

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université Abderrahmane MIRA de Bejaia**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Biologie Physico-Chimique**  
**Filière : Science biologique**  
**Option : Biochimie Fondamentale**



**Réf :.....**

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

**MASTER**

**Thème**

**Effet du chlorpyrifos sur la  
neurophysiologie murine**

Présenté par :

DAFRI Farid et LAHDIRI Nassim

Soutenu le : **24 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

M. GHIDOUCHE A.  
Melle. AIT-ALI D.  
M. BRIBI N.

MCB  
MCB  
MCB

Président  
Encadreur  
Examineur

**Année universitaire : 2017/2018**

## *Dédicaces*

*À tous ceux qui m'ont tous donné sans rien en retour*

*À mes parents, à qui aucune dédicace aussi parfaite et douce soit-elle, ne*

*saurait*

*Exprimer toute ma Reconnaissance et tout l'amour que je vous porte*

*À mon frère Abdelhafid*

*À ma sœur Nassima et son mari Djilali, sans oublier mon adorable petite*

*nièce Asiyah*

*À tous les membres de ma famille*

*À tous mes amis, en particulier Mourad, Lyes et Mehdi*

*À tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ma formation*

*À mon binôme Farid et à toute sa famille*

*Nassim*

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail :*

*Tout d'abord à mes parents qui m'ont encouragé et soutenu tout le long de mon  
parcours.*

*À mes frères et ma sœur (Rabah, Lamine et Chaïma).*

*À la famille D J A F R J.*

*À Laldja qui m'a toujours soutenu*

*À tous mes amis sans citer pour ne pas oublier.*

*À mon binôme Nassim et à toute sa famille.*

*Farid*

## *Remerciement*

*Nous tenons d'abord à remercier dieu le tout puissant, qui nous donner la force, le courage, la patience et la santé pour l'accomplissement de ce modeste travail*

*Nos remerciements les plus sincères vont à notre encadreur Mlle A.J. A.L.D. pour la qualité de son encadrement, sa confiance, sa rigueur qui nous beaucoup servie dans la réalisation de notre mémoire*

*Nous tenons également à remercier les membres de jury Mr B.R.G.B.J.N. et G.H.J.D.O.U.T.H.E.A. qui nous ont fait l'honneur d'examiner et d'évaluer notre travail*

*Nos vifs remerciements vont également à tout l'effectif du laboratoire de recherche de génie biologique du cancer, pour nous avoir accueillez parmi eux, pour leurs conseils, encouragements et pour nous avoir accompagnés tout au long de ce semestre*

**Liste des abréviations****Liste des figures****Liste des tableaux****Introduction ..... 1****Chapitre I : synthèse bibliographique**

<b>I.1</b>	<b>Généralités sur les pesticides</b> .....	<b>2</b>
I.1.1	Définition des pesticides .....	2
I.1.2	Classification des pesticides .....	2
I.1.2.1	Selon le risque sanitaire .....	2
I.1.3	Utilisation et voies de contamination .....	3
I.1.4	Effets des pesticides sur la santé humaine.....	4
<b>I.2</b>	<b>Chlorpyrifos</b> .....	<b>5</b>
I.2.1	Généralités sur le chlorpyrifos .....	5
I.2.2	Mécanismes moléculaires de toxicité du chlorpyrifos .....	6
I.2.2.1	Inhibition d'acétylcholine estérase.....	6
I.2.2.2	Stress oxydatif.....	6
I.2.2.3	Paraxonase PON1 .....	7
I.2.2.4	Effets non cholinergiques .....	8
I.2.3	Effets du chlorpyrifos sur le système nerveux .....	8
I.2.3.1	Maladies neurodégénératives .....	8
I.2.3.2	Troubles cognitifs .....	10
I.2.3.3	Troubles anxiodépressifs .....	10
I.2.4	Autres effets biologiques.....	10

**Chapitre II : Matériels et méthodes**

<b>II.1</b>	<b>Matériel</b> .....	<b>11</b>
II.1.1	Modèle animal .....	11
II.1.2	Matériel chimique .....	11
<b>II.2</b>	<b>Méthodes</b> .....	<b>11</b>
II.2.1	Préparation des solutions à injecter.....	11
II.2.2	Traitement des souris .....	11
II.2.3	Étude comportementale.....	12
II.2.3.1	Champ ouvert ( <i>Open field (OF)</i> ).....	12
II.2.3.1	Boite lumière/ obscurité ( <i>Dark/Light Box (DLB)</i> ).....	13

II.2.3.2	Labyrinthe en crois surélevée ( <i>ElevatedPlus Maze (EPM)</i> ) et Labyrinthe en zero surélevé ( <i>ZeroElevatedMaze (EZM)</i> ) .....	13
II.2.3.3	Piscine de Morris ( <i>Morris water maze (MWM)</i> ) .....	14
II.2.3.4	Labyrinthe de Barnes ( <i>Barnes Maze (BM)</i> ).....	15
II.2.3.5	Nage forcée ( <i>Forced Swim (FS)</i> ).....	16
II.2.4	Études histologiques .....	16
II.2.4.1	Fixation.....	16
II.2.4.2	Implantation et amincissement .....	16
II.2.4.3	Coloration .....	17
II.2.5	Analyse numérique .....	17
II.2.6	Analyse statistique .....	17

## **Chapitre III : Résultats**

<b>III.1</b>	<b>Étude comportementale.....</b>	<b>18</b>
III.1.1	Anxiété .....	18
III.1.1.1	<i>Openfield</i> .....	18
III.1.1.2	<i>Dark/light box</i> .....	19
III.1.1.3	<i>Elevated plus maze</i> .....	20
III.1.1.4	<i>Elevated zero maze</i> .....	22
III.1.2	Apprentissage et mémoire spatiale.....	23
III.1.2.1	<i>Morris water maze</i> .....	23
III.1.2.1	<i>Barnes maze</i> .....	23
III.1.3	Dépression .....	26
III.1.3.1	Nage forcée .....	26
<b>III.2</b>	<b>Étude morphologique (macroscopique).....</b>	<b>28</b>
<b>III.3</b>	<b>Étude histologique.....</b>	<b>29</b>
III.3.1	Cortex cérébral .....	29
III.3.2	Hippocampe .....	30
III.3.3	Lobe frontal .....	31

## **Chapitre IV : discussions**

<b>IV.1</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>31</b>
I.1.1	Anxiété.....	32
I.1.2	Apprentissage et mémoire spatiale .....	33
I.1.3	Dépression.....	34

<b>Conclusion &amp; Perspectives</b> .....	36
<b>Références bibliographiques</b> .....	38
<b>Annexes</b>	

## **Liste des abréviations**

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**CMR** : Cancérogène, Mutagène, Reprotoxique

**CPF** : Chlorpyrifos

**OPs** : Organophosphorés

**AChE** : Acétylcholine Estérase

**ACh** : Acétylcholine

**ROS** : Reactive Oxygen Species (dérivé réactif de l'oxygène)

**ERK**: Extracellular signal–regulated kinases

**PINK1**: PTEN-induced putative kinase 1

**NTE** : Neuropathy Target Esterase

**AChR- $\alpha$ 7** : Récepteur d'Acétylcholine

**NMDA** : Acide N-méthyl-D-aspartique

**SNP** : Système Nerveux Périphérique

**SNC** : Système Nerveux Central

**MP** : Maladie de Parkinson

**MA** : Maladie d'Alzheimer

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Principaux processus impliqués dans les transferts des pesticides responsables de leur dispersion dans l'environnement .....	4
<b>Figure 2</b> : Effets des pesticides sur les mitochondries et conséquence au niveau cellulaire .....	7
<b>Figure 3</b> : Mécanisme d'induction de la maladie de Parkinson par les pesticides .....	9
<b>Figure 4</b> : Photo originale montrant le dispositif photo originale montrant le dispositif <i>Open field</i> . .....	12
<b>Figure 5</b> : Photo originale montrant le dispositif photo originale montrant le dispositif <i>Dark/light box</i> . .....	13
<b>Figure 6</b> : Photo originale montrant le dispositif photo originale montrant le dispositif <i>Elevated Plus Maze EPM</i> et <i>Zero Elevated Maze EZM</i> . .....	14
<b>Figure 7</b> : Photo originale montrant le dispositif photo originale montrant le dispositif <i>Morris water maze MWM</i> . .....	15
<b>Figure 8</b> : Photo originale montrant le dispositif photo originale montrant le dispositif <i>Barnes maze</i> . .....	15
<b>Figure 9</b> : Photo originale montrant le dispositif photo originale montrant le dispositif <i>Forced swim</i> . .....	16
<b>Figure 10</b> : Evaluation de l'anxiété par le test d' <i>open field</i> . .....	18
<b>Figure 11</b> : Evaluation de l'anxiété par le test de <i>Dark/light box</i> . .....	20
<b>Figure 12</b> : Evaluation de l'anxiété par le test d' <i>Elevated plus maze</i> . .....	21
<b>Figure 13</b> : Evaluation de l'anxiété par le test d' <i>Elevated Zero maze</i> .....	22
<b>Figure 14</b> : Temps de latence pour trouver la plateforme dans le test de <i>Morris water maze</i> . .....	24
<b>Figure 15</b> : Temps de latence pour trouver la boîte d'évacuation dans le test de <i>Barnes maze</i> . .....	25
<b>Figure 16</b> : Evaluation du comportement dépressif par le test de nage forcée.....	26
<b>Figure 17</b> : Cerveaux de souris témoin et des souris traitées aux pesticides .....	28
<b>Figure 18</b> : Coupes histologique du cortex cérébral des souris témoins et souris traitées aux chlorpyrifos. ....	29
<b>Figure 19</b> : Coupes histologique de l'hippocampe des souris témoins et souris traitées aux chlorpyrifos. ....	30
<b>Figure 20</b> : Coupes histologique du front cérébral des souris témoins et souris traitées aux chlorpyrifos. ....	31

## **Liste des tableaux**

<b>Tableau I</b> : Classification des pesticides selon le risque (OMS, 2009).....	3
<b>Tableau II</b> : Maladies chroniques courantes provoquées par les pesticides. ....	5
<b>Tableau III</b> : Résultats moyens obtenus lors des tests d'évaluation de l'anxiété. ....	27

**Liste des annexes**

**Annexe 1 :** Propriétés physico-chimiques du chlorpyrifos

**Annexe 2 :** Instruments utilisés

**Annexe 3 :** Variations poids des souris males en fonction des injections

**Annexe 4 :** Variations poids des souris femelles en fonction des injections

**Annexe 5 :** étude histologique des foies de souris males.

**Annexe 6 :** étude histologique des testicules de souris males.

## **Introduction**

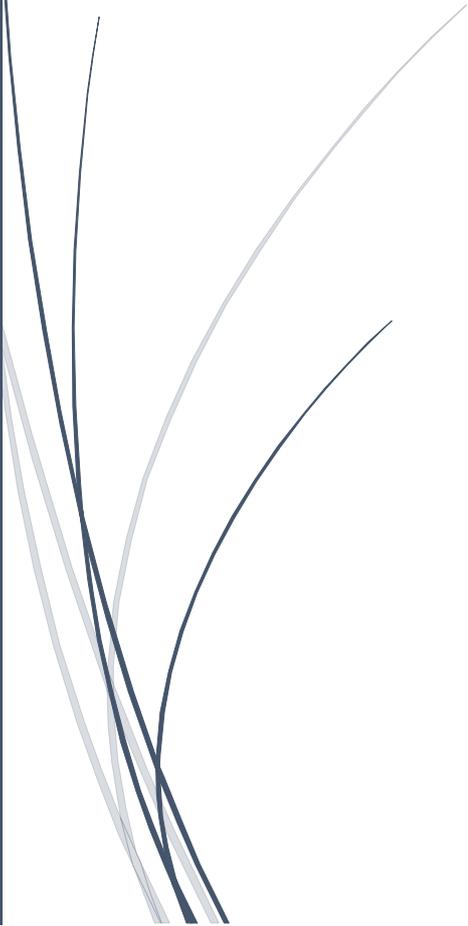
L'incidence de plusieurs maladies, notamment des maladies neurodégénératives, ne cesse d'augmenter, en particulier dans les pays en voie de développement. Les facteurs à l'origine de l'apparition et progression de ces pathologies peuvent être d'origine endogène comme les gènes de prédisposition, ou bien exogène, en d'autres termes l'ensemble des facteurs environnementaux. Les pesticides représentent une classe importante de polluants chimiques environnementaux. En effet leur utilisation n'a cessé de progresser depuis plus d'un demi-siècle (**Bettiche, et al., 2017**). Cette utilisation importante n'épargne aucune région du monde, c'est le cas aussi en Algérie qui figure parmi les plus grands utilisateurs mondiaux avec une consommation annuelle de plus de 30000 tonnes (**Lanez et Imane, 2014**). Les pesticides sont employés dans divers domaines tels que l'usage domestique, domaine de santé publique et majoritairement en agriculture. De ce fait, ils sont omniprésents dans l'environnement, augmentant ainsi le risque d'exposition humaine à ces substances (**Weiss et al., 2004**). Une exposition minimale, mais continue engendre une toxicité à court et à long terme. Malheureusement, seules les études sur la toxicité aiguë, court et moyen terme sont réalisées avant leurs mises sur le marché, sous-estimant ainsi leur toxicité chronique (**Lichiheb, 2017**).

Parmi ces pesticides, figure le chlorpyrifos (CPF) qui est l'un des insecticides organophosphorés (OPs) le plus utilisé au monde (**NPIC, 2011**). Diverses études montrent une association entre l'exposition aux OPs et certaines maladies telles que les troubles neurologiques, les cancers, les atteintes de la fonction de reproduction et du développement, avec une corrélation entre le degré de pathogénicité et le degré d'exposition à ces substances (**Singh et al., 2018**). De plus, ces études ont mis l'accent sur l'association existante entre l'exposition au CPF et l'apparition de divers troubles moteurs, cognitifs et anxieux dépressifs (**Braquenier et al. 2010**).

Afin de démontrer l'éventuelle association de l'exposition au Chlorpyrifos, et l'apparition de divers troubles neurologiques, nous avons réalisé une étude *in vivo* sur des souris BALB/C. Notre étude consiste en le traitement des animaux avec de nombreuses doses subchroniques du CPF et l'évaluation de différents paramètres neurocomportementaux, suivi d'une analyse histologique des tissus nerveux.

**Chapitre I**

# **Synthèse bibliographique**



## I.1 Généralités sur les pesticides

### I.1.1 Définition des pesticides

Les pesticides sont définis comme une large gamme de produits chimiques destinés à détruire, empêcher ou à repousser les organismes nuisibles. Ils sont employés dans divers domaines tels que l'agriculture, l'usage domestique et aussi pour lutter contre les vecteurs de maladies infectieuses constituant un risque de santé publique (Weiss *et al.*, 2004)

Ils sont utilisés seuls ou en combinaison avec d'autres pesticides et peuvent être présentés sous forme de poudre, cristaux, émulsion ou solution dans différents solvants (Viala et Botta, 2007).

### I.1.2 Classification des pesticides

Les pesticides diffèrent par leurs structures chimiques, leurs groupements fonctionnels ainsi que leurs activités (Mehri, 2008). Ainsi, il existe différents systèmes de classifications, soit reposant sur le type de nuisible à contrôler dont les plus importants sont les insecticides, herbicides, fongicides, ou la nature chimique, notamment les organophosphorés, organochlorés et les carbamates. D'autres classifications, notamment celles de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et du CMR (Cancérogène, Mutagène, Reprotoxique) se focalisent sur les degrés du risque sanitaire (Mehri, 2008; Garcia *et al.*, 2012).

#### I.1.2.1 Selon le risque sanitaire

En raison de la complexité de la classification des pesticides, l'OMS a mis au point un système de classification qui les scinde en cinq catégories selon leurs risques de toxicité aiguë.

Les pesticides peuvent être également classés selon leurs caractères CMR pour l'Homme, ce classement prend en compte les études : épidémiologiques, études toxicologiques (*In vivo*) et (*In vitro*). On distingue trois catégories :

**Catégorie1** : substance connue cancérogène, mutagène ou toxique pour la reproduction, définie par des données épidémiologiques (ex:Atrazine).

**Catégorie2** : substance devant être assimilée à un CMR, dans les cas où on dispose de suffisamment de données pour justifier une forte présomption(ex:monocrotophos).

**Catégorie3** : Substances préoccupantes en raison de leurs effets CMR possibles pour l'Homme (ex : Dichlorodiphényltrichloroéthane DDT)(Mehri, 2008 ; INRS, 2008).

**Tableau I :** Classification des pesticides selon le risque (OMS, 2009).

Classification par l'OMS		DL <sub>50</sub> pour les rats (mg/kg par poids corporel)		Exemples
		Orale	Dermique	
<b>Ia</b>	Extrêmement dangereux	<5	<50	Parathion, Dieldrin
<b>Ib</b>	Fortement dangereux	5-50	50-200	Eldrin, Dichlorvos
<b>II</b>	Modérément dangereux	50-2000	200-2000	DDT, <b>chlorpyrifos</b>
<b>III</b>	Légèrement dangereux	>2000	>2000	Malathion
<b>U</b>	Peu susceptible de présenter le risque aigu dans l'utilisation normale	≥5000		Carbétamide, Cycloprothrine

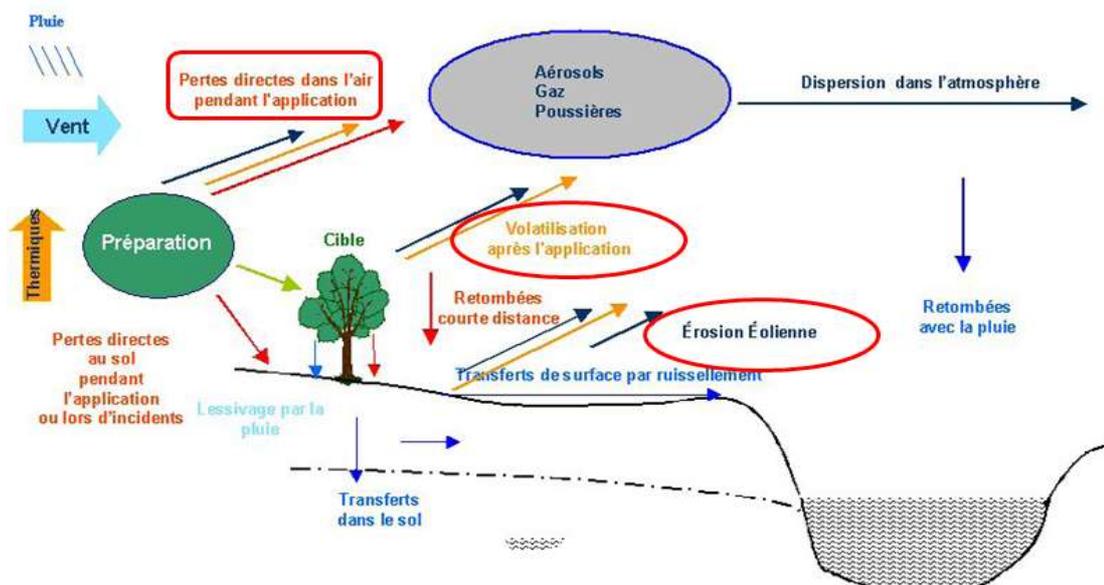
### I.1.3 Utilisation et voies de contamination

Les pesticides ont un impact significatif sur l'économie, l'environnement et la santé publique, leurs utilisations à travers le monde ont considérablement augmenté au cours de ces deux dernières décennies (**Bettiche et al., 2017**), surtout dans les pays en voies de développement où ils sont utilisés de manière importante, comme le cas de l'Algérie qui figure parmi les plus grands utilisateurs mondiaux, avec une consommation annuelle de plus de 30000 tonnes (**Lanez et Imane, 2014**). Ces substances sont utilisées dans divers domaines tels que le domaine de santé publique, l'usage domestique. Cependant, elles sont majoritairement utilisées dans le domaine agricole (**Garciaetal., 2012**), afin de maximiser les bénéfices tout en réduisant les coûts pour les producteurs et les consommateurs (**Regueiro et al., 2013**).

L'application des pesticides peut se faire de plusieurs manières, le plus souvent par pulvérisation directe sur les plantes ou le sol. Une fois appliqués ils vont exercer leurs actions phytosanitaires et une partie plus ou moins importante se disperse dans les différents compartiments environnementaux engendrant ainsi une potentielle exposition des écosystèmes et des populations animales et humaines (**Lichiheb, 2017**). De ce fait, les pesticides sont omniprésents dans l'environnement (**Weiss et al., 2004**), en contaminant l'air, le sol, l'eau et la nourriture qui constitue selon l'OMS la principale source de

contamination pour les non professionnels (alimentation à 80 %, eau à 10 %) (**De Jaeger et al., 2012**).

La mise sur le marché d'un pesticide nécessite une série de tests d'homologation par les autorités sanitaires compétentes. Ces tests concernent notamment l'efficacité et l'innocuité à l'égard des utilisateurs, les cultures, des animaux et de l'environnement dans les conditions précises prescrites. Toutefois, ces tests renseignent peu ou pas sur les toxicités chroniques et sur les effets synergiques des pesticides présents dans l'environnement. Ce défaut d'évaluation semble être à l'origine des corrélations observées entre l'utilisation des pesticides et les dangers sur la santé humaine observés actuellement (**Mehri, 2008**).



**Figure 1** : Principaux processus impliqués dans les transferts des pesticides responsables de leur dispersion dans l'environnement (**Lichiheb, 2017**).

#### I.1.4 Effets des pesticides sur la santé humaine

La toxicité aigüe due aux pesticides semble être liée de façon importante aux professionnels utilisant ces substances et cela contrairement à la toxicité chronique qui touche l'ensemble de la population professionnelle ou non (**De Jaeger et al., 2012 ; Garcia et al., 2012**). De nombreuses études épidémiologiques montrent une augmentation de certains types de cancers si l'environnement est contaminé par les pesticides (**INSERM, 2013**). D'autres études ont montré une association des pesticides aux cancers de l'enfant, notamment les tumeurs cérébrales, leucémies et néphroblastomes. En dehors des effets cancérigènes, quatre effets font l'objet d'une attention particulière : les troubles neurologiques, de la reproduction, du développement et de la perturbation endocrinienne.

Cependant, l'exposition réelle en milieu agricole est complexe, du fait de la diversité des secteurs, des cultures, des tâches et du matériel utilisé, mais aussi du rôle probablement synergique du cumul des pesticides utilisés (**De Jaeger et al., 2012**).

**Tableau II : Maladies chroniques courantes provoquées par les pesticides (Yadav et Devi, 2017).**

Maladies	Références
Cancers (cancer du cerveau chez l'adulte et les enfants, cancer des reins, cancer de la prostate, leucémie lymphocytaire)	Lee et al ; Shim et al. ; Heck et al. ; Xu et al ; Band et al. ; Cocco et al.
Maladies neurodégénératives incluant les maladies d'Alzheimer et de Parkinson	Elbaz et al ; Hayden et al. ; Tanner et al.
Maladies cardiovasculaires incluant les maladies artérielles	Abdullah et al. ; Andersen et al.
Diabète (Type 2)	Son et al.
Désordres reproductifs	Petrelli and Mantovani;Greenlee et al.
Défauts de naissances	Winchester et al. ; Mesnage et al.
Déséquilibres hormonaux y compris l'infertilité et les douleurs mammaires	Xavier et al.
Maladies respiratoires (Asthme, maladie pulmonaire obstructive chronique)	Chakraborty et al. ; Hoppin et al.

## I.2 Chlorpyrifos

### I.2.1 Généralités sur le chlorpyrifos

Le chlorpyrifos (CPF), appartenant à la famille des organophosphorés (OPs), est l'un des insecticides les plus utilisés au monde. Comme la plupart des insecticides OPs ; il agit sur sa cible en perturbant la fonction normale du système nerveux des insectes, par l'inhibition de l'Acétylcholinestérase (AChE) en se liant de manière covalente sur un

groupement serine au niveau de son site actif, conduisant à l'accumulation de l'Acétylcholine (ACh) dans la fente synaptique et la surstimulation des récepteurs post-synaptiques muscariniques et nicotinique des neurones cholinergiques. Cependant, cette enzyme est commune dans le règne animal, conférant ainsi au CPF une sélectivité relative et la possibilité d'agir sur des organismes non-cibles, conduisant à l'apparition de troubles neurologiques (NPIC, 2011).

## **I.2.2 Mécanismes moléculaires de toxicité du chlorpyrifos**

### **I.2.2.1 Inhibition d'acétylcholine estérase**

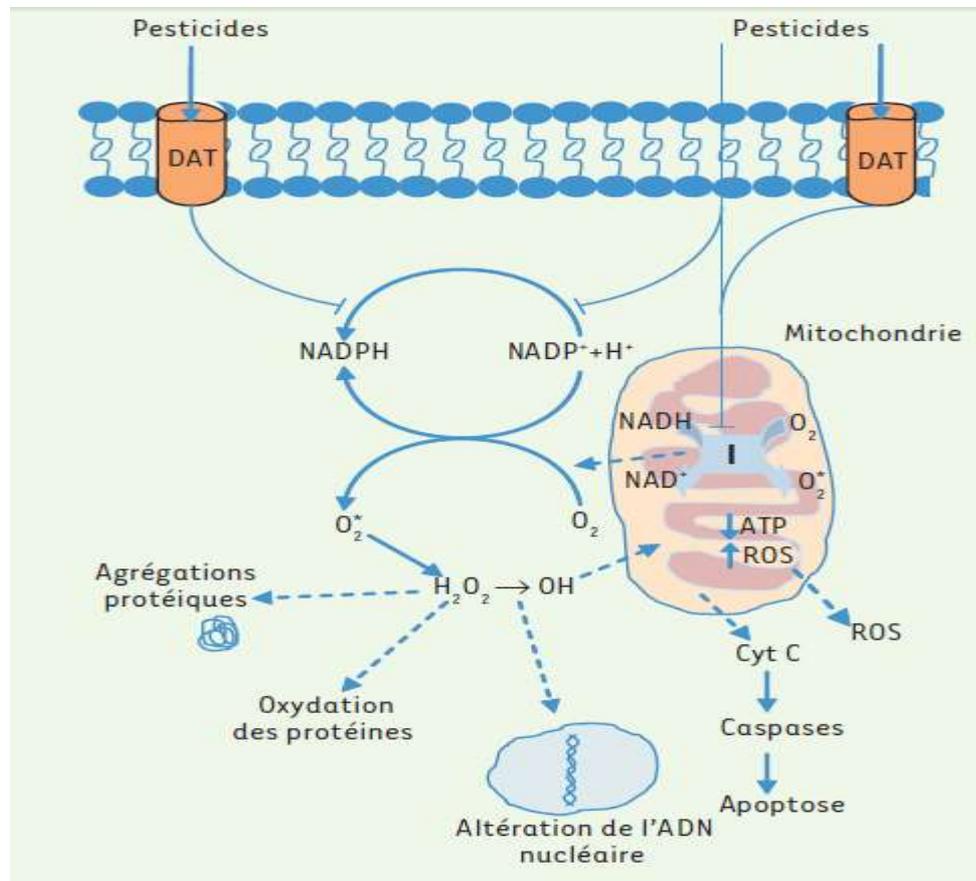
Le principal mécanisme de neurotoxicité des insecticides OPs est lié aux effets cholinergiques, provoqués par l'inhibition de l'AChE, cette dernière est localisée au niveau des neurones du système nerveux central et périphérique et assure plusieurs fonctions. Son inhibition se traduit par l'apparition des syndromes cholinergiques, caractérisés par l'apparition de plusieurs symptômes résultant de la surstimulation des récepteurs d'ACh. Les effets sur le récepteur nicotinique sont le résultat de l'ouverture des canaux et l'entrée massive d'ions de calcium  $Ca^{2+}$  ce qui peut conduire à des lésions cellulaires (Braquenier *et al.*, 2010 ; Singh *et al.*, 2018).

### **I.2.2.2 Stress oxydatif**

Plusieurs études ont rapporté que le CPF induisait une production excessive de radicaux libres. En perturbant le transport des électrons par le complexe I mitochondrial et en épuisant les systèmes antioxydants (enzymatique et non enzymatique) développés par les cellules pour atténuer et restaurer les dommages causés par les ROS. Ces derniers peuvent induire une dépolarisation de la membrane mitochondriale, qui s'accompagne d'une génération de ROS et la libération de nombreuses protéines pro-apoptotiques telles que le cytochrome C, ce qui peut aboutir à une mort cellulaire par apoptose. (Park *et al.*, 2017 ; Singh *et al.*, 2018).

En raison de son pouvoir pro-oxydant, cet insecticide peut avoir des effets génotoxiques (micronoyaux, coupures d'ADN, échanges de chromatides), et des effets proapoptotiques en activant plusieurs récepteurs de type MAPKinase (ERK et P38JNK) (INSERM, 2013). De plus, le CPF induit des dommages mitochondriaux, ce qui provoque une génération excessive de ROS par ces derniers. Pour atténuer ces dommages, la cellule

déclenche un processus de mitophagie médié par PINK1 et PARKIN pour éliminer les mitochondries défectueuses (Dai *et al.*, 2015 ; Park *et al.*, 2017).



**Figure 2 :** Effets des pesticides sur les mitochondries et conséquence au niveau cellulaire (steeve *et al.*, 2013).

### I.2.2.3 Paraxonase PON1

Lorsque le CPF pénètre à l'intérieur de l'organisme, il va être métabolisé principalement dans le foie par une Cytochrome P450 via deux voies, l'une d'elles est une désulfuration oxydative du CPF donnant naissance à son métabolite chlorpyrifos-oxon (CPO), cette réaction est une bioactivation, car le métabolite CPO est plus toxique que son composé parent CPF. En effet, des études ont montré qu'il pouvait inhiber l'ACHE environ 1000 fois plus que le CPF dans les cellules neuronales. Ce métabolite va subir par la suite une détoxification par la paraxonase PON1. Cependant, divers polymorphismes dans la région codante de cette enzyme existent chez l'Homme, et peuvent être à l'origine de plusieurs maladies telles les maladies neurodégénératives, ceci peut être dû à la baisse de leurs activités cataboliques (Androutsopoulos *et al.*, 2011).

#### I.2.2.4 Effets non cholinergiques

Outre les effets sur le système cholinergique, le chlorpyrifos peut agir sur d'autres systèmes de neurotransmetteurs comme la dopamine, la sérotonine, la norépinephrine et le glutamate (**Braquenier et al., 2010**). Il peut également agir sur l'enzyme neuropathy target esterase (NTE) en se liant sur son site actif, ce qui provoque son inhibition et pourra induire une polyneuropathie d'apparition retardée.

Le CPF induit une déplétion en ATP, due à un dysfonctionnement mitochondrial, limitant ainsi l'activité de la pompe  $\text{Na}^+/\text{k}^+\text{ATPase}$ . Ceci entraîne une dépolarisation membranaire et une augmentation de perméabilité des récepteurs NMDA du glutamate à l'entrée des ions  $\text{Ca}^{2+}$ . L'excès du glutamate provoqué par la surstimulation des récepteurs AChR- $\alpha 7$  dans les terminaisons glutamatergiques, induit un influx trop élevé de calcium, conduisant à la mort des cellules neuronales glutamatergiques (**Torres-Altoro et al., 2011 ; INSERM, 2013**).

#### I.2.3 Effets du chlorpyrifos sur le système nerveux

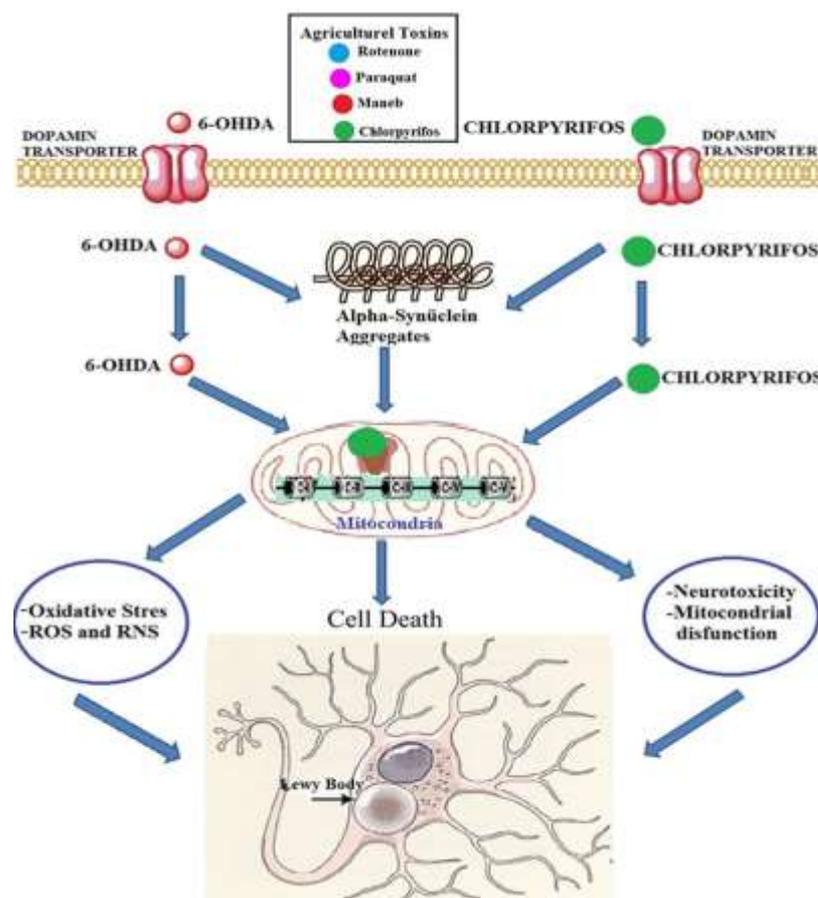
Le CPF agit principalement sur le système nerveux périphérique (SNP), car la barrière hématoencéphalique protège le système nerveux central (SNC). Cependant, en raison de leurs liposolubilités et leurs petites tailles les OPs peuvent traverser cette barrière et causer des effets neurotoxiques (**Braquenier, 2009**), tels que l'altération de la mémoire, l'anxiété et la dépression (**NPIC, 2011**).

##### I.2.3.1 Maladies neurodégénératives

Diverses études montrent l'existence d'un lien entre l'exposition aux pesticides et l'apparition de diverses maladies neurodégénératives, telle que la maladie de Parkinson (MP) et d'Alzheimer (MA).

La maladie de Parkinson et un trouble de mouvement lié à une perte progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire, qui s'accompagne de la présence des corps de Lewy. Plusieurs études épidémiologiques ont rapporté une association entre l'exposition à certains insecticides en particulier le CPF, avec un risque élevé d'apparition de MP (**Freire et Koifman, 2012**). De plus, une étude récente réalisée en 2018, a révélé pour la première fois la formation de corps de Lewy induits par le CPF dans le cerveau de

souris (Deveci et Karapehlivan, 2018). Cette maladie peut résulter du dysfonctionnement mitochondrial, stress oxydant et l'inflammation induite par ces pesticides (Freire et Koifman, 2012). Des études suggèrent l'implication de PON1 dans l'apparition de cette maladie. En effet l'équilibre entre le niveau de dopamine et d'acétylcholine est crucial pour la progression neuronale du système striatal, en raison de l'inhibition de l'AChE. Les OPs déplacent cet équilibre et cela a comme effet, une surproduction l'AChE pour maintenir l'équilibre entre les deux neurotransmetteurs. PON1 protège d'une accumulation d'AChE en dégradant les OPs. Cependant, les polymorphismes dans ses régions codantes réduisent son activité catalytique, favorisant ainsi l'accumulation d'AChE et en parallèle des OPs qui vont provoquer la mort des cellules dopaminergiques via la génération des ROS (Androutsopoulos *et al.*, 2011).



**Figure 3 :** Mécanisme d'induction de la maladie de Parkinson par les pesticides (Deveci et Karapehlivan, 2018).

La maladie d'Alzheimer quant à elle, est un trouble de mémoire caractérisé par une atrophie cérébrale accompagnée de plaques séniles (dépôts extracellulaires de bêta-

amyloïde), et de dégénérescence neurofibrillaire (accumulation de protéines Tau). Des études américaines et françaises réalisées sur des agriculteurs exposés aux pesticides montrent un risque deux fois plus élevé d'apparition de cette maladie, avec un excès de risque significatif de 40 à 50% pour les populations exposées aux OPs dans l'étude américaine. La perturbation du système cholinergique, l'augmentation des niveaux de bêta-amyloïde, stress oxydatif, altération dans les protéines du cytosquelette et l'induction de l'apoptose qui peuvent être causés par les OPs, sont des processus pathologiques observés dans la maladie d'Alzheimer (INSERM, 2013 ; Sánchez-Santed *et al.*, 2016).

### I.2.3.2 Troubles cognitifs

Ce sont des troubles dans le traitement des informations par le cerveau, affectant la mémoire, l'attention, le jugement, la compréhension et le raisonnement. Deux études de cohorte françaises auprès d'un millier de personnes chacune en populations générale ou agricole, ont révélés l'existence d'un lien entre l'exposition aux pesticides et des perturbations cognitives (Blanc-Lapierre *et al.*, 2012). D'autre part, trois autres études longitudinales (Pays-Bas, France, Nicaragua) rapportées par l'INSERM ont mis en évidence une baisse des performances cognitives chez des personnes exposées aux organophosphorés.

### I.2.3.3 Troubles anxiodépressifs

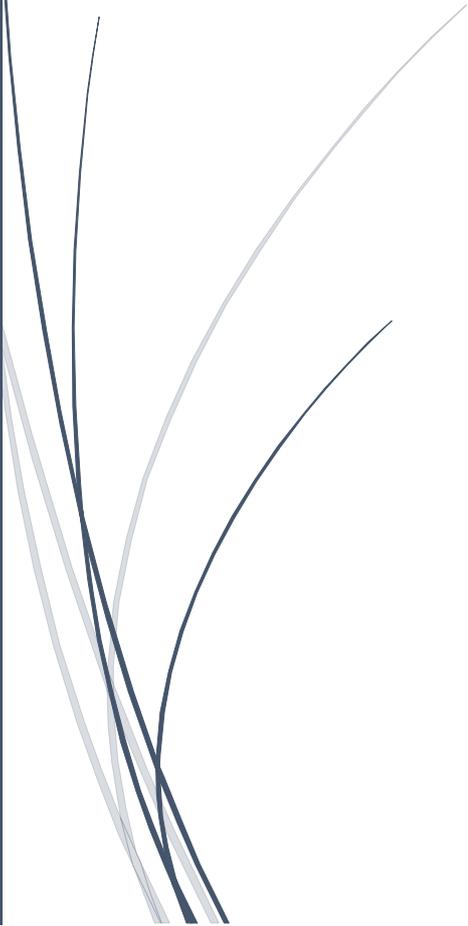
Plusieurs études épidémiologiques ont suggéré l'association d'exposition à des insecticides organophosphorés et l'apparition de certains troubles comportementaux, comprenant l'anxiété et la dépression. Des études réalisées chez des agriculteurs exposés au CPF rapportent un risque élevé d'apparition d'anxiété et de dépression. Ces observations ont été confirmées par une étude *in vivo*. Ces troubles ne sont pas directement liés à l'inhibition de l'acétylcholine estérase, mais peuvent être attribués à l'altération du système sérotonergique (Braquenier *et al.* 2010 ; Chen *et al.*, 2011).

### I.2.4 Autres effets biologiques

Autre effet neurotoxique du CPF, plusieurs études révèlent qu'il est également impliqué dans l'apparition des cancers, provoque des perturbations des voies métaboliques et est impliqué dans des troubles immunitaires (Singh *et al.*, 2018).

**Chapitre II**

# **Matériels et méthodes**



## II.1 Matériel

### II.1.1 Modèle animal

Des souris consanguines de souche albinos BALB/C, mâles et femelles, âgées de six à huit semaines fournies par l'Institut Pasteur d'Alger sont utilisés comme modèle animal et gardées au niveau de l'animalerie du laboratoire de génie biologique des cancers (GBC) de l'université A. MIRA (Campus Aboudaou).

Les souris ont été élevées dans des cages en polypropylène (nettoyées chaque deux jours), dans une salle régulée à une température de  $25 \pm 2$  °C et à une humidité  $60\% \pm 5$ , avec un cycle de lumière/obscurité 12h/12h, avec un accès libre à l'eau et à la nourriture (Annexe 1).

### II.1.2 Matériel chimique

- Solution commerciale de Chlorpyrifos, sous le nom Pyrical 480<sup>®</sup>EC, de concentration 480 g/l.
- Solution commerciale de Glyphosate, sous le nom de Roundup Turbo. Formaldéhyde, éthanol, xylène, paraffine, éosine, hématoxyline, chloroforme.

## II.2 Méthodes

### II.2.1 Préparation des solutions à injecter

Deux solutions mères de chlorpyrifos et de glyphosate à 10g/L sont obtenues à partir des solutions commerciales à 480g/L et 450g/L respectivement après dilution dans de l'eau physiologique (NaCL 0.9%). D'un côté, des solutions filles à injecter correspondante à des dilutions de 1/8<sup>ème</sup>, 1/10<sup>ème</sup> et 1/12<sup>ème</sup> de la DL50 par poids corporel sont préparé à partir de la solution mère du chlorpyrifos. De l'autre, des solutions filles de mélange de Chlorpyrifos et de Glyphosate correspondantes à des dilutions de 1/8<sup>ème</sup> de la DL50 par poids corporel sont préparées à partir de deux solutions mères du chlorpyrifos et du glyphosate (Mahmoud et Namaoui, 2017).

### II.2.2 Traitement des souris

Les souris sont laissées 30 jours avant le début des traitements pour s'acclimater, puis réparties selon la solution à injecter en cinq lots pour chaque sexe, et ont reçu un volume de 400 µl par voie intrapéritonéale chaque 72 heures pendant 11 semaines. Trois lots sont injectés respectivement avec une solution du Chlorpyrifos diluée à 1/8<sup>ème</sup>, 1/10<sup>ème</sup> et 1/12<sup>ème</sup> de la DL50 par poids corporel, un lot a reçu une administration d'une solution

comprenant un mélange de deux pesticides (CPF, GLY) à une dilution de 1/8<sup>ème</sup> de la DL50 chacun et un autre lot témoin recevant de l'eau physiologique (NaCl 0.9%).

Après 11 semaines, les souris ont été euthanasier en utilisant du chloroforme puis décapiter et disséquer dans le but de récupérer leurs sangs et leurs organes pour réaliser l'étude des paramètres biochimiques et histologiques (Mahmoud et Namaoui, 2017).

### II.2.3 Étude comportementale

Une série de tests sont réalisés pour évaluer l'anxiété (*Dark/Light Box*, *Open Field OF*, *Elevated plus maze* et *ElevatedZero Maze EZM*), l'apprentissage et la mémoire spatiale (*Morris water Maze (MWM)*, *Barnes Maze (BM)*), ainsi que la dépression par le test de la nage forcée. Avant chaque test, les souris sont placées 30 minutes dans la salle de comportement pour s'acclimater, et les dispositifs sont nettoyés avec de l'eau hypochloré pour éliminer tout indice olfactif. Durant tous les tests, les souris ne doivent pas voir et entendre l'expérimentateur.

#### II.2.3.1 Champ ouvert (*Open field (OF)*)

Basé sur l'aversion naturelle des souris aux champs ouverts, ainsi que leur comportement exploratoire, l'*open field* permet l'évaluation du comportement anxieux des souris ainsi que leur activité locomotrice. Le dispositif se compose d'un secteur carré clos par des murs de hauteur suffisante pour empêcher la fuite de l'animal. La souris est posée au centre du labyrinthe et laissée explorer librement pendant 5 minutes, le temps d'immobilité ainsi que le nombre et le temps passé au centre sont mesurés (Seibenhener et Wooten, 2015).



**Figure 5 :** Photographie originale montrant le dispositif de Champ ouvert

(Laboratoire Génie biologique du cancer (GBC), Bejaia, 2018)

### II.2.3.1 Boîte lumière/ obscurité (Dark/Light Box (DLB))

Ce test permet d'évaluer l'anxiété des souris, en se basant sur l'aversion naturelle de ces animaux pour les zones fortement éclairées et leur comportement exploratoire.

L'appareil se compose d'un compartiment sombre et d'un autre éclairé par une lumière froide, séparée par une cloison centrale menée d'une ouverture permettant le passage entre eux. La souris est placée dans le compartiment sombre et autorisée à explorer librement pendant cinq (5) minutes, la durée et le nombre d'entrées dans chaque zone sont mesurés (Takao et Miyakawa, 2006).



**Figure 4 :** Photographie originale montrant le dispositif de chambre lumière/obscurité

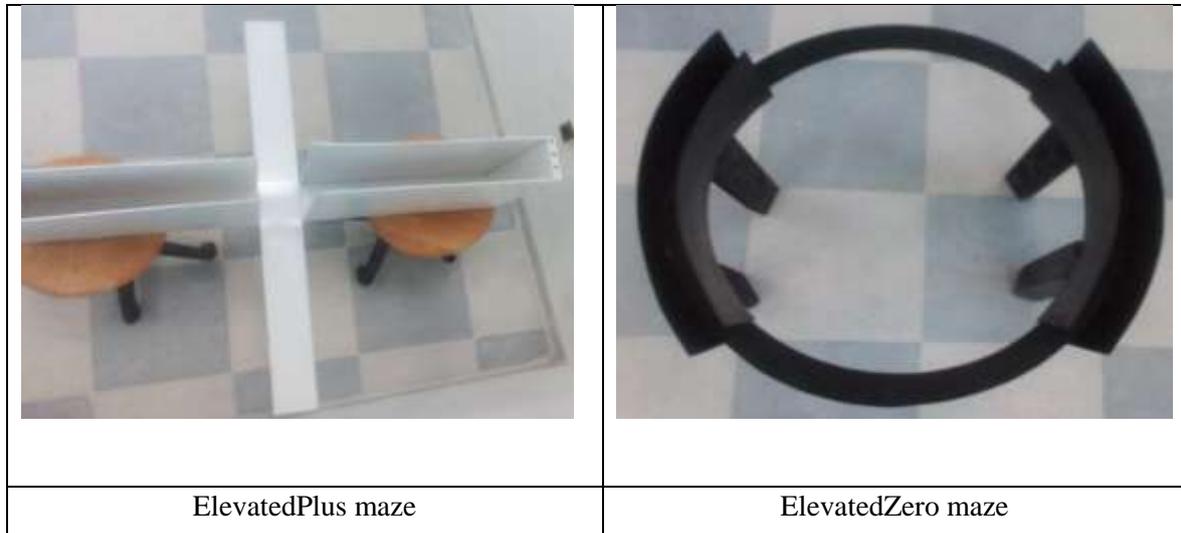
(Laboratoire Génie biologique du cancer (GBC), Bejaia, 2018)

### II.2.3.2 Labyrinthe en crois surélevée (*ElevatedPlus Maze (EPM)*) et Labyrinthe en zero surélevé (*ZeroElevatedMaze (EZM)*)

Ces deux tests permettent également d'évaluer l'anxiété des souris en se basant sur l'aversion naturelle pour les zones ouvertes et élevées, ainsi que le comportement exploratoire. Le *Elevated plus maze* est un test sous forme d'une croix comprenant deux bras ouverts adjacents perpendiculaires à deux bras fermés. La souris est placée dans la zone centrale face au bras ouvert et laisser explorer librement pendant 5 minutes, le temps passé et le nombre d'entrées dans les bras ouverts et fermés sont mesurés (Komada *et al.*, 2008).

Le *Elevatedzero maze* qui est une variante d'EPM sous forme d'un anneau circulaire surélevé divisé en quatre parties de longueur égale, deux quadrants ouverts opposés reliés à

deux quadrants fermés, les procédures suivies et les paramètres analysés sont les mêmes avec le test de EPM (Shepherd *et al.*, 1994).



**Figure 6 :** Photographie originale montrant les dispositifs de labyrinthe en croix et zéro surélevé (Laboratoire Génie biologique du cancer (GBC), Bejaia, 2018)

### II.2.3.3 Piscine de Morris (*Morris water maze (MWM)*)

Il a pour objectif l'évaluation de l'apprentissage et la mémoire spatiale. Le MWM consiste en une piscine remplie d'eau maintenue à une température de  $24 \pm 2$  °C et rendue opaque en rajoutant de la poudre de lait. La piscine est divisée en quadrants (Nord, Sud, Est, Ouest). Une plateforme de sauvetage fixe est submergée à un centimètre dans l'un des quadrants. L'eau est un facteur aversif pour la souris ce qui la motive à chercher la plateforme, après un certain nombre d'épreuves les souris apprennent à trouver la plateforme. Le test dure 5 jours, l'animal est positionné dans l'un des quadrants et laisser nager librement pendant 3 minutes, des repères sont posés autour de la piscine pour faciliter la localisation spatiale. Cette étape est répétée 4 fois par jour durant 4 jours et la plateforme est enlevé le cinquième jour est la souris est maintenue dans l'eau pendant 60 secondes. Le temps de latence pour trouver la plateforme et la distance parcourue sont mesurés (Tóthová *et al.*, 2017).



**Figure 7 :** Photographie originale montrant le dispositif de piscine de Morris

(Laboratoire Génie biologique du cancer (GBC), Bejaia, 2018)

#### **II.2.3.4 Labyrinthe de Barnes (*Barnes Maze (BM)*)**

C'est une variante du MWM, il consiste en une plateforme circulaire exposée à la lumière, contenant 20 trous périphériques, dont l'un d'eux contient une boîte d'évacuation. Les souris sont aversives aux espaces ouverts et cherchent la boîte d'évacuation pour fuir, au bout de quelques essais elles apprennent à retrouver la boîte. La souris est positionnée au centre du dispositif et laissée explorer pendant 3 minutes, des repères spatiaux sont utilisés et un son aversif est utilisé pour augmenter la motivation des souris à s'échapper. Cette étape est répétée 4 fois par jour pendant 4 jours et au cinquième jour l'abri est retiré et la souris est laissée à explorer pendant 90 secondes. La latence pour retrouver la plateforme est mesurée (**Sunyer *et al.*, 2007**).



**Figure 1 :** Photographie originale montrant le dispositif de labyrinthe de Barnes

(Laboratoire Génie biologique du cancer (GBC), Bejaia, 2018)

### II.2.3.5 Nage forcée (*Forced Swim (FS)*)

Il consiste en un réservoir en verre rempli à moitié d'eau (température  $24 \pm 2$  °C) de façon à ce que la souris ne touche pas le fond et qu'elle ne puisse pas s'échapper. Les souris sont placées dans le dispositif et leur mobilité liée à l'échappement est mesurée, nous renseignant ainsi sur leur comportement dépressif (**Can *et al.*, 2012**).



**Figure 2** Photographie originale montrant le dispositif de Nage Forcée  
(Laboratoire Génie biologique du cancer (GBC), Bejaia, 2018)

## II.2.4 Études histologiques

L'analyse histologique permet l'étude microscopique des cellules et des tissus. Elle consiste en une succession d'étapes décrites ci-dessous :

### II.2.4.1 Fixation

Réalisée le plus souvent en utilisant du formaldéhyde, dans le but de garder les propriétés tissulaires et cellulaires proches de l'état vivant, tout en les conservant de la dégradation et en facilitant la confection des coupes histologiques.

Les organes prélevés sont conservés dans des flacons contenant du formaldéhyde à 10%, puis gardés au frais dans une chambre froide pour une durée d'au moins 72 heures.

### II.2.4.2 Implantation et amincissement

Les échantillons ont été déshydratés dans 8 bains contenant des concentrations croissantes d'éthanol allant de 70 à 100 %, suivi de deux bains de xylène, afin d'éliminer l'eau et de le remplacer par de la paraffine pour donner une rigidité aux échantillons et faciliter la manipulation des tissus.

Les échantillons sont par la suite enrobés dans de la paraffine pour former des blocs. Ces derniers permettent la confection de coupes fines de 1 à 5µm grâce à un microtome, placées par la suite dans un bain d'eau chaude (70°C) puis placer sur une lame et sécher dans un incubateur.

### **II.2.4.3 Coloration**

Elle a pour but d'augmenter le contraste des cellules pour une meilleure observation au microscope optique par l'utilisation de différents colorants. Les échantillons ont été colorés en utilisant l'hématoxyline qui colore le noyau en bleu et l'éosine qui colore le cytoplasme en rose.

### **II.2.5 Analyse numérique**

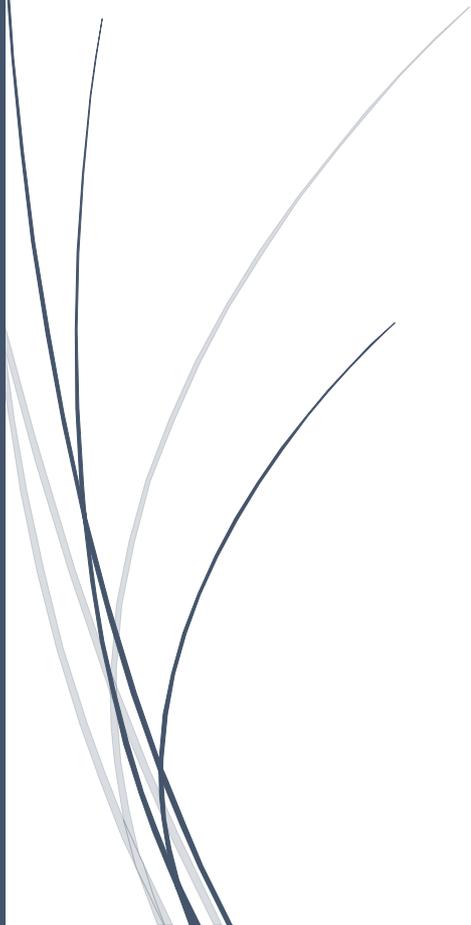
Pour l'analyse du comportement, des enregistrements vidéo ont été réalisés en utilisant une caméra HD 720 pixels fixe. Les vidéos obtenues sont analysées en utilisant deux logiciels de vidéo tracking Any-Maze 5.33 et Smart V3.0. Le son aversif utilisé pour améliorer l'aversion des souris dans le test de Barnes maze a été obtenu en utilisant le logiciel Test Tone Generator. Les coupes histologiques ont été analysées à l'aide du logiciel LAS EZ.

### **II.2.6 Analyse statistique**

Pour les études comportementales, les données ont été analysées en utilisant le modèle d'analyse des variances one-way ANOVA pour comparer entre les différents groupes. Puis des tests supplémentaires pour comparer entre un groupe traité et le groupe témoin sont réalisés en utilisant le test de Mann-Whitney. La signification statistique a été conventionnellement fixée à  $p < 0,05$ . Tous les résultats sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  S.E.M (erreur-type de moyenne). Le logiciel utilisé est GraphPad Prism 7. Pour les cinétiques, des courbes de tendances ont été tracées et des tests de corrélation linéaire en étaient réalisés en utilisant le logiciel Microsoft Office Excel 2016.

**Chapitre III**

# Résultats

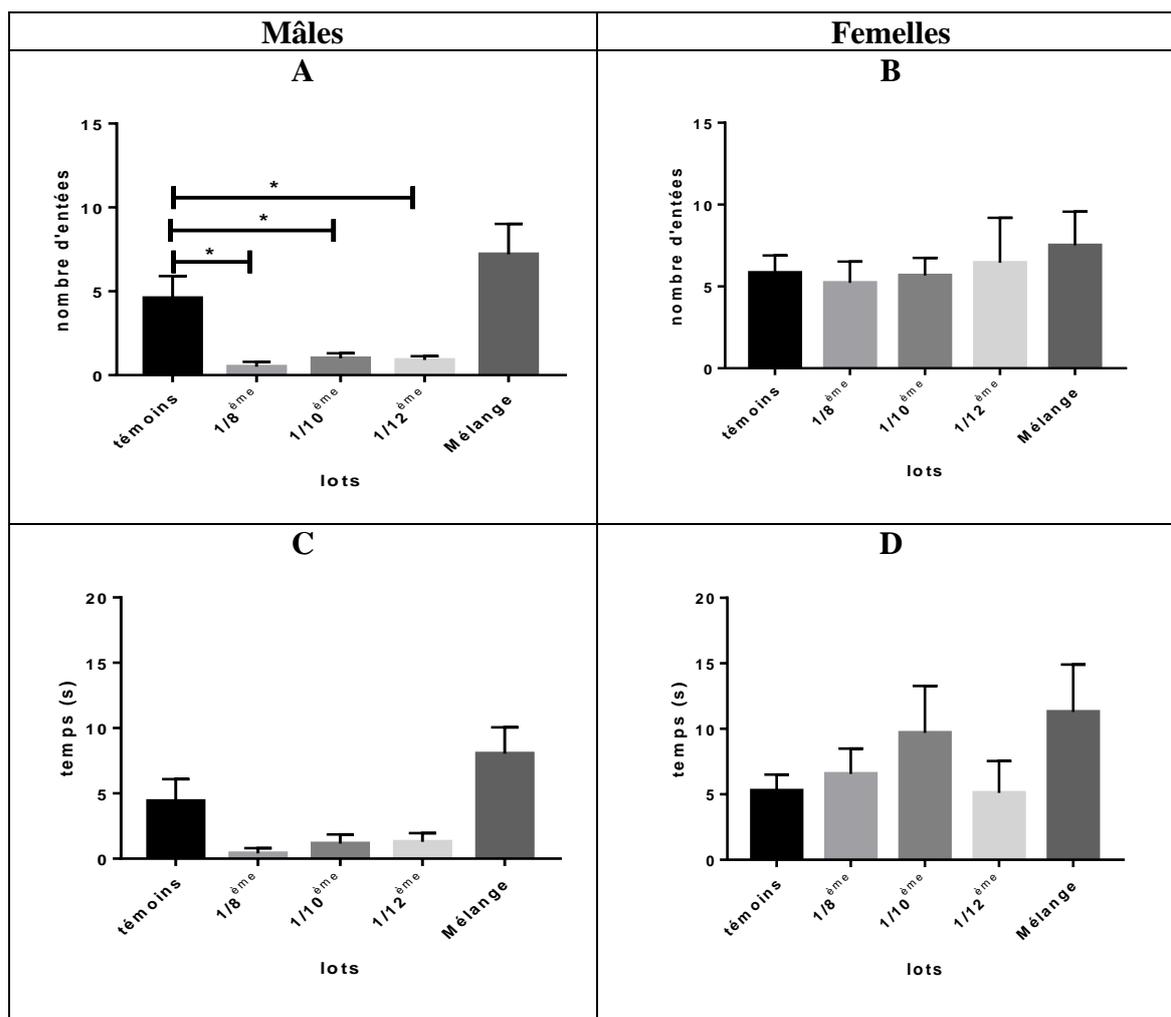


### III.1 Étude comportementale

#### III.1.1 Anxiété

##### III.1.1.1 Openfield

Dans le test d'*Open field*, on observe que les mâles traités aux CPF ont un nombre d'entrées en zone centrale cinq fois moins important ( $p=0,0018$ ) que les souris témoins. Contrairement aux souris traitées avec uniquement le CPF, les souris mâles traitées avec le mélange de pesticides (CPF/Gly) montrent un nombre d'entrées en zone



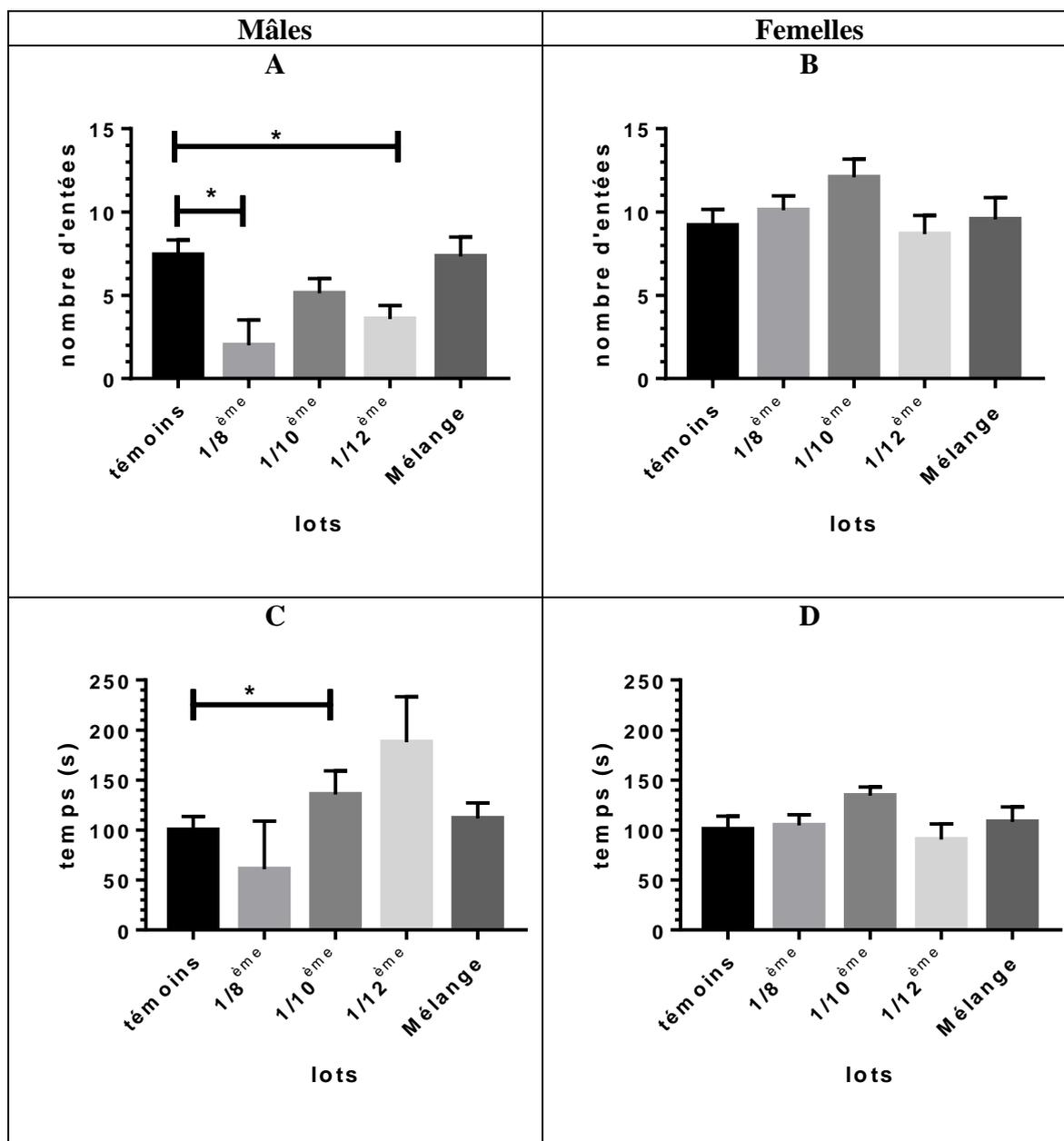
**Figure 10 :** Évaluation de l'anxiété par le test d'*open field*.

**A :** Nombre d'entrées des souris mâles au centre. **B :** Nombre d'entrées des souris femelles au centre. **C :** Temps passé en seconde des souris mâles au centre **D :** Temps passé en seconde des souris femelles au centre \* : p-value<0,05. \*\* : p-value<0 005. \*\*\* : p-value<0,0001. Utilisation du test statistique Mann-Whitney. Les souris reçoivent différentes injections chaque 72heures par voie intrapéritonéale. Les lots 1/8<sup>ème</sup>,1/10<sup>ème</sup> et 1/12<sup>ème</sup> traités avec le CPF reçoivent respectivement 1/8, 1/10 et 1/12 de la DL50 par poids corporel. Le témoin correspond à l'injection par IP d'eau physiologique (NaCL à 0,9%). Le mélange est constitué de chlorpyrifos et de glyphosate à une concentration équivalente à 1/8 de la DL50 par poids corporel. Chaque lot contient 04 souris.

centrale légèrement plus importante que les témoins, toutefois cette différence reste non-significative ( $p=0,2955$ ) (**Figure 10.A**). Le deuxième paramètre étudié lors de ce test, c'est le temps passé dans le compartiment central. En effet, le traitement par Chlopyrifos induit un changement significatif du comportement des souris mâles qui présentent une baisse de 78,4% du temps passé au compartiment central par rapport au lot de souris témoins. ( $p=0,0018$ ). Toutefois, l'effet de chaque concentration indépendamment ne montre pas de significativité (**Figure 10.A**). De façon intéressante ; le mélange CPF-Gly produit l'effet inverse par rapport à l'administration de CPF seul. Car on observe que les souris mâles de ce lot ont une tendance à rester plus longtemps dans le compartiment central (augmentation du temps de 82,6%). Contrairement aux souris mâles, les souris femelles ayant subi le même traitement ne montrent aucune différence en termes de nombre d'entrées dans le compartiment central (**Figure 10. C**). Cependant, pour le temps passé au centre, on remarque une légère augmentation chez les souris traitées avec du CPF à une concentration de 1/10 de la DL50 et au niveau des souris femelles traitées avec le mélange de pesticides. Toutefois, cette augmentation reste non-significative ( $p=0,92$  ;  $p=0,20$ ), respectivement (**Figure 10.d**).

#### **III.1.1.2 Dark/light box**

Le traitement avec les pesticides a provoqué chez les souris mâles, une diminution significative ( $p=0,0192$ ) dans le nombre d'entrées lors de l'exposition au CPF seul. Toutefois, l'analyse de chaque lot indépendamment ne révèle une baisse significative qu'au niveau des lots exposés à des concentrations équivalentes à 1/8<sup>ème</sup> et 1/12<sup>ème</sup> de la DL50 (**Figure 11. A**). Cependant, malgré l'observation de variations entre les différents lots de souris dans le temps passé dans le compartiment lumineux, aucune significativité n'est enregistrée ( $p=0,11$ ). De façon intéressante, les souris exposées à des concentrations de 1/10 de la DL50, sont les seuls à montrer une augmentation du temps passé dans le compartiment lumineux (**Figure 11. B**). Pour les femelles, le traitement n'a pas provoqué des changements ni dans le temps ou dans le nombre d'entrées au compartiment lumineux (**Figure 11 .C**, **Figure 11. D**). En effet, peu de variations sont observées entre les différents lots, avec des moyennes de  $(107,7 \pm 7,32)$  secondes et  $(9,917 \pm 0,59)$  respectivement.



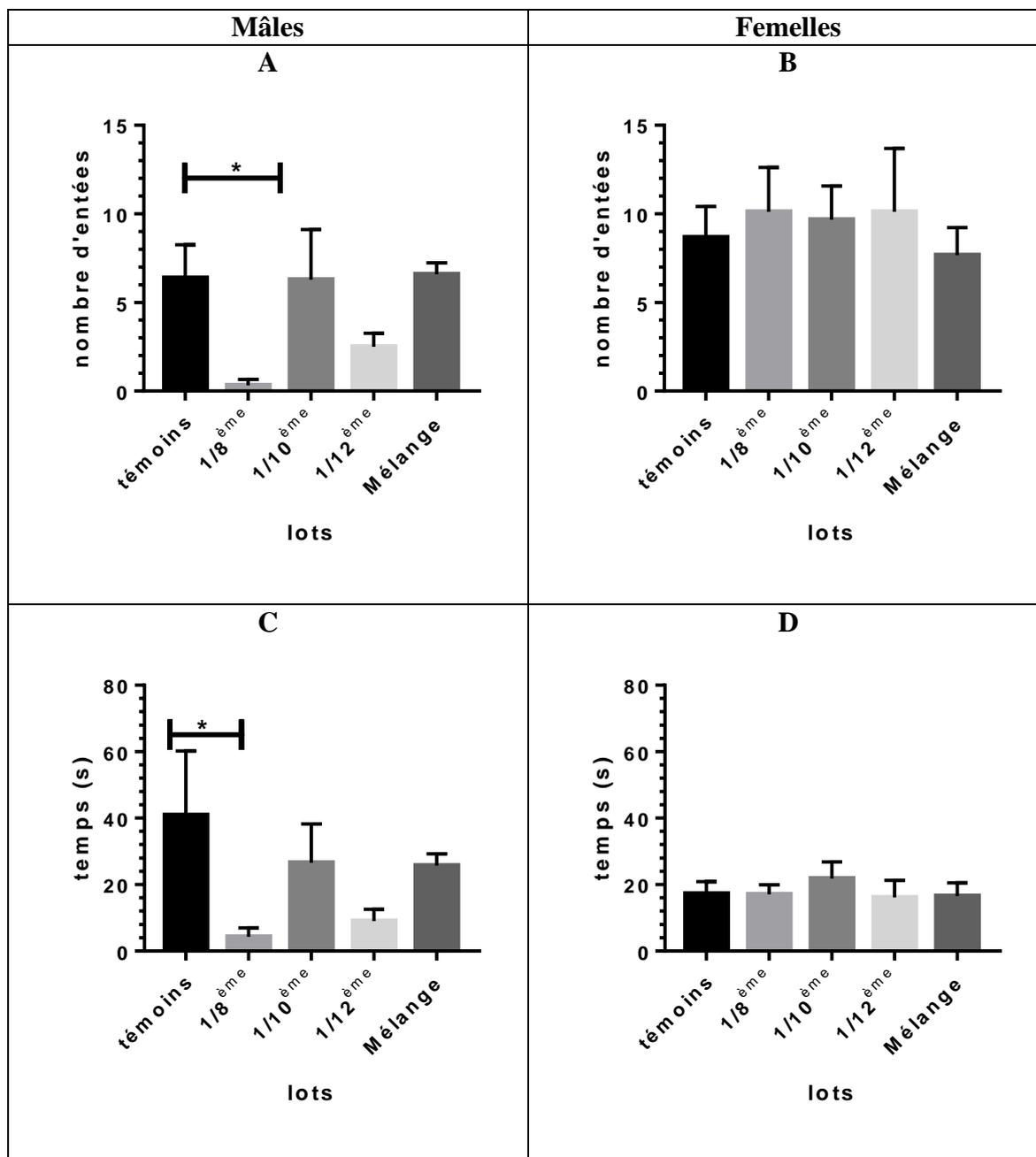
**Figure 11 :** Évaluation de l'anxiété par le test de *Dark/light box*.

**A :** Nombre d'entrées des souris mâles au compartiment lumineux. **B :** Nombre d'entrées des souris femelles au compartiment lumineux. **C :** Temps passé en seconde des souris mâles au compartiment lumineux **D :** Temps passé en seconde des souris femelles au compartiment lumineux \* : p-value<0,05. \*\* : p-value<0,005. \*\*\* : p-value<0,0001. Utilisation du test statistique Mann-Whitney. Les souris reçoivent différentes injections chaque 72heures par voie intrapéritonéale. Les lots 1/8<sup>ème</sup>, 1/10<sup>ème</sup> et 1/12<sup>ème</sup> traités avec le CPF reçoivent respectivement 1/8, 1/10 et 1/12 de la DL50 par poids corporel. Le témoin correspond à l'injection par IP d'eau physiologique (NaCl à 0,9%). Le mélange est constitué de chlorpyrifos et de glyphosate à une concentration équivalente à 1/8 de la DL50 par poids corporel. Chaque lot contient 04 souris.

### III.1.1.3 Elevated plus maze

Le traitement des souris avec les pesticides n'a pas de significativité statistique chez les populations des deux sexes, pour les deux paramètres analyser lors de ce test. Peu de variation entre les différents lots chez les femelles sont observés, avec un temps moyen de

17,77±1.04 (CI=95%) secondes passées dans les bras ouverts et un nombre d'entrées moyen de 9,22±0,47 (**Figure 12 .C, Figure 12. D**). Toutefois, chez les mâles, malgré que, les lots 1/10<sup>ème</sup> et mélange, en comparaison avec le témoin ne présentent pas une très grande



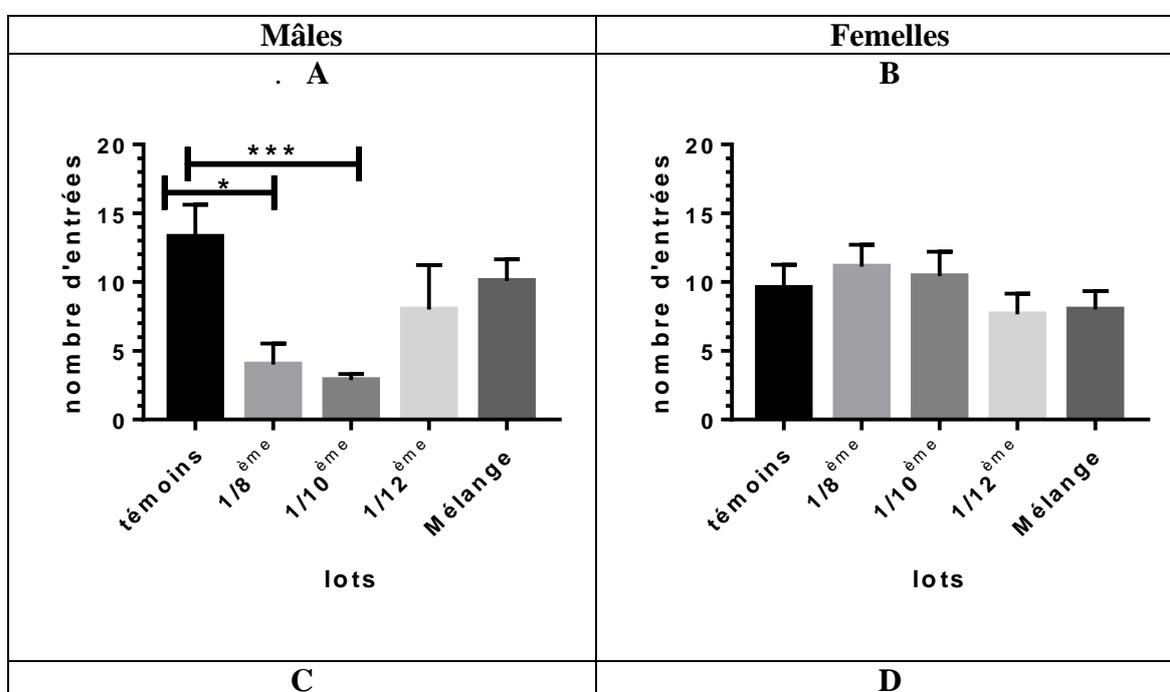
**Figure 12** : Evaluation de l'anxiété par le test d'*Elevated plus maze*.

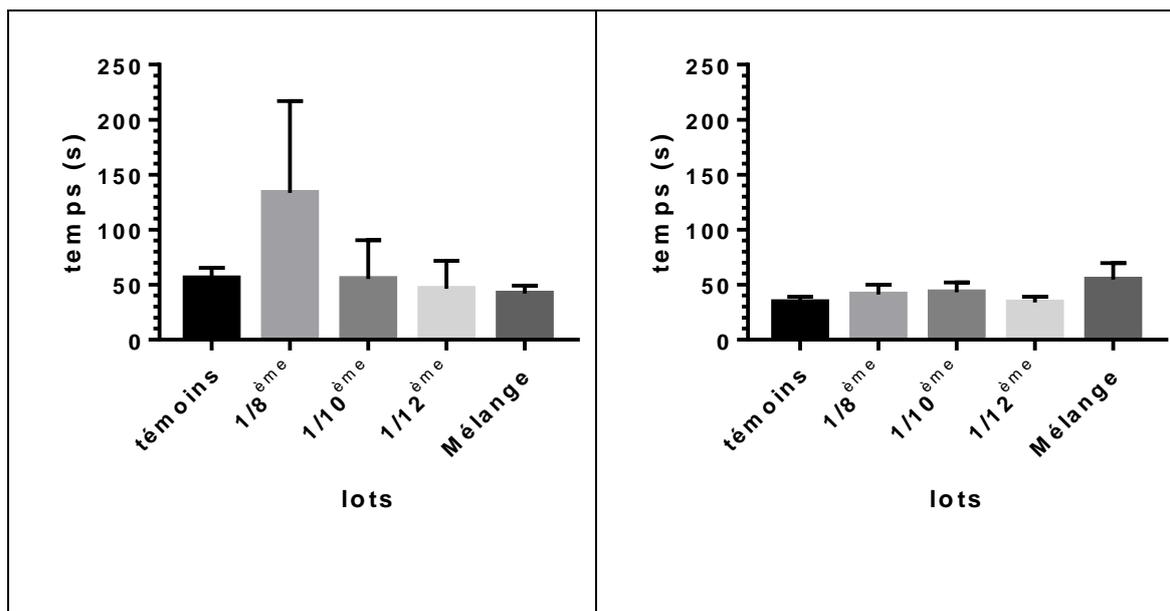
**A** : nombre d'entrées dans les bras ouverts des souris mâles. **B** : nombre d'entrées dans les bras ouverts des souris femelles. **C** : temps passé en secondes dans les bras ouverts par les souris mâles. **D** : temps passé en secondes dans les bras ouverts par les souris femelles \* : p-value<0,05. \*\* : p-value<0,005. \*\*\* : p-value<0,0001. Utilisation du test statistique Mann-Whitney. Les souris reçoivent différentes injections chaque 72heures par voie intrapéritonéale. Les lots 1/8<sup>ème</sup>,1/10<sup>ème</sup> et 1/12<sup>ème</sup> traités avec le CPF reçoivent respectivement 1/8, 1/10 et 1/12 de la DL50 par poids corporel. Le témoin correspond à l'injection par IP d'eau physiologique (NaCl à 0,9%). Le mélange est constitué de chlorpyrifos et de glyphosate à une concentration équivalente à 1/8 de la DL50 par poids corporel. Chaque lot contient 04 souris.

Variation dans le nombre d'entrées aux bras ouverts, avec une moyenne de  $6,415 \pm 0,088$ , les lots 1/8<sup>ème</sup> et 1/10<sup>ème</sup> présentent une baisse du nombre d'entrées en comparaison avec le lot témoin, avec une baisse statistiquement significative ( $p=0,0303$ ) pour atteindre un nombre moyen presque nul de  $(0,33 \pm 0,33)$  pour le lot 1/8<sup>ème</sup>, et une diminution de 60% pour le lot 1/12<sup>ème</sup> (**Figure 12. A**). De même, une baisse chez tous les groupes traités en comparaison avec le lot témoin, du temps passé dans les bras ouverts, et ce de manière significative pour le lot 1/8<sup>ème</sup> ( $p=0,0238$ ) (**Figure 12. B**).

#### III.1.1.4 Elevated zero maze

Pour les souris femelles, l'exposition aux pesticides ne semble pas provoquer d'effets. Car le nombre d'entrées et le temps passé dans les bras ouverts, sont proches de ceux du lot témoin, avec des moyennes respectives de  $(9,36 \pm 0,67)$  et  $(41,45 \pm 3,80)$  secondes. Pour les mâles, tous les lots traités présentent une baisse du nombre d'entrées dans les quadrants ouverts avec une baisse significative ( $p=0,0414$ ,  $p=0,0002$ ) d'environ 60% et 40%, chez les souris exposées à des concentrations de 1/8<sup>ème</sup> DL50 et 1/10<sup>ème</sup> DL50, respectivement. Cependant, malgré la variation dans le nombre d'entrées, les souris mâles passent pratiquement la même durée dans les zones ouvertes, sauf pour le lot 1/8<sup>ème</sup> qui présente une durée deux fois plus importante par rapport au témoin (**Figure 13**).





**Figure 13** : Evaluation de l'anxiété par le test d'*ElevatedZero maze*.

**A** : nombre d'entrées dans les bras ouverts des souris mâles. **B** : nombre d'entrées dans les bras ouverts des souris femelles. **C** : temps passé en secondes dans les bras ouverts par les souris mâles. **D** : temps passé en secondes dans les bras ouverts par les souris femelles \* : p-value<0,05. \*\* : p-value<0,005. \*\*\* : p-value<0,0001. Utilisation du test statistique Mann-Whitney. Les souris reçoivent différentes injections chaque 72heures par voie intrapéritonéale. Les lots 1/8<sup>ème</sup>, 1/10<sup>ème</sup> et 1/12<sup>ème</sup> traités avec le CPF reçoivent respectivement 1/8, 1/10 et 1/12 de la DL50 par poids corporel. Le témoin correspond à l'injection par IP d'eau physiologique (NaCl à 0,9%). Le mélange est constitué de chlorpyrifos et de glyphosate à une concentration équivalente à 1/8 de la DL50 par poids corporel. Chaque lot contient 04 souris.

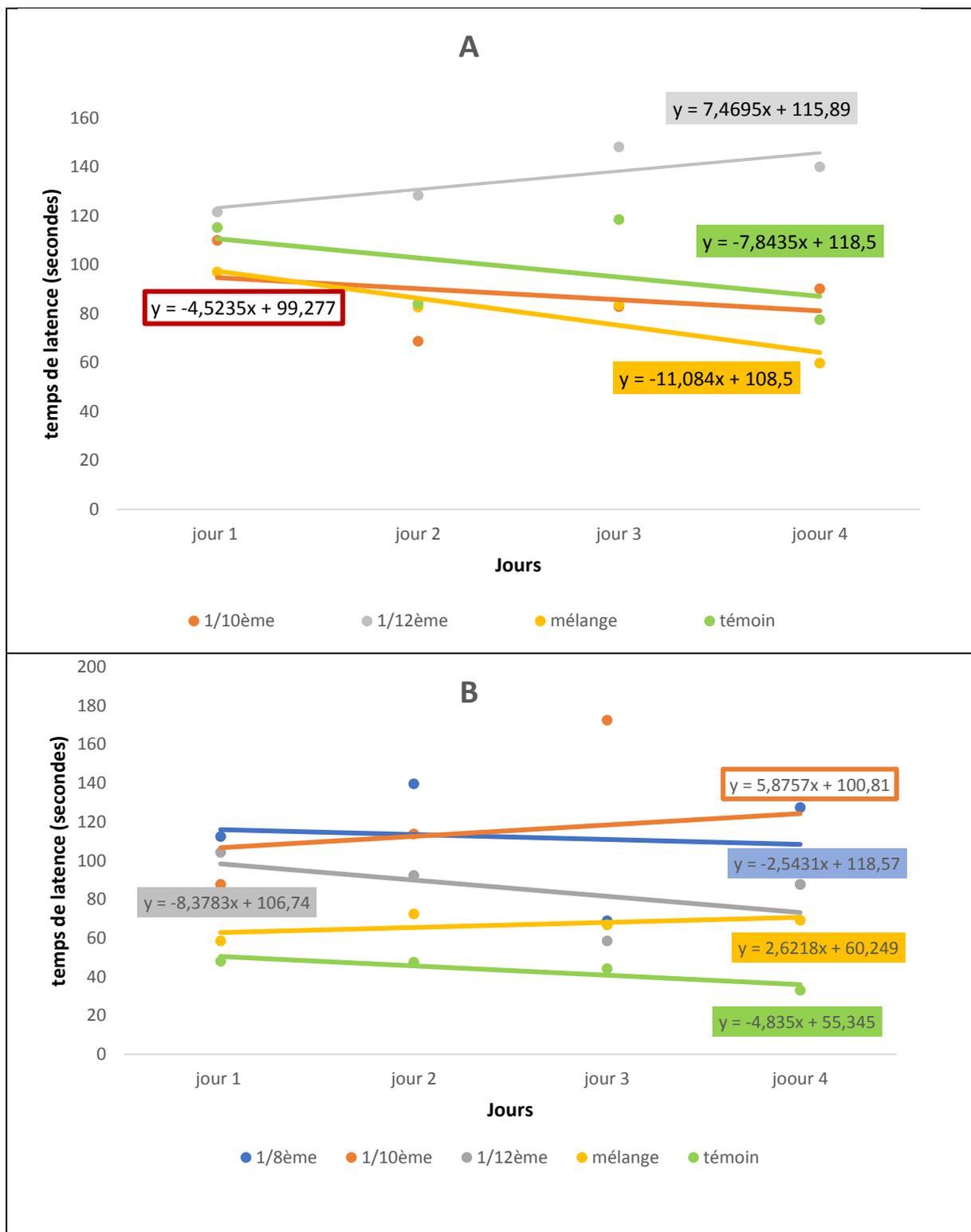
### III.1.2 Apprentissage et mémoire spatiale

#### III.1.2.1 Morris water maze

Le test de Morris nous a permis d'évaluer l'effet du Chlorpyrifos sur l'apprentissage des souris, cela sans guidage pour retrouver la plateforme. Nos résultats montrent que les souris traitées avec les pesticides présentent un déficit dans l'apprentissage comparant aux souris témoins ( $\alpha$  inférieur à celui de témoin). Cependant le mélange de pesticides n'a pas provoqué une altération dans l'apprentissage des souris mâles ( $\alpha = -11.08$ ) (**Figure 14**).

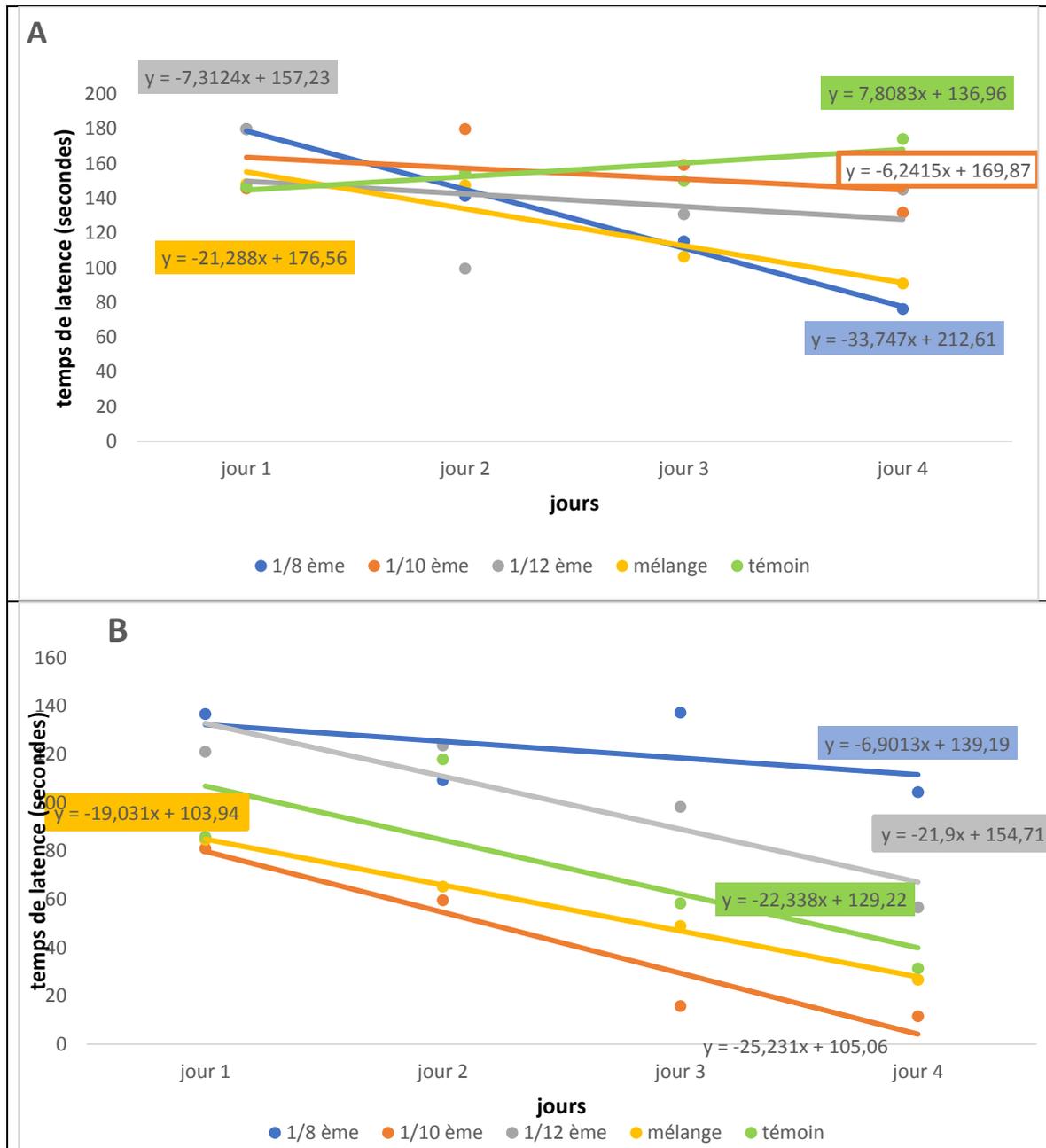
#### III.1.2.1 Barnes maze

Contrairement au test de Morris, durant ce test nous avons guidé les souris pour trouver l'abri d'échappement dans le but de les stimuler à utiliser la mémoire spatiale. Nos résultats indiquent que le Chlorpyrifos a provoqué une altération de la mémoire spatiale chez les souris femelles exceptées à une dose de 1/10<sup>ème</sup> de la DL50. Concernant le mélange de pesticides (CPF-GLY), il a induit un déficit de mémoire spatiale chez les femelles (**Figure 15**).



**Figure 14** : Temps de latence pour trouver la plateforme dans le test de *Morris water maze*.

**A** : Souris mâles. **B** : Souris femelles. Les souris reçoivent différentes injections chaque 72 heures par voie intrapéritonéale. Les lots 1/8<sup>ème</sup>, 1/10<sup>ème</sup> et 1/12<sup>ème</sup> traités avec le CPF reçoivent respectivement 1/8, 1/10 et 1/12 de la DL50 par poids corporel. Le témoin correspond à l'injection par IP d'eau physiologique (NaCl à 0,9%). Le mélange est constitué de chlorpyrifos et de glyphosate à une concentration équivalente à 1/8 de la DL50 par poids corporel. Chaque lot contient 04 souris.



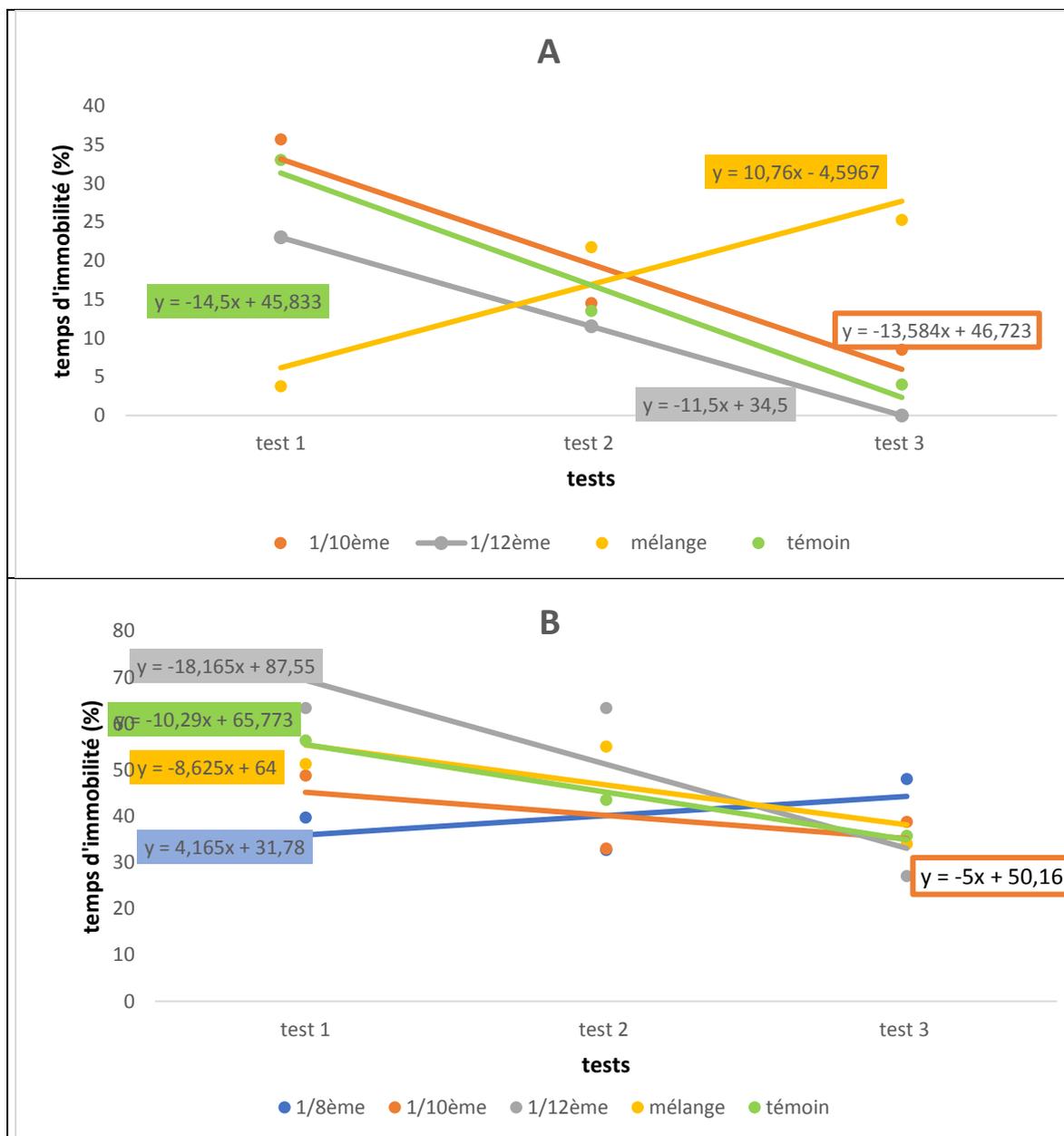
**Figure 15 :** Temps de latence pour trouver la boîte d'évacuation dans le test de Barnes maze.

**A :** souris mâles. **B :** les souris femelles. Les souris reçoivent différentes injections chaque 72 heures par voie intrapéritonéale. Les lots 1/8<sup>ème</sup>, 1/10<sup>ème</sup> et 1/12<sup>ème</sup> traités avec le CPF reçoivent respectivement 1/8, 1/10 et 1/12 de la DL50 par poids corporel. Le témoin correspond à l'injection par IP d'eau physiologique (NaCl à 0.9%). Le mélange est constitué de chlorpyrifos et de glyphosate à une concentration équivalente à 1/8 de la DL50 par poids corporel. Chaque lot contient 04 souris.

### III.1.3 Dépression

#### III.1.3.1 Nage forcée

Durant le test de Nage forcée, la durée du temps d'immobilité, qui nous permet d'évaluer la dépression chez les rongeurs, diminue chez les lots de souris qui ont reçu 1/10<sup>ème</sup> et 1/12<sup>ème</sup> de la DL50, mais de manière moindre par rapport aux souris témoins.



**Figure 16 :** Évaluation du comportement dépressif par le test de nage forcée.

**A** : temps d'immobilité en seconde pour les souris mâles. **B** : temps d'immobilité en seconde pour les souris femelles. Ce test est réalisé 3 fois à intervalle de 18 jours entre chaque test. Les souris reçoivent différentes injections chaque 72 heures par voie intrapéritonéale. Les lots 1/8<sup>ème</sup>, 1/10<sup>ème</sup> et 1/12<sup>ème</sup> traités avec le CPF reçoivent respectivement 1/8, 1/10 et 1/12 de la DL50 par poids corporel. Le témoin correspond à l'injection par IP d'eau physiologique (NaCl à 0,9%). Le mélange est constitué de chlorpyrifos et de glyphosate à une concentration équivalente à 1/8 de la DL50 par poids corporel. Chaque lot contient 04 souris.

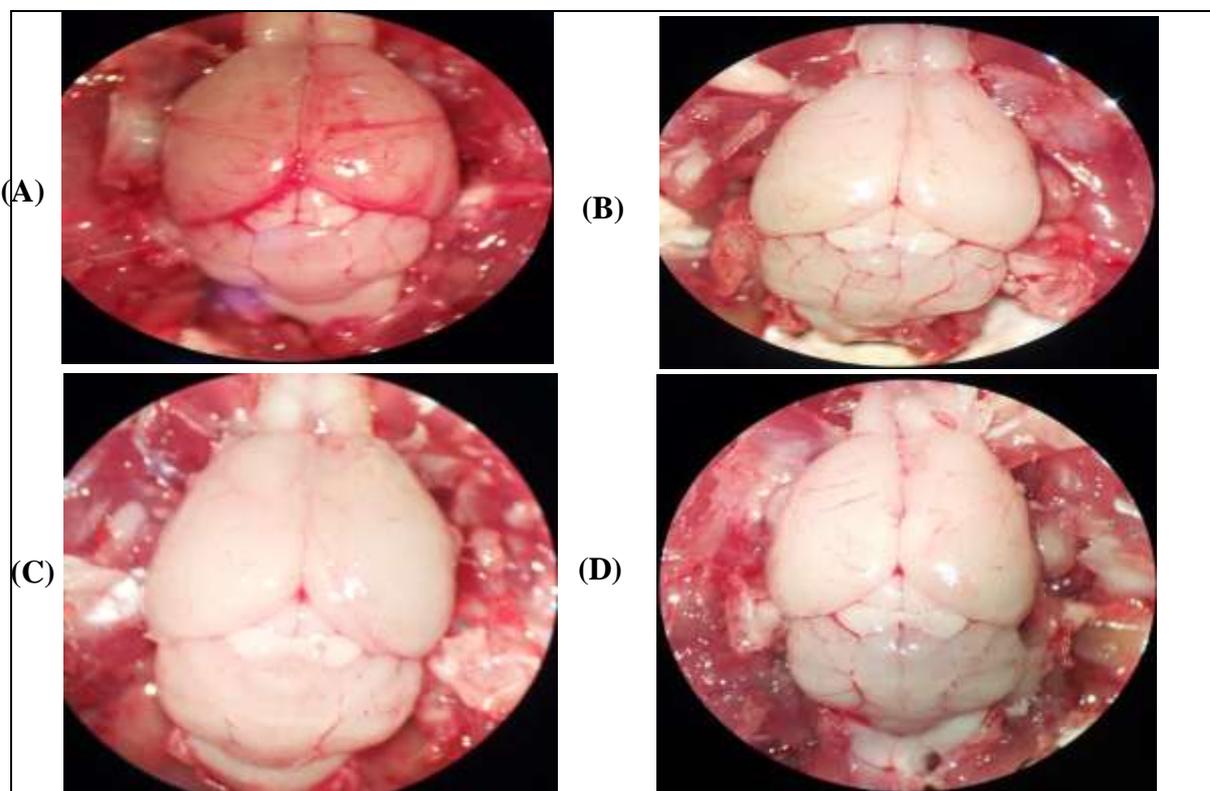
Cependant, cette durée augmente chez les lots de souris qui ont reçu 1/8<sup>ème</sup> de la DL50 du CPF et ceux qui ont reçu le mélange des deux pesticides (CPF-GLY), plus particulièrement chez le lot 1/8<sup>ème</sup>, ou la durée augmente de façon spectaculaire entre le premier test et le dernier test, passant d'un pourcentage d'immobilité presque nul, à un pourcentage avoisinant les 70%.

**Tableau III :** Résultats moyens obtenus lors des tests d'évaluation de l'anxiété.

Tests	Paramètres	Sexe	Lots				
			Témoin	1/8 <sup>ème</sup>	1/10 <sup>ème</sup>	1/12 <sup>ème</sup>	Mélange
Open field	Nombre d'entrées au centre	Mâles	4,6±1,30	0,5±0,29	1,0±0,30	0,9±0,23	7,2±1,81
		Femelles	5,83±1,06	5,22±1,29	5,67±1,08	6,44±2,75	7,5±2,07
	Temps passés au centre (s)	Mâles	4,4±1,69	0,4±0,4	1,163±0,69	1,29±0,67	8,03±2,01
		Femelles	5,28±1,24	6,57±1,94	9,69±3,58	5,1±2,44	11,28±3,62
	Distance parcourue (m)	Mâles	10,74±1,34	3,47±2,28	4,81±0,47	6,82±1,31	11,86±1,26
		Femelles	17,6±2,45	12,41±1,85	12,15±1,18	14,44±3,68	18,94±2,01
Vitesse moyennex 10 <sup>-2</sup> (m/s)	Mâles	3,57±4,48	1,17±0,78	1,16±0,14	2,27±0,43	3,95±0,42	
	Femelles	5,88±0,82	4,13±0,62	4,04±0,39	4,82±1,2	6,31±0,67	
Dark/light box	Nombres d'entrées aux compartiments lumineux	Mâles	7,43±0,89	2,0±1,53	5,13±0,88	3,51±0,81	7,33±1,17
		Femelles	9,18±0,98	10,11±0,86	12,08±1,09	8,67±1,13	9,55±1,33
	Temps passé dans le compartiment lumineux (s)	Mâles	100,1±13,4	60,67±48,25	135,6±23,66	173,6±36,3	111,6±15,6
		Femelles	100,7±13,1	104,7±10,57	134,5±10,57	90,56±15,5	108,5±14,9
Elevated plus maze	Nombre d'entrées aux bras ouverts	Mâles	6,38±1,88	0,33±0,33	6,29±2,83	2,5±0,76	6,58±0,67
		Femelles	8,67±1,75	10,11±2,51	9,67±1,12	10,11±3,58	7,67±1,56
	Temps passé aux bras ouverts (s)	Mâles	40,88±19,3	4,27±2,75	25,59±11,7	9,07±3,49	25,74±3,55
		Femelles	17,25±3,61	17,09±2,89	21,85±5,01	16,13±5,16	16,53±3,99
Elevated zero maze	Nombre d'entrées aux bras ouverts	Mâles	13,29±2,23	4,0±1,52	2,88±1,53	8,0±3,26	10,08±1,57
		Femelles	9,58±1,78	11,11±1,60	10,42±1,79	7,67±1,48	8,0±1,34
	Temps passés aux bras ouverts (s)	Mâles	55,87±9,39	133,6±83,48	55,33±35,27	46,4±25,48	41,88±7,53
		Femelles	34,33±4,68	41,2±8,97	43,21±8,89	33,79±5,47	54,73±15,1
	Distance parcourue (m)	Mâles	7,22±1,30	4,11±2,39	2,34±0,52	5,91±1,23	8,33±0,95
		Femelles	8,61±0,83	8,37±0,99	8,19±0,64	8,12±1,11	8,41±1,03
Immobilité (%)	Mâles	60,17±5,46	80,37±10,03	83,15±3,10	64,15±8,45	56,49±3,78	
	Femelles	58,21±2,58	58,41±5,15	51,27±6,15	58,77±5,29	55,68±3,37	

### III.2 Étude morphologique (macroscopique)

L'observation macroscopique du cerveau de souris traitées aux pesticides montre une altération de l'architecture cérébrale, et diminution de la vascularisation (**Figure 17**).



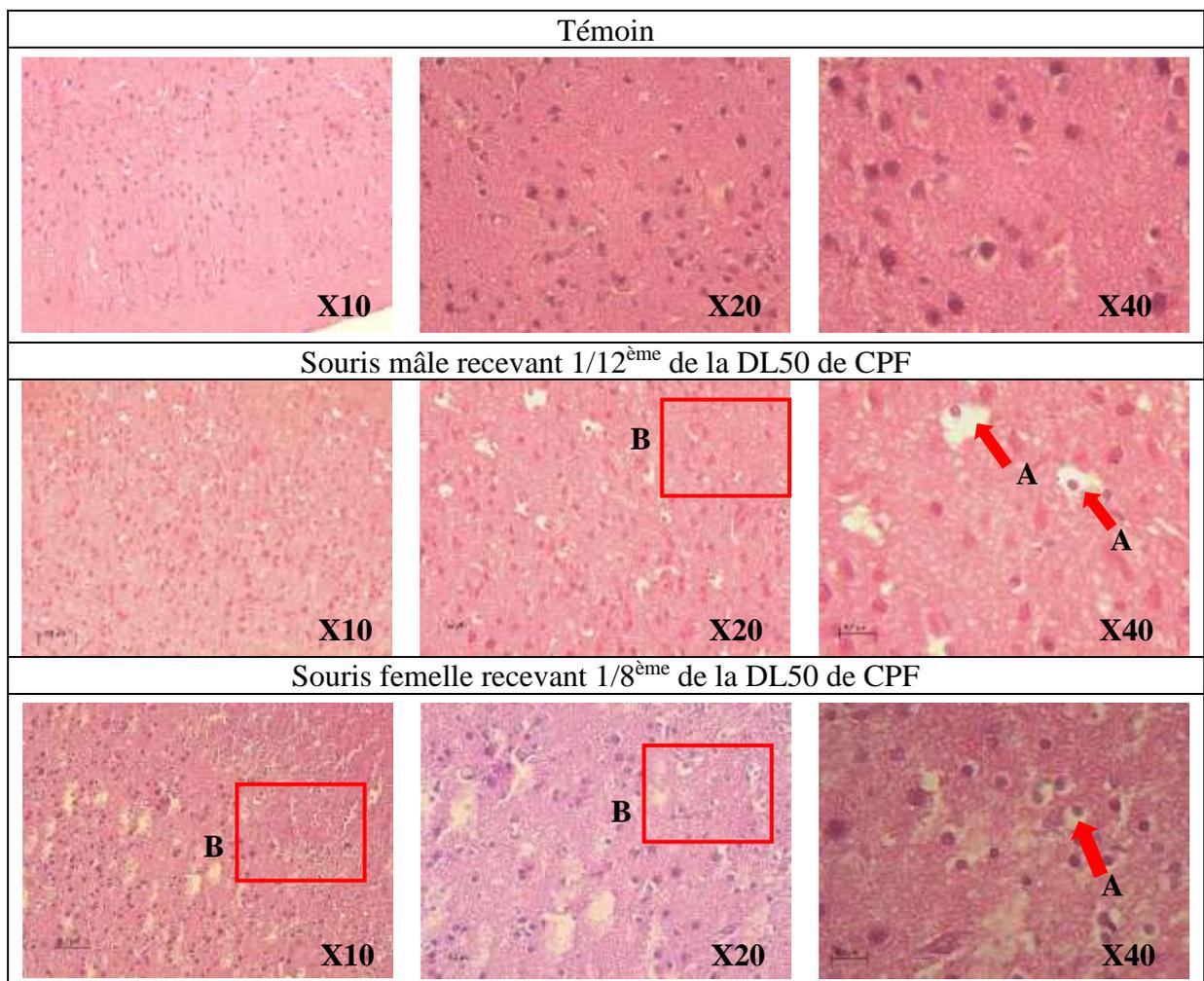
**Figure 17** : Cerveaux de souris témoin et des souris traitées aux pesticides.

**A** : souris témoin. **B** : souris mâle CPF+. **C** : souris femelles CPF+ **D** : souris mâle traitées avec le mélange de pesticides (Glyphosate/Chlorpyrifos)

### III.3 Étude histologique

L'étude histologique révèle la présence de foyers nécrotiques et des infiltrations immunitaires. Certaines zones présentent aussi des cellules avec une perte de l'architecture membranaires. On observe aussi la présence de cellule avec anomalies de dédoublements. L'ensemble de ces constatations histologiques semblent confirmer les résultats obtenus lors des tests comportementaux qui tendaient à démontrer une altération du tissu cérébral suite à l'injection de pesticides (**Figure 18, 19, 20**).

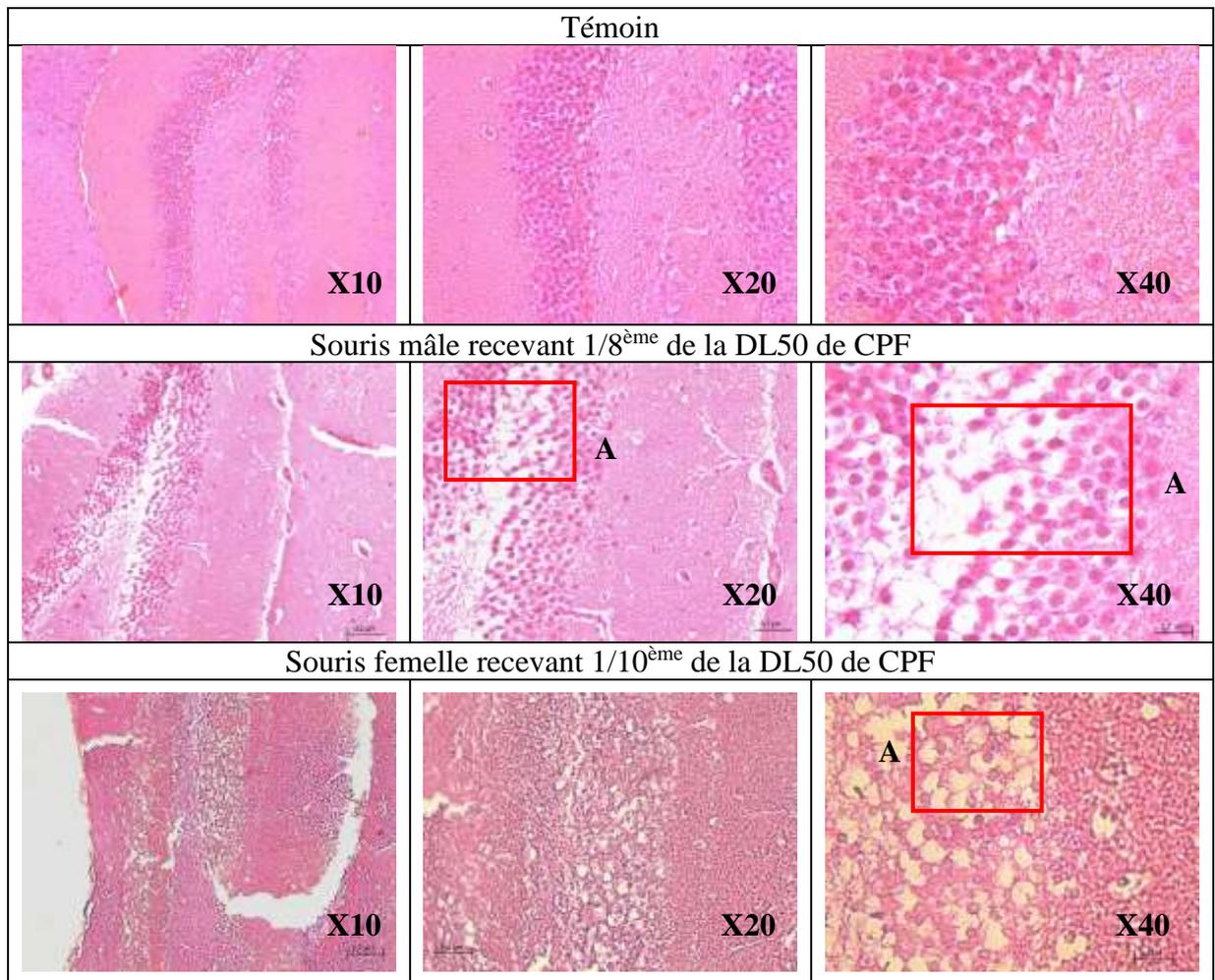
#### III.3.1 Cortex cérébral



**Figure 18** : Coupes histologiques du cortex cérébral des souris témoins et souris traitées aux chlorpyrifos.

**A** : cellules nécrotiques. **B** : Perte d'architecture tissulaire.

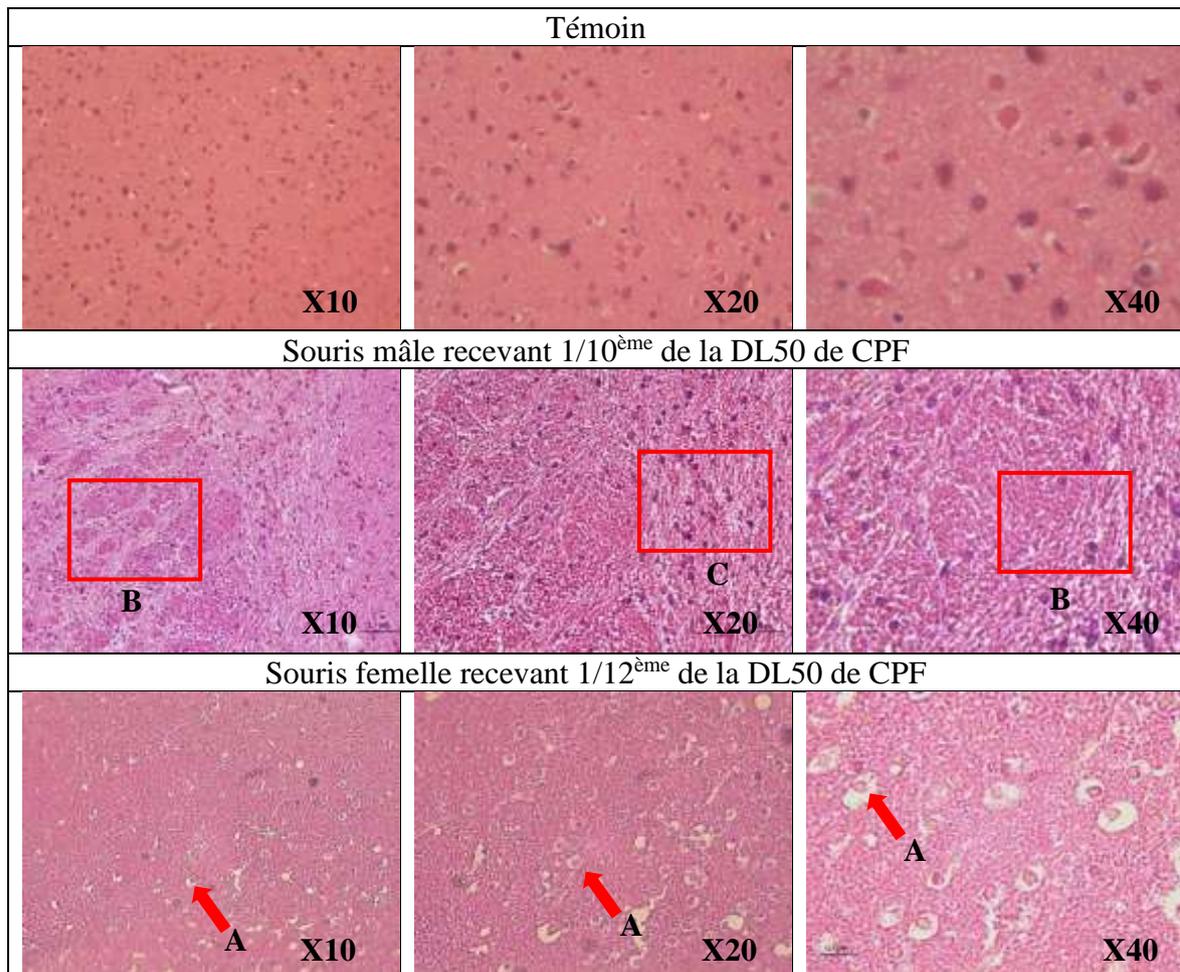
## III.3.2 Hippocampe



**Figure 19 :** Coupes histologiques de l'hippocampe des souris témoins et souris traitées aux chlorpyrifos.

**A :** Foyer nécrotique et perte de l'architecture tissulaire.

## III.3.3 Lobe frontal

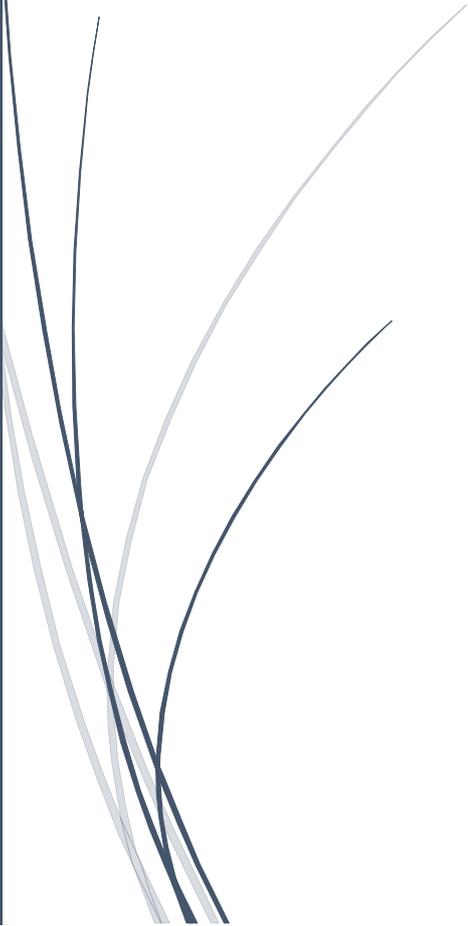


**Figure 20** : Coupes histologiques du front cérébral des souris témoins et souris traitées aux chlorpyrifos.

**A** : cellules nécrotiques. **B** : Perte d'architecture tissulaire. **C** : infiltration immunitaire.

**Chapitre IV**

# **Discussions**



## Discussion

Diverses études épidémiologiques ont rapporté l'éventuelle association du chlorpyrifos avec l'apparition de plusieurs troubles comportementaux, tels que les troubles anxieux-dépressifs (**Braquenier et al. 2010 ; Chen, et al., 2011**), et les troubles cognitifs, dont l'apprentissage et la mémoire (**Blanc-Lapierre et al., 2012**). Pour étudier l'implication de l'exposition subchronique au CPF sur le comportement de lots de souris qui ont reçu des injections par voie intrapéritonéale de 1/8<sup>ème</sup>, 1/10<sup>ème</sup> et 1/12<sup>ème</sup> de la DL50 du CPF et un autre lot traité avec un mélange de pesticides (CPF-GLY à des doses de 1/8<sup>ème</sup> de la DL50 chacun), nous avons évalué par une série de tests, le comportement anxieux, dépressif ainsi que l'apprentissage et la mémoire spatiale.

### I.1.1 Anxiété

Dans notre étude, nos résultats montrent que le CPF a induit un effet anxiogène chez les mâles, et une légère baisse d'anxiété chez les femelles. Ces résultats en accord avec ceux obtenus par (**Shanchez-Amate, et al., 2001**), ou ils ont rapporté que le CPF provoque un effet anxiogène chez des rats traités avec dose aiguë de CPF (1/10 de la DL50 pour les rats), ces résultats peuvent être expliqués par l'altération des systèmes sérotoninergique et dopaminergique, glutamatergique et GABAergique. En effet, ces systèmes de neurotransmetteurs jouent un rôle important dans l'apparition de l'anxiété. Plusieurs études montrent l'implication du taux sérotonine et ces protéines associées dans les désordres de l'humeur et de l'anxiété (**Judge, Savy et al., 2016**). À titre d'exemple, les récepteurs de la sérotonine 5-HT en particulier 5-HT<sub>1A</sub> dont les niveaux d'expressions sont altérés par l'exposition au CPF, peuvent être à l'origine des troubles anxiogènes observés. En plus d'un effet sur les niveaux d'expression, le CPF perturbe le fonctionnement de l'adénylate cyclase. Cette dernière est un élément essentiel dans les voies de signalisation induites par les récepteurs de neurotransmetteurs dont font partie la sérotonine et la dopamine (**Braquenier, 2009**). De nombreux pesticides dont fait partie le Chlorpyrifos, sont connus pour être des perturbateurs endocriniens. En effet, de nombreuses études font état d'une corrélation entre l'administration de pesticides et les dérégulations des niveaux hormonaux. Cette variation hormonale est rapportée comme étant une cause de changements comportementaux, tels qu'une augmentation des niveaux d'anxiété (**D'Hooge et De Deyn, 2001**).

Le mélange du glyphosate et chlorpyrifos ne semble pas provoquer un effet sur l'anxiété chez les souris. Une étude similaire réalisée en parallèle par nos collègues dans les mêmes conditions d'expérimentation, en utilisant le glyphosate à la place du Chlorpyrifos, montre que le glyphosate induit un effet anxiogène chez les deux sexes contrairement à nos résultats qui révèlent que le CPF induit l'anxiété uniquement chez les souris mâles, ceci peut être expliqué par une éventuelle interaction entre ces deux pesticides. En effet la mixture de pesticide peu provoqué un large spectre de réponses : addition, synergie, antagonisme et/ou potentialisation, qui peuvent donner naissance à des effets différents qu'avec l'exposition à ces pesticides indépendamment (**Gamet-Payraastre et Ludowick, 2017**).

### I.1.2 Apprentissage et mémoire spatiale

Nos résultats obtenus à partir des tests réalisés pour évaluer la mémoire spatiale et l'apprentissage montrent que les souris mâles utilisent la mémoire spatiale, cependant pour l'apprentissage, seules les souris ayant reçu le mélange de pesticides (chlorpyrifos et glyphosate) qui ne sont pas affectés. Concernant les souris traitées avec le CPF nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par (**Lopez-Granero, et al., 2016**) qui rapportent que l'exposition au CPF n'altère pas la performance des rats qui ont reçu une nourriture à base de 1/38 de la DL50 par poids corporels de CPF. Tandis que les souris femelles présentent une altération de la mémoire spatiale et de l'apprentissage, excepter le lot de souris ayant reçu 1/10 de la DL50 de CPF qui présente une amélioration de la mémoire. Basaure et son équipe ont rapporté des résultats similaires sur souris exposées au CPF à une dose 96 fois plus faible que la DL50 (**Basaure, et al., 2017**)

L'amélioration de la mémoire chez les femelles provoquée à une dose de 1/10 de la DL50, peut être expliquée par le fait que le CPF peut provoquer une augmentation des niveaux de la norépinéphrine et du glutamate (**Torres-Altora, et al., 2011**). Ces deux neurotransmetteurs jouent un rôle important dans l'apprentissage et la mémoire, leur augmentation peut améliorer les performances (**Lopez-Granero, et al., 2016**). De même, le système cholinergique joue un rôle critique dans de nombreux processus cognitifs, y compris la mémoire spatiale et l'apprentissage, l'inhibition de l'AChE par le CPF produit l'accumulation de l'ACh et en parallèle induit l'augmentation des performances (**Basaure, et al., 2017**).

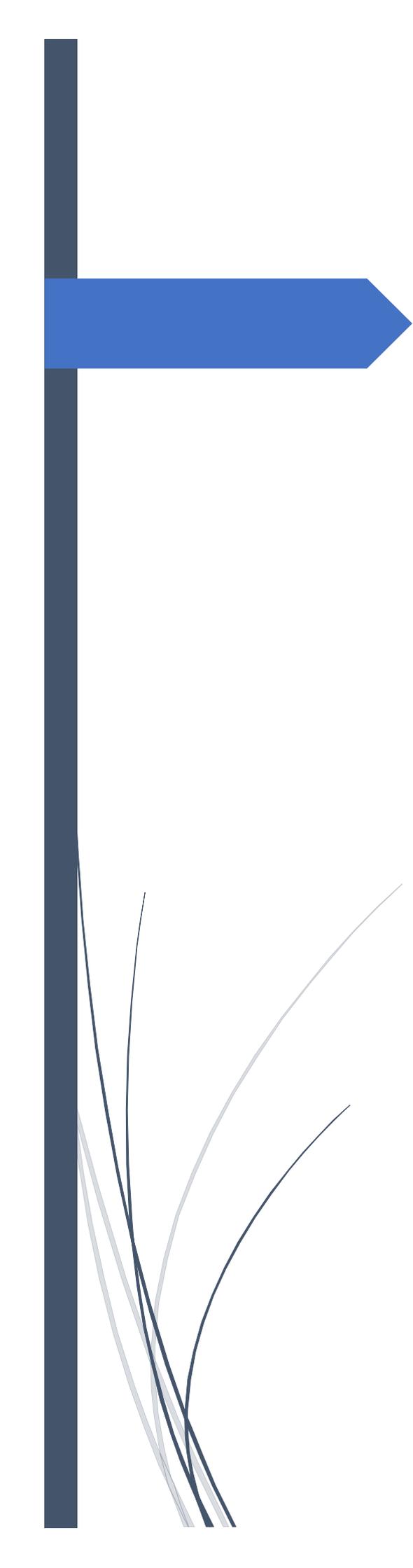
La perte de de l'apprentissage et mémoire peut être aussi liée au stress oxydatif engendré par le CPF en provoquant l'augmentation de la génération de radicaux libres (ROS) et l'altération des mitochondries conduisant à l'activation des voies apoptotiques ainsi la mort des cellules intervenantes dans le processus de mémorisation (**INSERM, 2013 ; Singh et al., 2018**). Ces mécanismes peuvent expliquer les lésions dans les différentes régions du cerveau (cervelet, cortex cérébral, hippocampe), révéler par notre étude histologique.

La différence dans le comportement observée entre les souris mâles et femelles peut être expliquée par la variation hormonale, en effet, des études ont montré que la testostérone donne un avantage aux souris mâles lors des tests de mémoire (**D'Hooghe et Deyn, 2001**).

### **I.1.3 Dépression**

Nos résultats obtenus lors du test de la nage forcée montrent que les doses 1/8<sup>ème</sup> de la DL50 du CPF induisent une augmentation de la dépression chez les femelles, tandis que le mélange des deux pesticides (GLY-CPF) provoque une dépression chez les mâles. Nos résultats abordent les mêmes éléments que ceux observés par Chen et collaborateurs qui rapportent que le CPF induit la dépression chez les rats injectés avec 1/19<sup>ème</sup> de la DL50 (**Chen et al., 2014**)

L'augmentation de la dépression chez le lot ayant reçu 1/8 de la DL50 de CPF peut s'expliquer par l'altération du système sérotoninergique. En effet, la sérotonine (5-HT), jouent un rôle important dans la dépression, plusieurs études réalisées sur des animaux montre que le CPF induit une baisse de concentration de la sérotonine en augmentant l'expression du récepteur 5-HT<sub>1A</sub> (**Slotkin, et al., 2015**), Ce dernier est un autorécepteur responsable de la recapture sérotonine dans la fente synaptique (**Gardier, Jacquot et al., 1995**). En effet, plusieurs études montrent que les lacunes du système nerveux en 5-HT sont souvent associés à des désordres émotionnels dont la dépression (**Chen, et al., 2011**).



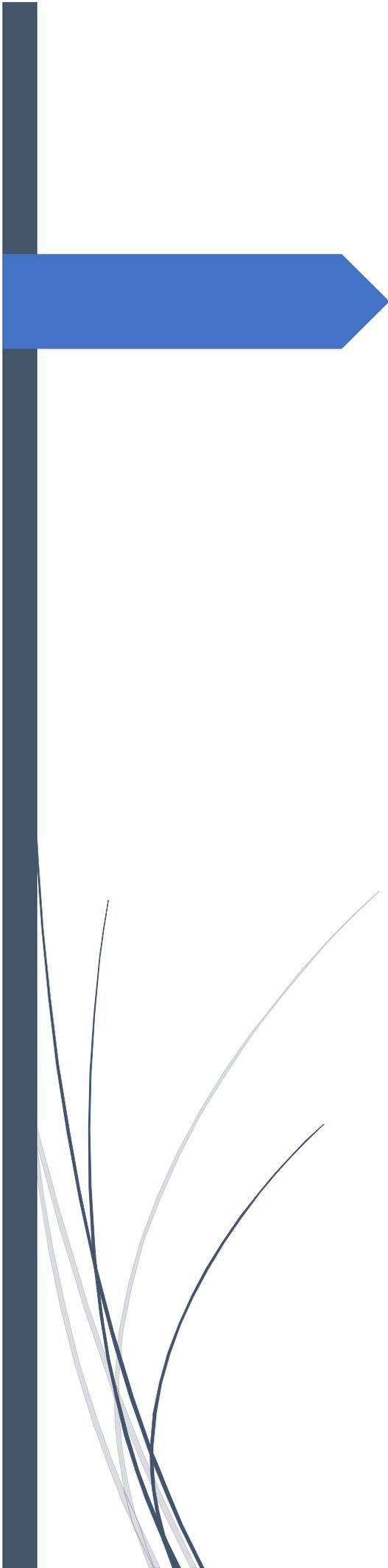
# **Conclusion & perspectives**

## Conclusion & Perspectives

La présente étude évaluant les effets de chlorpyrifos, confirme que cet insecticide organophosphoré provoque des désordres cognitifs, anxieux et dépressifs chez les souris. En effet on observe que le CPF exerce un effet anxiogène sur les souris en fonction du sexe à des doses ( $1/8^{\text{ème}}$ ,  $1/10^{\text{ème}}$  et  $1/12^{\text{ème}}$ ) de la DL50. Concernant l'apprentissage et la mémoire spatiale le Chlorpyrifos provoque des déficits de mémoire chez les femelles excepter à une dose de  $1/10$  de la DL50, indiquant que le CPF a un effet sexe dépendant sur la mémoire spatiale. Cependant cet insecticide provoque un déficit d'apprentissage indépendamment du sexe. Le mélange de pesticides (chlorpyrifos et glyphosate) ne provoque un déficit dans l'apprentissage et la mémoire spatiale que chez les souris femelles, ce qui confirme que le CPF et le mélange (CPF/GLY) sont des perturbateurs endocriniens. L'évaluation du comportement dépressif après l'exposition à une dose de  $1/8^{\text{ème}}$  de la DL50 de CPF et (CPF/GLY) indique que pesticides induise respectivement la dépression chez les femelles et les mâles, ce changement dans le comportement est dû à l'effet toxique de CPF et le mélange de pesticides (CPF-GLY) sur la neurotransmission et la neuromodulation des systèmes cholinergique, sérotoninergique, glutamatergique et dopaminergique. Ce pesticide utilisé à des doses subchroniques induit des lésions dans différentes régions de cerveau qui jouent un rôle dans les différents comportements cités dans cette étude. Pour conclure, cette étude préliminaire a permis de démontrer un effet du Chlorpyrifos sur le comportement des souris à différentes doses subchroniques avec des effets plus généralisés lors de l'utilisation de la dose de  $1/12$  de la DL50. Malgré ces résultats forts prometteurs, il serait intéressant de développer des recherches expérimentales pour approfondir les études sur les effets de CPF sur la physiologie humaine et pour une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires et cela par :

- ✓ Évaluation de l'impact hormonal : ceci va permettre d'affirmer ou non les dérèglements hormonaux potentiels et leur relation avec les changements comportementaux
- ✓ Augmentation de la cohorte : afin de renforcer les observations déjà constatées et améliorer nos significativités statistiques
- ✓ Réalisation de tests locomoteurs : Ceci va permettre d'étudier l'hypothèse d'une dérégulation de la voie cholinergique
- ✓ Dosage des radicaux libres : pour expliquer les phénomènes apoptotiques et nécrotiques, observé dans les coupes histologiques.

- ✓ Dosage des neurotransmetteurs : ceci va permettre de mieux comprendre les différents troubles de la transmission nerveux potentiels
- ✓ Études moléculaires par la réalisation de tests d'immunohistochimie et Q-RT-PCR : ceci va permettre de mieux comprendre l'implication du Chlorpyrifos dans le dérèglement des voies métaboliques.
- ✓ Étudier l'interaction entre le Chlorpyrifos et le Glyphosate : des évaluations chimiques sont nécessaires afin de comprendre les différents mécanismes de complexations entre ces deux pesticides largement utilisés dans notre agriculture.



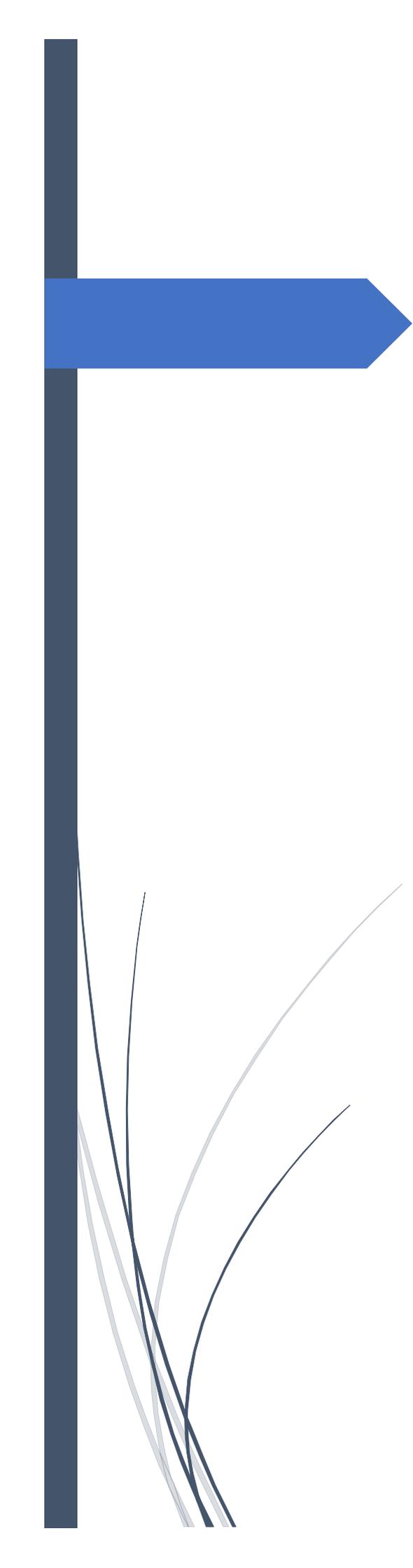
# **Références bibliographiques**

## Liste des références

- Androutsopoulos, V. P., K. Kanavouras and A. M. Tsatsakis (2011). "Role of paraoxonase 1 (PON1) in organophosphate metabolism: implications in neurodegenerative diseases." *Toxicol Appl Pharmacol*, 256(3): 418-424.
- Basaure, P., F. Peris-Sampedro, M. Cabre, I. Reverte and M. T. Colomina (2017). "Two cholinesterase inhibitors trigger dissimilar effects on behavior and body weight in C57BL/6 mice: The case of chlorpyrifos and rivastigmine. *Behav Brain Res*, 318: 1-11.
- Bettiche, F., O. Grunberger and M. Belhamra (2017). Contamination des eaux par les pesticides sous système de production intensive (serres), CAS DE BISKRA, ALGERIE. *Courrier du Savoir*, (23) : 39-48
- Blanc-Lapierre, A., G. Bouvier, A. Garrigou, M. Canal-Raffin, C. Raheison, P. Brochard and I. Baldi (2012). Effets chroniques des pesticides sur le système nerveux central : état des connaissances épidémiologiques. *Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique*, 60 (5): 389-400.
- Braquenier J-B. (2009). Etude de la toxicité développementale d'insecticides organophosphorés : Analyse comportementale de la souris CD1. Thèse de Doctorat, pour l'obtention du grade de Docteur en Sciences. Université de Liege, Département des Sciences et Gestion de l'Environnement, p. 13.
- Braquenier, J. B., E. Quertemont, E. Tirelli and J. C. Plumier (2010). Anxiety in adult female mice following perinatal exposure to chlorpyrifos. *Neurotoxicol Teratol*, 32 (2): 234-239.
- Can, A., D. T. Dao, M. Arad, C. E. Terrillion, S. C. Piantadosi and T. D. Gould (2012). The Mouse Forced Swim Test. *JoVE* (59): e3638.
- Chen, W.-Q., L. Yuan, R. Xue, Y.-F. Li, R.-B. Su, Y.-Z. Zhang and J. Li (2011). Repeated exposure to chlorpyrifos alters the performance of adolescent male rats in animal models of depression and anxiety. *Neurotoxicology*, 32 (4): 355-361.
- Dai, H., Y. Deng, J. Zhang, H. Han, M. Zhao, Y. Li, C. Zhang, J. Tian, G. Bing and L. Zhao (2015). PINK1/Parkin-mediated mitophagy alleviates chlorpyrifos-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Toxicology*, 334: 72-80.
- De Jaeger, C., E. Voronska, N. Fraoucene and P. Cherin (2012). Exposition chronique aux pesticides, santé et longévité. Rôle de notre alimentation. *Médecine & Longévité* 4(2): 75-92.
- Deveci, H. A. and M. Karapehlivan (2018). Chlorpyrifos-induced parkinsonian model in mice: Behavior, histopathology and biochemistry. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 144: 36-41.
- D'Hooge, R. and P. P. De Deyn (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev*, 36(1): 60-90.
- Freire, C. and S. Koifman (2012). Pesticide exposure and Parkinson's disease: epidemiological evidence of association. *Neurotoxicology*, 33(5): 947-971.
- Gamet-Payraastre, L. and C. Lukowicz (2017). "Les effets des mélanges de pesticides. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 52(5): 234-238.
- Garcia, F. P., S. Y. C. Ascencio, J. Gaytán-Oyarzún, A. CerueloHernandez and P. V. Alavarado (2012). Pesticides: classification, uses and toxicity. Measures of exposure and genotoxic risks. *Journal of Research in Environmental Science and Toxicology*, 1(11): 279-293.

- Gardier, A. M., C. Jacquot and F. Artigas (1995). Base neurobiologique du rôle des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> dans le mode d'action des antidépresseurs sérotoninergiques. *médecine/science*, 11 (10) : 14078-17.
- Imane, G. and T. Lanez. EVALUATION DE RISQUE MUTAGENE ET CANCEROGENE DE PESTICIDE." Premier Séminaire National sur l'Electrochimie-Méthodes et Applications, Vol. 1, (2014) El Oued, Algérie 2014 Université d'El Oued
- Inrs, 2008. Couverture béatrice-anne fourmier. Conception et illustration Atelier F. Causse.
- Inserm (2013). "Pesticides. Effets sur la santé." Collection expertise collective inserm paris.
- Judge, S. J., C. Y. Savy, M. Campbell, R. Dodds, L. K. Gomes, G. Laws, A. Watson, P. G. Blain, C. M. Morris and S. E. Gartside (2016). "Mechanism for the acute effects of organophosphate pesticides on the adult 5-HT system." *Chemico-Biological Interactions* 245: 82-89.
- Komada, M., K. Takao and T. Miyakawa (2008). "Elevated Plus Maze for Mice." *JoVE*(22): e1088.
- Lopez-Granero, C., A. M. Ruiz-Munoz, F. A. Nieto-Escamez, M. T. Colomina, M. Aschner and F. Sanchez-Santed (2016). "Chronic dietary chlorpyrifos causes long-term spatial memory impairment and thigmotaxic behavior." *Neurotoxicology* 53: 85-92.
- MAHMOUD Fadila et NAMAOUI Kahina. *Effets des pesticides sur la biologie des modèles murins*. Travail de diplôme en vue d'obtention du diplôme de MASTER, filière Science de la Nature et de la Vie, Université Abderrahmane Mira de Bejaia, p. 10.
- Mehri M. (2008) Etude de l'impact de l'exposition à des mélanges de pesticides à faibles doses : caractérisation des effets sur des lignées cellulaires humaines et sur le système hématopoïétique murin. Thèse de doctorat de l'université de Toulouse. L'Institut National Polytechnique de Toulouse, spécialité Pathologie, Toxicologie, Génétique & Nutrition.
- Nebila Lichiheb, Carole BEDOS, Erwan Personne et Enrique Barriuso « Synthèse des connaissances sur le transfert des pesticides vers l'atmosphère par volatilisation depuis les plantes », Pollution atmosphérique [En ligne], N° 224, mis à jour le : 23/05/2017, URL : <http://lodel.irevues.inist.fr/pollution-atmospherique/index.php?id=4732>  
<https://doi.org/10.4267/pollution-atmospherique.4732>
- NPIC. (2011. )Chlorpyrifos Technical Fact Sheet. 2011 Issue. <<http://npic.orst.edu/factsheets/archive/chlorptech.html>> (accessed 06/06/2018)
- Park, J. H., J. Ko, Y. S. Park, J. Park, J. Hwang and H. C. Koh (2017). "Clearance of Damaged Mitochondria Through PINK1 Stabilization by JNK and ERK MAPK Signaling in Chlorpyrifos-Treated Neuroblastoma Cells. *Mol Neurobiol*, 54(3): 1844-1857.
- Regueiro, Jorge & López-Fernández, Olalla & Rial-Otero, Raquel & Cancho-Grande, Beatriz & Simal-Gándara, Jesús. (2013). "A Review on the Fermentation of Foods and the Residues of Pesticides — Biotransformation of Pesticides and Effects on Fermentation and Food Quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55. null. 10.1080/10408398.2012.677872.
- Salem, H. and E. J. Olajos (1988). "Review of pesticides: chemistry, uses and toxicology. *Toxicol and Health* 4(3): 291-321.
- Sanchez-Amate, M. C., P. Flores and F. Sanchez-Santed (2001). Effects of chlorpyrifos in the plus-maze model of anxiety. *Behav Pharmacol*, 12(4): 285-292.
- Sánchez-Santed, F., M. T. Colomina and E. Herrero Hernández (2016). Organophosphate pesticide exposure and neurodegeneration. *Cortex*, 74: 417-426.

- Seibenhener, M. L. and M. C. Wooten (2015). "Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice." *J Vis Exp* (96): e52434.
- Shepherd, J. K., S. S. Grewal, A. Fletcher, D. J. Bill and C. T. Dourish (1994). "Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated "zero-maze" as an animal model of anxiety." *Psychopharmacology (Berl)* 116(1): 56-64.
- Singh, N., V. Lawana, J. Luo, P. Phong, A. Abdalla, B. Palanisamy, D. Rokad, S. Sarkar, H. Jin, V. Anantharam, A. G. Kanthasamy and A. Kanthasamy (2018). Organophosphate pesticide chlorpyrifos impairs STAT1 signaling to induce dopaminergic neurotoxicity: Implications for mitochondria mediated oxidative stress signaling events. *Neurobiology of Disease*. 31(117): 82-113.
- Slotkin, T. A., S. Skavicus, E. D. Levin and F. J. Seidler (2015). "Prenatal Nicotine Changes the Response to Postnatal Chlorpyrifos: Interactions Targeting Serotonergic Synaptic Function and Cognition." *Brain research bulletin* 111: 84-96.
- Sunyer, B., S. Patil, H. Höger and G. Lubec (2007). "Barnes maze, a useful task to assess spatial reference memory in the mice."
- Takao, K. and T. Miyakawa (2006). "Light/dark Transition Test for Mice." *JoVE*(1): e104.
- Thany, Steeve H. ; Reynier, Pascal ; Lenaers, Guy ; Neurotoxicité des pesticides : Quel impact sur les maladies neurodégénératives ? *Med Sci (Paris)*, 2013. 29 (3);; p. 273-278 ; DOI : 10.1051/medsci/2013293013
- Torres-Altora, M. I., B. N. Mathur, J. M. Drerup, R. Thomas, D. M. Lovinger, J. P. O'Callaghan and J. A. Bibb (2011). "Organophosphates dysregulate dopamine signaling, glutamatergic neurotransmission, and induce neuronal injury markers in striatum." *J Neurochem*, 119(2): 303-313.
- Tóthová, B., M. Kovalska, D. Kalenská, A. Beňová and J. Lehotský (2017). Effect of methionine-induced hyperhomocysteinemia on neurodegeneration in experimental conditions.
- Weiss, B., S. Amler and R. W. Amler (2004). "Pesticides." *Pediatrics* 113(Supplement 3): 1030-1036.
- Yadav, I. and N. Devi (2017). Pesticides Classification and Its Impact on Human and Environment. In : Anil Kumar, J C Singhal, Kuaanan Techato, Luisa T. Molina, Neetu Singh, Prashant Kumar, Pravinder Kumar, Ram Chandra, Santiago Caprio, Seema Upadhye, Seiichiro Yonemura, Surampalli Y Rao, Tian C Zhang, U C Sharma and Y P Abrol *Environmental Science and Engineering*. P. 140-158.



# **Annexes**

## Annexes

### Annexe 1 : Propriétés physico-chimiques du chlorpyrifos

**Nomenclature chimique :** O,O-DiethylO-3,5,6-trichloropyridin-2-yl phosphorothioate

**Formule chimique :** C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>C<sub>3</sub>NO<sub>3</sub>PS

**Synonyme :** dursban, lorsban

**Poids moléculaire :** 350.575 g/mol

**Solubilité :** 2 mg/l dans l'eau

**Apparence :** cristal sans couleur

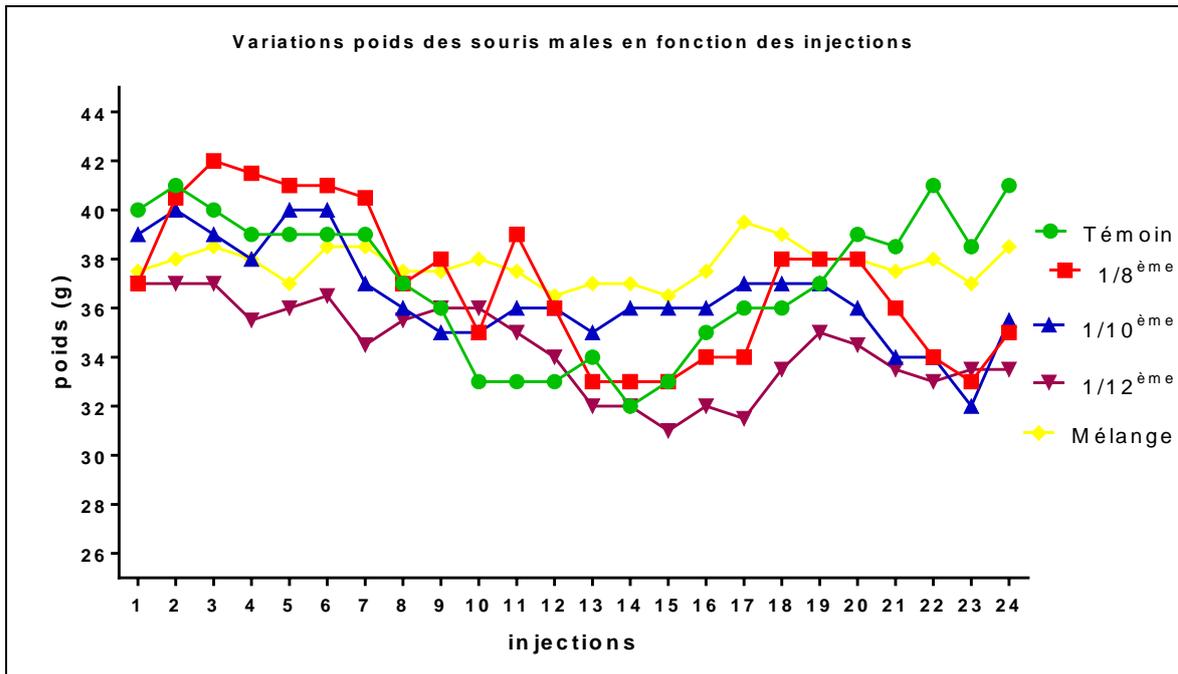
**Odeur :** odeur douce du Mercaptan

**Densité :** 1.4

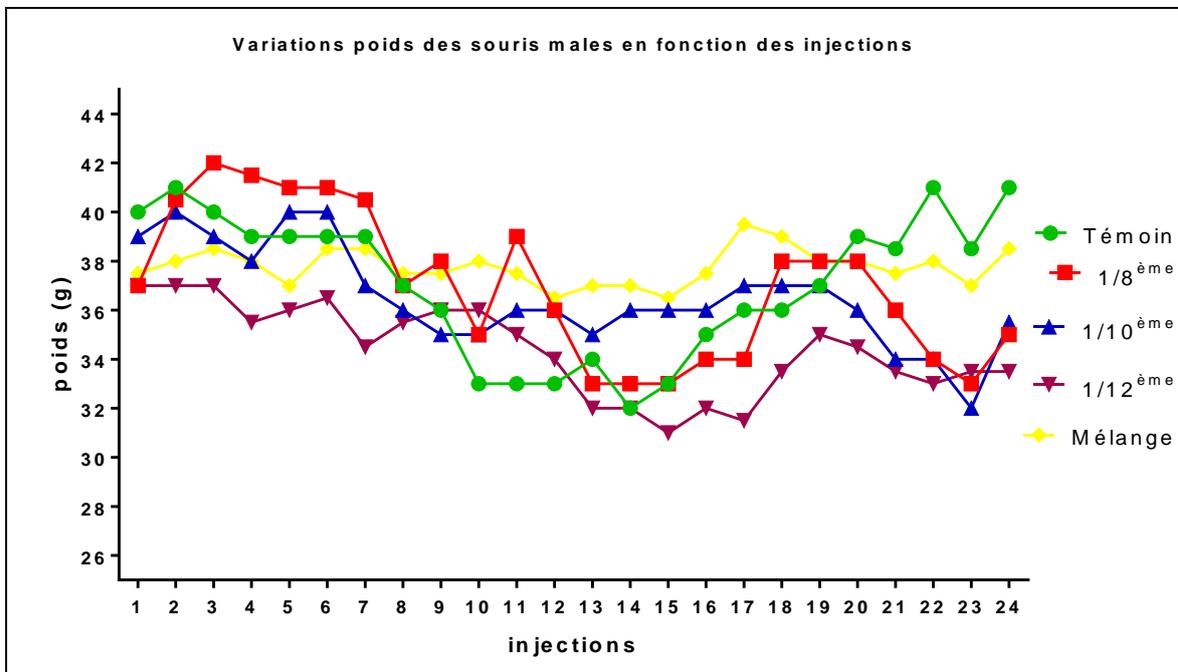
### Annexe 2 : Instruments utilisés

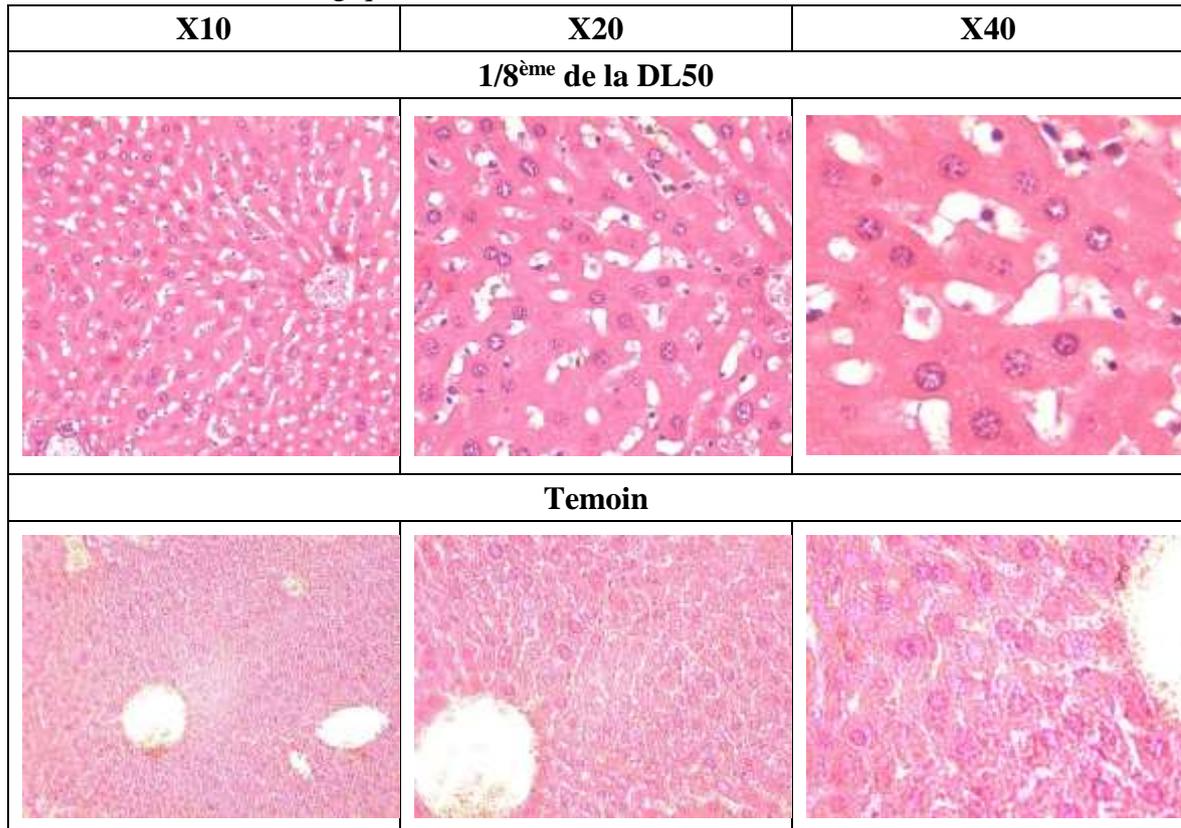
- Matériel de dissection,
- Microscope de dissection (LEICA M651) automate de déshydratation (LEICA TP 1020),
- Station d'enrobage (LEICA EG1150 H),
- Station réfrigérante (LEICA EG1150 C)
- Microtome (LEICA RM2125 RTS),
- Étuve,
- Centrifugeuse,
- Histocassettes,
- Lames et lamelles

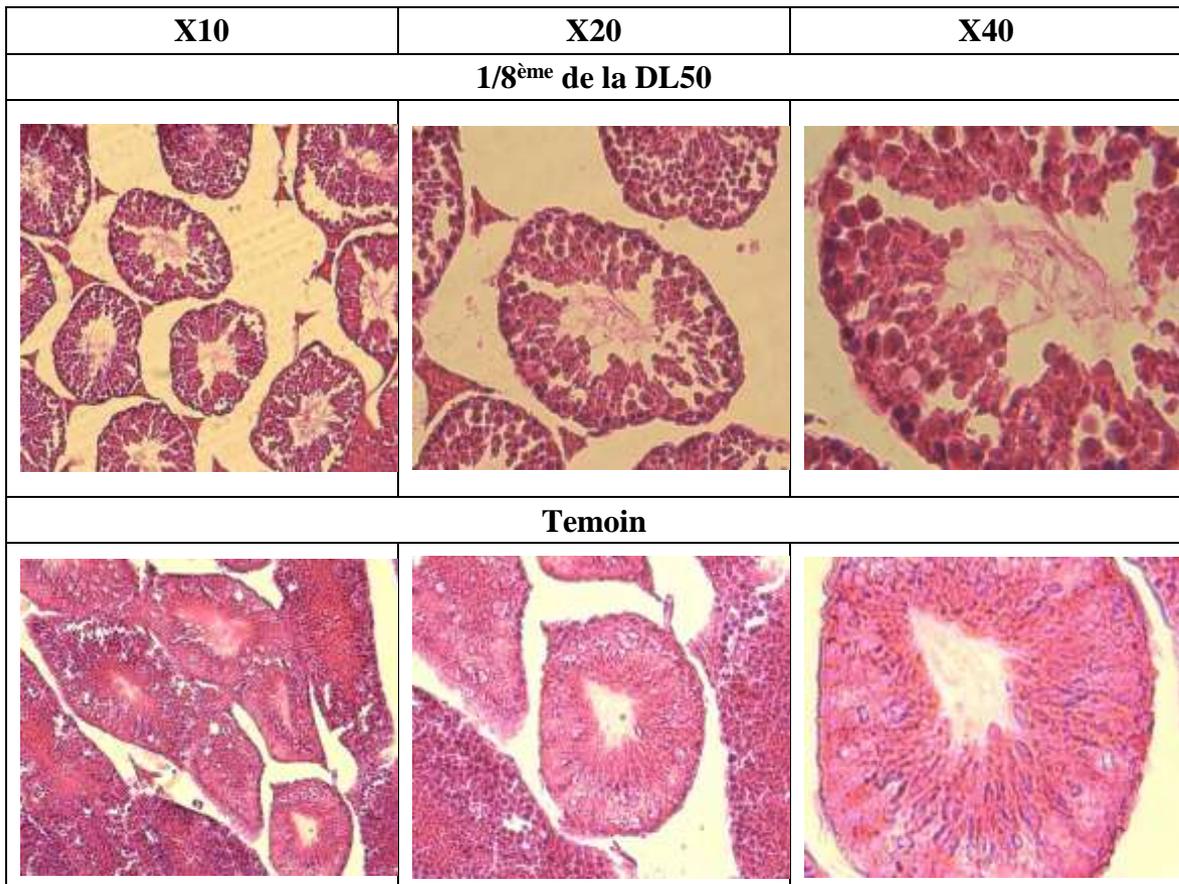
### Annexe 3 : Variations poids des souris males en fonction des injections



### Annexe 4 : Variations poids des souris femelles en fonction des injections



**Annexe 5 : Etude histologique des foies de souris males.**

**Annexe 6 : Etude histologique des testicules de souris males.**

## Résumé

Le Chlorpyrifos est un insecticide organophosphoré, largement utilisé dans l'agriculture mondiale. Diverses constatations font état d'un lien potentiel entre cette utilisation et l'augmentation de certaines pathologies, notamment celles ayant un impact sur le système nerveux, ou il peut causer divers troubles neurologiques. Dans cette présente étude, cinq lots de souris adultes pour chacun des sexes ont reçu différentes injections toutes les 72 heures par voie intrapéritonéale, pendant une durée de trois mois, de différentes doses subchroniques de CPF. En premier lieu, le comportement anxieux et dépressifs ainsi que l'apprentissage et la mémoire spatiale des souris ont été évalués avec une série de tests. Puis une étude histologique pour évaluer ces effets tissulaires et cellulaires. Les résultats obtenus montrent que le CPF a un effet anxiogène chez les souris mâles ( $P < 0.05$ ), et provoque l'altération de la mémoire chez les lots de souris femelles, il induit également la dépression à une dose de  $1/8^{\text{ème}}$  de la DL50 chez les femelles. Pour l'apprentissage ce paramètre est altéré à la fois chez les mâles et les femelles. Les différentes coupes histologiques réalisées au niveau des cerveaux des souris montrent une augmentation des processus apoptotiques et foyers nécrotiques chez les souris ayant reçu des pesticides. Ces résultats confirment que l'exposition subchronique au CPF provoque des troubles neurologiques en fonction du sexe et de façon dose non-dépendante.

**Mots clés :** Chlorpyrifos, Troubles cognitifs, Souris BALB/C, Anxiété, Dépression

## Abstract:

Chlorpyrifos is an organophosphorus insecticide, widely used worldwide. Some studies show that CPF can be toxic in humans, particularly in the nervous system, where it can cause various neurological disorders. In this study, five groups of adult mice for received different intraperitoneally injections every 72 hours during three months. Males mouse injected with different Chlorpyrifos concentration have an anxious and depressive behavior ( $P < 0.05$ ). Learning and spatial memory were also altered especially in female for male only the learning was altered. The histological study leads as to evaluate the histological disorders. Mouse groups treated with pesticides have an increase proportion of necrotic and apoptotic process. These results confirm that subchronic exposure to CPF induce neurological disorders in mice with a sex and dose independent manner.

**Key words:** Chlorpyrifos, Cognitivs disorders, BALB/C mice, Depression, Anxiety.

## ملخص

الكlorبيريفوس هو مبيد فوسفوري عضوي يستخدم على نطاق واسع في الزراعة العالمية. تشير النتائج المختلفة إلى وجود صلة محتملة بين هذا الاستخدام وزيادة بعض الأمراض، لا سيما تلك التي لها تأثير على الجهاز العصبي، أو يمكن أن تسبب اضطرابات عصبية مختلفة. في هذه الدراسة، تلقت خمسة مجموعات من الفئران البالغة لكل جنس حقنات مختلفة كل 72 ساعة في الغشاء البريتوني، على مدى ثلاثة أشهر، من جرعات شبيهة ثانوية مختلفة من الكlorبيريفوس. أولاً، تم تقييم السلوك القلق والاكتئاب فضلاً عن التعلم والذاكرة المكانية من الفئران مع سلسلة من الاختبارات. ثم دراسة نسيجية لتقييم هذه الأنسجة والتأثيرات الخلوية. تظهر النتائج التي تم الحصول عليها أن الكlorبيريفوس له تأثير على القلق في الفئران الذكور ( $P > 0.05$ )، ويسبب ضعف الذاكرة في مجموعات من الفئران الإناث، كما أنه يدفع الاكتئاب بجرعة من  $1/8$  من LD50 في الإناث. تغيير التعلم في كل من الذكور والإناث تظهره المقاطع النسيجية المختلفة التي أجريت في أدمغة الفئران في زيادة العمليات الاستماتية وبؤر نخرية في الفئران التي تلقت المبيدات. هذه النتائج تؤكد أن التعرض المتكررة للجرعات الكlorبيريفوس يسبب الاضطرابات العصبية حسب الجنس والجرعة.

الاكتئاب ، القلق ، الفئران ، الاضطرابات المعرفية ، الكlorبيريفوس : المفتاحية الكلمات