

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-chimie



Mémoire de Master

Filière: Biologie
Option: Génétique Appliquée

Thème

**Effet des pesticides sur le
comportement/mémoire dans un modèle
murin**

Présenté par :

Melle AouciRym et MrBoudjit Mourad

Soutenu le 22/06/2017

Composition du jury

Président: Mr Bribi. N	MCB	Président
Promotrice : Mme Debbache. N	MCB	Promoteur
Examinatrice : Mme Ait Ali. D	MCB	Examinatrice

Année universitaire: **2016/2017**

Introduction

Permettant une production agricole de qualité et un rendement constant, les agriculteurs mènent un combat contre les ennemis des cultures faisant appel à l'utilisation de substances chimiques ; les pesticides. Ces molécules sont toxiques pour plusieurs nuisibles et espèces indiscernables, de ce fait ils sont couramment classés en fonction de leur cible principale d'une part: insecticides, herbicides, fongicides, rodenticides et antiparasitaire, et par leur structure moléculaire d'une autre part: Organophosphoré, Organochloré, Carbamate, thiocarbamates, pyréthionoïde et Nicotinoides (**Caroline et michael, 2006**). Cependant, certains pesticides sont persistants dans l'environnement et de fait de leur action non sélective, la faune et la flore ainsi que l'homme constituent leur cible. En effet toutes les populations humaines sont exposées aux pesticides par le biais de plusieurs voies lors de leur fabrication, utilisation professionnelle, application domestique et environnementale: pollution de l'air, l'eau et contaminations des ressources alimentaires (**Abeer et al., 2016**).

Les effets indésirables de ces molécules sur la santé et leur implication dans plusieurs pathologies ; allergie, irritation, cancers, troubles de reproduction, perturbation du système endocrinien, maladies neurodégénératives et neurotoxicité ; se ressentent de plus en plus, et par conséquent certains types de pesticides ont été remplacés par d'autres (**Chine chan, 2015**). Dans notre études, nous nous sommes concentrés sur l'étude d'un type de pesticide le plus utilisé dans le monde ; les Organophosphorés (OPs) dont 70 % sont des insecticides (**Diane et al.; 2011**). En effet les OPs ont été conçus pour endommager le fonctionnement du système nerveux des insectes, en particulier les insecticides qui ont une toxicité plus élevée contre les espèces non ciblées, l'Homme (**lucio et al.; 2008**).

Nous allons décrire ici les effets neurotoxiques des OPs de manière générale ainsi que les mécanismes suggérés et élucidés, nous regroupons quelques études épidémiologiques chez l'homme pour avoir une idée des effets cliniques observés dans les différentes populations exposées à différente tranche d'âge, et d'autres prévenant des modèles animaux (*in vivo* et *in vitro*) pour mieux comprendre ce qui se passe dans l'organisme et au niveau cellulaire,. En dernier lieu nous allons essayer d'aller encore loin pour rapporter l'enjeu des gènes et l'impact des OPs sur ces derniers. Dans ce contexte extrêmement sensible, nous allons essayer de mettre en évidence les effets neurocomportementaux rapportés dans la littérature en testant l'insecticide OP le plus utilisée: le Chlorpyrifos (CPF).

I. Neurotoxicité des pesticides OPs :

Les OP, sont connues pour leur pouvoir inhibiteur d'une enzyme fortement conservée pendant l'évolution ; l'acétylcholine estérase. Cette inhibition engendre une accumulation accrue de l'ACh au niveau des synapses neuronales et une hyperstimulation de ses récepteurs provoquant des crises cholinergique et l'altération de la signalisation (**Sarah et al., 2015**). En effet, tous les OPs présentent les mêmes manifestations cliniques, mais plusieurs d'entre eux induisent également des symptômes qui ne sont pas en corrélation avec l'inhibition de l'AChE, qui elle est réversible (**Verónica et al., 2016**). Des souris AChE knock-out, présentent des symptômes de neurotoxicité comparables à ceux observés chez les souris de type sauvage après exposition aux OPs. Aucune relation significatif entre l'activité de l'AChE et les déficits neurocomportementaux n'a été démontrés dans les études épidémiologiques lors de l'exposition professionnelle aux OPs (**Christofer et Pamela, 2012**). *In vivo*, l'exposition aux dichlorvos et diisopropylfluorophosphate cause des déficits comportementaux indépendants de cette inhibition, où les niveaux d'AChE reviennent à la normale alors que les manifestations d'exposition persistent longtemps après (**Terry et al., 2014**). Ainsi que certains effets du chlorpyrifose qui ont été observé à des stades embryonnaires pour lesquels l'AChE n'est pas encore exprimée (**Ludmila et xavier., 2014**).

L'action dépend fortement de l'expression et de l'activité de la paraoxonase 1 (PON1) (**Ioannis et al., 2002**). En effet, des études sont actuellement en cours pour comprendre plus précisément, les mécanismes moléculaires potentiels de neurotoxicité due aux OPs dont et la recherche d'éventuelle autres biomarqueurs (d'exposition, susceptibilité, d'effet) et les fondements moléculaires des déficits neurocomportementaux sont envisagée.

I.1. Etudes épidémiologiques et conséquence chez l'Homme :

Des études épidémiologiques ont montré une association entre toxicité des OPs et l'indice d'apparition de trouble à long terme ; psychomoteur, cognitive, trouble psychiatrique, des maladies neurodégénératives et une diminution progressive des capacités neurocomportementales (**Ivanovic et al., 2004**). Cependant, une série de tests neuropsychologiques informatisées ont été développées ; le BSID, CBCL, BNBAS, CPT, NEPSY, FTII ; et utilisés dans les études épidémiologiques, pour comparer les performances cognitives (la mémoire, l'attention, attention soutenue, le réflexe l'intégration visuo - motrice, la capacité verbale et la perception).

Neurotoxicité des pesticides OPs

Des groupes de sujets exposés et non exposés, et de déceler les déficits subtils correspondant à des atteintes neurotoxiques précoces liées à des expositions professionnelles ou environnementales. (**Daniel et al., 2016 ; Yifan et al., 2014 ; Noriko et Masahiro., 2015**). En effet, Ismail et ses collaborateurs, (2012) ont conclu, dans leur méta analyse de 23 études épidémiologiques, que l'exposition chronique des travailleurs agricoles et des applicateurs de pesticides, a un impact significatif sur les performances neurocomportementales.

Une étude conduite en Egypte d'où cinquante-deux travailleurs masculins exposés aux OPs ; pendant la période où les pesticides ont été appliqués à des cultures de coton ; ont été comparés à 50 témoins masculins non exposés, a montré après une série importante d'examen et de batterie de tests neurologique et neurobiologique; une réduction des performances sur la plupart des tests neurocomportementaux (**Farahat et al., 2003**) .

En fonction des données du questionnaire d'une cohorte agricole bien définie réalisée par Breseler et ses collaborateurs, il a été conclu qu'une exposition chronique à un pesticide, était significativement associée à la dépression, troubles affectifs et anxiété. De plus, ils ont observé des changements du système cholinergique qui s'avère utile à court terme afin de réparer le déséquilibre engendré par l'hyperstimulation des RCh, qui est l'expression d'un isoforme de l'AChE connu sous le nom d'ACHE-R (transcrit uniquement pendant le stress). L'augmentation de l'ACHE-R provoque des changements dans l'expression de certains gènes via le c-fos à savoir : la réduction de l'ACh, la réduction du nombre des transporteurs vésiculaire et de la choline acétyl-transférase. Cependant ces réparations engendrent des problèmes psychiatriques (Dépression) à long termes. (**Breseler et al., 2008**)

Concernant la neurotoxicité développementale des OPs, des études récentes ont démontré les périodes sensibles d'exposition durant la grossesse (périodes néo-natales ou prénatales) (**Karen et al., 2012**). Des travaux épidémiologiques ont suggéré un rôle de ces pesticides dans des retards de croissance intra-utérins et les conséquences sur le développement neurologique et le comportement de l'enfant, à savoir; des malformations congénitales, retard mentale, fonctions motrices et acuité visuelle réduites, un temps de réaction plus long. De plus, la mémoire à court terme est atteinte et des problèmes d'attention et d'intelligence plus faible chez les enfants de 7 ans ont été enregistrés (**Leslie et al., 2012 ; Hernández et al., 2016**).

Neurotoxicité des pesticides OPs

Cependant, les nouveaux nés représentent une population particulièrement sensible à l'exposition aux OPs car ces pesticides traversent le placenta, et sont retrouvés dans le sang du cordon ombilicale et le lait maternel pendant l'allaitement, pouvant provoquer la destruction des voies dopaminergiques ou sérotoninergiques pendant le développement (**María Teresa et al., 2013**). Une étude menée en 2012 explique clairement que les faibles niveaux d'enzyme de détoxification, la paraoxonase (PON), lors du développement précoce, engendrent des problèmes fonctionnels qui émergeront plus tard dans la vie chez les nouveaux nés (**Toby et al., 2012**).

D'une autre part l'étude CHAMACOS a démontré lors de leur recherche sur des femmes ayant moins de 20 semaines de gestation, que l'activité enzymatique maternelle élevée peut protéger le fœtus, en effet les niveaux des OPs dans le sang du cordon ombilicale et inversement proportionnelle à l'activité de PON1 maternelle (**Karen et al., 2012**).

Dernièrement, de nombreuses études se sont intéressées à l'étiologie des maladies neuro-dégénératives. Les facteurs environnementaux ont été l'objet d'une attention particulière, notamment suite à des observations cliniques singulières (**Fernando et al., 2015**). Plusieurs cas de syndromes parkinsoniens survenus de manière aiguë; cas de suicide; ont été rapportés après une exposition à un pesticide (**pei-Chen et al., 2013**).

Une récente méta-analyse de 46 études a montré une association entre l'exposition générale aux OPs et les maladies neurodégénératives, en effet tous les OPs étudiés (L'acéphate, l'éthéphon, le phorate, le naled, le malathion, le merphos, le chlorpyrifos, le disulfoton, le diméthoate et les monocrotophoses) étaient associés à un risque élevé de développer la maladie de parkinson. Wang s'est intéressé à une étude de 500 personnes sur les lieux de travail et de résidence, menée dans la vallée centrale de la Californie et a révélé le lien entre la maladie de Parkinson et l'exposition domestique aux herbicides et insecticides (**Wang et al., 2014**). D'autre part une étude de cas témoin, a fournis la preuve que l'utilisation fréquente d'un pesticide domestique augmente les probabilités d'atteinte de PD de 47% et 71% spécifiquement par les OPs (**shilpa et al., 2013**).

En attendant, l'étude des effets neurotoxiques des OPs sur des modèles animaux, peut donner une idée des risques encourus, par conséquent des études *in vivo* sont associées à des recherches *in vitro* pour une meilleure compréhension des mécanismes impliquées dans ces phénomènes neurocomportementaux observés, dans les études épidémiologiques.

I.2. Mécanisme moléculaire et mode d'action:

De nombreuses études ont démontré que les OPs induisent des dommages au niveau des différentes régions du cerveau à savoir ; Neuronopathies, celles qui visent l'axone provoquent des axonopathies, celles qui induisent des myélinopathies et enfin celles qui affectent la neurotransmission (**Steev et al., 2013**). Hormis l'inhibition de l'AChE, d'autres marqueurs ont été identifiés dans les effets des OPs : perturbation de la structure du cytosquelette et perturbation du transport axonal par divers mécanismes, une altération de certaines protéines mitochondriales de la chaîne respiratoire, induction de certain facteur de transcription et de protéines pro-inflammatoires, perturbation de l'homéostasie calcique et de réserve énergétique et une transmission synaptique anormale (**Garan et al., 2002**).

- **OPs et stress oxydant :**

Les OPs exercent leurs effets toxiques par la production de radicaux libres, entretenue par un cycle d'oxydoreduction. La présence de OPs dans une cellule permet ainsi une production continue d' O_2^- et de ses dérivés (peroxyde d'hydrogène, H_2O_2 et radical hydroxyl OH^-), ce déséquilibre excède la capacité des enzymes antioxydantes à éliminer ces espèces réactives de l'oxygène (ERO) intrinsèque (par exemple : Superoxyde dismutase SOD, Gluthation peroxydase et Catalase). Les ERO réagissent fortement avec l'ADN et les lipides (8-oxodesoxyguanoine et peroxydation lipidique) conduisant ainsi à la mort cellulaire (**Rodrigo et al., 2010**). Les OPs ciblent les mitochondries, en inhibant notamment le complexe I et IV de la chaîne respiratoire, ceci a pour conséquence : une diminution de la production d'ATP, essentielle pour la cellule (traduction, maintenance du potentiel membranaire, le transport, dynamique cellulaire,...ect). Cependant cet appauvrissement en ATP contribue à l'accumulation d'agrégats protéiques (provoquant la neurodégénérescence) par l'inhibition du système ubiquitine/protéasome dont l'action dépend de l'ATP (**Anumantha et al., 2012**). Une étude menée par Binukumar, en 2011, rapporte que l'activité de la cytochrome oxydase et de la NADH déshydrogénase a été réduite de 56,7%, et 70% respectivement chez des rats traités au dichlorvos par rapport aux témoins, et une diminution de plus de 60% pour le taux d'ATP.

En plus de son rôle dans la respiration cellulaire, les mitochondries sont également impliquées dans les processus neurodégénératifs apoptotique par l'activation de la voie intrinsèque et stimulation des protéines pro-apoptotiques Bax, Bak, Bid qui favorisent le relargage du cytochrome C, ainsi que l'activation des caspases 3 et 9 (**Alesandra et al., 2015**).

Neurotoxicité des pesticides OPs

Par ailleurs plusieurs études ont démontré que la mort cellulaire cible plusieurs cellules du cerveau mais préférentiellement les neurones dopaminergiques qui seraient plus sensibles pour plusieurs raisons, en effet les OPs stimulerait le métabolisme oxydatif de la dopamine, et caractériser de faible concentration des antioxydants (glutathion) (**Wong et al., 2014**). En outre, des rats exposés à 2,5 mg / kg / j de DDVP pendant 12 semaines, a montré une réduction de 60 à 80% des neurones dopaminergiques de la substance noire et d'une réduction de 60 à 70% des niveaux de dopamine et de tyrosine hydroxylase (TH) (**Binukumar BK., 2010**).

- **OP et neurotransmission :**

D'une autre part l'administration des OPs au niveau du striatum de rats conduit à une élévation transitoire des niveaux extracellulaires de glutamate, Ceci pourrait contribuer à un mécanisme d'excitotoxicité passant par une stimulation séquentielle de récepteurs glutaminergiques NMDA qui conduirait à l'influx de Ca^{2+} au niveau des terminaisons nerveuses et à une activation de la NO synthase inductible et à la mort cellulaire (**Ludmila et xavier, 2014**). L'exposition au CPF à 100 μ M et au CPO à 1, 10, 30 et 100 μ M induit une mort neuronale par des mécanismes excitotoxiques (**Rush et al., 2010**). En effet, la perturbation de l'homéostasie calcique est critique pour la plasticité neuronale, la communication et il est cependant important dans les études neurotoxiques. Ainsi, même de petits changements dans le niveau de Ca^{2+} peut induire à des effets délétères (**Laximikant et al., 2014**). Des études ont rapporté que les OPs y compris le CPF et le parathion, inhibent les concentrations intracellulaires de Ca^{2+} via les canaux calciques voltage-dépendants VDCC diminuant ainsi la croissance des neurites et l'observation des lésions neuronales multifocales (**Marie et al., 2014**).

- **OPs et cytosquelette :**

En dernier lieu, la modification de la cyto-architecture ou de la morphologie des cellules du système nerveux ; à savoir des changements dans la longueur, le nombre ou les motifs de ramification des axones ou des dendrites font partie des autres mécanismes proposés est associés à des symptômes neurologiques lors d'une exposition aux OPs; (**Chen et al., 2013**).

Neurotoxicité des pesticides OPs

Ces effets ont été observés lors d'une exposition aux diazénon qui a altéré la croissance, la longueur et a réduit la ramification des neurites, dans les neurones corticaux primaires de souris (**Daniella et al., 2014**). Les pesticides forment notamment des liaisons covalentes avec certaines protéines du cytosquelette (**Fernando et al., 2015**). Des études *in vitro* ont montré que les OPs agissent sur la structure des microtubules en éliminant le groupe thiol au niveau de la tyrosine 281 et la phosphorylation de la serine 338 de la β -tubuline, empêchant ainsi leur polymérisations (**Wei et al., 2010**). L'une des autres protéines motrices suspectes sont: le complexe Kinesines/Dyneine intervenant dans le transport axonal et la diminution des concentrations des protéines associées au microtubule, est aussi un mécanisme suspect (**Terry., 2012**).

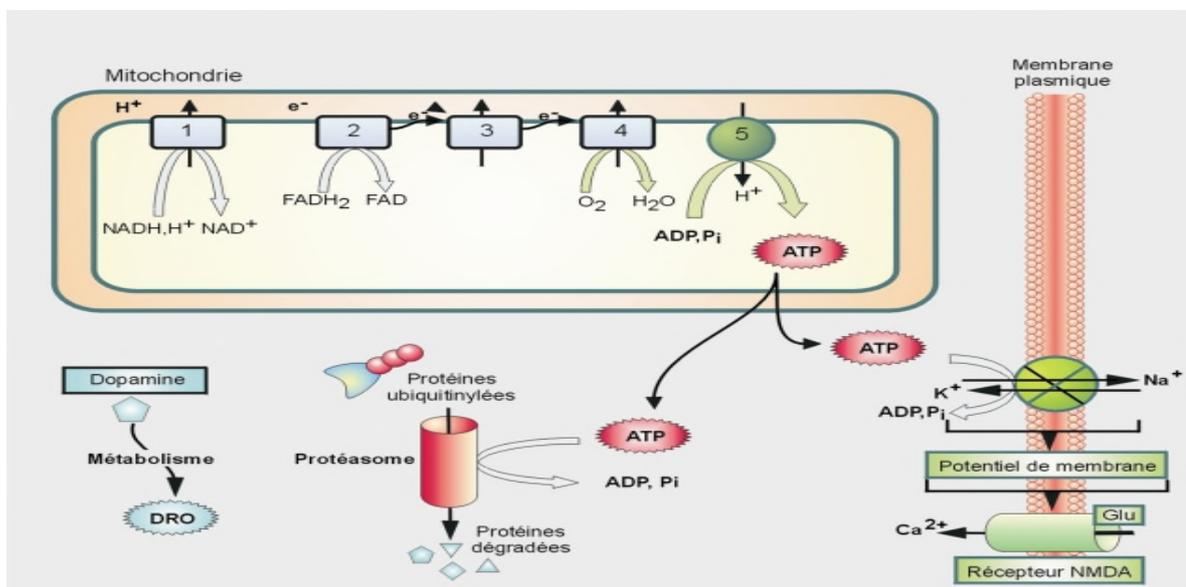


Figure 01 : Schéma récapitulatif des cibles cellulaires et mode d'action des OPs

Après avoir introduit quelques généralités et des études antérieures sur les effets des pesticides avec une description du mécanisme, il s'avère qu'il s'agit d'un complexe enchevêtrement de différentes voies dépendantes les unes des autres, ce qui rend encore les études plus difficiles.

II. Gènes et Pesticides :

Les susceptibilités individuelles à des maladies sont modifiées par des facteurs génétiques et épigénétiques. Cependant, certaines populations présentent une vulnérabilité génétique aux effets de l'exposition aux pesticides et sont par conséquent plus à risque que les autres (**Carol et al., 2013**).

En effet, il existe des polymorphismes au niveau des gènes codant pour les enzymes de métabolisme et de biotransformation des OPs, augmentant ainsi les risques neurotoxique de ces derniers (**Ken et al.; 2017**).

Les polymorphismes mis en cause dans les susceptibilités génétiques aux effets des pesticides concernent: gène du cytochrome P450, gène de la glycoprotéine P, gène DAT et gène de la paraoxonase. Par ailleurs, 160 polymorphisme ont été identifiés pour le gène codant l'enzyme PON 1 dont les SNP sont les plus étudiés (**Luci et al., 2004**), en effet, il existe 2 polymorphismes sur les régions codantes et 5 au niveau du promoteur qui influence à la fois la quantité et l'activité de cette enzyme, par exemple : SNP au niveau du promoteur: C108T augmente la concentration de PON de deux fois. Cependant, des études épidémiologiques se sont plus axées aux polymorphismes des régions codantes, à savoir : L55M et Q192R, qui sont des substitutions d'acide aminé présents en position 55 et 192 (Leucine: Méthionine) et (Glutamine: Arginine) respectivement. Certaines études estiment que la forme R a une activité catalytique de huit à neuf fois supérieure à la forme Q et fournit donc plus de résistance à la toxicité aiguë des OPs à des doses plus élevées, de même pour la forme L qui hydrolyse les oxons plus efficacement que la forme M grâce aux fortes concentrations de PON et par conséquent une détoxification plus rapide des OPs. On outre, les porteurs de la variante allélique Q192 (QQ) seraient prédites à avoir une sensibilité accrue à certains OPs par rapport à ceux homozygotes pour l'alloforme R192 (RR) ou hétérozygote 192 (QR) (**Thomas et al., 2012; Karen et al., 2012; shilpa et al., 2013; Carol et al., 2013; Pei-Chen et al., 2013, Paul et al., 2016; Kaur et al., 2017**). Par ailleurs, d'autres études se sont intéressées à l'impact des pesticides OPs sur les gènes et leurs transcriptions. Une étude récente, a montré qu'une hypométhylation de l'ADN ainsi que l'altération des voies de l'assemblage et de régulation de la chromatine, est associée à l'exposition à certains OPs et pourrait, en cas d'atteinte neuronale conduire à des perturbations de l'expression de certains gènes modifiant ainsi la plasticité neuronale et le bon fonctionnement de l'apprentissage et de la mémoire chez les adultes (**Iva et David,**

2012; Ludmila., 2014). Des modifications induites par l'exposition aux OPs ont été observées pour les gènes codant les neuropeptides hippocampique chez les animaux, associés à divers déficits neurocomportementaux y compris; le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF), la cortistatine (CORT) et le neuropeptide Y (NPY) ; et une réduction significative de l'expression des gènes codant pour certaines protéines; la cofiline, Protéine de choc thermique 1, protéine Rho, les sérine protéinases, Gène de l'histone germinale H4, B-36 VDAC, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et la sous unité ATPsynthase (**Verónica et al., 2016**).

Miguel et ses collaborateurs (2016), ont mis en évidence lors de l'exposition de cellules embryonnaires de souris au CPF et son métabolite CPO, une altération des voies de signalisation de différenciation cellulaire et une diminution de l'expression des gènes tels que : Vegfa, Bcl2, Jun et Amot. Une autre étude a démontré que le traitement néonatal des rats avec du diazinon, a provoqué des changements significatifs des taux d'expression des gènes liés aux développements des maladies neurodégénératives ; avec une régulation positive de l'acmsd et du lamp3, et une régulation négative de l'atp13a, gak, hip1r, park2, park7, pink1 et pla2g6. Alors que l'exposition de cellules PC12 à du chlorpyrifos pendant 72h a entraîné une forte régulation à la hausse de deux gènes (acmsd et snca), tandis que quatre autres (atp13a, bst1, gba3, lamp3) ont montré des décroissements significatifs de transcription (**Theodore et al., 2011**). Christopher de son côté a mis l'hypothèse que la toxicité aux OPs engendre une réponse neuro-inflammatoire qui s'avère à la fois neurotoxique et neuroprotectrice, et cela grâce aux études *in vitro* et *in vivo*, ou une exposition à différents pesticides OPs ont engendré des régulations positives des gènes impliqués dans la signalisation des cytokines proinflammatoires (LFAP, NYREN18, HSPB2, PSMB8, PSMB10, PRKCA, IL-6R et PDCD5) TNF- α , NF- κ B, ainsi que les molécules d'adhésions (ICAM-1, VCAM-1, E-selectine) au niveau de l'hippocampe et le cortex des rats et des souris traitées ainsi que pendant la culture des astrocytes et de microglies (**Christopher et Pamela., 2012**).

En vue de la complexité organisationnelle du cerveau, certaines formes de toxicité restent inaperçues, cependant des études neurocomportementales ont été établies afin de mieux s'informer sur les effets des pesticides sur la santé humaine, et cela grâce aux modèles animaux, ces dernières seront explorées dans ce travail.

III. Matériel et Méthode

Dans notre étude, nous allons nous référer aux protocoles développés par (Terry *et al.* 2012) dans le but d'étudier la neurotoxicité du **Chlorpyrifos** par l'évaluation neurocomportementale, avec comme modèle animal les souris.

III.1. Matériel biologique

III.1.1. Animaux et condition d'élevage :

Notre modèle biologique est la souris de poids moyen de $35g \pm 2g$ provenant de l'animalerie de l'université A/M Bejaia. Les animaux sont élevés dans des cages polyéthylène, avec accès libre à la nourriture et l'eau, et dans les conditions environnementales bien déterminé (photopériodicité naturelle d'un cycle de 12/12h, humidité relative de $(65 \pm 5)\%$ et une température constante de $25^{\circ}C$).

III.2. Méthodes

III.2.1. Traitements des animaux

Les animaux ont été répartis en trois groupes expérimentaux de huit souris chacun ($n=8$) et ont été traités, comme suit:

Groupe Témoin: a reçu une administration intragastrique de 0,5 ml de NaCl pendant 21 jours

Groupe Test 1: a reçu une seule injection de CPF a 200mg/kg

Groupe Test 2: reçoit un volume de chlorpyrifos à raison de (20mg/kg/jr).

Tous les groupes ont été traités chaque jour pendant 21 jours sauf le groupe test (1) et les souris avaient accès libre à l'aliment et à l'eau pendant cette période.

III.2.2. Tests de comportement

De multiples tests comportementaux peuvent être utilisés pour évaluer l'apprentissage, la mémoire et le comportement dans des modèles animaux. L'ensemble des tests ont été effectués aux cours des séances entre 10h à 16h, pendant 8 jr.

III.2.2.1. Tests de mémoire et d'apprentissage :

a) La piscine de Morris (MWM) :

- **Description du test**

Ce test a été conçu par Morris en 1984 pour évaluer la mémoire référentielle et la mémoire de travail des rongeurs (Avneet et al., 2012). Mis dans une situation aversive (l'eau), le rongeur doit se réfugier sur une plate-forme immergée sous la surface du bassin par le biais d'une représentation spatiale. Pour cela, l'animal doit utiliser les différents indices spatiaux disponibles en adaptant des stratégies égocentriques ou allocentriques (Ines et Rebecca., 2015).

- **Dispositif expérimental**

Le dispositif expérimental du test de la piscine de Morris est constitué d'une enceinte circulaire de 120 cm de diamètre et de 25 cm de hauteur, remplie à mi-hauteur d'eau à 23°C. L'eau est rendue opaque par l'ajout du lait en poudre. La plate-forme, constituée d'un cylindre (10cm de diamètre) en plastique, est immergée à 0,5cm sous la surface afin d'être invisible pour l'animal. La piscine est placée dans une pièce comportant différents indices distaux (étagères, carton, meuble, formes géométriques, etc.) susceptibles de permettre à l'animal de se repérer dans l'enceinte et de mémoriser la position de la plate-forme par rapport à un cadre de référence allocentrique. La tâche de la souris est d'apprendre à rejoindre la plateforme le plus rapidement possible (Sunita et al., 2010).

- **Protocole**

Le protocole développé par **Caroline et Michael, (2006)** a été adopté.

Test de mémoire de référence : les souris sont amenées dans la pièce une heure avant le début du test pour une adaptation. Ce protocole dure 5 jours, le premier consiste à une séance d'habituation au nouvel environnement. Les jours qui suivent (Phase d'acquisition) dure 3 jours, avec 3 essais pour chaque souris, séparés par un délai de 5min chacun.

La souris est déposée dans l'un des quadrants (O, E, S) de la piscine qui varie d'essai en essai, face à la plate-forme invisible depuis le centre du quadrant (N) dont la position reste inchangée au cours des 4 jours de l'expérience.

Matériel et Méthode

Cependant le temps de latence pour trouver la plate-forme est limité à 60s et la souris est autorisée à y rester pendant 30s, si la souris ne trouve pas la plate-forme durant les 60 s de l'essai, nous la guidons jusqu'à la plate-forme. 24H après le dernier jour d'apprentissage, la plate-forme est retirée pour subir un test de rétention d'une minute.



Figure 02: Photographie illustrant le dispositif expérimental de MWM

- **Variables mesurée**

- Le temps de latence pour trouver la plate-forme
- Le nombre d'entrées dans le quadrant cible
- Le temps passé dans ce dernier

b) Test de reconnaissance d'objet (NOR)

- **Description du test**

Le test de reconnaissance d'objet permet d'étudier la mémoire déclarative chez les rongeurs. Cette tâche évalue la capacité de la souris à reconnaître un nouvel objet par rapport à un objet familier dans un environnement connu (tendance naturelle des rongeur à explorer préférentiellement un nouvel élément) (**David et al., 2011**).

- **Dispositif utilisé et Protocole :**

Les souris sont placées dans une boîte (40×40cm) ou sont déposés deux objets identiques (D: 2 cm, H: 4 cm). Les souris sont laissées explorer librement pendant 10 min. Après 2 min de rétention, l'animal est replacé dans l'enceinte pendant 5 min pour explorer à nouveau les objets dont l'un a été remplacé.

A noter que les souris ont eu droit à une phase d'habituation à l'enceinte ; déjà utilisée pour le test de locomotion.



Figure 03 : Dispositif utilisé dans NOR

- **Variables mesurées :**

- Le temps d'exploration pour l'objet familier et nouvel objet
- L'indice d'exploration.
- Discrimination Ratio

c) Tests de comportements

La durée de tous les tests de comportement que nous avons fait durant les 10min comportant 02 sessions de 05 minutes chacune.

c1) Labyrinthe en croix surélevé (EPM)

- **Description du test**

Le test du labyrinthe en croix surélevé, initialement décrit par Handley et Mithami en 1984, a été développé dans le but de mesurer le taux d'anxiété chez les rongeurs ou l'effet anxiolytique d'une molécule. En effet, la forme du dispositif nous permet de détecter la situation de la souris. Le premier jour, les souris ont été placées à l'extrémité d'un bras ouvert pendant 5 minutes, avant le test. Après cette séance d'habituation, les souris ont été déposées individuellement au centre du labyrinthe face à un bras ouvert, les laissant explorer librement l'appareil d'un délai limité à 10min. (Xiaong *et al.*, 2011, Contreras *et al.*, 2014).

- **Dispositif utilisé**

L'appareil est construit en bois et se compose de deux bras ouverts protégés, perpendiculaires à deux autres fermés (50 cm x 10 cm x 40 cm). Les bras sont étendus à partir d'une plate-forme centrale (10cm x 10 cm) et le labyrinthe est élevé à une hauteur de 50 cm du sol.



Figure 04: Dispositif utilisé dans EPM

- **Variables mesurées**

- Le temps passé dans les différentes parties du dispositif
- Le nombre d'entrées dans les bras fermés et dans les bras ouverts
- Head deapping
- Calcule de l'index d'anxiété

c2) Test Claire/obscur:

- **Description du test et dispositif utilisé**

Ce test s'appuie sur les propriétés aversives d'un champ ouvert et la comparaison des activités exploratrices dans un compartiment fortement éclairé et illuminé (25x25x40cm) et d'une chambre sombre en bois (25x25x30cm), ces deux compartiments sont séparés par une petite ouverture (10x5 cm). Chaque sujet a été déposé dans le centre de la boîte sombre, et ont été autorisés à explorer l'appareil pendant 10 min par intervalle de 5min (Muhammad et Sultana, 2016; Sarah, 2017).



Figure 05: Dispositif utilisé dans le test C/O

- **Variables mesurées**

- Le temps passé dans chaque compartiment

c3) Planche à trous/ Hole board discrimination test

- **Description et dispositif du test**

Mis en place pour la première fois par Boissier en 1964, afin d'évaluer le comportement exploratoire et de curiosité chez la souris. On place les souris individuellement pendant 10 min, dans une boîte de 40 cm × 60 cm, avec 15 trous de 3cm de diamètre chacun réparti uniformément sur le plancher (**Sunita Sharma et al., 2010; Shankar et al., 2016**)



Figure 06: Photographie illustrant le dispositif expérimental utilisé

- **Variables mesurées :**

- Le nombre de trous explorés par la souris

c4) Test de bille enterrée

- **Description du test et dispositif utilisé :**

Le test a été utilisé pour mesurer l'enfouissement défensif induit par l'anxiété, 12 billes distancées de 5cm, ont été uniformément placées dans des cages (30 × 23 x 19 cm) tapissées d'une litière de 4,5cm. Les souris ont été ensuite déposées dans les cages individuellement, pendant une période de 15 minutes. (**Kaziya et al., 2016**).



Figure 07 : Dispositif expérimental utilisé

- **Variables mesurées :**
 - Le nombre de billes enfouies

c5) Test des champs ouverts

- **Description et dispositif du test**

Le test de l'Open Field, initialement décrit par **Hall (1934, 1938)**, a été développé dans le but de mesurer les différences de réactivité émotionnelle chez le rongeur. Le test consiste à placer l'animal dans une enceinte inconnue et à observer son comportement et évalue la capacité exploratoire dans un contexte stressant. Chaque souris était initialement placée dans un des quatre coins de l'open-field, la tête orientée vers le coin. Son comportement était observé pendant 10 min par phase de 5min (**Quillfeldt, 2016**).

- **Dispositif utilisé**

L'activité locomotrice, est mesurée dans le test de l'Open Field, grâce à un dispositif fréquemment utilisé en expérimentation. Le dispositif utilisé est une enceinte carrée en bois de 50cm de côté et de 30cm de haut (figure 03).

- **Variables mesurées :**
 - Le nombre d'entrées dans la partie centrale et périphérique
 - Le nombre total de carreaux traversés

NB : Tous les dispositifs ont été nettoyés avec de l'éthanol à 70% après chaque passage de souris.

III.2.3. Etude Histologique

Les souris ont été sacrifiées sous anesthésie au chloroforme après avoir subi les différents tests neurocomportementaux ainsi que ceux de la mémoire. Les cerveaux de souris (Test et Témoin) ont été prélevés, pesés et conservés dans du Formol (10%) afin de réaliser des coupes histologiques. Ces coupes ont été réalisées au laboratoire de biologie des cancers au niveau de la faculté de médecine à l'université de Bejaia, Campus Aboudaou. La technique histologique utilisée est celle décrite par **Martoja et M Martoja, 1997**):

Pour l'étude histologique, des segments ont été fixés dans du formol (10%). La pièce anatomique sera entièrement déshydratée par de l'éthanol qui sera ensuite traité avec le xylène avant l'inclusion dans la paraffine.

Matériel et Méthode

La déshydratation a été réalisée par submersion de la pièce dans 7 bains successifs (5mn) d'éthanol allant de 40 à 100%, suivis par 3 bains de xylène pur. L'inclusion était réalisée dans des moules permettant la confection de blocs qui se montent ensuite sur le microtome afin de réaliser des coupes de 3 μm d'épaisseur. Les coupes ont été ensuite déparaffinées par chauffage à l'étuve pendant 3 heures.

Pour mettre en évidence les cellules, les coupes ont été d'abord réhydratées par submersion successivement dans les bains suivants: 1 bain de xylène (30 min), 3 bains d'éthanol à des concentrations décroissantes: 100%, 90%, 80% (5 min chacun). Après rinçage avec de l'eau distillée, les coupes réhydratées ont été placées dans un bain d'hématoxyline (2min) pour colorer les noyaux, l'excès de colorant est enlevé par de l'eau du robinet. Elles ont été mises ensuite dans un bain 1% d'éosine (60 secondes) pour colorer le cytoplasme, l'excès de colorant est enlevé par l'éthanol.

Les lames ainsi colorées ont été couvertes de lamelles. Finalement les lames sont prêtes à l'observation microscopique à plusieurs grossissements.

III.3 Analyse statistique des résultats :

Les données expérimentales obtenues ont été exprimées en moyenne \pm SEM pour un certain nombre d'expériences. Les différences significatives entre les groupes ont été déterminées à l'aide de l'analyse de variance (ANOVA) suivie de la méthode Benferroni ; *Compare selected pairs of columns*. Les différences ont été considérées comme significatives à $P < 0,05$.

Résultat

IV. Résultat :

IV-1 Observation du comportement et tableau clinique des souris

Les souris mâles et femelles traitées par une dose unique de 200mg/kg du CPF présentent les symptômes ci-après :

De fortes convulsions et agitation, accélération du rythme cardiaque, sueur, diarrhée et une difficulté respiratoire. L'activité des animaux est réduite, leur démarche devient lente jusqu'à ce qu'ils se couchent sur le ventre et se rangent les uns à côté des autres. Au bout de 30min la mort survient.

Il a été observé chez les animaux traités tous les jours et pendant 21 jours avec du CPF à 20mg/Kg/J les modifications sont décrites dans le tableau I :

Tableau I: Les modifications observée chez les souris traités avec du CPF

Modification	Souris Male	Souris Femelle
Poils hérissés	5ème injection	13ème injection
Œdème	7ème injection	non
Comportement de peur	8ème injection	15ème injection
Agressivité	11ème injection	non

- **Poids corporel**

Les mesures du poids corporel ont été effectuées au cours de 5 séances d'observation menées tout au long d'une série d'injections intra-gastrique du CPF (Groupe test) ou du NaCl (Groupe Témoin) pendant 21jours. Les souris intoxiquées aux CPF évoluent presque de la même façon que les témoins avec augmentation séquentielle de poids. Cependant la différence dans le gain de poids au cours de la période de traitement était négligeable entre les deux groupes qui reste non significative selon l'étude statistique : ($p=0,324$ vs male et $p=0,657$ vs femelle) (Figure 09).

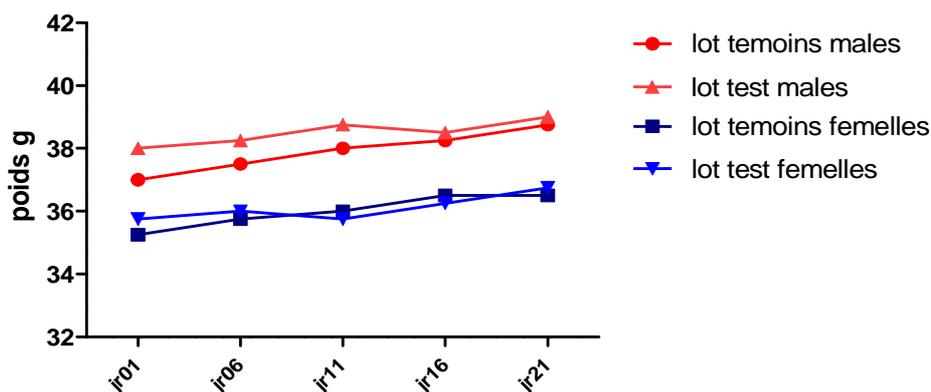


Figure 09 : Effets de l'exposition répétée au CPF sur le poids corporel chez les souris (représenté sous forme de moyenne \pm SEM).

IV.2 Effet du CPF sur la mémoire

- **Effets du CPF sur la capacité mémorative au cours du test MWM**

Les souris intoxiquées aux CPF ont passé moins de temps dans le cadran cible contrairement au groupe témoin. En effet l'étude statistique révèle une différence entre les 2 groupes [$F(16,76)=12$; * $p<0,001$] et [$F(16,76)=-8$; # $p<0,01$] pour les mâles et femelles respectivement. La différence a été enregistrée entre les deux sexes mais reste non significative [$F(16,76)=1,5$; $p=0,08$]. Cependant les mâles traités ont un temps de latence plus grand comparé au mâles témoin, Le test ANOVA a détecté une différence significative de [$F(18,28)= -33,5$; $p=0,0003$], de même pour les femelles avec [$F(18,28)= 24$; $p<0,001$]. Il existe une différence de performance entre les deux sexes mais qui reste non significative selon l'étude statistique avec [$F(18,28)= -9,5$]. L'analyse de ces données confirme l'existence d'un déficit de mémoire de références chez les souris traitées par le CPF (Figure 10).

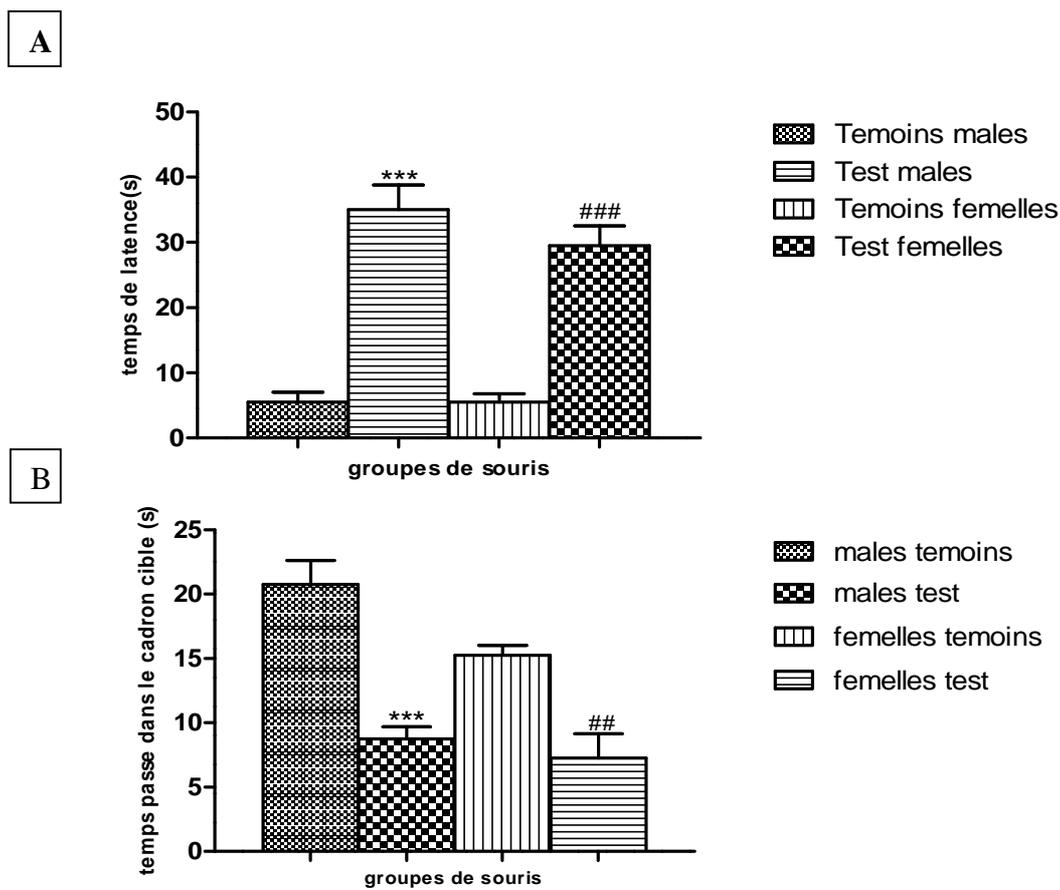


Figure 10 : Suivi des paramètres du test de la piscine : le temps de latence (A) et le temps passé dans le quadrant cible (B) pour les deux groupes de souris non exposés et exposés au (CPF) représenté sous forme de moyenne \pm SEM (n=8). (*): Différence significative entre male test vs témoin ; (#) : différence significative entre Femelle test vs témoin.

- **Effets du CPF sur la capacité mémorative au cours du teste NOR**

Les souris intoxiquées aux CPF ont passé moins de temps à explorer le nouvel objet par rapport à l'objet familier contrairement au groupe témoin indiquant que ces derniers ne se souvenaient pas de l'objet familier. En effet l'étude statistique confirme effectivement qu'il y a une différence significative avec $[F(20,7)= 0,385 ; p<0,001]$ pour les mâles et $[F(20,7)= -0,3150 ; p<0,001]$ pour les femelles. Ainsi, les souris traitées présentent un taux de discrimination négatif qui était significativement plus faible (-0,23 et -0,024) par rapport à un taux de discrimination positif (0,56 et 0,60) observé chez les souris mâle et femelle non traitées respectivement, indiquant une mémoire de reconnaissance réduite avec $p<0,001$.

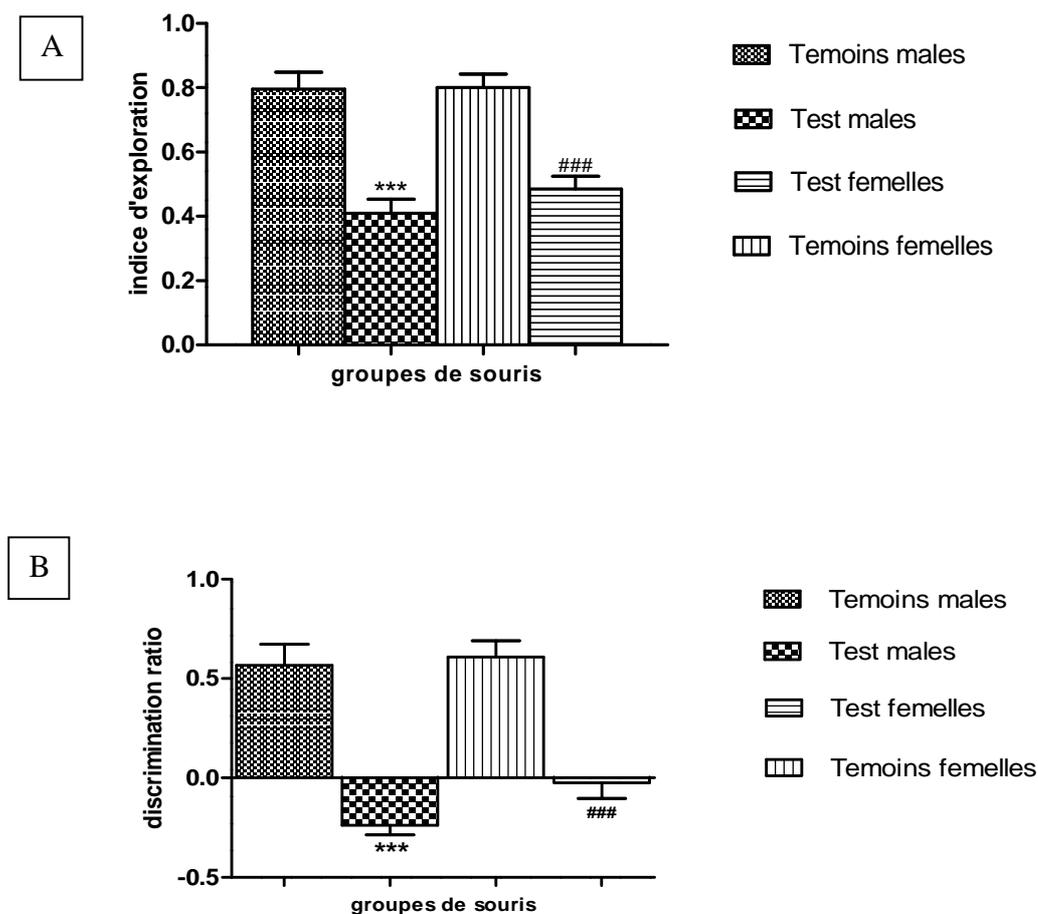


Figure 11 : Présentation graphique de l'effet du CPF sur la capacité mémorative au cours du test NOR. Données exprimées en moyenne \pm SEM (n=8). L'indice d'exploration (A) et discrimination ratio (B). (*): Différence significative entre male test vs témoin ; (#) : différence significative entre F test vs témoin.

IV.3. Effet du CPF sur le comportement

IV.3.1 Effets du CPF sur la capacité locomotrice

a. Test Open Field

Le nombre de carreaux traversés par les groupes traités est plus faible comparativement aux témoins mais reste non significative selon l'étude statistique. Le test ANOVA n'a révélé aucun effet significatif sur l'activité locomotrice, concluant que l'exposition au CPF à une dose de 20mg/kg n'affecte pas l'activité locomotrice des souris.

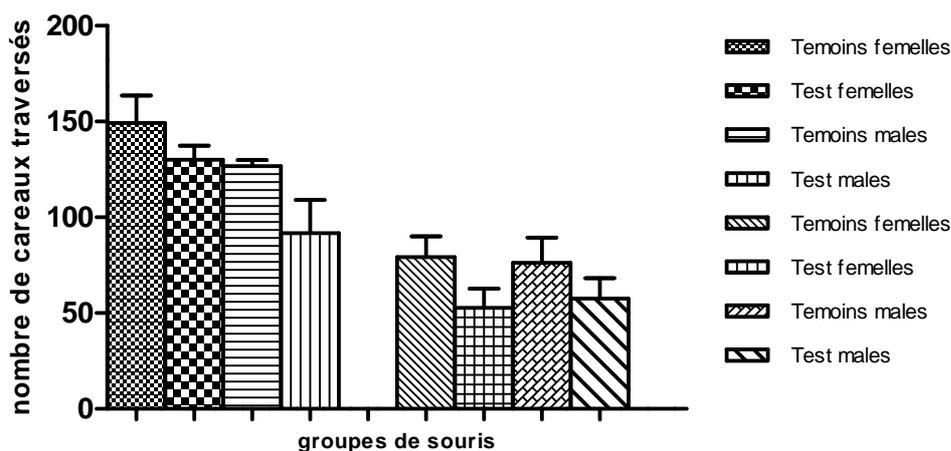


Figure 12 : Le nombre de carreaux traversés pour les deux groupes d'animaux (n=8) chacun, évalué dans le test open-field pendant 10 min par bloc de 5min.

b. Test EPM

Le nombre total d'entrée dans les différents bras du dispositif sont presque identiques pour tous les groupes et l'analyses statistiques ont montré qu'il n'y a aucune différence significative, enregistrée au niveau des groupes mâles et femelles exposés ou non au CPF tout au long de l'expérience. Ce qui confirme les résultats observés dans le test à champ ouvert précédemment cité.

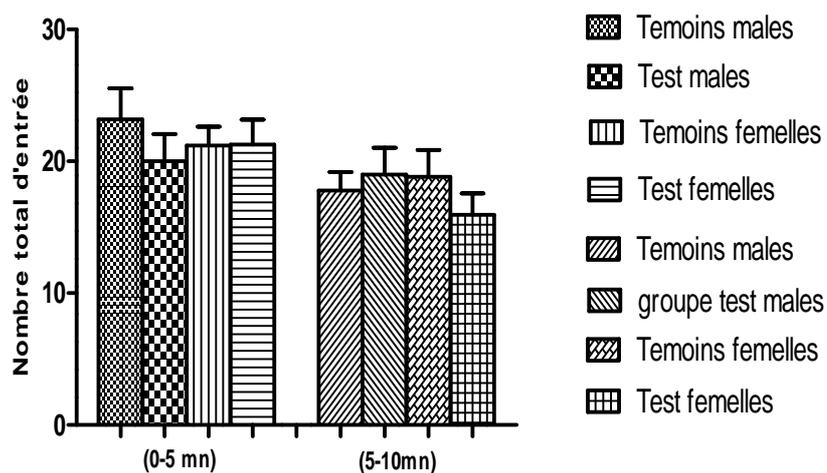


Figure 13 : Présentation graphique de l'effet du CPF sur capacité locomotrice dans le test de la crois surélever (le nombre totale d'entrée). Données exprimées en moyenne \pm SEM.

c. Planche à trou

La moyenne du nombre de trous explorés par les souris femelles témoin est moindre à celle des souris exposées au CPF mais qui reste non significative révélant un taux de curiosité déjà élevé de nature chez le sexe féminin. Par contre les males qui sont de nature non curieux, le CPF à un effet positif sur ces derniers d'où nous observons un grand nombre de trous explorés par les males traités. Ce qui est confirmé par le test ANOVA suivi de l'analyse Benferroni confirme qu'il existe une différence significative ($p < 0,001$).

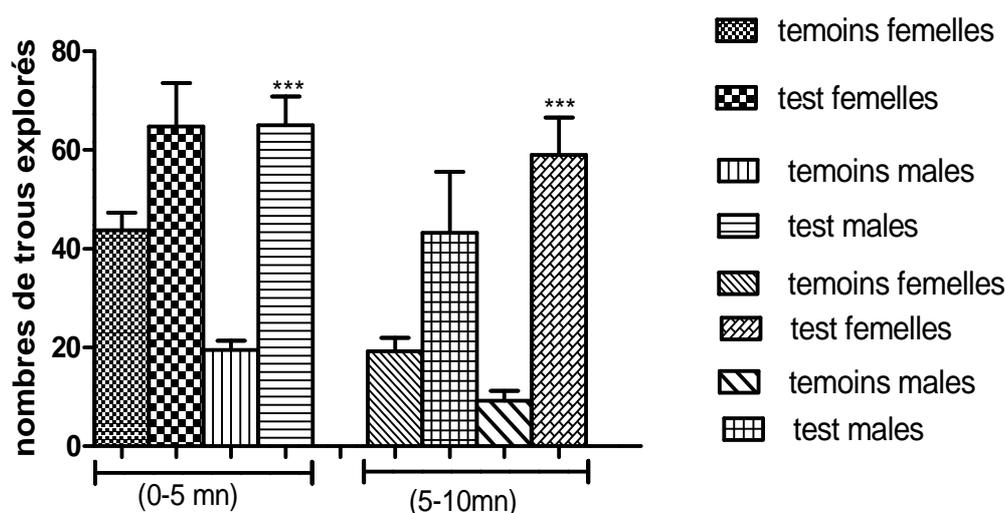


Figure 14 : Effet du CPF sur l'activité exploratoire et réactivité au nouvel environnement motivant dans le test de planche a trou. (*): différence significative entre mâle test vs témoin.

IV.3.2 Test d'anxiété et de peur

a) Test de bille enterrées / *Marble burring*

Les données de la Figure 14 ont démontré des différences significatives dans le nombre de billes enterrées pour les 2 groupes avec $[F(3,28) = -3,250]$ et la moyenne du nombre de bille enterrées par les souris non exposées est plus faible $[F(3,28) = -9,750]$ avec $p < 0,001$. Cependant il a été observé un plus grand effet par les Males traités qui est statistiquement plus élevé comparé aux femelles du groupe test $[F(3,28) = -6,5 ; p < 0,001]$. Cela détermine un taux de peur élevé chez les souris exposés avec un effet plus accentué chez les males (Figure 14).

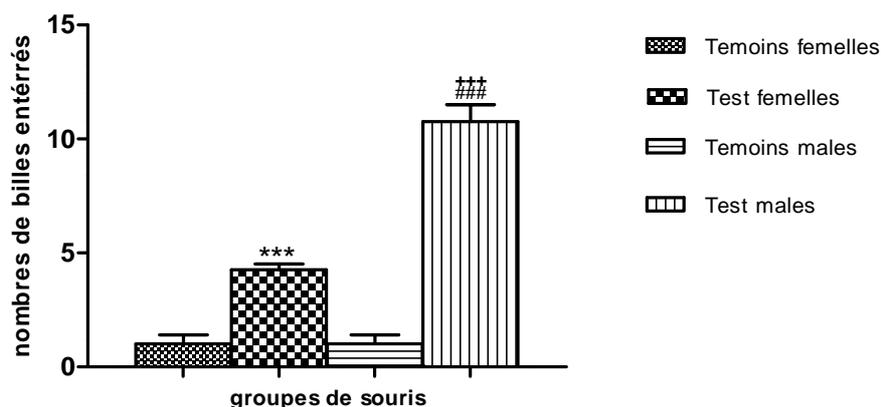


Figure 15 : Moyenne \pm S.E.M du nombre du nombre de billes enterrées pour les deux groupes de souris. (*) : différence significative (Femelle test vs témoin); (#) : différence significative (male test vs témoin); (+) : différence significative entre male test vs femelle test.

b) Test de stress (Test noir et blanc)

Les résultats révèlent que les souris traitées par le CPF passent plus de temps durant les intervalles (0-5mn) et (5-10mn) dans le compartiment obscur comparativement aux groupes non traités. Le test ANOVA a enregistré des différences significatives entre les groupes Males témoin et test, $F(54,83) = -59,75$; $p=0,001$ pour les 5 premières minutes et $(F(54,83) = 54,5$; $p=0,001)$ pendant l'intervalle (5-10mn), quant aux groupes composés de souris femelles. Le test ne révèle aucune différence significative entre les deux lots. Ces résultats déterminent un plus grand degré d'anxiété chez les males exposés au CPF par rapport aux femelles mais cela reste non significatif selon l'analyse statistique avec $p=0,40$ et $p=0,67$ dans les deux intervalles de temps, respectivement. Toutefois, du fait de la grande taille et la luminosité de la chambre claire cette dernière fournit des stimuli anxiogènes pour les souris (figure 16)

Résultat

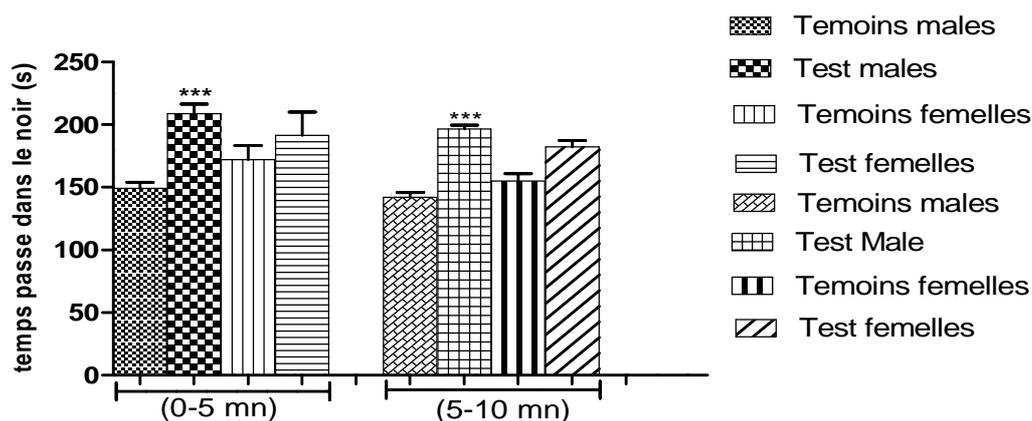


Figure 16 : Présentation graphique de l'effet du CPF sur le temps passé dans compartiment noir. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM. (*): différence significative (male test vs Témoin)

c) Le test de Labyrinthe en croix surélevé

L'analyse des pourcentages du temps passé dans les bras ouverts mesurés pendant le test a révélé des différences significatives chez les souris exposées au CPF par rapport aux souris du groupe témoin. La différence significative est détectée entre les groupes femelles pendant les 5 premières minutes ($F(17, 26) = -13,22$; $p = 0,039$). Selon le test Benforreni, le % du temps passé dans les bras ouverts chez les femelles traitées est significativement plus faible que celle des témoins dans l'intervalle (5-10min) avec ($p < 0,001$), et celle des souris male exposés au CPF est significativement plus basse ($p = 0,001$) que celle des souris non exposées. Cependant, il n'a été observé aucune différence significative entre les deux sexes. La moyenne du nombre de HD réalisés par les souris femelles non exposées est plus élevée que celle des souris femelles traitées avec du CPF. L'analyse statistique précise que le nombre de HD est significativement plus élevé chez le groupe traité par rapport au Témoin de même pour la comparaison entre mâle et femelle $p < 0,001$. Enfin l'indice d'anxiété confirme effectivement qu'il ya une différence significative entre les groupes traités et les non traités ($F(49,03) = -0,24$ et $p < 0,001$) et ($F(49,03) = 0,18$ et $p < 0,001$) pour les mâles et femelles, respectivement. Selon les critères de mesure d'anxiété, à la fois le % de temps passé dans les bras ouverts et le nombre de « head-dipping » réalisés durant tout le test, les souris exposées aux CPF présentent un niveau d'anxiété plus élevé que les souris non exposées.

Résultat

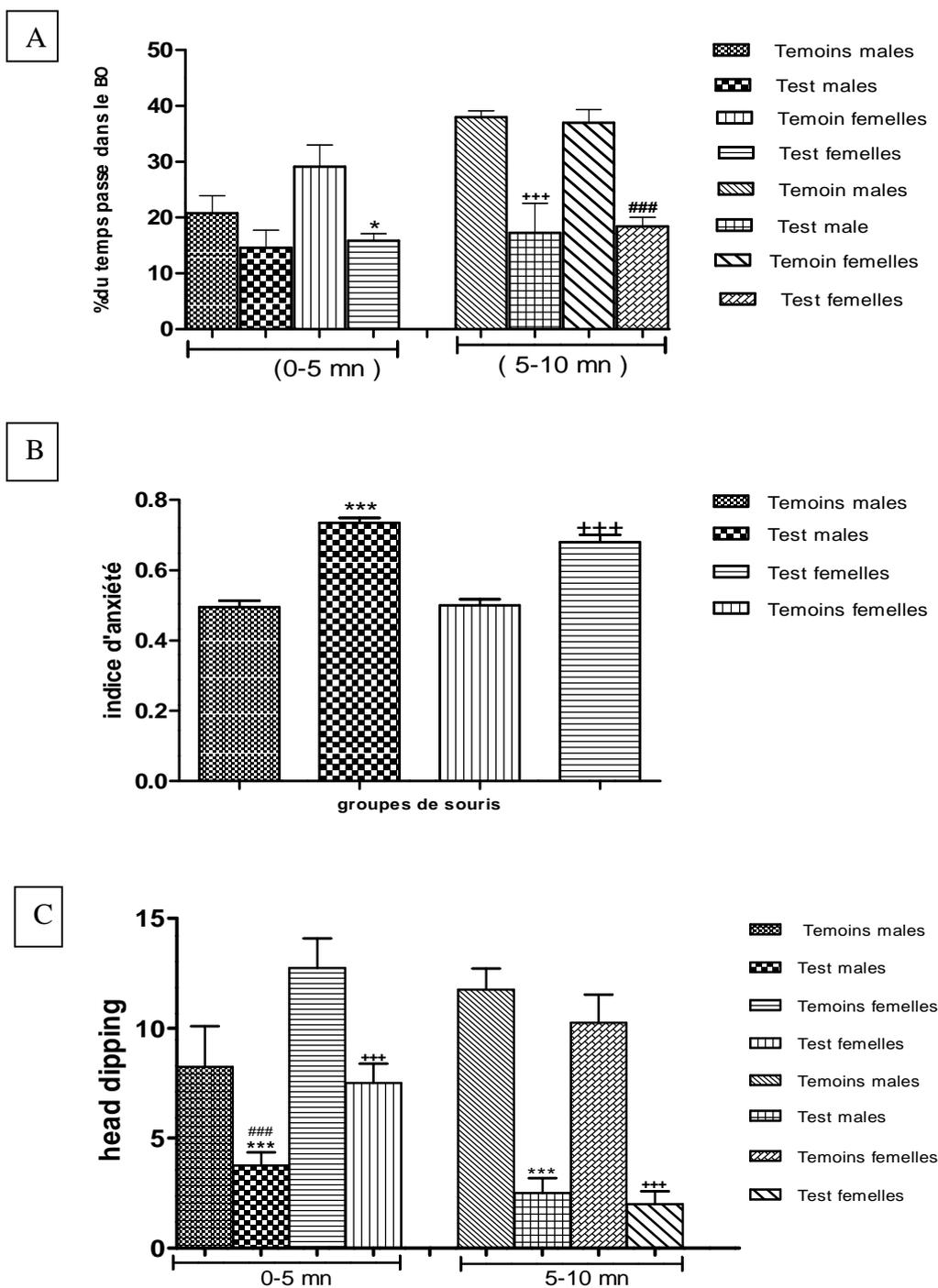


Figure 17 : Résultats du test de l'anxiété chez des souris traitées par le CPF. % des temps passé dans BO (A), Indice d'anxiété (B) et Head-dipping (C) réalisés en moyenne \pm SEM pour le groupe de souris exposées et non exposées. (*): différence significative (male test vs Témoin); (+): différence significative (femelle test vs Témoin); (#) : différence significative entre male test vs femelle test.

IV.3.3 Analyse histopathologique

L'observation des coupes histologiques du cerveau des souris témoins (Figure 18) (CPF-), a révélé une conservation de l'architecture cellulaire à savoir celle des noyaux; vaisseaux normaux et absence de halo clair au tour des vaisseaux. Par contre, l'observation microscopique des différentes parties de l'hippocampe des souris traitées par du CPF, montre une dégénérescence neuronale et dépopulation des cellules pyramidal de ce dernier. Nous pouvons constater aussi une caryolyse (flèche noire), une caryorrhixise (Bleu) et disparition de noyaux (rouge).

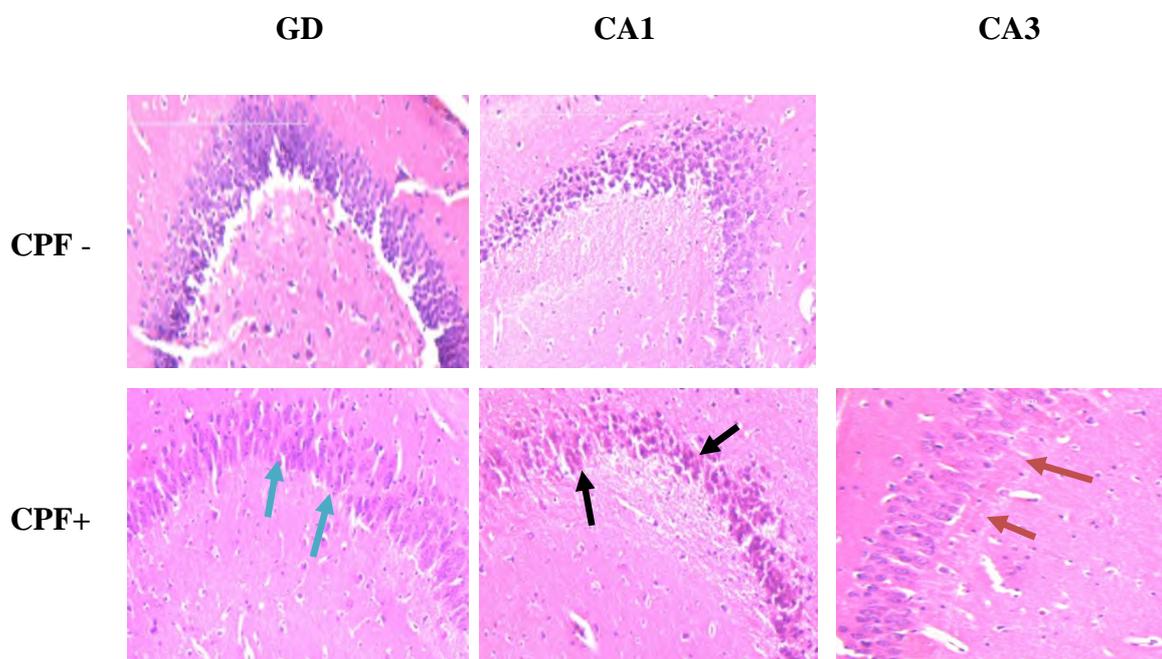


Figure 18: Observation au microscope optique des coupes histologiques du cerveau au niveau de l'hippocampe des souris témoin CPF- et traité CPF. GD: Gyrus denté, CA1 et CA3: Corne d'Ammon. (Coloration a H&E, Gr x10).

De plus, l'analyse des coupes histologiques du cerveau au niveau du cortex des souris témoin (A) a permis de constater une conservation de l'architecture cellulaire ainsi que celle des noyaux, par contre celle des souris du groupe test montre des altérations importantes: une condensation cytoplasmique hyperéosinophilé (B), présence d'halo clair en forme Y et caryolyse due à une nécrose cellulaire (C) et une nécrose hémorragique avec un aspect cellulaire coagulé et disparition du noyau (D).

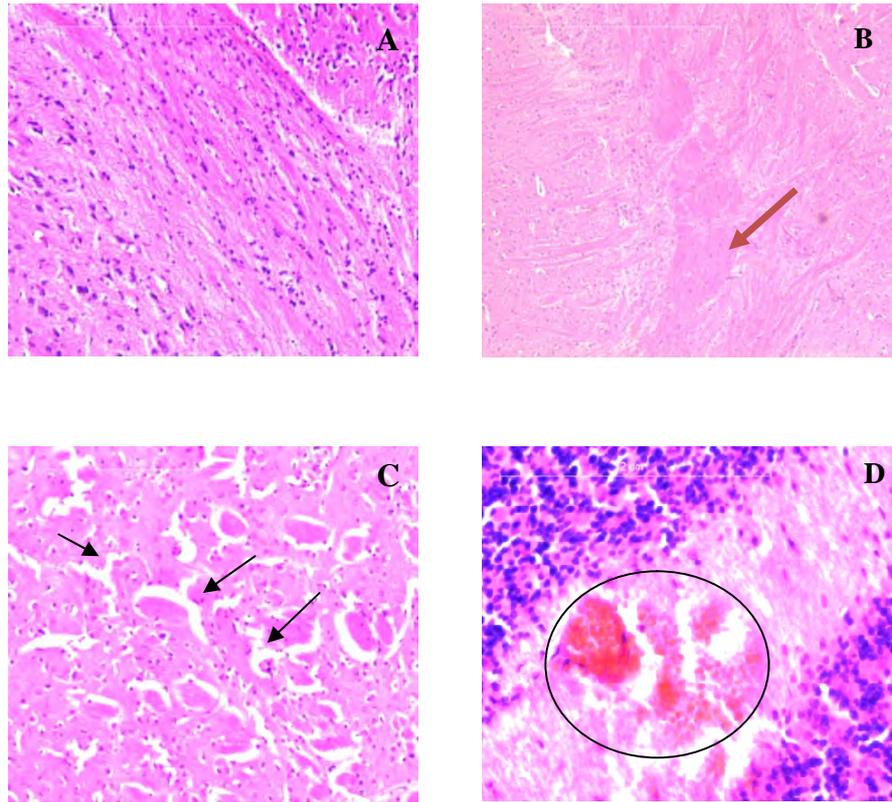


Figure 19 : Observation au microscope optique des coupes histologiques au niveau du cortex des souris témoin (A) et traités au CPF (B, C, D) (Coloration a H & E, Gr x10).

V. Discussion :

La nécessité d'étudier l'impact des pesticides sur la santé, a conduit à la mise en place de plusieurs procédures variant selon la littérature par: le stade de vie (prénatale/postnatale, enfants, adulte), le sexe, la dose, la durée d'exposition et les voies d'administration.

Notre modèle d'exposition prend en compte l'importance de cette voie d'où notre choix de la voie intra-gastrique dont le but est de mimer l'exposition de la population générale, à s'avoir les consommateurs.

Dans la présente étude, l'administration du CPF a entraîné des modifications phénotypiques qui surviennent de manière différente selon le sexe de l'animal, reflétant une toxicité générale d'un côté, due aux changements métaboliques qui pourraient probablement contribuer aux modifications toxicogénomiques, qui ne sont pas explorée dans ce travail, et d'une toxicité spécifique pour d'autre a savoir : le comportement d'agressivité apparu uniquement chez les mâles.

En effet, il a été rapporté que l'effet moléculaire du CPF était sexuellement dimorphes, en modulant les niveaux des neuropeptides hypothalamiques différemment chez les deux sexes. Cependant ces neuropeptide ; tels que l'ocytocine (OT), la vasopressine (AVP) et la prolactine (PRL) ; sont des régulateurs clés de l'agressivité ainsi que de divers aspects du comportement social chez les mammifères ; d'où des souris *Oxt^{-/-}* ont montré des niveaux d'agressivité extrême (**A. Venerosi et al., 2006**).

En 2012, la même équipe a démontré que des souris traités avec du CPF diminuait l'expression de l'ocytocine suivie d'une régulation positive du AVPR1a chez les males alors qu'une augmentation des niveau de OT a était marquer chez le femelle (**A. Venerosi et al., 2012**).

Les OPs affectent notamment le métabolisme des hormones stéroïdiennes inhibant irréversiblement le métabolisme de la testostérone chez les males (**Kaur., 2017**). Pour tous cela, nous pensons que de même régulation se déroule chez les animaux de notre expérience, d'où l'effet antagoniste observé chez les souris vis-à-vis du comportement agressif.

Il a été rapporté que l'administration de CPF, dose dépendante (<25mg/kg) avait tendance à un gain de poids, et a des doses supérieurs il induit l'effet inverse c'est-à-dire une perte, cependant les résultats obtenus dans ce travail était conforme à certaines études ou on a observé une légère augmentation de poids qui reste non significative.

Discussion

Lee et ses collaborateurs ont rapporté que le poids corporel chez les rats traités quotidiennement avec 10 mg / kg par CPF n'était pas différent des témoins jusqu'au dernier jour (21jr) lorsque les rats traités par CPF pesaient beaucoup moins que les animaux témoins (**Lee et al., 2016**).

L'effet des expositions répétées au CPF (10, 18, 20mg/kg) sur le poids corporel pendant 30 jours a provoqué une augmentation progressive de poids au cours de la période du traitement, et il n'y avait aucune différence significative entre les groupes traités par les doses suivantes : 1 ; 2,5 et 5mg/kg (**Terry et al., 2007**). En 2002 les mêmes observations ont été faites pour toutes les doses (1 à 25 mg) au cours des 14 jours d'injection à l'exclusion des doses de 50 et 100 mg ou ils ont observé une perte de poids à partir de la 3^{ème} injection (**Terry et al., 2002**).

- **Effets sur le niveau d'activité :**

Une manifestation commune d'exposition aiguë aux OPs chez l'Homme, est la neuropathie retardée induite par un organophosphate (OPIDN) qui est associée à la capacité des OPs à inhiber la NTE (Neuropathy Target Esterase) et se caractérise par une dégénérescence des portions distales des axones longs dans les 1 à 4 jours de l'exposition. Les manifestations cliniques de l'OPIDN comprennent la faiblesse, les altérations des réflexes, le picotement des membres, la perte de sensation et les altérations de la locomotion et de la coordination. Plusieurs OP ont été liés aux déficits de mouvement et de coordination chez les humains suite à des expositions professionnelles, y compris le CPF, le DFP, le DDVP et le parathion (**Steev et al., 2013**). Ici, nous discutons l'impact du CPF sur les déficits moteurs et de coordination à des expositions répétées faibles à modérées que nous allons comparer à nos résultats. À noter que parmi les raisons de notre choix d'utiliser une dose de 20mg/kg était dans le but d'exclure les faux positifs associés à des effets motivateurs ou locomoteurs délétères du CPF qui pourraient confondre l'interprétation des résultats comportementaux liés à la cognition (c'est-à-dire les effets qui auraient pu influencer les performances dans les tests liés à la mémoire et l'anxiété).

Pour cela nous avons étudié l'effet du CPF dans 3 types de dispositifs afin d'appuyer encore plus nos résultats : le Open field, le % d'entrée dans les bras ouverts de la croix surélevée ou le CPF n'a pas affecté l'activité locomotrice des souris, ainsi que le test effectué sur la planche à trou qui est beaucoup plus réalisé afin d'évaluer l'activité exploratoire des souris et leur curiosité ou on avait observé l'effet positif du CPF sur les souris mâle et femelle.

Discussion

Cependant nos résultats sont conformes à plusieurs autres études précédemment effectué. En effet aucun déficit de l'activité motrice n'a été observé lorsque les souris femelles (27-36jr postnatal) ont été exposées à (2,5; 5; 10 Ou 20 mg/kg) de CPF pendant 10 jours (**Chen et al., 2014**). Rishera a eu des résultats similaires lors d'une exposition répétée au CPF dose comprise entre (2,5-18,0 mg/kg) tous les deux jours au cours d'un mois d'exposition (**middlemore-rishera et al., 2010**).

À l'inverse, la littérature révèle une série d'effets d'altération de l'activité en fonction de la période d'exposition. En effet, l'exposition au CPF durant la gestation (jours 9-12) produit une hypoactivité et une altération de l'habituation des rats mâles et femelles (**Icenogle et al., 2004**) alors que seules les souris femelles présentent une altération de locomotion lorsque l'exposition se trouve en fin de gestation (jours 17-20), et que seuls les rats males montrent une hypoactivité lorsque la période d'exposition au CPF se déroule au début de vie (PND 1-4). Une autre étude d'exposition prolongé (GD 15-PND 14) à des doses subtoxiques relativement faibles de CPF (5 mg/kg via la mère) produit une hypoactivité persistante chez les souris males, cette hypoactivité survient également chez les souris males par une exposition postnatale à 1 mg/kg de CPF par voie sous-cutané (**Levin et al., 2002**).

- **Effets sur le niveau d'anxiété et la peur**

L'effet de l'exposition subtoxique au CPF sur le niveau d'anxiété a été étudié dans 3 tests différents. Dans nos résultats, des niveaux élevés d'anxiété ont été soulignés chez les animaux traités au CPF ou ils manifestent des comportements anxiogène (passent plus de temps dans les bras fermés qui semble refléter une aversion envers les bras ouverts qui est gènère par la peur des espaces avec un nombre de head-dipping très bas et un indice d'anxiété élevée, et plus de temps dans le compartiment obscure dans le test chambre clair/obscur et un nombre très grand de bille enterrées).

Nous allons cependant comparer nos résultats à certaines études précédente afin de mieux les discutés : Des rats adolescents (29 jr) exposés aux CPF pendant 7 jr consécutive à des doses (10, 20 et 40 mg/kg/jr) ont subi des altérations de comportement, les rats traités avec 10 et 20 mg/kg/jr ne montrent aucune différence dans le test de la croix surélevé comparant au témoin, alors qu'ils ont démontré que le CPF a considérablement augmenté le temps passé dans les bras fermés pour la dose de 40 mg/kg, et produisait un effet

Discussion

anxiolytique a des doses relativement élevées (60, 80 et 160 mg/kg), se manifestant comme un effet croissant sur le pourcentage de temps passé dans les bras ouverts.

Cependant, 48 heures après une seule exposition aiguë au CPF (166 mg/kg et 250 mg/kg) a produit des effets anxiogènes, et un effet anxiolytique 5 jours après (**Chen et al., 2011**). La même équipe a réétudié l'effet du CPF a des doses assez faible (2.5, 5, 10 et 20 mg/kg) sur des souris âgées de 36 jr et ont observé des effets anxiogéniques en passant moins de temps dans les bras ouverts dans les tests de la croix surélevée (**Chen et al., 2014**). Une exposition au CPF de 5, 10 et 20 mg/kg ont tous induit une augmentation du niveau d'anxiété (**Terry et al. 2003**). Contrairement à ce qui a été observé chez les souris femelles, les niveaux d'anxiété chez les mâles ne sont pas affectés dans les tests de la croix surélevée ou chambre clair/obscur (**Venerosi et al., 2015**). Braquenier de son côté a étudié l'effet du CPF sur l'anxiété a différents stades de vie, en traitant des souris gestantes avec (0,2; 1 et 5mg/kg) de CPF et cela pendant les 4 derniers jours de gestation et les 2 premières semaines de lactation (PND 14), les souriceaux ont été soumis à deux tests évaluant l'anxiété. En effet, ces derniers ont montré des comportements anxiogènes pour toutes les doses, avec un effet plus élevée pour la dose de 1 mg/kg (ont passée 63,58% du temps dans le compartiment obscur et 13,21% du temps passé dans les bras ouverts, dans le test de la chambre clair/obscur et de la croix surélevée respectivement (**Braquenier et al., 2009**). Concernant, le test de bille et le nombre de head-dipping sont utilisés beaucoup plus pour mesurer le comportement de peur, dans nos résultats nous avons constaté que le CPF avait un effet positif sur le comportement de peur avec un taux accentué chez les mâles, d'où l'apparition précoce de ce dernier chez les mâles (Tableau 01).

En dépit de ces résultats, nous allons rapporter quelque explication émise par les chercheurs. Il a été suggéré que l'exposition au CPF produit des changements persistants dans les systèmes sérotonergiques au niveau de l'hippocampe (**Chen et al., 2011**). Cependant un lien a été établi entre l'anxiété et le taux de sérotonine (**Marta., 2016**). Le CPF induit des altérations de la 5-hydroxytryptamine (5 HT), une diminution du nombre et densité des sous-groupes spécifiques des récepteurs du 5HT et une aberrante modulation des gènes liés à la sérotonine, en effet, une perturbation de la signalisation des 5HT_R est observée chez les deux sexes avec un effet plus prononcé chez les mâles; **Chen et al., 2014**).

Discussion

Le CPF a la capacité de moduler différemment les niveaux d'expression des neuropeptides hypothalamiques qui agissent comme régulateurs clés de l'anxiété ; augmenté l'expression du récepteur de la vasopressine 1a dans l'amygdale chez les deux sexes, une diminution de l'OT chez les mâles et une augmentation de cette dernière chez les femelles ; (**Venerosi et al., 2015**).

Sachant que l'OT exerce une action réduisant le stress, on peut donc considérer cela comme un deuxième argument expliquant la différence du niveau d'anxiété chez les deux sexes observés dans notre étude.

Un autre facteur que nous pouvons rajouter à cette étude est l'âge. Les souris mâles que nous avons utilisées avaient presque une semaine de plus que les femelles. En effet, il a été prouvé que l'âge influence le comportement des souris dans le test de la croix surélevée et la chambre clair/obscur, les souris âgées passent moins de temps dans les bras ouverts et plus de temps dans le compartiment obscur comparant au jeune souris dans les deux tests. (**Marta., 2016**).

- **Effets sur la mémoire et l'apprentissage :**

Nous avons mis en évidence par le test de reconnaissance d'objet et la piscine de Morris, que le CPF altère la mémoire et la stratégie d'apprentissage des souris. En effet, nous avons remarqué pendant le test de la piscine que les deux groupes de souris n'utilisent pas la même stratégie pour atteindre la plate-forme, les souris exposées au CPF baignent le long des parois de la piscine et s'y frottent par contre, le groupe témoin aurait adopté une stratégie d'apprentissage en parcourant un chemin en forme de triangle cela nous laisse dire que les souris exposées au CPF ne se souviennent pas des différents indices spatiaux qui existaient dans la chambre d'expérimentation, l'analyse des indices d'apprentissage et de mémoire appuyée par le test de reconnaissance d'objet, nous a permis de déterminer que le CPF altère la mémoire spatiale et la mémoire de reconnaissance des souris à 10 jours de la dernière exposition, avec un effet un peu plus accentué mais qui reste non significatif chez les mâles, ce qui devrait être logique mis à part l'effet direct du CPF sur la mémoire, l'impact de l'anxiété et de la peur ralentit le taux d'acquisition et la mémoire spatiale (**Marta., 2016**). Cependant, nos résultats concordent avec plusieurs études antérieures.

En effet selon la littérature, des doses élevées de CPF (18 et 25mg/kg) ont été associées à une performance inférieure comparant au témoin pour trouver la plateforme lors des

Discussion

séances d'apprentissage et pendant lequel le transport axonal antérograde et rétrograde a été diminué (**Terry et al., 2003**). Des résultats similaires ont été observés, ou les rats exposés au CPF à 18mg/kg prenaient beaucoup plus de temps pour atteindre la localisation de la plate-forme, et reste moins de temps dans le quadrant d'évasion cible (**Terry et al., 2007**). Il a été rapporté que le traitement quotidien avec du CPF (2,5 à 25,0 mg / kg) pendant 2 semaines a entraîné une diminution des performances dans le test de la piscine de Morris dépendante de la dose. Les résultats rapportés ici appuient les résultats de l'étude antérieure, et l'exposition à 10 et 18 mg/kg CPF tous les deux jours pendant 30 jours, a entraîné des déficits dans RAM (Morris Arm Radial) et la piscine et cela après de longue périodes de 50 et 140 jours après la dernière injection (**Terry et al., 2012**) la même chose a été observées pour des dose allant de 2,5 à 18mg/kg (**rishera et al., 2010**). Toby à rapporter lors d'une exposition répétée au métabolite actif du CPF à (0,15, 0,18 ou 0,25 mg/kg/jr de CPO) qu'il n'y avait aucune différence entre les groupes de traitement lors de l'acquisition par contre les latences pour trouver la plate-forme invisible ont diminué tout au long des sessions d'apprentissage (**Toby., 2012**).

L'ensemble de ces études appuient les modifications induites par le CPF dans les différentes étapes de la mémoire, avec une durée d'exposition et des doses variante influençant la persistance du déficit. Quelles sont les aires du cerveau touché ?? Quels sont les mécanismes de toxicité que le CPF met en œuvre pour induire cette altération de la mémoire ??? Pour répondre à ces questions nous avons pu faire une étude anatomopathologique du cerveau des souris traité au CPF que nous avons comparé ensuite au témoin. Le cerveau est divisé en plusieurs zones avec des fonctions relativement spécialisées. Les informations visuelles et la mémoire de nature spatiale et non spatiale est régulée par des aires associatives du cortex et par l'hippocampe ainsi que par le système du lobe temporal qui transitent par des voies différentes vers les différente couche de ce complexe (**Edward Levin., 2015**).

Une altération de l'une ou de toutes ces structure pourrait participer aux troubles de la mémoire produits par le CPF, ainsi les résultats obtenus ont pu mettre en évidence les effets toxiques du chlorpyrifos sur le cerveau, il a été constaté que l'administration du CPF a entraîné l'apparition de plusieurs lésions au niveau du cortex et la corne d'Ammon impliquées dans divers pathologies neurologiques, ce qui pourrais expliquer l'altération de la mémoire de reconnaissance et la mémoire spatiale. Cependant, diverses études ont

Discussion

montré un lien potentiel entre l'exposition aux OPs sur les neurones pyramidaux de l'hippocampe et la mémoire (**Sigurdsson et Duvarci., 2016 ; Daniella et al., 2014**)

Par exemple, Deshpande a récemment signalé des dommages neuronaux dans de multiples régions du cerveau, y compris l'hippocampe, l'amygdale et le cortex dans un modèle murin lors d'une exposition au métabolite actif des OPs. Une lésion neuronale dans les régions CA1 et CA3 de l'hippocampe a été observée, sur une culture cellulaire (PC12) dans un milieu contenant le métabolite actif du parathions POX (**Laximikant., 2014**). Une exposition a (1 et 10 μ M) de chlorpyrifos-oxon (CPO) a provoqué les mêmes lésions neuronales mesurées par la fluorescence d'iodure de propidium (PI) (**Dongren Yang et al 2008**)

L'exposition au CPF diminue également la densité des neurones *in vivo*, 3 mois après l'administration du CPF, (**Haley et al., 2011**). En outre, l'application topique de 20 et 40 mg/kg/j de CPF pendant 7 jours a des souris, a induit une diminution significatives de la densité des neurones de l'hippocampe et une réactivité accrue des astrocytes étaient apparentes, ainsi les neurones pyramidaux CA3, CA2 et CA1 ont montré des dommages neuronaux sous forme de pycnose de noyaux et de vacuolisation de neuropile. Cette pycnose était plus fréquemment observée dans les régions CA3 et CA1 par rapport à la région CA2 (**Nilesh et al., 2009 ; Lim et al., 2011**). ce qui est similaire au résultats obtenu dans cette études

L'exposition prolongée aux pesticides (OPs) peut produire des déficits cognitifs qui reflètent les lésions de l'hippocampe chez les humains et les rongeurs. Ces données fournissent une base anatomique et neurophysiologique pour les déficits cognitifs décrits dans la littérature et dans plusieurs études épidémiologique, et soutiennent encore l'argument selon lequel l'exposition répétée à des doses relativement faibles d'OP entraîne un endommagement persistant du cerveau.

Cependant, les informations fournies par la littérature indique que le mécanisme des effets à long terme des OPs sur la cognition peut être multifactorielle lié à des modifications de protéines qui jouent un rôle fondamental dans la fonction neuronale, des changements biochimiques au niveau de l'hippocampe, activation astroglial.

VI. Conclusion et Perspectives :

Nous avons montré la faisabilité d'une approche basée sur l'estimation d'index d'exposition au CPF constitués à partir de plusieurs lectures, après réflexion nous avons mis au point ce protocole. La prise en compte des expositions répétées subchroniques apparaît importante à considérer dans la mesure des effets neurologiques à long terme, qui dépendent à la fois de l'intensité et de la durée d'exposition.

A travers ce travail, nous avons mis en évidence un lien entre des expositions aux chlorpyrifos et les détériorations cognitives à long terme afin d'y répondre à la problématique qui est abordée maintes fois dans la littérature scientifique.

La présente étude a montré que l'exposition répétée de bas niveau par le CPF a entraîné la détérioration de la mémoire que nous avons mis en évidence par deux tests : Piscine de Morris évaluant la mémoire de référence et le test de reconnaissance d'objet pour la mémoire spontanée des rongeurs, et nous avons réalisé des études histologiques, ou nous avons pu observé plusieurs types de lésions dans des airs différente du cerveau des souris traité, montrant une dégénérescence neuronale et dépopulation des cellules pyramidal de l'hippocampe CA1 et CA2, avec une caryolyse, caryorrhixise et disparition de noyaux.cela a permis d'expliquer le détérioration de la mémoire de ces souri traité avec du CPF.

Des tests de comportements (anxiété, stress, peur, curiosité et locomotion) ont été réalisé, ces derniers nous a permis de constaté des changements aberrants, élévation du tau d'anxiété de stress et de peur chez les souris test des deux sexes avec un effet plus accentué chez le male, développement de comportement d'agressivité a été observé uniquement chez le male, et enfin nous avons pu constaté que le traitement au CPF a 20mg/kg/jr pendant 21 jr ne modifier en aucune moment le l'activité locomotrice de ces derniers et une légère amélioration de la curiosité des souris observé lors du test de la planche a trou.

Mais une semaine est-elle suffisante pour avoir une influence sur l'effet du CPF ??? Pour quoi tous ces comportement antagoniste du CPF entre anxiogène et anxiolytique que nous avons vu dans différents article ?? Cependant, la durée d'exposition, la période de traitement, la dose, la voie d'expositions, l'âge ou le sexe, qui parmi ces facteur est capable de donner ce double effet du CPF ??? Cet effet est-il dû au CPF directement, à son

Conclusion et perspectives

métabolite actif CPO, ou indirectement due aux perturbations cellulaires engendrées ?? Est-il juste le fruit d'une résistance due à l'un ou à un ensemble de polymorphismes déjà cité dans la partie synthèse bibliographique ???

Les pesticides forment un groupe important de substances chimiques qui peuvent contaminer l'écosystème aboutissant à l'exposition. Douze millions d'enfants, rien qu'aux Etats-Unis, souffrent de troubles de l'apprentissage, d'altérations neuro-développementales et comportementales liées à une exposition environnementale à différents produits chimiques dont certains insecticides.

Malgré les efforts déployés pour développer des méthodes alternatives, les pesticides sont toujours le moyen de lutte prédominant et leurs résidus constituent une menace potentielle. Il est donc impératif d'étudier la toxicité des pesticides car ils ont été très cités pour leur cytotoxicité et génotoxicité dans les études toxicologiques.

Cette étude représente une contribution importante à l'évaluation correcte de l'ampleur du risque sanitaire dû à l'exposition aux résidus de pesticides, particulièrement le chlorpyrifos.

Ces résultats méritent des investigations plus poussées quant à la neurotoxicité à long terme de certains organophosphorés tels que CPF ou autres, en effet il faudrait une mise au point de protocole réaliste : pour mettre en évidence les mécanismes d'action des pesticides, l'utilisation de modèles animaux ou cellulaires utilisant des concentrations élevées de ces produits phytosanitaires sur de courtes périodes d'exposition, cependant ces conditions sont très différentes des expositions réalistes chez l'Homme sans parler des voies d'exposition, les doses utilisées dans les protocoles sont en général beaucoup plus élevées que celles auxquelles nous sommes exposés par notre alimentation, par voie respiratoire ou cutané sachant que l'exposition réelle est via plusieurs voies.

Un autre problème, l'utilisation d'une seule molécule présente dans les études n'est pas une bonne extrapolation car en pratiques l'homme est exposés à des mélanges de xénobiotiques ou un cocktail de pesticides. En effet il a été montré que, pour certaines molécules, les expositions multiples, concomitantes ou successives, pouvaient présenter des effets infra/supra additifs ou synergiques par une augmentation de l'activation ou une

Conclusion et perspectives

diminution de la détoxification de ces molécules toxiques, ce qui est à noter aussi c'est l'existence des ingrédients inertes et les adjuvants utilisés pour la production de ces pesticides peuvent jouer un rôle dans certains effets toxiques.

Identification et développement de marqueurs précoces dans un but préventif, en renforçant les données mécanistiques de ces derniers, qui seront associées à des mesures de susceptibilité génétique qui amélioreront notre capacité à caractériser le risque individuel et identifier les membres les plus vulnérables de la population et à prendre en charge. Il est important de vérifier si la toxicité est due à la matière active elle-même ou à la dégradation de celle-ci et confirmer ces résultats par des analyses biochimiques hématologiques.

Il serait également intéressant d'étudier les taux de ces résidus dans le temps et à long terme. Il serait aussi indispensable de tester leur bioaccumulation et bioconcentration chez les animaux pour mieux étudier leurs méfaits sur la santé.

Encourager le suivi des populations agricoles pour étudier les risques liés, et prendre la mesure de leur impact dans cette population qui de par ses caractéristiques peut se montrer plus vulnérable aux effets sur le système nerveux central.

Mettre en œuvre des protocoles expérimentaux afin de faire sortir les différentes cibles thérapeutiques envisageables pour traiter les personnes intoxiquées au CPF.

1. **Abeer F. El Nahas, Mohamed A.S. Abdel-Razek, Nashwa M. Helmy, Shawky Mahmoud, Haneen A. Ghazy** (2016). Impaired antioxidant gene expression by pesticide residues and its relation with other cellular biomarkers in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) from Lake Burullus. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 137 (2017) 202–209.
2. **Aldina Venerosi, Gemma Calamandrei, Laura Ricceri** (2006). A social recognition test for female mice reveals behavioral effects of developmental chlorpyrifos exposure. *Neurotoxicology and Teratology* 28 (2006) 466–471
3. **A. Venerosi, L. Ricceri, S. Tait, G. Calamandrei** (2012). Sex dimorphic behaviors as markers of neuroendocrine disruption by environmental chemicals: The case of chlorpyrifos. *NeuroToxicology* 33 (2012) 1420–1426.
4. **Aldina Venerosi, Sabrina Tait, Laura Stecca, Flavia Chiarotti, Alessia De Felice, Maria Francesca Cometa, Maria Teresa Volpe, Gemma Calamandrei1 and Laura Ricceri** (2015). Effects of maternal chlorpyrifos diet on social investigation and brain neuroendocrine markers in the offspring – a mouse study. *Environmental Health* (2015) DOI 10.1186/s12940-015-0019-6.
5. **Alessandra Antunes dos Santos · Aline Aita Naime · Jade de Oliveira · Dirleise Colle · Danúbia Bonfanti dos Santos · Mariana Appel Hort · Eduardo Luiz Gasnhar Moreira · Cristina Suñol · Andreza Fabro de Bem · Marcelo Farina.**(2014) Long-term and low-dose malathion exposure causes cognitive impairment in adult mice: evidence of hippocampal mitochondrial dysfunction, astrogliosis and apoptotic events.
6. **Alvin V. Terry Jr, Patrick M. Callahan, Wayne D. Beck, Leah Vandenhuerk, Samantha Sinha, Kristy Bouchard, Rose Schade and Jennifer L. Waller** (2014). Repeated exposures to diisopropylfluorophosphate result in impairments of sustained

attention and persistent alterations of inhibitory response control in rats. *Neurotoxicol Teratol.* 2014 ; 44: 18–29.doi:10.1016/j.ntt.2014.04.069.

7. **Alvin V. Terry, Jr., Debra A. Gearhart, Wayne D. Beck, Jr., Jacob N. Truan, Mary-Louise Middlemore, Leah N. Williamson, Michael G. Bartlett, Mark A. Prendergast, Dale W. Sickles, and Jerry J. Buccafusco (2007).** Chronic, Intermittent Exposure to Chlorpyrifos in Rats: Protracted Effects on Axonal Transport, Neurotrophin Receptors, Cholinergic Markers, and Information Processing. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* vol. 322, no. 3 U.S. government work not protected by U.S. copyright 125625/3241369 Jpet 322:1117–1128, 2007.
8. **Anumantha Kanthasamy, Huajun Jina, Vellareddy Anantharama, Gautam Sondarvab, Velusamy Rangasamyb, Ajay Ranab, and Arthi Kanthasamy (2012).** Emerging Neurotoxic Mechanisms in Environmental Factors-Induced Neurodegeneration. *Neurotoxicology*. 2012 August ; 33(4): 833–837. doi:10.1016/j.neuro.2012.01.011.
9. **Anthony Wang, Myles Cockburn, Thomas T. Ly, Jeff Bronstein, and Beate Ritz (2014).** The Association Between Ambient Exposure to Organophosphates and Parkinson's Disease Risk. *Occup Environ Med.* 2014 April ; 71(4): 275–281. doi:10.1136/oemed-2013-101394.
10. **Avneet Gupta, Hemraj, Sunny Jalhan, Anil Jindal, Neeraj Upmanyu (2012).** Various animal models to check learning and memory a review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* ISSN- 0975-1491 Vol 4, Issue 3, 2012
11. **A.V. Terry Jr, W.D. Beck, S. Warner, L. Vandenhuerk and P.M. Callahan (2012).** Chronic Impairments in Spatial Learning and Memory in Rats Previously Exposed to Chlorpyrifos or Diisopropylfluorophosphate. *Neurotoxicol Teratol.* 2012 ; 34(1): 1–8. doi:10.1016/j.ntt.2011.08.015.

12. **Braquenier, jean-baptiste, Quertemont, Etienne, Tirelli, Ezio, Plumier, Jean-Christopher** (2010). Anxiety in adult female mice following perinatal exposure to chlorpyrifos. *Neurotoxicology and Teratology*, Vol 32(2), Mar-Apr 2010, 234-239.
13. **Binukumar BK, Amanjit Bal, Ramesh JL Kandimalla, Kiran Dip Gill** (2010). Nigrostriatal neuronal death following chronic dichlorvos exposure: crosstalk between mitochondrial impairments, a synuclein aggregation, oxidative damage and behavioral changes. <http://www.molecularbrain.com/content/3/1/35>.
14. **B. K. Binukumar • Amanjit Bal • Kiran Dip Gill** (2011). Chronic Dichlorvos Exposure: Microglial Activation, Proinflammatory Cytokines and Damage to Nigrostriatal Dopaminergic System. *Neuromol Med* (2011) 13:251–265 DOI 10.1007/s12017-011-8156-8.
15. **Carol J. Burns, Laura J. McIntosh, Pamela J. Mink, Anne M. Jurek and Abby A. Li** (2013) pesticide exposure and neurodevelopmental outcomes: review of the epidemiologic and animal studies. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 16:127–283, 2013.
16. **Caroline Cox and Michael Surgan** (2006). Unidentified Inert Ingredients in Pesticides: Implications for Human and Environmental Health. *Environmental Health Perspectives* • volume 114 | number 12.
17. **Cheryl L. Beseler, Lorann Stallones, Jane A. Hoppin, Michael C.R. Alavanja, Aaron Blair, Thomas Keefe and Freya Kamel** (2008). Depression and Pesticide Exposures among Private Pesticide Applicators Enrolled in the Agricultural Health Study *Environmental Health Perspectives* • VOLUME 116 | NUMBER 12 | December 2008.
18. **Christopher N. Banks and Pamela J. Lein** (2012). A Review of Experimental Evidence Linking Neurotoxic Organophosphorus Compounds and Inflammation *Neurotoxicology*. 2012 June; 33(3): 575–584. doi:10.1016/j.neuro.2012.02.002
Author manuscript; available in PMC 2013 June 01.

19. **Daniel J. Franklin¹ & Stephen Grossberg¹ (2016)** .A neural model of normal and abnormal learning and memory consolidation: adaptively timed conditioning, hippocampus, amnesia, neurotrophins, and consciousness *Cogn Affect Behav Neurosci* (2017) 17:24–76. DOI 10.3758/s13415-016-0463-y.
20. **Daniella M. Pizzurro^a, Khoi Dao^a, and Lucio G. Costa^{a,b} (2014)**. Diazinon and diazoxon impair the ability of astrocytes to foster neurite outgrowth in primary hippocampal neurons. ^aDepartment of Environmental and Occupational Health Sciences, University of Washington, Seattle, WA, USA. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014 February 1; 274(3): 372–382. doi:10.1016/j.taap.2013.11.023.
21. **David J. Sanderson, Emma Hindley, Emily Smeaton, Nick Denny, Amy Taylor, Chris Barkus, Rolf Sprengel, Peter H. Seeburg and David M. Bannerman (2011)**. Article is online at <http://www.learnmem.org/cgi/doi/10.1101/lm.2083411>.
22. **Diane S. Rohlman, W Kent Anger, and Pamela J Lein (2011)**. Correlating neurobehavioral performance with biomarkers of organophosphorous pesticide exposure. *Neurotoxicology*. 2011 March; 32(2): 268–276. doi:10.1016/j.neuro.2010.12.008
23. **Dongren Yang^{1,*}, Angela Howard^{2,*}, Donald Bruun¹, Mispa Ajua-Aleman³, Cecile Pickart^{3,§}, and Pamela J. Lein^{1,2} (2008)**. Chlorpyrifos and Chlorpyrifos-Oxon Inhibit Axonal Growth by Interfering with the Morphogenic Activity of Acetylcholinesterase. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008 April 1; 228(1): 32–41.
24. **Edward D. Levin, Ph.D (2015)**. Learning about Cognition Risk with the Radial-Arm Maze in the Developmental Neurotoxicology Battery. *Neurotoxicol Teratol*. 2015 ; 52(0 0): 88–92. doi:10.1016/j.ntt.2015.05.007.
25. **Fernando Sanchez-Santed, Maria Teresa Colomina and Elena Herrero Hernandez (2016)**. Organophosphate pesticide exposure and neurodegeneration. *cortex* 74/ 417- 426 www.elsevier.com/locate/cortex.

26. **Goran A. Jamal, Stig Hansen, Peter O.O Julu** (2002). Low level exposures to organophosphorus esters may cause neurotoxicity. *Toxicology* 181_/182 .23_/33 www.elsevier.com/locate/toxicol.
27. **Haley E. Speed, Cory A. Blaiss, Ahleum Kim, Michael E. Haws, Neal R. Melvin, Michael Jennings, Amelia J. Eisch and Craig M. Powell** (2011). Delayed Reduction of Hippocampal Synaptic Transmission and Spines Following Exposure to Repeated Subclinical Doses of Organophosphorus Pesticide in Adult Mice. *Toxicological sciences* 125(1), 196–208 doi:10.1093/toxsci/kfr253.
28. **Icenogle, L, M.Christopher, N, C. Blackwelder, W, P. Cadldewell, D, Pet al.,**(2004). Behavioral alterations in adolescent and adult rats caused by a brief subtoxic exposure ton chlorpyrifos during neurulation. *Neurotoxicol Teratol* 26, 95-101.
29. **Ioannis Zaganasa, Stefania Kapetanakia, Vassileios Mastorodemos, Konstantinos Kanavourasa, Claudio Colosiob, Martin F. Wilksc, Aristidis M. Tsatsakisd** (2013). Linking pesticide exposure and dementia: What is the evidence? *Toxicology* 307 (2013) 3– 11. www.elsevier.com/locate/envint .
30. **Iva B Zovkic and J David Sweatt** (2012) Epigenetic Mechanisms in Learned Fear: Implications for PTSD. www.neuropsychopharmacology.org.
31. **Inês Tomás Pereira and Rebecca D. Burwell** (2015). Using the Spatial Learning Index to Evaluate Performance on the Water Maze. *Behav Neurosci.* 2015 August ; 129(4): 533–539. doi:10.1037/bne0000078. Neonatal Rat Cerebellum. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2016, 13, 987; doi:10.3390/ijerph13100987. www.mdpi.com/journal/ijerph.
32. **Jorge A. Quillfeldt** Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats (2000)

33. **Karen Huen, Asa Bradman, Kim Harley, Paul Yousefi, Dana Boyd Barr, Brenda Eskenazi, and Nina Holland** (2012). Organophosphate pesticide levels in blood and urine of women and newborns living in an agricultural community. *Environ Res.* 2012 August; 117: 8–16. doi:10.1016/j.envres.2012.05.005 available in PMC 2015 January.
34. **Kaziya M. Lee, Michal A. Coelho, Hadley A. McGregor, Noah R. Solton, Matan Cohen and Karen K. Szumlinski** (2016). Adolescent Mice Are Resilient to Alcohol Withdrawal-Induced Anxiety and Changes in Indices of Glutamate Function within the Nucleus Accumbens. *Frontiers in Cellular Neuroscience* | www.frontiersin.org. November 2016 | Volume 10 | Article 265.
35. **Kaur G., Jain A. K. and Singh S** (2017) *CYP/PON* genetic variations as determinant of organophosphate pesticides toxicity. *J. Genet.* **96**,187–201.
36. **Ken Declerck, Sylvie Remy, Christine Wohlfahrt-Veje, Katharina M. Main, Guy Van Camp, Greet Schoeters, Wim Vanden Berghe and Helle R. Andersen** (2017). Interaction between prenatal pesticide exposure and a common polymorphism in the PON1 gene on DNA methylation in genes associated with cardio-metabolic disease risk—an exploratory study.
37. **Kimberly C. Paul, Janet S. Sinsheimer, Shannon L. Rhodes, Myles Cockburn, Jeff Bronstein, and Beate Ritz.** (2016). Organophosphate Pesticide Exposures, Nitric Oxide Synthase Gene Variants, and Gene–Pesticide Interactions in a Case–Control Study of Parkinson’s Disease, California (USA) conformant HTML version of this article is available at <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1408976>. *Environmental Health Perspectives* • volume 124 | number 5 |2016.
38. **Laxmikant S. Deshpande, Kristin Phillips, Beverly Huang and Robert J. DeLorenzo** (2014). Chronic behavioral and cognitive deficits in a rat survival model of paraoxon toxicity. *Neurotoxicology*.0: 352–357. doi:10.1016/j.neuro.2014.08.008.

39. **Lee Y, S. Lewis, J. A. Ippolito D, L. Hussainzada, N. Lein P, J. Jackson D, A et al.** (2006). Repeated exposure to neurotoxic levels of chlorpyrifos alters hippocampal expression of neurotrophins and neuropeptides. *Toxicology* 340, 53-62. 10.1016/j.tox.2016.01.00.
40. **Leslie London, Cheryl Beseler, Maryse F. Bouchard, David C. Bellinger, Claudio Colosio, Philippe Grandjean, Raul Harari, Tahira Kootbodien, Hans Kromhout, Francesca Little, Tim Meijster, Angelo Moretto, Diane S. Rohlman, and Lorann Stallones** (2012). Neurobehavioural and neurodevelopmental effects of pesticide exposures. *Neurotoxicology*. 2012 August ; 33(4): 887–896. doi:10.1016/j.neuro.2012.01.004.
41. **Levin, E.D. Addy, N. Baruah, A. Elias, A. Christopher, N.C. Seidler, F.J and Slotkin, T, A** (2002). Prenatal chlorpyrifos exposure in rats causes persistent behavioral alterations. *Neurotoxicol Teratol* 24, 733-741.
42. **Lucio G. Costa , Gennaro Giordano, Marina Guizzetti, Annabella Vitalone** (2008). Neurotoxicity of pesticides: a brief review. *Frontiers in Bioscience* 13, 1240-1249, 2008.
43. **Lucio G. Costaa, Annabella Vitaloneb, Toby B. Colea, Clement E. Furlongc** (2004) Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochemical Pharmacology* 69 (2004) 541–550 www.elsevier.com/locate/biochempharm.
44. **Ludmila Juricek, Xavier Coumoul** (2014). Alimentation, pesticides et pathologies neurologiques Diet, pesticides and neurological diseases. *Cahiers de nutrition et de diététique* (2014) 49, 74-80.
45. **M.L. Middlemore-Risher, J.J. Buccafusco and A.V. Terry Jr** (2010). Repeated exposures to low-level chlorpyrifos results in impairments in sustained attention and increased impulsivity in rats. *Neurotoxicol Teratol*. 2010 ; 32(4): 415–424. doi:10.1016/j.ntt.2010.03.008

46. **Mari'a Teresa Muñoz-Quezada , Boris A. Lucero, Dana B. Barr , Kyle Steenland , Karen Levy . Barry Ryan, Veronica Iglesia, Sergio Alvarado, Carlos Concha, Evelyn Rojas, Catalina Vega** (2013). Neurodevelopmental effects in children associated with exposure to organophosphate pesticides: A systematic review
47. **Marta Weinstock** (2016). Prenatal stressors in rodents: Effects on behavior. *Neurobiology of Stress* 6 (2017) 3e13.
<http://www.journals.elsevier.com/neurobiology-of-stress>
48. **Mariel Muller Q, Leonardo Hess, Agostina Tardivo, Rafael Lajmanovich, Andres Attademo, Gisela Poletta, Maria Fernanda Simoniello, Agustina Yodice, Simona Lavarello, Dante Chialvo, Oscar Scremin** (2014). Neurologic dysfunction and genotoxicity induced by low levels of 3 chlorpyrifos. *NeuroToxicology* . September 2014 DOI: 10.1016/j.neuro.2014.08.012 · Source: PubMed
49. **Miguel A. Sogorb, Encarnación Fuster, Eva del Río, Jorge Estévez, Eugenio Vilanova** (2016). Effects of mipafox, paraoxon, chlorpyrifos and its metabolite chlorpyrifos-oxon on the expression of biomarker genes of differentiation in D3 mouse embryonic stem cells, *Chemico-Biological Interactions*,
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2016.04.017> .
50. **Noriko Takahashi, Masahiro Hashizume** (2014). A systematic review of the influence of occupational organophosphate pesticides exposure on neurological impairment. *BMJ Open* 2014;4:e004798. doi:10.1136/bmjopen-2014-004798.
51. **Pei-Chen Lee, PhD^{a,b}, Shannon L. Rhodes, PhD^a, Janet S. Sinsheimer, PhD^c, Jeff Bronstein, MD, PhD^d, and Beate Ritz, MD, PhD^{a,d}** (2013). Functional Paraoxonase 1 variants modify the risk of Parkinson's Disease due to Organophosphate Exposure. *Environ Int.* 2013 June ; 56: 42–47.
doi:10.1016/j.envint.2013.03.004.

52. **Rodrigo Franco**¹, , **Sumin Li**¹, **Humberto Rodriguez-Rocha**¹, **Michaela Burns**¹, and **Mihalis I. Panayiotidis**^{2,3} (2010). Molecular Mechanisms of Pesticide-induced Neurotoxicity: Relevance to Parkinson's Disease. *Chem Biol Interact.* 2010 November 5; 188(2): 289–300. doi:10.1016/j.cbi.2010.06.003.
53. **Sarah Mackenzie Ross**, **Chris McManus**, **Virginia Harrison**, **Oliver Mason** (2015). Reflections on the process of using systematic review techniques to evaluate the literature regarding the neurotoxicity of low level exposure to organophosphate pesticides. *Environment International* 92-93 (2016) 569–573.
www.elsevier.com/locate/envint.
54. **Sarah E Starks**, **Fred Gerr**, **Freya Kamel**, **Charles F Lynch**, **Michael P Jones**, **Michael Calavanja**, **Dale P Sandler**, and **Jane A Hoppin** (2012). Central nervous system function and organophosphate insecticide use among pesticide applicators in the Agricultural Health Study. *Neurotoxicol Teratol.* 2012 ; 34(1): 168–176.
55. **Shilpa Narayan**, **Pei-Chen Lee**, **Zeyan Liew**, **Kimberly Paul**, **Janet S Sinsheimer**, **Jeff M Bronstein** and **Beate Ritz** (2013). Household organophosphorus pesticide use and Parkinson's disease *International Journal of Epidemiology* 2013;42:1476–1485
doi:10.1093/ije/dyt170
56. **Steeve H. Thany**, **Pascal Reynier**, **Guy Lenaers** (2013). Neurotoxicité des pesticides quel impact sur les maladies neurodégénératives ? *médecine/sciences* n° 3, vol. 29, mars 2013. DOI : 10.1051/medsci/2013293013.
57. **Sunita Sharma**, **Sharlene Rakoczy**, **Holly Brown-Borg** (2010). Assessment of spatial memory in mice. *Life Sciences* 87 (2010) 521–536.
58. **Takahashi N**, **Hashizume M** (2014). A systematic review of the influence of occupational organophosphate pesticides exposure on neurological impairment. *BMJ Open* 2014;4:e004798. doi:10.1136/bmjopen-2014-004798.
59. **T M Farahat**, **G M Abdelrasoul**, **M M Amr**, **M M Shebl**, **F M Farahat**, **W K Anger** (2003) neurobehavioural effects among workers occupationally exposed to

organophosphorous pesticides. www.occenvmed.com .Occup Environ Med;60:279-286.

60. **T. Rush, X. Q. Liu, J. Hjelmhaug AND D. Lobner** (2010). Mechanisms of chlorpyrifos and diazinon induced neurotoxicity in cortical culture. *Neuroscience* 166 (2010) 899–906.
61. **Theodore A. Slotkin and Frederic J. Seidler.**(2011) Developmental exposure to organophosphates triggers transcriptional changes in genes associated with parkinson's disease in vitro and in vivo. *Brain Res Bull.* 2011 November 25; 86(5-6): 340–347. doi:10.1016/j.brainresbull.2011.09.017.
62. **Theodore A. Slotkin, Jennifer Card and Frederic J. Seidler** (2012). Chlorpyrifos developmental neurotoxicity: Interaction with glucocorticoids in PC12 cells. *Neurotoxicol Teratol.* 2012 September ; 34(5): 505–512. doi:10.1016/j.ntt.2012.07.002
63. **Thomas S. Wingoa, Ami Rosena, David J. Cutlerb, James J. Laha,c, and Allan I. Leveya,c** .(2012) Paraoxonase 1 polymorphisms In Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and AD-PD spectrum diseases. *Neurobiol Aging.* 2012 January ; 33(1): 204.e13–204.e15. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2010.08.010.
64. **Toby B. Cole, Jenna C. Fisher, Thomas M. Burbacher, Lucio G. Costa and Clement E. Furlong** (2012). Neurobehavioral assessment of mice following repeated postnatal exposure to chlorpyrifos-oxon. *Neurotoxicol Teratol.* 2012 May ; 34(3): 311–322. doi:10.1016/j.ntt.2012.02.003.
65. **Torfi Sigurdsson and Sevil Duvarci** (2016). Hippocampal-Prefrontal Interactions in Cognition, Behavior and Psychiatric Disease. *Frontiers in Systems Neuroscience /* January 2016 | Volume 9 | Article 190. www.frontiersin.org.
66. **V. Terry, JR., J. D. Stone, J. J. Buccafusco, D. W. Sickles, A. Sood, and M. A. Prendergast** (2002), Repeated Exposures to Subthreshold Doses of Chlorpyrifos in

Rats: Hippocampal Damage, Impaired Axonal Transport, and Deficits in Spatial Learning. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* vol. 305, no. 1. DOI: 10.1124/jpet.102.041897. <http://jpet.aspetjournals.org>.

67. **Verónica O. Berríos, Nawal M. Boukli** (2016). Paraoxon and Pyridostigmine Interfere with Neural Stem Cell Differentiation. *Neurochem Res*. Author manuscript; available in PMC 2016 September 11
68. **Wei Jiang, Ellen G. Duysen, Heidi Hansen, Luda Shlyakhtenko, Lawrence M. Schopfer and Oksana Lockridge** (2010). Mice Treated with Chlorpyrifos or Chlorpyrifos Oxon Have Organophosphorylated Tubulin in the Brain and Disrupted Microtubule Structures, Suggesting a Role for Tubulin in Neurotoxicity Associated with Exposure to Organophosphorus Agents. *Toxicological sciences* 115(1), 183–193 (2010) doi:10.1093/toxsci/kfq032
69. **Wen-Qiang Chen, Li Yuan, Rui Xue, Yun-Feng Li, Rui-Bin Su, You-Zhi Zhang, Jin Li** (2011). Repeated exposure to chlorpyrifos alters the performance of adolescent male rats in animal models of depression and anxiety. *NeuroToxicology* 32 (2011) 355–361.
70. **Wen-Qiang Chen, You-Zhi Zhang, Li Yuan, Yun-Feng Li, Jin Li** (2014). Neurobehavioral evaluation of adolescent male rats following repeated exposure to chlorpyrifos. *Neuroscience Letters* 570 (2014) 76–80.
71. **Xiaojun Xiang, M.D., Ph.D., Wen Huang, M.D., Ph.D., Colin N. Haile, M.D., Ph.D., and Therese A. Kosten, Ph.D.** (2011). Hippocampal GluR1 Associates with Behavior in the Elevated Plus Maze and Shows Sex Differences. *Behav Brain Res*. 2011 September 23; 222(2): 326–331. doi:10.1016/j.bbr.2011.03.068
72. **Yifan Li , Chao Zhang , Yanhong Yin , Fang Cui , Jinyang Cai , Zhaohui Chen , Yanhong Jin , Mark G. Robson , Mao Li , Yuting Ren , Xusheng Huang and Ruifa Hu** (2014). Neurological Effects of Pesticide Use among Farmers in China.

73. **Young S. Leea,b, John A. Lewisb, Danielle L. Ippolitob, Naissan Hussainzadaa,b,1, Pamela J. Leinc, David A. Jacksonb, and Jonathan D. Stallingsb** (2016). Repeated exposure to neurotoxic levels of chlorpyrifos alters hippocampal expression of neurotrophins and neuropeptides. *Toxicology*. 2016 January 18; 340: 53–62. doi:10.1016/j.tox.2016.01.001.

Resumé:

Des anomalies comportementales persistantes ont été fréquemment associées à une intoxication aiguë par un pesticide (OP); Cependant, on connaît relativement peu les conséquences des expositions chroniques de ce dernier, qui sont indépendantes des symptômes cholinergiques aigus. L'objectif de cette étude était d'étudier l'impact de l'exposition subchronique au CPF sur la mémoire et le comportement des souris. Les souris albinos ont été exposés par voie intra-gastrique avec du CPF (20 mg/kg) tous les jours pendant 21 jours. Les animaux ont été soumis à une panoplie de tests de mémoire (MWM, NOR) et de comportement (Open field, chambre clair/obscur, EPM, planche à trou et le test de billes) révélant des déficits comportementaux et cognitifs. À noter qu'une diminution de performance de la mémoire de référence a été observée 10 jours après la dernière exposition au CPF. En effet, des coupes histologiques du cerveau ont révélé des lésions au niveau du cortex et de l'hippocampe (CA1, CA2 et GD) des souris traitées à cet insecticide. Ces résultats indiquent donc que des expositions subchroniques au CPF peuvent conduire à des déficits chroniques dans le traitement de l'information, la fonction cognitive et du comportement.

Mot Clé : Pesticide, Chlorpyrifos, Organophosphoré, Mémoire, Comportement.

ABSTRACT:

Persistent behavioral abnormalities have been commonly associated with acute (OP) pesticide poisoning; however, relatively little is known about the consequences of chronic OP exposures that are not associated with acute cholinergic symptoms. The objective of this study was to determine the impact of subchronic exposure to CPF on the memory and behavior on mice. The albino mice were initially injected intragastric CPF (20 mg/kg) every day for 21 days and were subjected to a variety of memory tests (MWM, NOR) and behavioral (Open field, Dark/Light, EMP, Hole board and Marble burring). In behavioral experiments conducted during 10 days of washout period, decrements in a water-maze hidden platform task were observed. However, the mice treated with this insecticide revealed lesions in the cortex and in the hippocampus (CA1, CA2 and GD). These results indicate, therefore, that subchronic exposures to CPF can lead to chronic deficits in information processing, cognitive function and behavior.

Keywords

Pesticide; Chlorpyrifos; Organophosphorus; Memory; Neurobehavioral.