

Estimation du niveau de connaissance et Analyse toxicologique chez des manipulateurs de pesticides organophosphorés exposés au Fénitrothion dans la région de Sfax, en Tunisie

[Estimated level of knowledge and Toxicological analysis in organophosphate pesticide handlers in the region of Sfax]

Asma Ghorbel¹, Houda LAZREG AREF³, Mounira Hajjeji Darouiche², Neila Moalla Nouri¹, Mohamed Laarbi Masmoudi², and Feriele Messadi Akrou¹

¹Hygiene Laboratory, Hedi Chaker Hospital, Sfax, Tunisia

²Working Medicine Service, Hedi Chaker Hospital, Sfax, Tunisia

³Biochemistry Laboratory, LR12ES05 Nutrition- Functional Foods and vascular Health, Faculty of Medicine, Monastir, Tunisia

Copyright © 2016 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: Organophosphate pesticides, commonly used in the occupational field, represent a real threat to human health and the environment. The aim of our study is to estimate the level of knowledge of the subjects exposed to these products and assess their toxicity biomarkers. We conducted a prospective descriptive survey about 26 pesticide handlers who checked in occupational medicine service in Hedi Chaker university hospital. A questionnaire allowed us to gather information about the level of workers education and their practices of organophosphate pesticides specifically Fenitrothion. Three samples of blood and urine tests were collected before and after exposure and after rest in hygiene service. Each blood sample was used for the determination of serum and erythrocyte cholinesterase activity. The detection of organophosphate pesticides was made in the urine by GC/MS. A low level of knowledge of the manipulators for pesticides (global score was 20.46) was found. Reference globular cholinesterase activities were all below the usual values. Serum cholinesterase activities were decreased by 30 to 50% in 48% of patients and more than 50% in 30% of the subjects. These activities have recovered after rest. The detection of pesticides (fenitrothion) was positive in 4 workers. Biological assays show impregnation of manipulators by organophosphate. Their kinetic reflects the exposure of subjects with the pesticide. These data were correlated with the low level of workers knowledge ($p=0.01$).

KEYWORDS: Organophosphorus, Pesticides, Cholinesterases, fenitrothion, site esterasique, biomarqueurs.

RÉSUMÉ: Les pesticides organophosphorés (OP), fréquemment utilisés en milieu professionnel, représentent une menace réelle pour la santé de l'Homme et pour l'environnement. L'objectif de notre étude est d'estimer le niveau de connaissance des sujets exposés à ces produits et évaluer leur toxicité par des marqueurs biologiques. Nous avons mené une enquête prospective descriptive à propos de 26 manipulateurs de pesticides ayant consulté au service de médecine de travail au CHU Hédi Chaker de Sfax. Un questionnaire nous a permis de collecter les informations concernant le niveau d'instruction des ouvriers ainsi que leur manipulation de pesticides organophosphorés et spécifiquement le fénitrothion. Trois prélèvements de sang et d'urine ont été réalisés, avant et après exposition puis après repos. Chaque prélèvement sanguin a servi pour le dosage des activités cholinestérasiques sérique et globulaire. La détection de pesticides organophosphorés a été faite au niveau des urines à l'aide de la GC/MS. Le niveau de connaissance des manipulateurs concernant les pesticides était faible (score global moyen : 20,46 sur 43). Les activités cholinestérasiques globulaires de référence étaient toutes inférieures aux

valeurs usuelles. Les activités cholinestérasiques sériques ont baissé de 30 à 50% chez 48% des sujets et de plus de 50% chez 30% des sujets. Ces activités se sont rétablies après repos. Leur cinétique reflète bien l'exposition des sujets avec le pesticide. La détection de pesticides (fénirothion) était positive chez 4 travailleurs. Ces données ont été corrélées avec le faible niveau de connaissances des travailleurs ($p=0,01$).

MOTS-CLEFS: organophosphores, pesticides, cholinesterases, esterasic site, biomarqueurs.

1 INTRODUCTION

Les pesticides constituent une arme à double tranchant. Ils peuvent causer un préjudice à des espèces non-cibles dont l'espèce humaine. Quand un pesticide est actif, il peut être aussi dangereux pour ses manipulateurs que pour l'environnement. Les travailleurs sont souvent portés à croire que les responsables de la préparation ou de l'application de pesticides peuvent être exposés de façon significative [1]. Au niveau mondial, les premières dispositions législatives sur le contrôle des pesticides datent de 1943 (loi n°525 du 2 novembre 1943). En France, le décret d'application (décret 74/682 du 1er août 1974) a créé «la commission d'étude de la toxicité des produits antiparasitaires à usage agricole et assimilés». En Tunisie, le secteur des pesticides est très pauvre en matière de réglementation. Le seul texte existant est le décret n° 2002-3469 qui fixe simplement les modalités et les conditions d'obtention de l'homologation et de l'autorisation de vente des pesticides [2], [3].

Aujourd'hui, la surveillance des sujets exposés aux pesticides OP est possible et réalisable par l'étude des biomarqueurs d'effet notamment l'AchS et l'AchE et par la détection des biomarqueurs d'exposition par le dépistage de ces produits et/ou de leurs métabolites dans le milieu biologique. Mais, il existe une large variation interindividuelle de l'activité cholinestérasique rendant difficile la détection d'une dépression précoce. Notre étude est descriptive portant sur 26 sujets exposés aux pesticides. La finalité de notre étude est d'estimer le niveau de connaissance des manipulateurs de pesticides sur ces produits toxiques et évaluer le niveau d'exposition de ces travailleurs aux pesticides OP, particulièrement le fénirothion. Celui-ci est un insecticide organophosphoré contre les moustiques adultes dit adulticide ou imagocide. Sa cible principale est le site estérasique de l'acétylcholinestérase prenant la place du substrat naturel. Il s'agit d'une véritable lésion biochimique puisque l'organophosphoré vient occuper, en le phosphorylant, le site estérasique de l'enzyme, s'opposant ainsi à l'hydrolyse physiologique de l'acétylcholine en choline et en acide acétique [4]. En effet, les OP, très lipophiles, franchissent aisément toutes les barrières biologiques et se fixent de façon covalente aux cholinestérasas de la jonction synaptique des fibres du système nerveux central, non dosables en pratique courante. Ils se fixent également aux acétylcholinestérasas érythrocytaires (Ache-Er) et aux pseudo-cholinestérasas ou « butyrylcholinestérasas » du foie et du plasma. Ces dernières sont très sensibles mais peu spécifiques, renseignant généralement sur une exposition à un inhibiteur des cholinestérasas. Même si une faible quantité franchit la barrière hématoencéphalique, elle suffit pour inhiber en quelques secondes pratiquement toute l'activité acétylcholinestérasique (AchE) [5].

Notre étude s'intéresse aux pesticides organophosphorés (OP), particulièrement le fénirothion. L'étude effectuée par Maroni et al en 2000 sur un homme et une femme produisant industriellement le fénirothion et par conséquent exposés par voie aérienne à cet insecticide a démontré la présence du métabolite du fénirothion, le 3-méthyl-4-nitrophénol au niveau de leurs urines [6]. Ce métabolite a également été retrouvé dans les urines de 11 personnes de la population générale ayant administré par voie orale le fénirothion, dans une étude élaborée par Hernandez et al. en 2004 [7].

L'objectif de cette étude est d'évaluer le niveau d'imprégnation du fénirothion chez des travailleurs exposés professionnellement par voie aérienne. Le niveau de connaissance des travailleurs mis en présence de ce pesticide OP ses conditions d'utilisation ont été également estimées.

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 RECRUTEMENT DES SUJETS

Il s'agit d'une enquête prospective transversale descriptive réalisée au cours du premier trimestre de l'année 2014 sur des manipulateurs de pesticides ayant déjà consulté au service de médecine de travail au Centre Hospitalo-universitaire (CHU) Hédi Chaker de Sfax. 26 personnes ont participé à cette étude.

2.2 RECUEIL DES DONNÉES

Un questionnaire a été élaboré pour collecter les caractéristiques démographiques et les conditions d'utilisation des pesticides de ces travailleurs. Il comprend des questions de type fermé et orienté sur les conditions et l'organisation du travail ainsi que sur les symptômes fonctionnels d'intoxication aiguë et chronique aux pesticides. Le questionnaire a été rempli par le médecin du travail en se basant sur les « dires » de l'ouvrier confirmés ou infirmés par leur surveillant présent sur les lieux du travail. La première partie est relative à l'identité du travailleur, sa catégorie, son histoire professionnelle, aux antécédents médicaux et aux accidents d'origine toxique. La deuxième partie est une série de 44 questions auxquelles le sujet interrogé répond par oui ou non. Si la réponse est affirmative, la note de 1 est attribuée. Sinon, la note sera 0. Ainsi, nous avons réussi à obtenir un score global noté sur 43 et à évaluer le niveau de connaissance de ces manipulateurs de pesticides. Ce score global représente le total de 5 sous scores. Le premier score, noté sur 4, est relatif à la formation et l'information des travailleurs concernant la nature des pesticides manipulés et leurs effets sur la santé.

2.3 RECUEIL DES PRÉLÈVEMENTS BIOLOGIQUES

Trois types de prélèvement ont été effectués en début et en fin de poste au sein du Laboratoire Régional d'Hygiène du CHU Hédi Chaker de Sfax (unité de toxicologie) : du sang veineux sur tube sec (sérum), du sang veineux sur tube hépariné (plasma) et des urines dans un pot en plastique non stérile et sans conservateur. Le 1^{er} prélèvement a été effectué avant exposition (lundi matin). Chaque ouvrier était exposé au Fénitrothion lundi après-midi et mardi matin. Le 2^{ème} prélèvement a été réalisé juste après exposition au Fénitrothion (mardi en fin de matinée). Le 3^{ème} prélèvement a été fait après repos (vendredi ou samedi matin suivant la disponibilité du travailleur). Ces prélèvements ont été rendus systématiques pour chaque travailleur manipulant des pesticides et consultant au service de Médecine de Travail.

2.4 ANALYSES EFFECTUÉES

La recherche des biomarqueurs d'exposition à savoir le fénitrothion et/ou de son métabolite au niveau des urines et la détermination des biomarqueurs d'effets notamment les cholinestérases sériques (AChS) et globulaires ou érythrocytaires (AChE) pouvant être des tests de suivi réglementé chez ces travailleurs ont été réalisées. Le dosage de l'AChS a été établi grâce au sérum prélevé. Le sang hépariné a servi pour le dosage de l'AChE. Quant aux urines, elles ont servi comme matrice biologique pour la recherche du fénitrothion et/ou de son métabolite. Ces analyses ont été effectuées au sein du laboratoire d'hygiène de Sfax.

2.4.1 DOSAGE DE L'ACTIVITÉ CHOLINESTÉRASIQUE GLOBULAIRE

Le dosage de l'AChE a été réalisé selon la méthode colorimétrique d'Ellman et al. [8]. L'hémolysat a été préparé en mélangeant 100 µL de sang hépariné avec 6 mL d'eau distillée et laissant reposer pendant 30 minutes à température ambiante. 3 mL de DTNB et 100 µL de PTCl ont été mélangés dans un tube en verre à 37° auxquels ont été ajoutés 100 µL de l'hémolysat. Le mélange obtenu a été mis dans un bain marie à 37° pendant 10 minutes. 1 mL d'hyamine a été ensuite ajouté pour stopper la réaction. Chaque échantillon a été fait en double et avait un blanc correspondant où la PTCl a été remplacée par de l'eau distillée. La lecture était faite par spectrophotométrie entre 5 à 10 minutes à une longueur d'onde égale à 440 nm.

Les réactifs utilisés ont été préparés au laboratoire.

L'activité enzymatique a été calculée selon la formule :

$$\text{AChE} = (A_E - A_B) * 17,87$$

A_E : Absorbance de l'échantillon

A_B : Absorbance du blanc

$$17,87 : \frac{\text{dilution}}{\text{molaire absorbance}} * \text{temps de la réaction} * \text{largeur de la cuve} = \frac{2562}{14340} * 10 * 10$$

Valeurs usuelles : [7,66-9,48 µmol/mL d'érythrocytes]

2.4.2 DOSAGE DE L'ACTIVITÉ CHOLINESTÉRASIQUE SÉRIQUE

La butyrylthiocholine est hydrolysée en thiocholine et acide butyrique sous l'action des cholinestérases. La thiocholine réagit avec DTNB pour former l'acide 5-mercapto-2-nitrobenzoïque (5-MNBA) dont la coloration, mesurée par spectrophotométrie, est proportionnelle à l'activité enzymatique du cholinestérase sérique dans l'échantillon. Dans une cuvette : 1,5 mL de Réactif de Travail préparé par dissolution du réactif 2 (DTNB 0.25 M et butyrylthiocholine 7 M) dans 2.5 mL de réactif 1 (Tampon Phosphate pH 7.7 50 M) ont été pipetés puis 10 μ l du sérum à tester. Le spectrophotomètre a été ajusté à zéro avec de l'air. Les lectures des absorbances ont été effectuées à 0, 30, 60 et 90 secondes à une longueur d'onde 405 nm. La différence des absorbances ainsi que la moyenne de ces différences d'absorbance (ΔA) ont été déterminées.

Les réactifs utilisés ont été préparés au laboratoire.

L'ACS a été calculé selon cette formule :

$$\Delta A * 22710 = U/L$$

ΔA : Différence d'absorbance / 30 s

Une unité internationale (UI) correspond à la somme des enzymes qui transforment 1 μ mol de substrat par minute, dans des conditions standard. L'activité est exprimée en unités par litre d'échantillon (U/L). Valeurs usuelles : [3000-9000 U/L].

2.4.3 DETECTION DU FENITROTHION OU DE SON METABOLITE DANS LES URINES DES MANIPULATEURS

2.4.3.1 EXTRACTION

Le but de l'extraction est d'isoler une molécule ou un groupe de molécules d'une matrice (sang, urine, cheveux...). Pour cela, les propriétés physico-chimiques des molécules à chercher doivent être connues. 1 ml de sulfate d'ammonium (Fluka Garantie, 132,4 g/Mol) a été ajouté à 2 mL de l'échantillon (urines) prélevé. L'extraction a été réalisée avec 4 mL du mélange éthanol (Carlo Erba, 46,07 g/Mol) /hexane (Sigma Aldrich pour HPLC \geq 97% GC) 1 :3 en ayant recours à une agitation mécanique. La phase organique a été récupérée dans un tube conique contenant du Florisil (Merk) puis répartie dans des tubes à vis en verre mis au bain-marie (Memmert) jusqu'à évaporation à sec. Après refroidissement, 2 mL d'éthylacétate (Sigma Aldrich, 88,11 g/Mol) ont été ajoutés au résidu.

2.4.3.2 CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE

A partir d'un composé minéral ou organique, des ions gazeux caractéristiques du composé sont produits. Ces ions ont été séparés (par GC HP 6890) et détectés (par MS HP 5973) pour identifier et/ou quantifier le composé. Nous avons eu recours à la méthode analytique répondant aux conditions analytiques suivantes : colonne HP5-MS, Injection (type :splitless, température :270°C, volume :2 μ L), débit du gaz (Hélium) :1mL/mn, programme thermique : température initiale :100°C pendant 2 mn, 100°C à 200°C (20°C/mn), 200°C à 245°C (10°C/mn), 245°C à 280°C (4°C/mn), 280°C à 310°C (30°C/mn), une température de détection de 150°C et un mode d'acquisition SCAN. La limite de détection de cette méthode était de 0.3 μ g/L et le taux de recouvrement était de 80 à 120%.

2.5 ANALYSE STATISTIQUE

L'analyse statistique descriptive a été effectuée selon les techniques traditionnelles : les fréquences, les moyennes, les écarts-types et les extrêmes ont tous été calculés.

Dans un deuxième temps, une étude plus approfondie a été réalisée en se basant sur des analyses uni et multi-variées. La corrélation entre les variables quantitatives étudiées a été déterminée par le test χ^2 de Pearson.

3 RESULTATS

3.1 PARTIE DESCRIPTIVE

3.1.1 DONNÉES SOCIO-PROFESSIONNELLES

Tableau 1 : Caractéristiques socio-professionnelles des travailleurs

	Effectifs	Pourcentages (%)
Niveau d'instruction		
primaire	15	58%
secondaire	9	34%
universitaire	2	8%
Tabac		
Fumeurs	11	42%
anciens fumeurs	7	27%
non fumeurs	8	31%
Alcool		
Non buveurs	24	92%
Buveurs occasionnels	2	8%
Etablissement employeur		
Municipaliés	18	68%
Hôpital	4	16%
Compagnie privée	4	16%
Durée d'exposition (années)		
<1	1	4%
[1-9]	5	19%
[10-19]	11	42%
[20-29]	8	31%
>30	1	4%
Type de contact avec les pesticides		
Stockage	12	46%
Préparation	23	88%
Pulvérisation	25	96 %
Nettoyage du matériel	14	54%
Disposal	7	27%
Modes d'utilisation des pesticides		
Pulvérisation	3	12
Pulvérisation et poudrage	22	88
Nombre d'heures de travail par jour		
5H	3	12%
6H	2	8%
7H	4	16%
8H	16	60%
9H	1	4%
Fréquence d'exposition		
quotidiennement	24	92%
1 jour / 2	1	4%
1semaine / 2	1	4%

Vingt-six sujets exposés aux pesticides ont été interrogés. Ils étaient âgés de $45,42 \pm 9.12$ ans avec une prédominance masculine (sex-ratio de 25). Une minorité (8 %) avait un niveau d'éducation universitaire. Plus des deux tiers (69%) fumaient, tandis que la majorité (96 %) n'était pas des consommateurs d'alcool (voir tableau I). La durée d'exposition au fénitrothion a

varié de 1 mois à 32 ans avec une moyenne de $15,73 \pm 8,4$ ans. Dans notre étude, différents types de contact avec les pesticides ont été constatés. Le seul pesticide organophosphoré utilisé était le fénitrothion. La majorité des sujets travaillaient quotidiennement 8 heures. 7 sujets (27%) ont déjà été victime d'un accident lié aux pesticides. Ces accidents étaient de type évanouissement, projection accidentelle de pesticides (voir tableau 1). 7 sujets sur 22 utilisaient plusieurs produits simultanément en les mélangeant. Les modes d'utilisation des pesticides étaient la pulvérisation et le poudrage (Voir tableau 1).

Le tableau 2 illustre les moyens de prévention utilisés chez les manipulateurs qui en disposaient.

Tableau 2: utilisation des moyens de prévention chez les manipulateurs qui disposent de ces moyens

Moyens de prévention	Disponibilité	Utilisation	% d'utilisation en fonction de la disponibilité
Gants	22	15	68,18
Lunettes	4	0	0
Masque	15	3	20
Combinaison	3	3	100

Certains manipulateurs de pesticides (38.5%) ont bénéficié d'une surveillance médicale et/ou biologique. D'autres n'ont jamais eu de suivi. Malgré leur disponibilité, les moyens de protection n'étaient pas toujours utilisés. (Tableau 2)

Le tableau 3 résume le degré de respect des conditions de travail dans notre série. Les manifestations cliniques les plus fréquentes étaient les irritations cutanées.

Tableau 3 : Respect des conditions de travail

Respect des conditions de travail	Nombre	%
Ne pas fumer, manger, boire sur les lieux du travail (durant la manipulation des pesticides)	16	61,53
Se laver les mains après chaque manipulation	16	61,53
Se laver les mains avant de manger	22	84,61
Prendre une douche après l'application	14	53,84
Se changer les vêtements de ville par les vêtements de travail avant chaque manipulation	21	80,76

La figure 1 résume les fréquences des principales manifestations cliniques chez les manipulateurs de pesticides après utilisation.

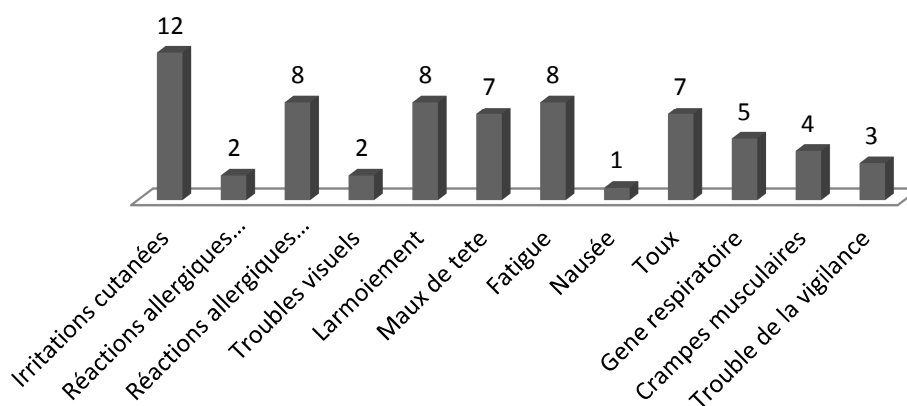


Figure1 : Fréquence des signes cliniques chez les manipulateurs après utilisation de pesticides

La formation et l'information des sujets exposés ont été évaluées par un score allant de 0 à 4. La figure 2 montre la répartition de ces sujets en fonction du score obtenu. 14 individus (54%) ont eu un score supérieur ou égal à 2. 5 individus ont obtenu un score de 0 et seulement 3 individus ont atteint le score maximal de 4.

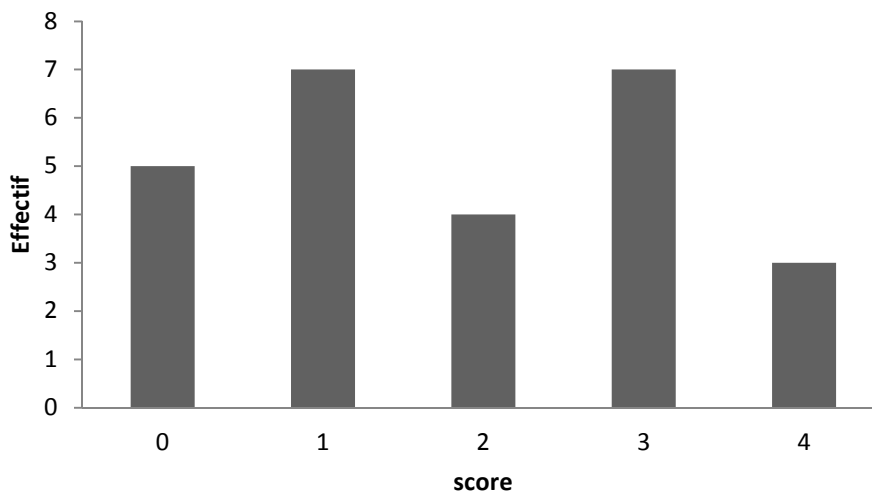


Figure 2 : Score de la formation et l'information des travailleurs

3.2 EVALUATION BIOLOGIQUE DE L'EXPOSITION AUX PESTICIDES OP

3.2.1 ACTIVITÉ CHOLINESTÉRASIQUE

3.2.1.1 ACTIVITÉ CHOLINESTÉRASIQUE SÉRIQUE

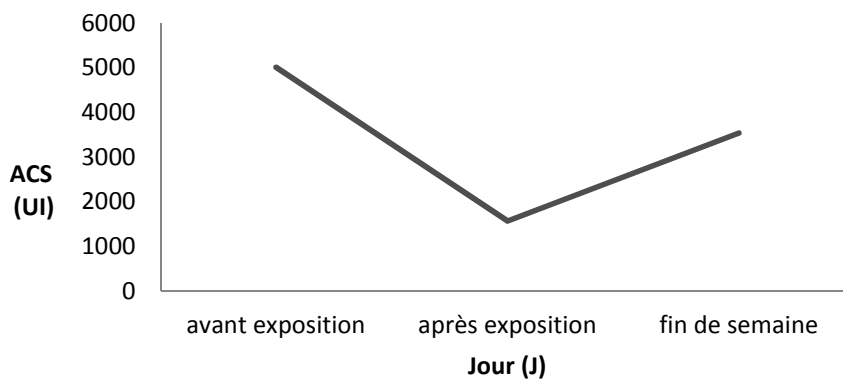


Figure 3 : Evolution de l'AChS (U/L) chez ces sujets pendant toute la semaine

La figure 3 montre la même allure pour tous ces sujets interrogés. Avant exposition, l'AChS de référence a été notée. Ces valeurs de référence étaient inférieures aux valeurs usuelles [3000-9000 U/L] chez 6 sujets. Après exposition aux OP, l'activité a baissé significativement par rapport à la valeur référence chez tous les sujets. En fin de semaine, elle était de nouveau rétablie. Le pourcentage de baisse de l'AChS après exposition a été évalué par rapport aux activités avant exposition références (voir figure 4).

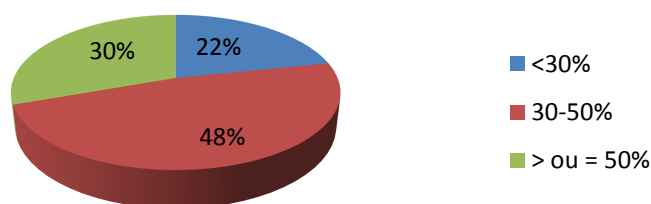


Figure 4: Pourcentage de baisse de l'AChS

3.2.1.2 ACTIVITÉ CHOLINESTÉRASIQUE GLOBULAIRE

Les AChE trouvées avant exposition étaient toutes inférieures aux valeurs normales [7,66-9,48 μ moles/mL d'érythrocytes]. La figure 5 classe les sujets en fonction du pourcentage de baisse de l'AChE par rapport à la normale.

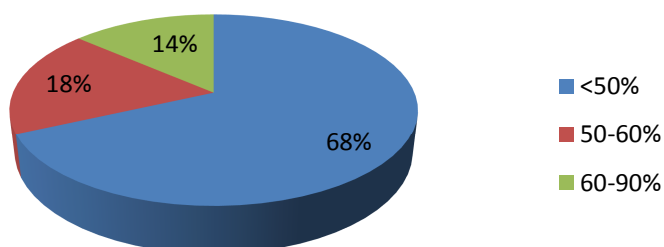


Figure 5: Pourcentage de baisse de l'AChE

3.3 DETECTION DES PESTICIDES ORGANOPHOSPHORES AU NIVEAU DES URINES

Les pesticides OP (Dioxathion et fénitrothion) ont été recherchées au niveau des urines des 26 sujets. Le fénitrothion a été retrouvé chez 4 travailleurs.

3.4 ETUDE ANALYTIQUE

3.4.1 SCORE DE LA FORMATION ET L'INFORMATION

Le niveau de connaissance était corrélé significativement avec le score de la formation et l'information des travailleurs sur les pesticides. 66.7% des sujets qui n'avaient pas obtenu la moyenne à ce score avaient un niveau scolaire primaire et les 33.3% restants avaient un niveau scolaire secondaire. Les sujets qui avaient un niveau « Baccalauréat » et plus ont eu cette moyenne. Le tableau 4 résume les corrélations étudiées.

Tableau 4 : Etude analytique du score de la formation des travailleurs

Corrélation significative		Corrélation non significative	
Paramètre	p	Paramètre	P
Ancienneté au travail	0,046	Age	0,51
Niveau d'instruction	0,007	Nombre d'heures de travail	0,099
		Etablissement employeur	0,132
		Antécédents professionnels	0,211
		Antécédents personnels	0,142
		Rythme d'exposition	0,726

3.5 ACTIVITE CHOLINESTERASIQUE SERIQUE AU 1^{ER} PRELEVEMENT

L'ACHs au 1^{er} prélèvement était corrélée d'une manière statistiquement significative avec l'âge ($p=0,008$). Elle dépendait aussi de l'établissement employeur ($p=0,002$). En effet, nous avons noté que cette activité était en dessous des valeurs normales surtout lorsqu'il s'agissait des agents de la municipalité. De plus, la corrélation était significative avec le niveau d'instruction des manipulateurs ($p=0,003$) et le score de formation et d'information des travailleurs ($p=0,01$). Cependant, la corrélation était non significative avec l'ancienneté au travail, le nombre d'heures de travail, les antécédents professionnels, les antécédents personnels, le tabac, l'alcool, le rythme d'exposition, le score des moyens de protection, le score de la gestion des incidents et le score global.

3.6 BAISSSE DE L'ACTIVITE CHOLINESTERASIQUE SERIQUE AU 2EME PRELEVEMENT

Aucune corrélation significative n'a pu être établie entre la baisse de l'ACHs et l'âge, l'ancienneté au travail, l'établissement employeur, les antécédents professionnels, les antécédents personnels, le tabac, l'alcool, le rythme d'exposition, le score de la formation et l'information et le score global. Le nombre d'heures de travail a été corrélé significativement à la baisse AChS avec $p=0,035$.

3.7 BAISSSE DE L'ACTIVITE CHOLINESTERASIQUE GLOBULAIRE AU 1^{ER} PRELEVEMENT

Nous avons trouvé une corrélation significative entre la baisse de l'ACHe et le rythme d'exposition ($p=0,032$) : pour un rythme d'exposition quotidien, la baisse était plus importante. De même, cette baisse était corrélée significativement avec le score de la formation et l'information ($p=0,021$) : 75% des sujets ayant des activités indiquant un faible niveau d'intoxication aux OP et 100% des sujets ayant des activités indiquant une intoxication modérée n'avaient pas tous la moyenne au score de la formation et l'information. D'autres paramètres ont été étudiés mais ils n'ont révélé aucune corrélation significative avec cette baisse de l'ACHe. Nous citons : l'âge, l'ancienneté au travail, le nombre d'heure de travail, le niveau d'instruction, l'établissement employeur, les antécédents professionnels, les antécédents personnels, le tabac, l'alcool et le score global.

3.8 DETECTION DU FENITROTHION DANS LES URINES

Le fénitrothion était le seul pesticide détecté par GC/MS à l'aide d'une bibliothèque de spectre au niveau du deuxième prélèvement (après exposition) de quatre travailleurs.

La présence du fénitrothion dans les urines était corrélée significativement avec la baisse de l'ACHe ($p=0,002$) après exposition et avec l'ancienneté au travail ($p=0,024$). Elle était statistiquement non corrélée avec la baisse de l'ACHs après exposition, l'âge, les signes cliniques et les différents autres paramètres.

4 DISCUSSION

Les données socio-professionnelles de nos sujets étaient proches de celles de la littérature. Notre population était à prédominance masculine comme c'était le cas des études de Bolognesi et al. [9]. La moyenne d'âge était aux alentours de 45 ans proches de celle observée par Tinoco [10]. Les mêmes manifestations cliniques observées dans notre série ont été rapportés par Bolognesi et al. [9]. L'utilisation des moyens de protection dans la littérature était aussi partielle ou inexistante (voir tableau 5). La majorité des sujets exposés étaient des fumeurs. Bolognesi et al. [9] ont noté dans leur série 25,4% de fumeurs.

Tableau 5 : Comparaison entre les caractéristiques socio

	Sexe	Age moyen (ans)	Manifestations cliniques	Moyens de protection
Bolognesi 1993	Prédominance masculine	-	Céphalées, brûlures oculaires, nausées, vertiges	-
Tinoco 1998	Exclusivement masculin	40	0	Non
Farahat 2010	-	38	-	Utilisation partielle
Notre étude 2014	Prédominance masculine	45,42	Irritations cutanées, toux, larmoiement	Utilisation partielle

Aucun cas d'alcoolisme chronique n'a été signalé. Le pourcentage des buveurs d'alcool était très faible. Garcia et al. [11] ont relevé dans leur étude sur les intoxications aux pesticides, 4 cas sur 122 avaient un taux d'éthanol sanguin supérieur à 1g/L. Nous avons relevé quelques antécédents médicaux des travailleurs comme le diabète qui peut être un facteur influant sur le degré de toxicité des pesticides [12]. Dans notre étude, les pesticides utilisés appartenaient aux familles des OP et pyréthroïdes. 19 sujets ont affirmé qu'ils utilisaient un seul pesticide, l'emballage de l'insecticide « Fénitrothion » a été ramené au service de médecine de travail et son utilisation a été vérifiée par le médecin sur les lieux du travail, alors que les 7 autres sujets utilisaient plusieurs produits phytosanitaires en mélange sans vérifier leur compatibilité. Garcia et al. [11] ont rapporté dans leur étude que la majorité des sujets étudiés utilisait un seul pesticide (alors que 11,47% utilisaient deux pesticides ou plus). Les pesticides utilisés étaient les : OP (40,16%), les carbamates pesticides (Cb) (33,02%) et les organochlorés (OC) (12,75%). Tinoco et al. [10] ont rapporté que 80% de la population étudiée utilisaient les OP, 12,3% manipulaient les pyréthroïdes et 11% travaillaient avec les Cb et les OC. D'après Bolognesi et al. [9], la population « travailleurs » utilisait un mélange de plusieurs pesticides (OP, Cb et autres). Dhalla et Sharma [13] dans leur étude sur les pulvérisateurs Pendjabis ont utilisé des OC, OP, Cb, composés pyréthroïdes et plusieurs composés inorganiques. Sur 183 travailleurs, 126 ont été exposés à un seul pesticide. Néanmoins, 44 sujets utilisaient une combinaison de deux pesticides et six pulvérisateurs ont été exposés à un mélange de trois pesticides. Dans la majorité des études, la plupart des sujets exposés utilisaient un mélange de différents pesticides. Ceci peut être expliqué par le fait que ces études sont en général faites sur des travailleurs agricoles qui, dans le traitement de leur récolte, sont obligés d'utiliser des insecticides contre les ravageurs insectes et des herbicides contre les mauvaises herbes. Dans notre série, il y a deux méthodes prédominantes d'utilisation : la pulvérisation et le poudrage. 88% des sujets interrogés utilisaient la pulvérisation et le poudrage. Les sujets restants pratiquaient uniquement la pulvérisation. En réalité, la méthode de poudrage se résume en un mélange du pesticide en poudre avec un solvant avant l'épandage de ce produit pesticide. Tinoco et al. [10] ont noté que 97% de leur population mélangeaient et pulvérisaient le produit. La majorité des études [12], [14] sont faites sur des agriculteurs qui mélangent eux même les pesticides et les appliquent sur les organismes nuisibles. Nous avons constaté que plus de 60% des sujets interrogés étaient en contact avec les pesticides 8 heures par jour. Bolognesi et al. [9] ont estimé que les sujets exposés travaillaient 8 heures par jour. Dans l'étude de Farahat et al. [15], la moyenne d'heure de travail était de 4-5h. Les travailleurs de coton égyptiens de l'étude de Farahat et al. [15] avaient un rythme d'exposition de 7 jours par semaine pendant la saison d'application. Nous avons noté dans notre série que 6 sujets (27%) ont déjà été victimes d'un accident lors de la manipulation des pesticides. D'après Tinoco et al. [10], 44% de sujets exposés utilisant l'OP, ont rapporté des accidents pendant la pulvérisation de ce produit souvent dus à une contamination accidentelle (60%) [10]. 27% de nos sujets interrogés ne tenaient pas compte des conditions atmosphériques lors de la pulvérisation. Dans l'étude de Roberts et al. [14], 97% de la population étudiée travaillaient pendant la période de chaleur et de froid et 71% travaillaient sous serre ou en milieu fermé mal ventilé. Brown et al. [16], dans leur enquête, ont relevé que 71% des sujets étudiés travaillaient pendant les jours de chaleur et de vent. L'ambiance de travail peut provoquer la survenue des accidents aux pesticides et peut amplifier la pénétration de ces produits dans l'organisme. Dans notre série, la disponibilité des moyens de protection a varié entre 11.5% pour les combinaisons jusqu'à 85% pour les gants en passant par les lunettes et les masques. De plus, nous avons noté un taux variable d'utilisation de ces moyens quand ceux-ci étaient disponibles. Brown et al. [16] ont remarqué dans leur étude que 37% des sujets n'utilisaient pas de moyens de protection et que 44% des sujets interrogés ont violé le code de sécurité. Tinoco et al. [10] ont relevé que la majorité des sujets interrogés ne portait pas de moyens de protection. Farahat et al. [15], dans leur étude ont trouvé que tous les travailleurs portaient un pantalon long, dont la moitié portait des chemises à manches longues et l'autre moitié portait des chemises à manches courtes. La différence la plus significative entre les catégories d'emploi était l'utilisation de chaussures. Ils ont observé que tous les ingénieurs portaient des chaussures, tandis

que trois des six applicateurs étaient pieds nus et deux autres portaient des sandales. Quant aux techniciens, deux portaient des chaussures et quatre portaient des sandales. Aucun des travailleurs ne portait des gants ou tout autre vêtement de protection, et aucun n'utilisait un respirateur. Certains participants portaient des masques de poussière, mais pas souvent sur le nez, et certains portaient des lunettes mais pas toujours de façon appropriée. Nos résultats se rapprochent donc de ceux des autres études. La plupart des ouvriers exposés aux pesticides n'utilisait pas les moyens de protection contre ces produits toxiques non seulement par faute de disponibilité mais aussi ceci est dû au niveau socio-culturel de ces travailleurs. Les conditions de travail chez certains de nos sujets interrogés ne sont pas satisfaisantes puisque ces derniers ne respectent pas correctement les règles d'hygiène et de sécurité. Tinoco et al. [10] ont noté que 94% des sujets mangeaient sur le lieu du travail (dans les champs traités). Une sensibilisation accrue des sujets exposés reste nécessaire pour préserver leur santé contre les effets inhérents aux poisons manipulés. L'interrogatoire des 26 sujets a montré qu'après l'utilisation des pesticides, un nombre de signes cliniques apparaît : irritations cutanées (46%), toux (27%), larmoiement (30%). Tinoco et al. [10] ont remarqué dans leur enquête une augmentation de la fréquence des symptômes avec céphalées (41,4%), brûlures oculaires (25,7%), vertiges (7,1%), nausées (5,7%). Au début, les symptômes de crise cholinergique sont dus à une stimulation excessive des récepteurs muscariniques et nicotiniques. L'apparition de la crise cholinergique aigue varie de quelques minutes à plusieurs heures après l'exposition [12].

Dans notre série, nous avons noté une prédominance des signes cliniques chez les sujets ayant un pourcentage de baisse de l'AChS important. (Cette prédominance est non significative). 54 % des sujets ont eu un score de formation et information supérieur ou égal à la moyenne. Ceci est expliqué par le fait que leur recrutement n'exige pas une formation particulière sur les produits manipulés. De plus, la notion de formation continue (séminaire, stage...) était absente dans tous les établissements étudiés. Les valeurs des AChS de référence appartenaient en général à l'intervalle [3000-9000 U/L]. Seuls 6 sujets avaient des valeurs inférieures à 3000. Ces taux faibles peuvent être dus au non respect des modalités de prélèvement des échantillons notamment l'abstinence à l'exposition avant le 1^{er} prélèvement. Il existe, de plus, une variabilité interindividuelle qui explique que dans la population occidentale 3 à 4 % des personnes présentent une activité AChS basse d'origine génétique. Certains individus sont même totalement dépourvus d'AChS sans présenter aucun symptôme [17]. Selon les pourcentages de baisse de l'AChS donnés par Jalady et al [18], nous pouvons classer notre population en 3 catégories : 48% des sujets avaient une baisse de l'activité entre 30 et 50% ce qui nécessite une surveillance, 30% des sujets avaient une baisse de plus de 50% témoignant d'une intoxication par les OP très probable et les 22% restant avaient une baisse d'activité non significative. Tous les sujets de notre série ont présenté une AChE inférieure aux valeurs normales. Ceci peut être expliqué par le phénomène dit du vieillissement. Une fois les ChE inhibées de façon irréversible, voire vieilles, le retour à la normale de l'activité AChE est lent : 100 à 120 jours environ (1 % par jour par renouvellement des érythrocytes) ; il est plus rapide pour l'AChS (environ 3-7 % par jour par synthèse hépatique ; deux à trois semaines environ seraient nécessaires pour une récupération totale) [19].

Maroni M et al [6] ont établi une classification des niveaux d'intoxication basée sur la baisse d'AChE en la corrélant aux signes cliniques et au pronostic vital [6]. Selon cette classification, nous avons noté que 18% des sujets avaient un faible niveau d'intoxication (baisse d'AChE de 50-60%) et 14% avaient une intoxication modérée (baisse d'AChE de 60-90%). Le dosage de l'AChE est l'indicateur le plus simple et le plus fiable de l'inhibition de l'AChE synaptique, et donc le meilleur reflet des effets sur la santé [18]. C'est le meilleur indicateur de l'exposition aux OP. Si l'activité de base de l'individu n'est pas connue, le dosage de l'activité AChE doit être réalisé en complément du dosage de l'activité AChS pour orienter le diagnostic vers l'exposition à un inhibiteur de cholinestérase (OP ou carbamate notamment) [17]. Lors de l'exposition chronique, l'activité de l'AChE peut atteindre des niveaux faibles sans symptômes apparents. Une faible exposition supplémentaire peut provoquer l'apparition des symptômes. Ils ne sont alors pas uniquement associés au niveau d'inhibition atteint, mais dépendent aussi de la rapidité avec laquelle la chute d'activité cholinestérasique s'est produite [17]. L'indicateur biologique d'exposition en France est une activité AChE qui a chuté jusqu'à 70 % de la valeur de référence individuelle (soit 30 % d'inhibition). C'est le niveau d'alarme signifiant une exposition possible à un inhibiteur des ChE [17]. Quand la chute de l'activité des ChE est rapide et massive, le dosage préalable de l'activité moyenne de base n'est pas indispensable pour le diagnostic de certitude d'une exposition [20]. La conduite à tenir est résumée dans la figure 7. La mesure de l'excrétion urinaire de la 3-méthyl-4-nitrophénol est un test sensible pour évaluer l'exposition au fénitrothion puisque ce métabolite se trouve chez les travailleurs exposés en l'absence d'inhibition CHE. Aucune inhibition CHE ne se produit jusqu'à des concentrations urinaires 3-méthyl-4-nitrophénol de 3 mg/l (valeur susceptible de correspondre à une dose orale de 7 mg) [6]. Dans notre étude, la détection des produits OP était corrélée significativement avec la baisse de l'AChE et non pas avec la baisse de l'AChS. Ceci confirme encore que l'AChE est le biomarqueur le plus fiable de l'exposition aux OP.

5 CONCLUSION

L'exposition aux OP était importante ce qui explique la nécessité du suivi médical et biologique régulier de ces ouvriers. Une grande proportion des sujets interrogés n'utilisait pas de moyens de protection. Vu que le risque d'intoxication par voie transcutanée augmente avec la chaleur et l'humidité et en tenant compte de notre climat méditerranéen, nous pouvons dire que dans la majorité des cas, les consignes de sécurité n'étaient pas respectées et le code de prévention était négligé. L'étude a souligné également la nécessité d'améliorer la surveillance et la protection des travailleurs exposés.

Ceci nous incite à une prise en charge multidisciplinaire basée sur :

- L'éducation et l'information des sujets exposés, des professionnels de la santé et des autorités locales sur le risque des pesticides, les moyens de prévention, la toxicité et les signes d'intoxication, les modalités de suivi et le traitement.
- La mise en place d'une législation qui régleme l'importation, la fabrication, le stockage et le transport, l'étiquetage et l'emballage, la vente et l'utilisation des pesticides et leur contrôle.
- Un examen d'embauche qui implique un examen clinique, un dosage biologique, un dosage de l'AChS, une radiographie du thorax, une exploration fonctionnelle respiratoire, et si possible un électromyogramme (EMG).
- Un suivi médical tous les ans avec un arrêt du travail en cas d'apparition de signes cliniques d'intoxication chronique ou baisse de l'AChS au-delà de 30% ou trouble à l'exploration fonctionnelle respiratoire ou à l'EMG.
- L'information du public sur les risques des pesticides et les modalités d'utilisation.
- La promotion de la recherche afin d'assurer une meilleure qualité des pesticides.
- L'interdiction de vente sur le marché des pesticides de classe I de toxicité (DL inférieure à 5mg/kg).
- L'application de toutes ces mesures devrait réduire au minimum les accidents et les risques pour la santé des personnes exposées aux pesticides.

REFERENCES

- [1] Saltmarsh, M., *Food safety: Pesticides*, Dans: J.A. Novotny, and D.J. Baer., Encyclopedia Human Nutrition, 2^{ème} éd. Elsevier, pp. 347-52, 2013.
- [2] Abdollahi, M., and Karami-Mohajeri S., *A comprehensive review on experimental and clinical findings in intermediate syndrome caused by organophosphate poisoning*: Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 258, no. 3, pp. 309-14, 2012.
- [3] Shahar, E., Bentur, Y., Bar-Joseph, G., Cahana, A., and Hershman, E., *Extrapyramidal parkinsonism complicating acute organophosphate insecticide poisoning*: Pediatric Neurology, vol. 33, no. 5, pp. 378-82, 2005.
- [4] Thabet, H., Brahmi, N., Kouraïchi, N., Elghord, H., and Amamou, M., *Organophosphorus poisoning*: New concepts. Réanimation, no. 18, pp. 633-9, 2009.
- [5] Worek, F., Koller, M., Thiermann, H., and Szincz, L., *Diagnostic aspects of organophosphate poisoning*: Toxicology, vol. 214, pp. 182-9, 2005.
- [6] Maroni, M., Colosio, C., Ferioli, A., and Fait, A., *Biological Monitoring of Pesticide Exposure: a review*. Introduction: Toxicology, vol.143, no. 1, pp. 1-118, 2000.
- [7] Hernandez, A.F., Gómez, M.A., Pena, G., Gil, F., Rodrigo, L., Villanueva, E., and Pla, A., *Effect of long-term Exposure to Pesticides on Plasma Esterases From Plastic Greenhouse Workers*: Journal of Toxicology Environmental Health PART A. vol. 67, NO. 14, PP. 1095-108, 2004.
- [8] Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V.Jr., and Feather-stone, R.M., *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*: Biochemical Pharmacology. Vol. 7, pp. 88-95, 1961.
- [9] Bolognesi, C., Parrini, M., Reggiardo G, Merlo F, Bonassi S. *Biomonitoring of workers exposed to pesticides*: International and Archives Occupational Environmental Health, vol. 65, no.1, pp. S185-S187, 1993.
- [10] Tinoco-Ojanguren, R., and Halperin, D.C., *Poverty, production, and health: inhibition of erythrocyte cholinesterase via occupational exposure to organophosphate insecticides in Chiapas*: Mexico. Archives of Environmental Health, vol. 53, no. 1, pp. 29-35, 1998.
- [11] Garcia-Repetto, R., Soria, M.L., Gimenez, M.P., Menendez, M., and Repetto, M., *Deaths from pesticide poisoning in Spain from 1991 to 1996*: Veterinary and Human Toxicology, vol. 40, no. 3, 166-8, 1998.
- [12] Chowdhary, S., Bhattacharyya, R., and Banerjee, D., *Acute organophosphorus poisoning*: Clinical Chimica Acta, vol. 431, pp. 66-76, 2014.
- [13] Dhalla, S.A., and Sharma, S., *Assessment of serum cholinesterase in rural Punjabi sprayers exposed to a mixture of pesticides*: Toxicology international, vol. 20, no. 2, pp. 154-9, 2013.

- [14] Roberts, D.M., Karunaratna, A., Buckley, N., Manuweera, G., Rezvi Sheriff, M.H., and Eddleston, M., *Influence of pesticide regulation on acute poisoning death in Sri Lanka*: Bull World Health Organ, vol. 81, pp. 789-98, 2003.
- [15] Farahat, F.M., Fenske, R.A., Olson, J.R., Galvin, K., Bonner, M.R., Rohlman, D.S., Farahat, T.M., Lein, P.J., and Anger, W.K., *Chlorpyrifos exposures in Egyptian cotton field workers*: NeuroToxicology, vol. 31, no. 3, pp. 297-304, 2010.
- [16] Brown, S.K., Ames, R.G., and Mengle, D.C., *Occupational illnesses from cholinesterase-inhibiting pesticides among agricultural applicators in California, 1982-1985*: Archives Environmental Health, vol. 44, no. 1, pp. 34-9, 1989.
- [17] Eddleston, M., Buckley, N.A., Eyer, P., and Dawson, A.H., *Management of acute organophosphorus pesticide poisoning*: Lancet, vol. 371, no. 9631, pp. 2170-1, 2008.
- [18] Jalady, A.M., and Dorandeu, F. *Intérêt du dosage des cholinestérasés dans le cadre des intoxications aux organophosphorés* : Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation, vol. 32, no. 12, pp. 856-62, 2013.
- [19] Testud, F., and Grillet, J.P., *Insecticides organophosphorés, carbamates, pyréthrinoïdes de synthèse et divers* : EMC Pathologie professionnelle et de l'environnement, pp. 1-24, 2007.
- [20] Testud, F., and Bougon, D., *Intoxication sévère par un insecticide organophosphoré après un accident de pulvérisation aérienne* : Archives des maladies professionnelles et de l'environnement, vol. 70, pp. 465-70, 2009.