; 29(6): 543-568p.
- Ratziu V, Bellentani S, Cortez-Pinto H, Day C, Marchesini G.** A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *Journal of Hepatology*. 2010; 53: 372-384.
- Ridgway P, Nixonb TE, Leach JP.** Occupational exposure to organic solvents and long-term nervous system damage detectable by brain imaging, neurophysiology or histopathology. *Food and Chemical Toxicology*. 2003; 41: 153-187p.
- Rihani L.** L'effet du di-n-butyl phthalate (DBP) sur les paramètres hématologiques, biochimiques et les paramètres de la reproduction chez le lapin mâle Oryctolagus Cuniculus. Thèse de doctorat en reproduction et développement. Algérie. Université Badji Mokhtar -Annaba-. 2013; 124p.
- Russell HK.** A modification of Movat's pentachrome stain. *Archives of Pathology*. 1972; 94(2): 187-191.
- Rutchik JS.** Organic solvent neurotoxicity. Medscap. 2018.
<https://emedicine.medscape.com/article/1174981-overview>
- Sahu SC, Lowther DK, Jones SL.** Biochemical response of rat lung to inhalation n-hexane. *Toxicology Letters*. 1982; 12(1): 13-17.
- Sai L, Li X, Liu Y et al.** Effects of chlorpyrifos on reproductive toxicology of male rats. *Environ Toxicol*. 2013; 29: 1083–1088.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- Saihia A.** L'effet d'éthanol sur les paramètres hématologiques, biochimiques et les paramètres de la reproduction chez le lapin mâle Oryctolagus Cuniculus. Thèse de doctorat en reproduction et développement. Algérie. Université Badji Mokhtar - Annaba-. 2015; 158p.
- Sallmen M, Neto M, Mayan ON.** Reduced fertility among shoe manufacturing workers. Occup Environ. Med. 2008; 65(8): 518-524.
- Schmidt R, Schnoy N, Altenkirch H, Wagner HM.** Ultrastructural alteration of intrapulmonary nerves after exposure to organic solvents. A contribution to "sniffers disease". Respiration. 1984; 46(4): 362-369.
- Schnoy N, Schmidta R, Altenkirch H, Wagner HM.** Ultrastructural alteration of the alveolar epithelium after exposure to organic solvents. Respiration. 1982; 43(3): 221-231.
- Schultz A, Kaplan A et al.** Uric acid. Clin Chem the C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton. 1984; 1261-1266p.
- Scibior A, Zaporowska H, Ostrowski J, Banach A.** Combined effect of vanadium (V) and chromium (III) on lipid peroxidation in liver and kidney of rats. Chem Biol Interact. 2006; 159(3): 213-22.
- Sendur OF, Turan Y, Bal S, Gurgan A.** Toxic Neuropathy due to n-hexane: Report of Three Cases. Inhalation Toxicology. 2009; 21(3): 210-21p.
- Setchell BP, Galil KA.** Limitations imposed by testicular blood flow on the function of Leydig cells in rats in vivo. Australian Journal of Biological Sciences. 1983; 36: 285-293.
- Sharp CW, Rosenberg NL.** Inhalants. In: Lowinson JH, Ruiz P, Millman RB, Langrod JG. Substance Abuse. 4th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.. 2005; 336-366p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



Sheftel VO. Indirect food additives and polymers: Migration and toxicology. 1st Edition. USA: CRC Press. 2000; 740p.

Sigma-Aldrich. Safety data sheet. n-Hexane. 2017.

<https://www.weizmann.ac.il/safety/sites/safety/files/uploads/MSDS/Hexane.pdf>

Siracusa G, Bastone A, Sbraccia M, Settimi L, Mallozzi C, Monaco E, Frontali N. Effects of 2,5-hexanedione on the ovary and fertility. An experimental study in mice. Toxicology. 1992; 75(1): 39-50.

Smith GS, Hall RL, Walker RM. Applied Clinical Pathology in Preclinical Toxicology Testing. In: Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA. Handbook of toxicologic pathology. 2nd Edition. USA: Elsevier. 2002; 1: 123-156p.

Spencer PS, Schaumburg HH. Central-peripheral distal axonopathy-the pathology of dying-back polyneuropathies. Progress in Neuropathology. 1976; 3: 253-295.

Sprong RC, Winkelhuyzen-Janssen AM, Aarsman CJ, Van Oirschot JF, Van Der BT, Van Asbeck BS. Low-dose n-acetylcysteine protects rats against endotoxin-mediated oxidative stress, but high-dose increases mortality. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 1998; 157(4): 1283-1293.

Stramer BM, Mori R, Martin P. The inflammation-fibrosis link? a Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. J Invest Dermatol 127:1009-1017. Journal of Investigative Dermatology. 2007; 127(5): 1009-1017.

Sunil T, Pai MD. Peripheral neuropathy. In: Rakel D. Integrative medicine. 4th Edition. USA: Elsevier. 2018; 1072p.

Tarazona JV, Ramos-Peralonse MJ. Ecotoxicology. USA: Elsevir. 2014; 116-120p.

Teixeira LSG, Guimarães PRB, Pontes LAM, Almeida SQ, Assis JCR, Vianna RF. Studies on the effects of solvents on the physiochemical properties of automotive gasoline. Society of Petroleum Engineers. 2001; 1-6.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



Teixeira-Clerc F. Effets hépatiques de l'alcool. Cahier de Nutrition et de Diététique. 2015; 1-9.

Travis CC, Quillen JL, Arms AD. Pharmacokinetics of benzene. Toxicology and Applied Pharmacology. 1990; 102(3): 400-420.

Tsuruta H. Percutaneous absorption of organic solvents. On the penetration rates of hydrophobic solvents through the excised rat skin. Industrial Health. 1982; 20(4): 335-345.

Uboh FE, Eteng MU, Ebong PE, Umoh IB. Vitamins A and E reverse gasoline vapors-induced hematotoxicity and weight loss in female rats. Toxicology and Industrial Health. 2010; 26(9): 559-566.

Ukolova AI, Kessenikha ED, Radilova AS, Goncharo NV. Toxicometabolomics: Identification of markers of chronic exposure to low doses of aliphatic hydrocarbons. Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 2017; 53(1): 25-36.

United States Environmental Protection Agency (US EPA). Toxicological review of n-hexane. Integrated risk information system. 2005; 141p.
https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/toxreviews/0486tr.pdf

United States Environmental Protection Agency (US EPA). n-Hexane. 2019.
<https://comptox.epa.gov/dashboard/dsstoxdb/results?search=DTXSID0021917#details>

Upreti RK, Shanker R. 2,5-hexanedione-induced immunomodulatory effect in mice. Environmental Research. 1987; 43(1): 48-59.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- Uzma N, Khaja MS, Kumar BS, Aziz N, David MA, Reddy VD.** Impact of organic solvents and environmental pollutants on the physiological function in petrol filling workers. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2008; 5(3): 139-146.
- Valentine WM, Amarnath V, Graham DG, Anthony DC.** Covalent cross-linking of erythrocytes spectrin by carbon disulphide in vivo. Toxicology and Applied Pharmacology. 1993; 121: 71-77.
- Van Engelen, JG, Rebel-de Haan W, Opdam, JJ et al.** Effect of coexposure to methyl ethyl ketone (MEK) on n-hexane toxicokinetics in human volunteers. Toxicol Appl Pharmacol. 1997; 144:385-395.
- Vermeulen R, Lan Q, Li G, Rappaport SM, Kim S, van Wendel de Joode B, Shen M, Bohong X, Smith MT, Zhang L, Yin S, Rothman N.** Assessment of dermal exposure to benzene and toluene in shoe manufacturing by activated carbon cloth patches. Journal of Environmental Monitoring. 2006; 8: 1143-1148.
- Veulemans H, Van VE, Janssens H, Masschelein R, Leplat A.** Experimental human exposure to n-hexane. Study of the respiratory uptake and elimination, and of n-hexane concentrations in peripheral venous blood. International Archives of Occupational and Environmental Health. 1982; 49(3): 251-263.
- Viaene M, Vermeir G, Godderis L.** Sleep disturbances and occupational exposure to solvents. Sleep Medicine Reviews. 2009; 13: 235-243.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- Walker R, Flanagan RJ, Lennard MS, Mills GA, Walker V.** Solid-phase microextraction: Investigation of the metabolism of substances that may be abused by inhalation. *Journal of Chromatographic Science*. 2006; 44: 387-393.
- Wang FI, Kuo ML, Shun CT, Ma YC, Wang JD, Ueng TH.** Chronic toxicity of a mixture of chlorinated alkanes and alkenes in ICR mice. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 2015; 65: 279-291.
- Weckbecker G, Cory JG.** Activité ribonucléotide réductase et croissance in vitro de cellules L1210 de leucémie de souris appauvries en glutathion. *Cancer Letters*. 1988; 40(3): 257-264.
- Wenger C et al. Kaplan A et al.** Alkaline phosphatase. *Clin Chem the C.V. Mosby Co. St Louis*. Toronto. Princeton. 1984; 1094-1098p.
- Wexler P.** Encyclopedia of toxicology. 3rd Edition. USA: Academic Press. 2014; 5220p.
- Winder C, Stacey NH.** Occupational toxicology. 2nd Edition. USA: CRC Press. 2004; 624p.
- Wirth MD, Sevoyan M, Hofseth L, Shivappa N, Hurley TG, Hébert JR.** The dietary inflammatory index is associated with elevated white blood cell counts in the national health and nutrition examination survey. *Brain Behavior Immunity*. 2017; 69: 296-303.
- World Health Organization (WHO).** Environmental Health Criteria No 122. n-Hexane health and safety guide. 1991.
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/41640/9241510595_en.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Xiao G, Pan C, Cai Y, Lin H, Fu Z.** Effect of benzene, toluene, xylene on the semen quality and the function of accessory gonad of exposed workers. *Industrial Health*. 2001; 39(2): 206-210.
- Zhang L, Tang X, Rothman N, Vermeulen R, Ji Z, Shen M, Qiu C, Guo W, Liu S, Reiss B, Beane FL, Ge Y, Hubbard AE, Hua M, Blair A, Galvan N, Ruan X, Alter BP, Xin KX, Li S, Moore LE, Kim S, Xie Y, Hayes RB, Azuma M, Hauptmann M,**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



Xiong J, Stewart P, Li L, Rappaport SM , Hanlin Huang H , Fraumeni JF, Smith MT, Lan Q. Occupational exposure to formaldehyde, hematotoxicity and leukemia-specific chromosome changes in cultured myeloid progenitor cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010; 19(1): 80-88.

ANNEXE

Annexe

❖ Préparation des solutions:

- Paramètres biochimiques
- Paramètres biochimiques hépatiques
- L'aspartate aminotransférase

Réactifs :

Réactif 1: Tampon	TRIS pH 7,8	80 mM/L
	L-Aspartate	200 mM/L
Réactif 2: Substrat	NADH	0,18 mM/L
	Lactate déshydrogénase (LDH)	800 U/L
	Malate déshydrogénase (MDH)	600 U/L
	α -céto glutarate	12 mM/L

Réactif de travail : dissoudre un comprimé de R2 dans un flacon de R1 et mélanger légèrement. Ce réactif est stable pendant 21 jours à 2-8°C ou 72 heures à 15-25°C.

Procédure :

Réactif de travail (mL)	1,0
Echantillon (μL)	100

Mélanger et incuber pendant 1 minute. Lire l'absorbance initiale (A) de l'échantillon à 340 nm. Lancer le chronomètre et lire les absorbances pendant 3 minutes à une minute d'intervalle.

Calcul :

$$\text{Activité de ASAT (U/L)} = \Delta A/\text{min} \times 1750$$

ANNEXE

➤ L'alanine aminotransférase

Réactifs :

Réactif 1: Tampon	TRIS pH 7,8	100 mM/L
	L-Alanine	500 mM/L
Réactif 2: Substrat	NADH	0,18 mM/L
	Lactate déshydrogénase (LDH)	1200 U/L
	α -cétoglutarate	15 mM/L

Réactif de travail : dissoudre un comprimé de R2 dans un flacon de R1 et mélanger légèrement. Ce réactif est stable pendant 21 jours à 2-8°C ou 72 heures à 15-25°C.

Procédure :

Réactif de travail (mL)	1,0
Echantillon (μL)	100

Mélanger et incuber pendant 1 minute. Lire l'absorbance initiale (A) de l'échantillon à 340 nm. Lancer le chronomètre et lire les absorbances pendant 3 minutes à une minute d'intervalle.

Calcul :

$$\text{Activité de ALAT (U/L)} = \Delta A/\text{min} \times 1750$$

➤ La phosphatase alcaline

Réactifs :

Réactif 1: Tampon	Diéthanolamine (DEA) pH 10,4	1 mM/L
	Chloride de magnésium	0,5 mM/L
Réactif 2: Substrat	p-Nitophénylphosphate (pNPP)	10 mM/L

Réactif de travail : dissoudre un comprimé de R2 dans un flacon de R1 et mélanger légèrement. Ce réactif est stable pendant 21 jours à 2-8°C ou 72 heures à 15-25°C.

Procédure :

ANNEXE

Réactif de travail (mL)	1,2
Echantillon (μL)	20

Mélanger et incuber pendant 1 minute. Lire l'absorbance initiale (A) de l'échantillon à 405 nm. Lancer le chronomètre et lire les absorbances pendant une minute à 3 minute d'intervalle.

Calcul :

$$\text{Activité de PAL (U/L)} = \Delta A/\text{min} \times 3300$$

➤ Le glucose

Procédure:

Le lecteur se met en marche automatiquement par simple insertion de la bandelette réactive.

- Le symbole d'une goutte clignote.
- Déposer la goutte de sang sur la zone de dépôt orange de la bandelette.
- La mesure est terminée au bout de 5 secondes environ, et le résultat apparaît à l'écran.
La glycémie est donnée en g/L.

➤ Les protéines totales

Réactifs :

Réactif : Biuret	Tartrate de potassium de sodium Iodure de sodium Iodure de potassium Sulfate de cuivre (II) Hydroxyde de sodium	15 mmol/L 100 mmol/L 5 mmol/L 5 mmol/L 1000 mmol/L
Protéine Totale CAL	Patron primaire d'albumine bovine	7 g/Dl

Procédure :

ANNEXE

	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif (mL)	1,0	1,0	1,0
Étalon (μL)	/	25	/
Échantillon (μL)	/	/	25

Mélanger et incuber pendant 5 minutes à 37°C ou 10 minutes à température ambiante (15-25°C). Lire l'absorbance initiale (A) de l'échantillon à 540 nm de l'étalon et l'échantillon contre le Blanc du réactif. La couleur est stable au moins 30 minutes.

Calcul:

$$\text{Protéine totales (g/dL)} = \frac{(A) \text{ Echantillon} - (A) \text{ Blanc}}{(A) \text{ Étalon} - (A) \text{ Blanc}} \times 7 \text{ (Conc. Étalon)}$$

- Paramètres biochimiques rénaux
- La créatinine

Réactifs :

Réactif 1: Réactif picrique	GOOD pH 7,5	17,5 mM/L
Réactif 2: Réactif alcalin	Hydroxyde de sodium	0,29 mM/L
Créatinine calibreur	Créatinine aqueuse (standard)	2 mg/Dl

Réactif de travail: mélanger un volume de réactif 1 avec un volume de réactif 2. Le réactif du travail est stable pendant 10 jours à 15-25°C.

Procédure :

	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif (mL)	1,0	1,0	1,0
Étalon (μL)	/	100	/
Échantillon (μL)	/	/	100

Mélanger, déclencher le chronomètre. Lire à 492 nm la densité optique (A1) après 30 secondes et la densité optique (A2) après 90 secondes.

Calcul :

$$\text{Créatinine (mg/dL)} = \frac{(\Delta A) \text{ Echantillon} - (\Delta A) \text{ Blanc}}{(\Delta A) \text{ Étalon} - (\Delta A) \text{ Blanc}} \times 2 \text{ (Conc. Étalon)}$$

$$(\Delta A) = A2 - A1$$

➤ L'urée

Le dosage de l'urée a été réalisé par la méthode enzymatique colorimétrique selon la fiche technique du Kit Spinréact.

Réactifs :

Réactif 1: Tampon	Phosphate PH 6,7	50 mM/L
	EDTA	2 mM/L
	Salicylate de sodium	400 mM/L
	Nitroprussiate de sodium	10 mM/L
Réactif 2: NaClO	Hypochlorite de sodium (NaClO)	140 mM/L
	Hydroxyde de sodium	150 mM/L
Réactif 3: Enzymes	Uréase	3000 U/L
Urée calibreur	Urée aqueuse (standard)	50 g/dL

Réactif de travail: dissoudre un comprimé de R3 dans un flacon de R1 et mélanger légèrement.

Procédure :

	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif (mL)	1,0	1,0	1,0
Étalon (µL)	/	10	/
Échantillon (µL)	/	/	10

Mélanger, déclencher le chronomètre. Lire à 492 nm la densité optique (A1) après 30 secondes et la densité optique (A2) après 90 secondes.

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

ANNEXE

	Blanc	Etalon	Echantillon
R2 (mL)	1,0	1,0	1,0

Mélanger et incuber 10 min à température ambiante (15-25°C). Lire l'absorbance (A) des échantillons et de l'étalon, contre le blanc à 580 nm. La couleur est stable pendant 30 minutes à 15°-25°C.

Calcul :

$$\text{Urée (mg/dL)} = \frac{(A) \text{ Echantillon}}{(A) \text{ Etalon}} \times 50 \text{ (Concentration du calibrateur)}$$

➤ L'acide urique

Réactifs :

Réactif 1: Tampon	Phosphate pH 7,4	50 mM/L
	2-4 dichlorophénol sulfonate (DCPS)	4 mM/L
Réactif 2: Enzymes	Uricase Peroxydase (POD)	60 U/L
	Ascorbate oxydase	660 U/L
	4-Aminophénazone (4-AP)	200 U/L
		1 mM/L
Acide urique calibreur	Acide urique aqueux (standard)	6 mg/dL

Réactif de travail: dissoudre le contenu d'une bouteille de R2 dans un flacon de R1. Mélanger légèrement. La couleur est stable pendant 30 minutes.

Procédure :

	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif (mL)	1,0	1,0	1,0
Étalon (μL)	/	25	/
Échantillon (μL)	/	/	25

Mélanger et incuber 10 min à 15-25°C. Lire l'absorbance (A) des échantillons et de l'étalon, contre le blanc à 520 nm.

ANNEXE

Calcul :

$$\text{Acide Urique (mg/dL)} = \frac{(A) \text{ Echantillon}}{(A) \text{ Etalon}} \times 6 \text{ (Concentration du calibrateur)}$$

- Paramètres biochimiques lipidiques
- Le cholestérol

Réactifs :

Réactif 1: Tampon	PIPES pH 6,9			90 mM/L
	Phénol			26 mM/L
Réactif 2: Enzymes	Cholestérol	estérase	(CHE)	300 U/L
	Cholestérol oxydase (CHOD)			300 U/L
	Peroxydase (POD)			1250 U/L
	4-Aminophénazone (4-AP)			0,4 mM/L
Cholestérol calibreur	Cholestérol aqueux (standard)			200 mg/dL

Réactif de travail: dissoudre le contenu d'une bouteille de R2 dans un flacon de R1 et mélanger légèrement. Ce réactif est stable pendant 4 mois à 2-8°C ou 40 jours à 15-25°C.

Procédure :

	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif (mL)	1,0	1,0	1,0
Étalon (µL)	/	10	/
Échantillon (µL)	/	/	10

Mélanger et incuber 10 min à température ambiante. Lire l'absorbance (A) des échantillons et de l'étalon, contre le blanc à 505 nm. La couleur est stable pendant 60 minutes.

Calcul :

$$\text{Cholestérol (mg/dL)} = \frac{(A) \text{ Echantillon}}{(A) \text{ Etalon}} \times 200 \text{ (Concentration du calibrateur)}$$

➤ Les triglycérides

Réactifs :

Réactif 1: Tampon	GOOD pH 7,5	50 mM/L
	p-Chlorophénol	2 mM/L
Réactif 2: Enzymes	Lipoprotéine lipase (LPL)	150000 U/L
	Glycérol kinase (GK)	500 U/L
	Glycérol-3-oxydase (GPO)	2500 U/L
	Peroxydase (POD)	440 U/L
	4-Aminophénazone (4-AP)	0,1 mM/L
	ATP	0,1 mM/L
Triglycérides calibreur	Triglycérides aqueux (standard)	200 mg/dL

Réactif de travail: dissoudre le contenu d'une bouteille de R2 dans un flacon de R1 et mélanger légèrement. Ce réactif est stable pendant 6 semaines à 2-8°C ou une semaine à 15-25°C.

Procédure :

	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif (mL)	1,0	1,0	1,0
Étalon (µL)	/	10	/
Échantillon (µL)	/	/	10

Mélanger et incuber 10 min à température ambiante. Lire l'absorbance (A) des échantillons et de l'étalon, contre le blanc à 505 nm. La couleur est stable pendant 30 minutes.

Calcul :

$$\text{Triglycérides (mg/dL)} = \frac{(A) \text{ Echantillon}}{(A) \text{ Etalon}} \times 200 \text{ (Concentration du calibrateur)}$$

➤ Paramètres biochimiques tissulaires

ANNEXE

➤ Dosage du glutathion

Solution EDTA (0,02 M):

Dissoudre 5,613 g EDTA dans 750 mL d'eau distillée.

Solution DTNB (0,01 M):

Dissoudre 200 mg DTNB dans 50 mL de méthanol absolu.

Solution d'acide salicylique (0,25 %):

Dissoudre 250 mg d'acide salicylique dans 100 mL d'eau distillée.

Dosage des protéines :

Solution BSA (1 mg/mL) :

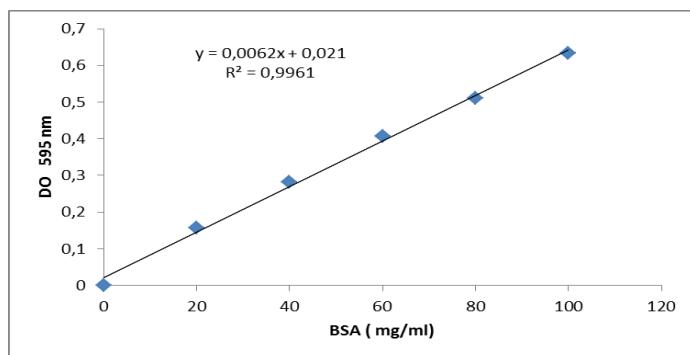
Dissoudre 5 mg BSA dans 5 mL d'eau distillée.

Réactif de Bradford :

Dissoudre 100 mg de bleu de Coomassie (G 250) dans 50 mL d'éthanol (95 %). Agiter par l'agitateur pendant 2 heures, puis ajouter 100 mL d'acide orthophosphorique (85 %) et 850 mL d'eau distillée (pour obtenir 1 L de solution). Ce réactif doit être filtré puis conserver pendant 1 mois au maximum à une température de 4 °C et à l'abri de la lumière.

Réalisation de la gamme d'étalonnage des protéines :

BSA (mL)	0	20	40	60	80	100
DO à 595 nm	0	0,158	0,281	0,407	0,51	0,633



➤ **Dosage du malondialdéhyde**

Solution TCA (20 %) :

Dissoudre 20 g de TCA dans 100 mL d'eau distillée.

Solution Tris :

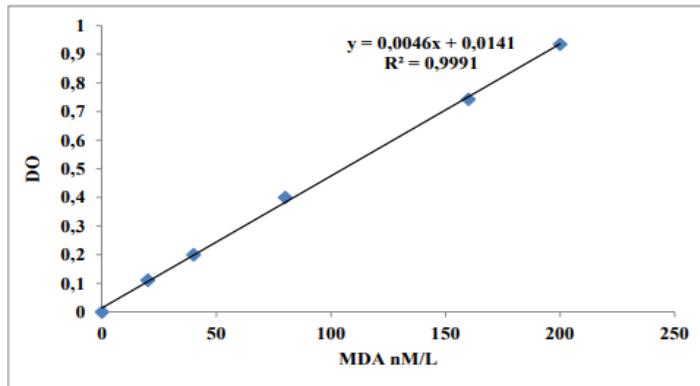
Dissoudre 0,15 g de tris dans 50 mL d'eau distillée.

Solution TBA (0,67 %) :

Dissoudre 0,33 g de TBA dans 50 mL de la solution tris.

Réalisation de la gamme d'étalonnage du MDA :

1,1,3,3-tetraetoxyp propane (mL)	0	20	40	80	160	200
DO à 530 nm	0	0,158	0,281	0,407	0,51	0,633



- Paramètres hormonaux mâle
- L'hormone lutéinisante

Réactif :

	CAL0 REF DCE002 / 0906-0	1mL
	CAL1 REF DCE002 / 0907-0	1mL
Réactif 1 : Six Calibreurs	CAL2 REF DCE002 / 0908-0	1mL
	CAL3 REF DCE002 / 0909-0	1mL
	CAL4 REF DCE002 / 0910-0	1mL
	CAL5 REF DCE002 / 0911-0	1mL
Réactif 2 : Contrôle	DCE045 / 0903-0	1mL
Réactif 3 : Conjugué	LH anti-peroxydase de raifort (HRP) et la LH anti-biotinylée	12mL
Réactif 4 : Microplaqué	Streptavidine adsorbée dans la microplaqué revêtue	1 cassable microplaque
Réactif 5 : Substrat de TMB	H2O2-TMB 0,26g/L	15mL
Réactif 6 : Solution d'arrêt	Acide sulfurique 0,15 mol/L	15mL
Réactif 7 : Solution de lavage concentrée	NaCl 45g /L; Tween-20 55g/L	20mL
	50X	

Conserver les réactifs à 2,8 ° C, à l'abri de la lumière. Ouvrir l'enveloppe de réactif 4 (microplaqué enrobée) uniquement après l'avoir ramenée à température ambiante et la

ANNEXE

refermer immédiatement après avoir retiré les bandelettes à utiliser; Une fois ouvert, il est stable jusqu'à la date d'expiration du kit.

Procédure :

Les calibreurs (C0-C5) sont prêts à l'emploi, calibrés par rapport à la référence internationale WHO 1st IRP 68/40 et ont les concentrations suivantes:

C0	C1	C2	C3	C4	C5
0mIU/mL	5mIU/mL	25 mIU/mL	50mIU/mL	100mIU/mL	200mIU/mL

Avant utilisation, diluer le contenu de chaque flacon de solution de lavage concentrée (50X) avec de l'eau distillée jusqu'à un volume de 1000mL. Pour préparer de plus petits volumes, respecter le taux de dilution de 1:50. La solution de lavage diluée est stable à 2 ° C pendant au moins 30 jours.

Echantillons / Contrôle	/	20µL
Calibreurs C0-C5	20µL	/
Conjugué	100µL	100µL

Incuber à température ambiante (22 ° C) pendant 1 heure. Retirer le contenu de chaque puits et laver les puits 3 fois avec 300µL de solution de lavage diluée.

Substrat TMB	100µL	100µL	100µL
--------------	-------	-------	-------

Incuber à température ambiante (22 ° C) pendant 15 minutes dans l'obscurité.

Solution d'arrêt	100µL	100µL	100µL
------------------	-------	-------	-------

Agiter la microplaquette doucement. Lire l'absorbance (E) à 450 nm contre une longueur d'onde de référence de 620-630 nm ou contre Blank dans les 5 minutes.

Calcul :

Des concentrations exprimées en mIU/mL.

➤ **La testostérone****Réactif :**

Réactif 1 : cinq Calibreurs	DCE002/0206-0	1mL
	DCE002/0207-0	1mL
	DCE002/0208-0	1mL
	DCE002/0209-0	1mL
	DCE002/0210-0	1mL
Réactif 2 : Contrôle	DCE045/0203-0	1mL
Réactif 3 : Conjugué	Testostérone conjuguée à la peroxydase de raifort (HRP)	12mL
Réactif 4 : Microplaques	Anticorps anti-testostérone adsorbé sur microplaques cassables	1 microplaque revêtue
Réactif 5 : Substrat de TMB	H2O2-TMB 0,26 g/L	15mL
Réactif 6 : Solution d'arrêt	Acide sulfurique 0,15 mol/L	15mL
Réactif 7 : Solution de lavage	Tampon phosphate 0,2 M pH 7,4 concentrée 10X	50mL

Stocker tous les réactifs à 28 ° C dans l'obscurité. Ouvrez le sac du réactif 4 (Microplaques enrobées) uniquement lorsqu'il est à température ambiante et fermez-le immédiatement après utilisation. Une fois ouverte, la microplaque est stable jusqu'à la date de péremption du kit.

Procédure :

Les calibreurs sont prêts à l'emploi et ont la concentration suivante de testostérone:

C0	C1	C2	C3	C4
0ng/mL	0.2ng/mL	1ng/mL	4ng/mL	16ng/mL

Diluer le contenu de chaque flacon de la «solution de lavage concentrée 10X avec de l'eau distillée jusqu'à un volume final de 500 mL avant utilisation. Pour les plus petits volumes, respecter le taux de dilution de 1:10. La solution de lavage diluée est stable pendant 30 jours à 2-8 ° C. Dans une solution de lavage concentrée est possible d'observer la présence de

ANNEXE

cristaux; dans ce cas, mélanger à température ambiante jusqu'à dissolution complète des cristaux; pour plus de précision, diluer la totalité de la solution de lavage concentrée à 500 ml, en prenant soin de transférer complètement les cristaux, puis mélanger jusqu'à dissolution complète des cristaux..

Echantillons / Contrôle	/	25µL
Calibreurs C0-C4	25µL	/
Conjugué	100µL	100µL

Incuber à 37°C pendant 1 heure. Retirez le contenu de chaque puits. Laver les puits 3 fois avec 300µL de solution de lavage diluée.

Substrat TMB	100µL	100µL	100µL
Incuber à température ambiante (22-28 ° C) pendant 15 minutes dans l'obscurité.			
Solution d'arrêt	100µL	100µL	100µL

Agiter la microplaqué doucement. Lire l'absorbance (E) à 450 nm contre une longueur d'onde de référence de 620-630 nm ou contre le blanc dans les 5 minutes.

Calcul :

Des concentrations exprimées en ng/mL.

➤ Étude histologique

Fixation des échantillons :

Après la décapitation des rats, les organes prélevés (foie, rein, poumon, testicule) doivent être conservés immédiatement dans un fixateur (Formol 10%) qui a pour but fixé les structures cellulaires tout en conservant leurs morphologies. Le Formol permet de durcir l'échantillon sans l'abîmer. Des coupes transversales ont été faites par l'anatomopathologiste et placées dans des cassettes spéciales à parois trouées afin de permettre le passage des liquides au cours des étapes qui suivent.

Déshydratation des échantillons :

ANNEXE

Comme la paraffine n'est pas miscible à l'eau, les échantillons doivent être alors complètement déshydratés avant l'inclusion dans la paraffine. Cette dernière n'est pas non plus soluble dans l'alcool utilisé pour la déshydratation, on assiste donc à une substitution par le xylène. La déshydratation se fait grâce à un automate qui fait immerger les échantillons dans des bains d'éthanol à concentration croissante (70, 95 et 100 %), puis dans des bains de xylène qui constitue un agent éclaircissant donnant au tissu une certaine transparence. Cette étape est réalisée par un automate qui permet le passage automatique et progressif des échantillons.

Inclusion :

L'inclusion consiste à mettre les pièces dans des bains de paraffine liquide. Les tissus étant maintenus et imbibés de paraffine, ils sont placés dans des moules appelés les barres de Leuckart, puis sont remplis de paraffine. Ceci facilite la confection des coupes. Les blocs de paraffine ainsi formés vont être coupés par un microtome, permettant de réaliser des tranches de section de 2 à 5 µm. Les rubans de paraffine obtenus sont étalés sur des lames porte-objet, puis déplissées et fixées par l'eau. Les lames sont ensuite séchées dans une étuve à 100°C pendant 1 heure.

Procédure coloration :

Le déparaffinage des échantillons s'effectue à l'aide du xylène pour que les colorants puissent y pénétrer. Ensuite, on fait passer les lames dans des bains d'alcool de degré décroissant (100%, 90%, 70%) pour la réhydratation. Le rinçage est réalisé avec l'eau du robinet. Puis, mettre les lames dans l'hématoxyline pendant 10 à 20 minutes, celui ci colore les noyaux en violet. Après rinçage les lames sont mises dans l'eau ammoniaquée (25 ml d'eau + 2 gouttes d'ammoniac), et un deuxième rinçage, puis on utilise l'éosine 1% pendant 10 minutes pour mettre en évidence le cytoplasme coloré en rose. Après un autre rinçage, on fait passer les lames dans des bains d'alcool d'ordre croissant (90%, 100%) pour les déshydrater.

Enfin, nous plaçons les lames dans un mélange de 50% de xylène + 50% d'acétone, puis les lames sont mises dans deux bacs de xylène.

Montage :

Le montage se fait pour protéger des échantillons des différents tissus par des lamelles en verre après la coloration, en mettant deux gouttes d'E kitt (colle).

➤ **Étude histochimique**

Procédure de coloration trichrome de Masson :

- Déparaffiner dans des bains de xylène.
- Hydrater par des bains d'alcool à 100%, 90% et 70%.
- Rincer à l'eau distillée.
- Colorer avec l'hématoxyline pendant 4 minutes.
- Rincer à l'eau de robinet pendant 4 minutes après à l'eau distillée.
- Colorer avec le Fuchsine Ponceau pendant 5 minutes.
- Rincer à l'eau distillée.
- Placer dans l'acide phosphomolybdique 1% pendant 2 minutes.
- Placer dans le vert lumière pendant 3 minutes, puis dans l'acide acétique 0,5% pendant 5 minutes.
- Passer dans l'alcool absolu, après dans le toluène.

Procédure coloration PAS :

- Déparaffiner dans des bains de xylène.
- Hydrater par des bains d'alcool à 100%, 90% et 70%.
- Rincer à l'eau distillée.
- Placer dans l'acide acétique 0,5% pendant 30 minutes puis rincer à l'eau distillée.
- Colorer avec le réactif de Schiff pendant 30 à 45 minutes puis rincer à l'eau de robinet.
- Colorer avec l'hématoxyline pendant 1 à 2 minutes.
- Passer au carbonate de lithium ou bien eau ammoniacale.
- Rincer à l'eau de robinet, puis dans l'alcool absolu et le toluène.

Procédure coloration pentachrome Movat :

ANNEXE

- Déparaffiner et hydrater dans DI H₂O.
- Tache dans le bleu d'alcian pendant 20 minutes.
- Laver dans l'eau du robinet pendant 5 minutes.
- Placer les lames dans l'alcool alcalin pendant exactement 1 heure.
- Laver à l'eau courante pendant 10 minutes.
- Rincer à DI H₂O.
- Tache dans une solution d'hématoxyline pendant 12 à 15 minutes.
- Rincer dans plusieurs changements de DI H₂O.
- Différencier soigneusement, chaque lame individuelle, en plongeant 2 ou 3 fois dans du chlorure ferrique aqueux à 2%; rincer dans DI H₂O et vérifier sous microscope.
- Placer les lames dans du thiosulfate de sodium pendant 1 minute.
- Laver dans de l'eau courante pendant 5 minutes; rincer dans DI H₂O.
- Tache en crocein scarlat-acide fuchsin pendant 1 à 3 minutes, en fonction de la rougeur désirée.
- Rincez dans plusieurs changements de DI H₂O.
- Rincer à l'eau acide acétique à 0,5%.
- Placer les lames dans de l'acide phosphotungstique aqueux à 5%, 2 changements de 5 minutes chacun.
- Rincer à l'eau acide acétique à 0,5%.
- Rincer dans 3 changements d'alcool absolu.
- Teindre au safran pendant 15 minutes.
- Rincer dans 3 changements d'alcool absolu frais et 2 changements de xylène et monter dans le support de montage.