

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Béjaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-Chimique
Spécialité biochimie fondamentale



Réf :.....

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

MASTER

Thème

**Effets du glyphosate sur la physiologie
murine**

Présenté par :

BENYOUB Cylia & HAMZA Tassadit

Soutenu le : **24 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

Mme AIT ALI Djida

Mr GHIDOUCHE Abderrezak

Mme OUAHMED Hania

MCB

MCB

MCB

Présidente

Encadreur

Examinatrice

Année universitaire : 2017 / 2018

Remerciements

Avant toute chose, On tient à remercier Dieu le tout puissant de nous avoir donné la force et la patience de mener à bien ce travail.

On remercie notre promoteur, Dr GHIDOUCHE, pour sa patience, et surtout pour sa confiance, ses remarques et ses conseils, sa disponibilité et sa bienveillance. Ce mémoire n'aurait sans doute jamais abouti sans lui.

Un grand MERCI pour Dr AITALI D, pour sa disponibilité, pour ses conseils et encouragements.

Nos familles et nos amis qui ont été toujours là pour nous encourager et nous soutenir.

On remercie les techniciennes du laboratoire de médecine HAKIMA, LINDA et LOUIZA qui nous ont aidées à réaliser ce travail.

On voudrait également remercier les membres du jury, Mme OUAHMED et Mme AITALI pour avoir accepté d'évaluer ce travail et pour toutes leurs remarques et critiques, ainsi que le personnel et les enseignants, je tiens aussi à remercier tous mes enseignants en signe d'un profond respect.

Dédicaces

Je dédie À la plus belle créature que Dieu a créée sur terre,

À cette source de tendresse, de patience et de générosité,

À ma mère.

A celui qui a veillé à ce que je ne manque de rien.

A celui qui m'a inculqué les valeurs de la vie Et a fait de moi une femme

Mon père.

*A mes deux chères sœurs ; Souad et Rebiha qui m'ont assez encouragé,
conseillé et surtout soutenue moralement.*

A mes trois frères : Khelifa, Abderrahman et Salah qui m'ont tant encouragé.

A mon très cher grand père qui a toujours espéré me voir réussir.

A toute ma famille, mes tentes et mes cousines.

A ma binôme Sonia, mes collègues : Nora, Katia, Nassim et Farid

A mes voisins et à tous mes ami(e)s sans exception.

Et au plus cher à mes yeux, Mekhlouf.

Celia

Je dédie ce modeste travail

A moi même pour tous les efforts que j'ai fournis pour la réalisation de ce travail.

A mes parents pour l'éducation qu'ils m'ont prodiguée et pour leurs soutiens, leurs confiances ainsi que leurs prières tout au long de mes études. Sans eux je ne serais jamais arrivé à ce stade de ma vie, que dieu vous accorde santé, longue vie et vous garde à mes coté.

A mes aimables frères : Nadir, Toufik, Farid, Massinissa et Juba.

A mon très cher Juju que je remercie dieu de nous avoir réuni.

A ma très chère amie Nassima que j'aurais aimais partager cette expérience et que j'espère voir bientôt.

A ma binôme Cylia et mes collègues : Nora, Katia, Nassim et Farid.

Sonia

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION..... 1

CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

I.1.Généralité sur les pesticides 2

I.1.1 définition des pesticides..... 2

I.1.2 Classification 2

I.1.3 Répartition de l'utilisation des pesticides..... 3

I.2.Glyphosate

II.2.1 Mode d'action du Glyphosate 4

II.2.2. Métabolisme dans l'environnement 5

II.2.3 Relation environnement-Glyphosate..... 5

II.2.4 Principales voies de contamination..... 6

III.2.5 Etude épidémiologique..... 6

I.3. Profil toxicologique

I.3.1 Toxicité chronique..... 7

I.3.2 Neuromodulation..... 9

I.3.2.1 Stress oxydatif 9

I.3.2.2 Neurotransmission..... 10

Chapitre II : Matériels et méthodes

I. 1 Matériels

I.1.1 Model animal 13

I.1.2matériel chimique.....	13
I.1.3matériel du laboratoire	14
II.2 Méthodes	
II.2.1 Préparation des pesticides	14
II.2.2 Traitement des animaux	15
II.2.3 Tests comportementaux	15
II.2.4 Sacrifice des animaux	19
II.2.4.1 Etude macroscopique.....	20
II.2.4.1 Etude microscopique.....	20
II.2.5 Analyses numérique	21
II.2.6 Analyses statistique	22

Chapitre III Résultats et discussions

I.1 Impacte sur les poids.....	22
II.2 Impacte sur le comportement /mémoire	22
III.3 Etudes histologiques	32
III.3.1 Macroscopiques.....	32
III.3.2 Microscopiques	32

Conclusions et perspectives

Références bibliographiques

Annexes

Liste des figures

Figure 1 :Utilisation mondiale des pesticides	3
Figure 2 :Structure chimique du glyphosate	3
Figure 3 : Mode d'action du glyphosate.....	4
Figure 4 : Effet du glyphosate sur l'environnement et la santé.....	5
Figure 5 : Représentation schématique du mécanisme excitotoxicité du glutamate et du stress oxydatif induit par le glyphosate chez les rats	11
Figure 6 :Photographie originale de quelques instruments utilisés.....	13
Figure 7 : Photographie originale représentant le traitement d'une souris par injection intrapéritonéale.....	14
Figure 8 : Photographie originale du dispositif du test de Dark light box.....	15
Figure 9 : Photographie originale des dispositifs	17
Figure 10 : Photographie originale du dispositif du test Open Field.....	17
Figure 11 :Photographie originale du dispositif de Barnes maze	18
Figure 12 : Photographie originale du dispositif du test de Morris Water Maze.....	18
Figure 13 : photographie originale du dispositif de la Nage forcé	19
Figure 14 : Photographie originale du dispositif du test de pole	19
Figure 15 : évaluation de l'anxiété par le test d'Open field.....	23
Figure 16 : évaluation de l'anxiété par le test EPM.....	24
Figure 17 :évaluation de l'anxiété par le test EZM	26
Figure 18 :évaluation de l'anxiété par le test Dark/light.....	27
Figure 19 : représentation graphique de la capacité d'apprentissage des souris Males en utilisant la piscine de Morris	29

Figure 20 : représentation graphique de la mémoire et de l'apprentissage des souris Femelles par le test de Morris.....	30
Figure 21 : représentation graphique de la capacité d'apprentissage des souris mâles et femelles en utilisant le test de Barnes maze.....	31
Figure 22 : évaluation de la dépression par le test de la Nage Forcée.....	32
Figure 23 : Photographie des souris traitées et non traitées aux pesticides.....	33
Figure 24 : Observation au microscope optique des coupes histologiques du cerveau au niveau du cervelet, cortex et hippocampe des souris témoin GLY- et traité GLY+	34

Liste des tableaux

Tableau : Résultats des souris au cours du test de POL.

Liste des abréviations

AChE: Acétylcholine estérase.

AMPA: acide aminométhylphosphonique.

BeWo: *lignée cellulaire* lymphoblastoïde.

BO: Bras ouvert

CaMKII: Protéine kinase Ca²⁺/calmoduline-dépendante.

CIRC: Centre International de Recherche sur le Cancer.

CL : Compartiment lumineux.

DA- D1: récepteur dopaminergique.

DL50: Dose létale.

EPM: Elevated plus maze.

EPSPS: 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthétase.

ERK: Extracellular signal-regulated kinases.

EZM: Elevated zero maze.

FST: Forced swim test.

GABA: Acide gamma aminobutyrique.

GBH: Glyphosate based herbicid.

INF-KB: nuclear factor-kappa B.

IP: Intrapéritoneale.

MPOC: maladie pulmonaire obstructive chronique.

MWM: Morris water maze.

NMDA: Acide N-méthyl-D-aspartique.

OC: organochlorés.

OF: Open field.

OP: organophosphorés.

PC12: phaeochromocytoma.

POEA: polyoxyethylene amine.

RA: Acide rétinoïque.

ROS: espèces réactives d'oxygène.

SH-SY5Y: lignée cellulaire neuronale.

SLA: sclérose latérale amyotrophique.

S100B: protéine astrocytaire.

5-HT: 5-hydroxytryptamine.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Pour être productive, l'agriculture moderne fait aujourd'hui appel à plus d'insecticide, d'herbicide et de fongicide pour assurer la pérennité des exploitations agricole fondée principalement sur la rentabilité maximale et qui ont une vocation d'exportation de leurs produits vers les pays d'Afrique et d'Asie. C'est pourquoi leur croissance va de pair avec l'utilisation intensive des pesticides. Cette utilisation de pesticide à un impact pernicieux sur l'environnement car ils sont signalé parmi les polluants les plus dangereux de l'environnement en raison de leur persistance, mobilité dans la nature et leur effet à long terme sur les organismes vivants. De nombreuses études épidémiologiques suggèrent une corrélation entre l'utilisation professionnelle et/ou domestique des pesticides et l'apparition de certaines pathologies chez les populations concernées. Des effets neurotoxique, cancérigènes, ou de type perturbation endocrinienne, des problèmes d'infertilité ou encore du système immunitaire affaibli sont plus fréquents chez ces populations (**Bouziyani *et al*, 2007**).

Dans notre étude nous nous somme intéresser à l'évaluation de l'effet du Glyphosate ainsi que du mélange de Glyphosate et de Chlorperyfos sur des sujets murins suite à une exposition à de dose sub-léthale par voie intrapéritonéal.

Ce manuscrit se décline en trois parties ; la première consiste en une étude bibliographique assez élargie aux études effectuées par des chercheurs renommés et dont les résultats font référence dans le domaine.

Dans la 2^{ème} partie nous développons les méthodes utilisés dans l'étude de l'effet du Glyphosate et du mélange de pesticide sur le comportement, le système nerveux, la fonction hépatique et reproductrice chez les souris.

La 3^{ème} partie est enfin consacrée aux résultats obtenus. Une discussion générale est engagée et les perspectives de notre travail sont clarifiées. Dans cette partie, nos résultat sont commentés et des comparaisons sont faites par rapport à des recherches antérieures et à d'autres qui font référence dans le domaine.

CHAPITRE I

SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Généralité sur les pesticides

I.1.1 Définition des pesticides

Les pesticides sont des produits chimiques utilisés pour détruire, atténuer, prévenir ou repousser les organismes nuisibles tels que les insectes, les souris, les mauvaises herbes, les champignons et les micro-organismes. En raison de leurs propriétés, les pesticides servent à beaucoup d'objectifs utiles et sont couramment employés dans l'agriculture, d'autres usages professionnels ou domestiques. Néanmoins, du moment que ces agents sont biologiquement actifs, de ce fait ils peuvent potentiellement causer des effets néfastes aux humains, à la faune et à la flore (Vopham *et al*, 2017).

I.1.2. Classification des pesticides

Les pesticides sont généralement classés selon :

- La nature des cibles visées; il existe principalement trois grandes familles : Les *herbicides* : contre les mauvaises herbes (Glyphosate). Les *fongicides* : contre les champignons et les moisissures. Les *insecticides* : contre les insectes nuisibles (Chlorperpyfos).
- La nature chimique de la substance active qui compose les produits phytosanitaires.

On distingue : les *organochlorés (OC)* sont des composés organiques qui possèdent tous en commun un ou plusieurs atomes de chlore (Cl). Les *carbamates* : Les pesticides de cette famille sont des esters dérivés de l'acide carbamique. (Les *organophosphorés (OP)* sont des composés possédant au moins un atome de phosphore (P) ils constituent le plus grand groupe d'insecticides vendus dans le monde (Hatcher *et al*, 2017).

I.1.3. Répartition de l'utilisation des pesticides

Les pesticides sont devenus omniprésents dans notre société moderne. Leur développement a contribué à améliorer notre qualité de vie, mais il a aussi fait naître de nouveaux dangers. Au niveau mondial, l'expansion de l'usage des pesticides notamment le Glyphosate continue à s'effectuer depuis plus d'un demi-siècle (**figure01**). En effet, la croissance de leur utilisation dans le Tiers-monde compense une certaine régression de leur consommation (en tonnage) dans les pays développés.

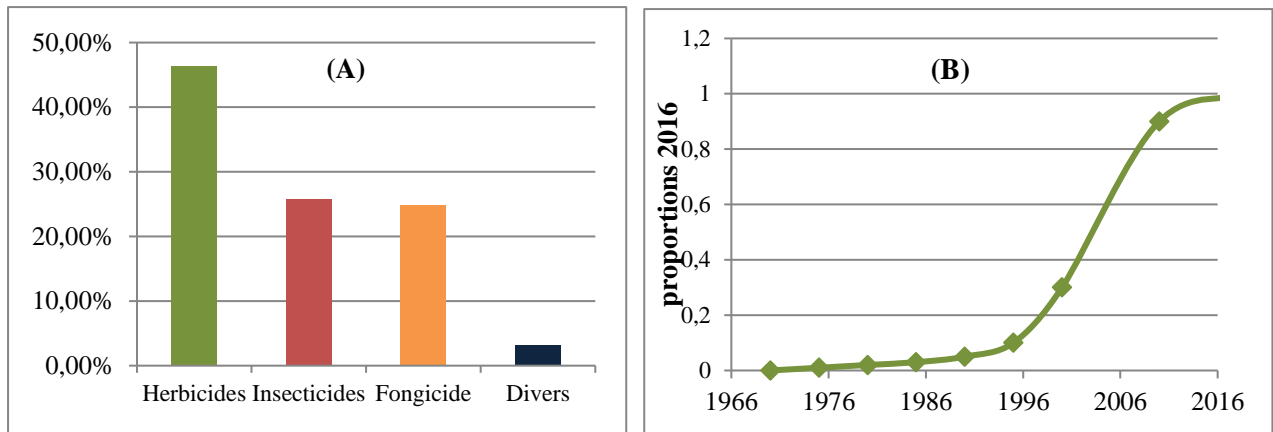


Figure01 : Utilisation mondiale des pesticides. (A) consommation mondiale des produits phytosanitaires par catégorie de produits. (B) Utilisation mondiale du Glyphosate entre 1970 et 2016 -900 million kg en 2016- (Bruggen et al, 2018).

En Algérie, plusieurs entreprises se sont spécialisées dans l'importation d'insecticides et divers produits apparentés. Ainsi, environ 400 produits phytosanitaires sont homologués dans notre pays, dont une quarantaine de variétés sont largement utilisées par les agriculteurs (Bouziati *et al*, 2007).

En dépit de preuves présentées par les industriels du secteur agro-alimentaire, il apparaît que les pesticides sont la cause directe ou indirecte de pathologies. De multiples études épidémiologiques ont identifié une corrélation entre l'exposition professionnelle aux OP et l'apparition de maladies neurodégénératives, psychiatriques, déficits sensorimoteurs, cancers, hémopathies, et des malformations dont l'incidence tend à augmenter dans le monde.

I.2. Glyphosate

Chimiquement, la substance active glyphosate (N-phosphonométhyl-glycine) est un dérivé de la glycine un acide aminé naturel sur lequel on a substitué un atome d'hydrogène par un groupement phosphonométhyle au niveau de la fonction amine primaire (R-NH₂). Il a été commercialisé pour la première fois en 1974 sous le nom de Roundup.

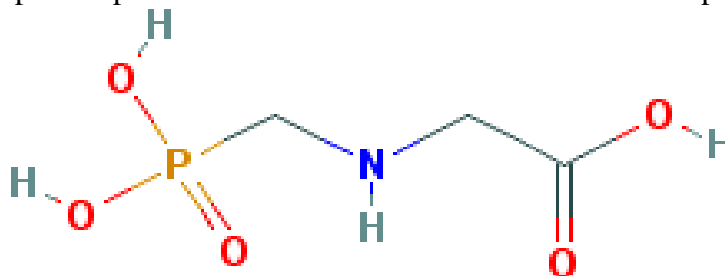


Figure 02 : Structure chimique du glyphosate

Cetherbicide OP, principal ingrédient actif présent dans le Roundup (Monsanto Company, St. Louis, MO) mène le marché mondial des pesticides; il est devenu l'herbicide le plus couramment utilisé dans l'agriculture industrielle et le jardinage domestique. Son utilisation a considérablement augmenté avec le développement de cultures génétiquement modifiées pour tolérer l'herbicide, en partie à cause de l'apparition de mauvaises herbes résistantes au glyphosate (Cattani *et al*, 2014).

Il a été suggéré que la toxicité du Roundup est probablement due à des effets synergiques entre le glyphosate et d'autres produits de formulation, tels que le tensioactif polyoxyethylene amine(POEA) qui pourrait faciliter la pénétration du glyphosate dans les membranes plasmiques potentialisant sa toxicité (Benbrook, 2016).

I.2.1 Mode d'action du Glyphosate

C'est en 1980 que la cible du glyphosate fut identifiée ; il s'agit de la 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthétase (EPSPS), une enzyme située majoritairement dans les chloroplastes et est essentielle à la synthèse des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane) important pour la synthèse de protéines nécessaires à la croissance de la plante.

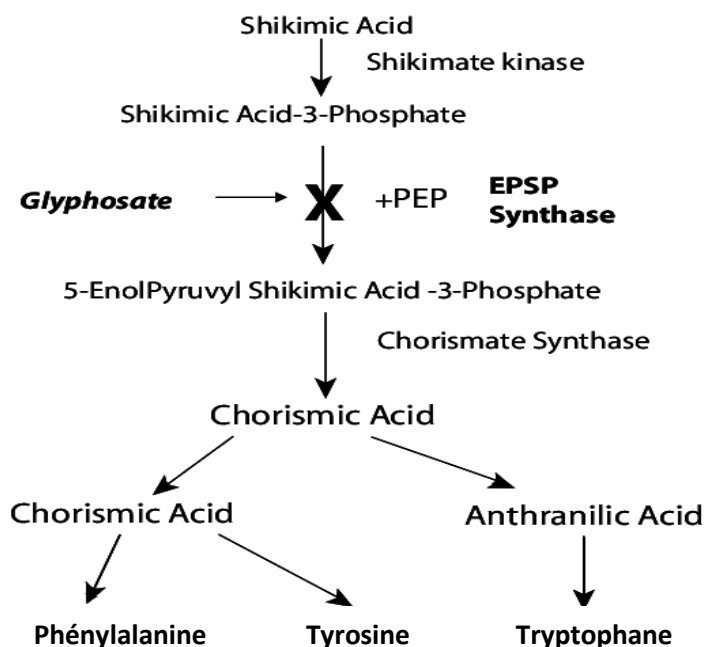


Figure 03 : Mode d'action du glyphosate (Dill, 2015)

Puisque cette enzyme n'est pas présente chez les vertébrés, on a longtemps cru que le glyphosate n'affecterait pas les espèces non ciblées dont les mammifères et les humains (Martinez *et al*, 2018) ; Cependant, cette voie est présente chez les bactéries intestinales, qui jouent un rôle important dans la physiologie humaine (Ait Bali *et al*, 2018).

I.2.2. Métabolisme dans l'environnement

La principale voie de dégradation du glyphosate dans l'environnement est la dégradation microbienne par les bactéries du sol, tandis qu'une autre voie de dégradation a également été identifiée, chacune produisant un ensemble différent de produits finaux. La dégradation par la voie primaire conduit à la production du principal métabolite du glyphosate, l'AMPA (acide aminométhylphosphonique) et l'acide glyoxylique. Une décomposition plus poussée de ces deux métabolites crée du dioxyde de carbone et un ion ammonium. La deuxième voie de dégradation est moins fréquente, se produisant uniquement dans les espèces bactériennes spécialisées du sol qui métabolisent le glyphosate en phosphate inorganique et en sarcosine, puis en convertissant davantage la sarcosine en glycine (ANNEXE N°2) (Dill, 2015).

I.2.3. Relation environnement- Glyphosate

Les plantes génétiquement modifiées résistent à cet herbicide. Les agriculteurs le versent en masse sur les plantations afin de tuer les plantes naturelles n'ayant pas cette résistance. De cette façon, il rentre dans la terre, l'eau, les plantes et la chaîne alimentaire humaine (Bruggen *et al*, 2018).

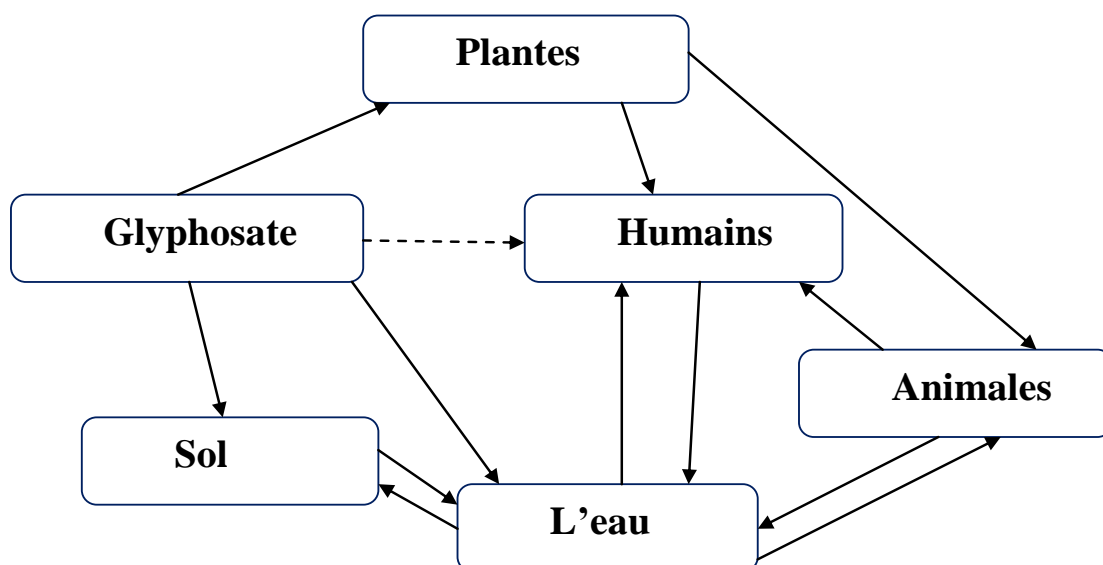


Figure 04 : Effet du glyphosate sur l'environnement et la santé (adapté de Bruggen *et al*, 2018).

I.2.4. Principales voies de contamination

L'exposition au Glyphosate peut se produire directement dans le cadre de sa fabrication ou de son utilisation professionnelles ou domestiques, mais aussi indirectement par l'air, ou l'ingestion alimentaire à partir d'eau potable et d'aliments contaminés. Selon les circonstances, ce sont soit des populations professionnellement exposées, soit la population générale qui sera concernées. Qu'il s'agisse d'expositions professionnelles ou environnementales, les substances pénètrent dans l'organisme selon trois voies : la voie cutanée, la voie digestive (ou orale) et la voie respiratoire qui est la voie la moins exposable car le produit est faiblement volatil. (Dezielet *et al*, 2015).

I.2.5. Etudes épidémiologiques

Des organismes non ciblés peuvent être exposés au glyphosate. En effet, des preuves de l'exposition humaine à cet herbicide ont été démontrées grâce à la détection du glyphosate dans des échantillons d'urine de personnes vivant dans des fermes et pratiquant des activités non agricoles (Conrad *et al*, 2017).

Une étude récente a également démontré la présence du glyphosate dans le sérum du cordon ombilical des femmes enceintes ayant accouché dans trois provinces de Thaïlande (Kongtip *et al*, 2017). Les auteurs ont montré que les femmes enceintes qui travaillent dans l'agriculture ou qui vivent avec des familles travaillant dans l'agriculture sont plus exposées au glyphosate que les femmes enceintes qui ne sont pas agricultrices par profession. La détection du glyphosate dans le cerveau et le liquide céphalo-rachidien après exposition humaine à l'GBH indique que cet herbicide est capable de franchir la barrière hémato-encéphalique. Certains rapports cliniques sur l'intoxication humaine avec des formulations commerciales de Gly décrivent des effets négatifs au niveau du système nerveux, liés à la motricité, l'anxiété et les troubles de la mémoire à court terme (Nishiyori *et al*, 2014). Wang et ses collaborateurs ont rapporté en 2011 un cas de parkinsonisme à la suite d'une exposition chronique au glyphosate chez une femme de 44 ans auparavant en bonne santé qui travaillait dans l'unité de production de glyphosate.

Les conséquences sur la santé des habitants des régions agricoles en argentine se multiplient Les cas de cancers ont été multipliés par trois en dix ans chez les habitants. Le nombre de nouveau-nés souffrant de malformation congénitale et de maladies internes (rétrécissement de l'œsophage, malformation cardiaque et rénale) est passé de 46 en 1998, à 186 en 2009 au

moment où les pulvérisations de pesticides ont commencé dans la région. (**Thaddeus et al, 2015**).

I.3. Profil toxicologique

I.3.1 Toxicité chronique

Le glyphosate interfère avec les réactions biochimiques fondamentales et peut prédisposer les humains à divers pathologies.

Les études de toxicité sur les animaux de laboratoire sont généralement à court terme. Les dommages causés par une exposition chronique de faible niveau ne peuvent être observés qu'après une longue période de temps, souvent des années, voire des décennies.

- **Glyphosate et stress oxydatif**

Chez les organismes ciblés, le principal effet signalé est une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) Les ROS sont susceptibles de causer des effets mutagènes potentiellement toxiques ou des dommages cancérigènes due à leur forte réactivité ionique (**Rondón-Barragán et al, 2012**).

- **Glyphosate et cancer**

En 2015, le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) a classé le glyphosate comme «probablement cancérogène pour l'homme» (groupe 2A). Cette classification, se base sur le nombre d'études confirmés démontrant un effet potentiel de ce pesticide sur le développement et ou la progression tumorale notamment le lymphome non hodgkinien.

Une autre source de preuves à l'appui des effets indésirables du glyphosate a été fournie par le groupe de Bell et ses collaborateurs (2007). Ils ont suggéré que le glyphosate et son principal métabolite, l'AMPA, modifient les points de contrôle du cycle cellulaire en interférant avec les mécanismes physiologiques de réparation de l'ADN. Plusieurs GBH ont été testés, et ils ont induit un dysfonctionnement dans le cycle cellulaire de la première division cellulaire dans les embryons d'oursins. Cette défaillance des points de contrôle du cycle cellulaire est connue pour conduire à l'instabilité génomique et au développement possible du cancer (**Manéas et al, 2009**).

- **Glyphosate et système endocrinien**

En plus des effets cités, le glyphosate pourrait agir comme un perturbateur endocrinien affectant de façon prépondérante le système reproducteur masculin, car il peut entraîner des altérations de l'activité et de l'expression de l'aromatase), des niveaux d'œstrogènes et de testostérone. Ces études révèlent aussi que les effets de perturbation endocriniennes observés sont doses indépendantes (Clair *et al*, 2012).

- **Glyphosate et système immunitaire**

Différentes études ont montré que de nombreux pesticides sont immunotoxiques car ils peuvent altérer la structure de certains composants du système immunitaire, induisant ainsi une immunodépression. Avec de plus en plus de preuves des effets du Glyphosate sur la réponse immunitaire des poissons, la question de son impact sur l'expression des gènes des cytokines est apparue (Evrard *et al*, 2010). Une étude récente menée par Kwiatkowska et ses collaborateurs en 2017 a démontré pour la première fois que le glyphosate peut induire des dommages de l'ADN des lymphocytes T et B des humains et provoquent des altérations épigénétiques dans les cellules animales.

- **Glyphosate et effet tératogène**

Il y a de plus en plus de preuves qui soulèvent des inquiétudes quant aux effets de GBH sur les personnes vivant dans des zones où les herbicides sont utilisés de manière intensive. Les femmes exposées aux herbicides pendant la grossesse ont accouché des bébés présentant des malformations congénitales, notamment une microcéphalie, une anencéphalie et des malformations crâniennes. Dans ce contexte, une étude *in vitro* impliquant la cinétique de transport du glyphosate à travers la monocouche cellulaire BeWo (utilisée comme modèle de trophoblaste humain) et à travers la barrière placentaire dans le système de perfusion *ex vivo* ont montré que le transport du glyphosate par le placenta est possible (Poulsen *et al*, 2009).

Des observations similaires ont été observées chez des embryons de poulet exposés à de petites concentrations de GBH. Ces effets ont été caractérisés par des altérations des marqueurs de la crête céphalique, une réduction des vésicules optiques et une microcéphalie causée par des changements dans les voies intracellulaires de l'acide rétinoïque (RA) et du Sonichedgehog (Shh). (Romina *et al*, 2016)

- **Impacte du Glyphosate sur les organes**

Il y a des rapports reliant cet herbicide aux dommages hépatiques, à la tolérance d'antibiotique, et à la déficience rénal. En effet, des rats nourris avec un maïs traité génétiquement modifié résistant au glyphosate ont montré des altérations fonctionnelles dans

les deux organes détoxifiants: les reins et le foie ainsi qu'au niveau du cœur et du système hématopoïétique. Plus récemment, une étude menée par **Gilles-Eric Séralini en 2014** a démontré que les rats mâles traités au glyphosate ont développés une nécrose et d'importantes congestions du foie et des néphropathies rénales sévères. Les données biochimiques ont confirmé des déficiences chroniques significatives des reins pour les deux sexes, 76% des altérations des paramètres physiologiques étaient liés aux reins (**Cacabelos, 2017**).

- **Glyphosate et autre pathologies**

Récemment, **Samsel et Seneff (2016)** dans leur revue de la littérature ont suggéré que Le glyphosate, agit comme analogue de la glycine et peut être incorporé par erreur dans des peptides durant la synthèse des protéines. Les auteurs ont affirmé que la substitution de la glycine par le glyphosate peut conduire au développement de divers troubles tels que le diabète, l'obésité, l'asthme, la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC), la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique (SLA), la maladie de Parkinson.

I.3.2. Neuromodulation

Le système nerveux représente une cible principale pour les effets aigus et chroniques des pesticides. Des études antérieures démontrent que l'exposition au Glyphosate est associée à des dommages oxydatifs et à la neurotoxicité. Par conséquent, le mécanisme des effets neurotoxiques induits par le glyphosate doit être déterminé(**Hernandez et al, 2015**).

I.3.2.1 Stress oxydatif

Le stress oxydatif est caractérisé par un déséquilibre entre les processus prooxydants et antioxydants, en faveur du prooxydant, endommageant ainsi les biomolécules (ADN, protéines et lipides) et perturbant la signalisation oxydoréduction.

Plus précisément, il a été démontré que l'exposition au glyphosate pouvait augmenter la production de ROS telle que l'ion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($-OH$) (**Aguiar et al, 2016**).

Le glyphosate est associé à l'induction du stress oxydatif et à la neuroinflammation, il est capable de provoquer un stress oxydatif dans certaines régions du cerveau: la substantia nigra, le cortex cérébral et l'hippocampe. Récemment, il a été constaté que le glyphosate provoque la mort cellulaire dans la lignée cellulaire dopaminergique PC12 par l'apoptose et les mécanismes autophagiques. Ces études suggèrent que l'exposition au glyphosate peut

affecter le système dopaminergique des humains et des rats, probablement par le stress oxydatif. De plus, **Chorfa et ses collègues 2013** ont démontré que le glyphosate provoque une cytotoxicité significative sur la lignée cellulaire neuronale SH-SY5Y.

De nombreuses preuves montrent que le stress oxydatif peut influencer l'apparition de maladies telles que le diabète, la dépression, l'anxiété, les maladies neurodégénératives et les perturbations associées à l'exposition aux contaminants environnementaux dont le glyphosate (**Cacabelos, 2017**).

I.3.2.2 Neurotransmission

La croissance et la différenciation morphologique des neurones sont des événements critiques dans l'établissement d'une connectivité et d'un fonctionnement neuronal appropriés.

Une étude a rapporté un développement neuronal altéré causé par l'exposition au glyphosate. En particulier, la différenciation axonale initiale et la croissance des neurones cultivés est affectée par le glyphosate et se caractérisent soit par une indifférenciation et/ou une diminution de la ramification des dendrites. Ces données suggèrent que les défauts morphologiques seraient probablement une conséquence de la diminution de l'expression de Wnt5a et de l'activité de CaMKII induite par le glyphosate (**Romina et al, 2016**).

Le Glyphosate pourrait aussi inhiber les activités enzymatiques de la sérine hydroxyméthyl-transférases, une source majeure de glycine intracellulaire. Pour cette raison, il a été suggéré que le glyphosate inhibe la prolifération cellulaire en appauvrissant la glycine (**Li et al, 2013**). Cattani et ses collaborateurs (2014) a suggéré que l'exposition au GBH diminue la recapture et le métabolisme du glutamate dans les cellules gliales et augmente sa libération dans la fente synaptique. De plus le glyphosate se lie au récepteur NMDA conduisant à l'influx de Ca^{2+} dans l'hippocampe de rats immatures. D'importants mécanismes de mort cellulaire dans les maladies neurologiques qui mène à une stimulation incontrôlable des enzymes protéolytiques, la lipoperoxydation et la génération des espèces réactives d'oxygènes (ROS), ont été signalés. La même équipe a confirmé les résultats précédents et a associé l'excitotoxicité du glutamate au développement du comportement dépressif chez les rats.

Parallèlement, les niveaux sériques différents de la protéine astrocytaire S100B durant les périodes post et prés natal ont suggéré un dysfonctionnement des astrocytes dû à l'effet neurotoxique de l'herbicide.

Les mêmes résultats ont été observés chez la génération n+1 du rat lors d'une exposition chronique au GBH pendant la grossesse et l'allaitement (Gallegos *et al*, 2016).

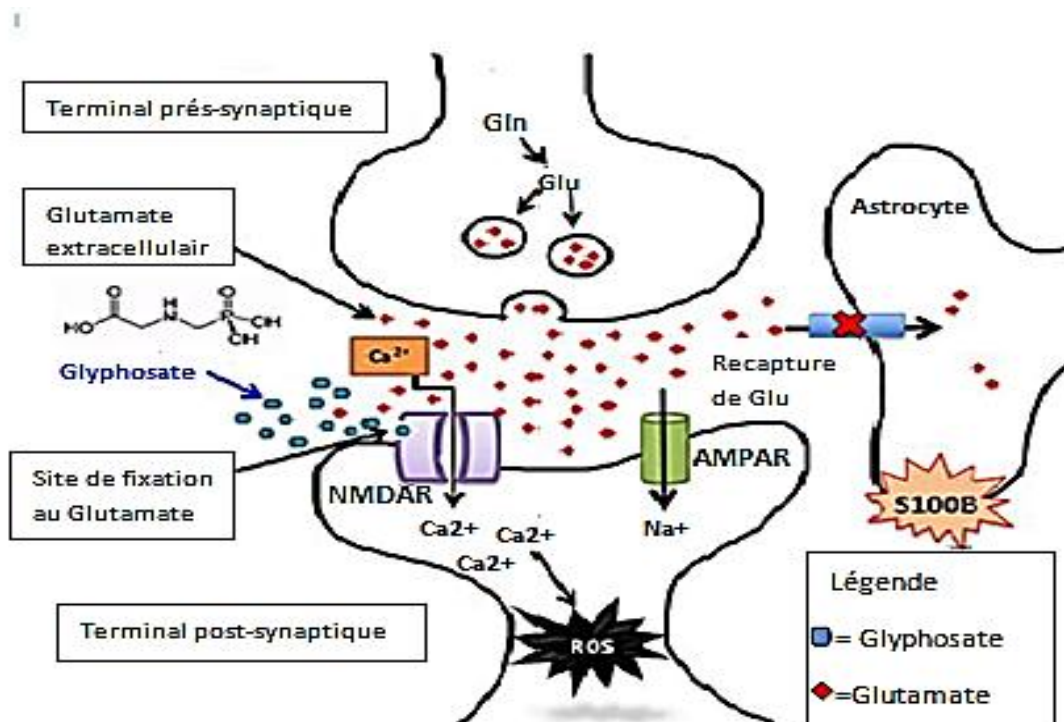


Figure 05 : Représentation schématique du mécanisme d'excitotoxicité du glutamate et du stress oxydatif induit par le glyphosate chez les rats (Cattani *et al*, 2017).

En 2017, Martinez et son équipe ont démontré que l'exposition orale des Rats Wistar au Glyphosate induit une altération des niveaux de sérotonine, la dopamine, la norépinephrine et ses métabolites dans des régions du cerveau. Et Notamment la réduction de la tyrosine hydroxylase et de la sérotonine-IR dans différentes zones cérébrales comme il a été rapporté par Ait Bali et ses collaborateurs (ait Bali *et al*, 2017). Des études ont rapporté que le Glyphosate est généralement un faible inhibiteur de l'acétylcholinestérase. Par ailleurs l'exposition répétée au Glyphosate entraîne une hypoactivité accompagnée d'une diminution de la liaison spécifique aux récepteurs DA- D1 dans le noyau accubens Chez les rats wister injectés par voie IP (Hernandez *et al*, 2015). Une étude menée par Negga et ses collaborateurs en 2011 a démontré que l'exposition de *C. elegans* au glyphosate a conduit à une pathologie du système nerveux dans la région nigrostriatal, analogue au système dopaminergique associé à la maladie de Parkinson.

Toutes ces constatations dérivent de la théorie réticulariste (Camillo Golgi 1906) qui déclare que les neurones ne sont pas indépendants les uns des autres ; Ils établissent entre eux des

liaisons et forment des chaînes de neurones constituant un réseau continu. Les changements structuraux et neurochimiques au cours d'une exposition chronique au GBH sont associés à des modifications de la connectivité fonctionnelle entre les régions du SN qui peuvent conduire à des changements dans la régulation des fonctions affectives et cognitives. (**Ait Bali et al, 2017, Martinez et al, 2018**).

CHAPITRE II

MATERIELS

ET

METHODES

II.1 Matériels

II.1.1. Modèle animal

39 souris albinos (BALB/C) âgées de 6 semaines pesant environ 32 ± 3 g (femelles) et 38 ± 3 g (males) sont utilisées dans notre étude, ces animaux à statut holoxénique proviennent de l'Institut PASTEUR d'Alger d'un élevage de type conventionnel. Ils ne présentent aucun signe clinique de pathologies au moment de leur mise à disposition. Les souris sont hébergées dans des cages marquées d'un numéro de lot (**Figure1**) et contenant une couche de sciure renouvelée 1 fois par 2 jours afin d'entretenir les conditions d'hygiène appropriées. Elles sont maintenues dans des conditions de température constante ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) et d'humidité ($60 \pm 5\%$) dans un cycle lumière-obscurité de 12 h, avec un accès libre à l'eau et à la nourriture.

Les conditions d'élevage et d'expérimentation sont en accord avec les règles de l'éthique dans l'expérimentation animale.



Figure 05: Photographie originale de l'une des cages hébergeant les souris.

II.1.2. Matériel chimique :

- **Pesticides utilisés :** Glyphosate commerciale à 450g/l et Chlorpyrifos commercial à 480g/l.
- **Réactifs chimiques :** Paraffine, Formol 10%, Éthanol, L'hématoxyline, Xylène, Acétone, éosine.

II.1.3. Matériel laboratoire : Trousse de dissection, Histocassettes, Automate de déshydratation, Station d'enrobage, Plaque refroidissante, Microtome, Microscope optique.

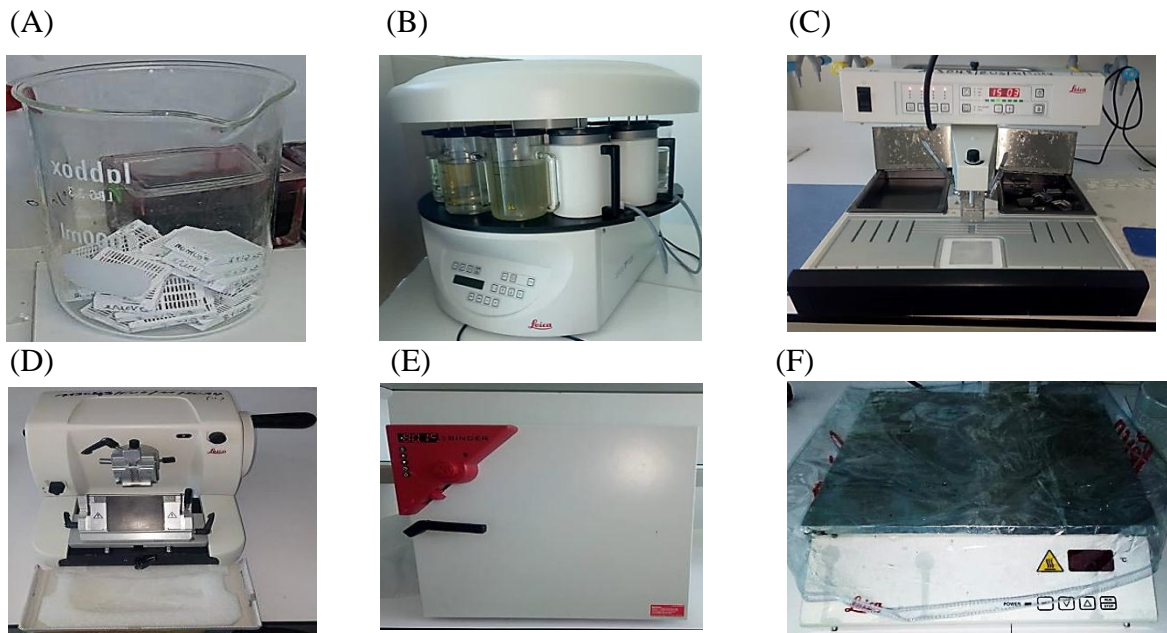


Figure 06 : Photographie originale de quelques instruments utilisés. (A) : histocassettes. (B) automate de déshydratation (C) station d'enrobage. (D) microtome (E) étuve. (F) plaque chauffante.

II.2.Méthodes

II.2.1.Préparation des pesticides

Solutions à base de pesticide:

Une solution mère de 10 g/l à base de glyphosate est préparée par dissolution de la solution commerciale (Roundup 450g/l) dans de l'eau physiologique (0.9% NaCl). Des solutions filles correspondants à 1/8, 1/10/, 1/12 de la DL50 par poids corporel sont préparés à partir de la solution mère. En suivant le même procédé, un mélange contenant du glyphosate et du Chlorpyrifos à une concentration de 1/8 de la DL50 du poids corporel est préparé.

NB : Chaque concentration de pesticide en fonction du poids corporel est préparée dans un volume maximal de 400ul et injectée par voie intrapéritonéale.

II.2.2. Traitement des animaux

Les animaux sont répartis en 4 lots :

Lot 1: contient 7 souris de sexes différents traités par de l'eau physiologique à 0.9% NaCl. Il est considéré comme étant notre lot témoin.

Lot 2, 3 et 4: contient chacun 7 souris des deux sexes traités par des concentrations différentes de glyphosate à savoir 1/8 ,1/10 et 1/12 de la DL50, respectivement.

Lot 5: contient 8 souris de sexes différents traités par un mélange de pesticides (Glyphosate et Chlorpyrifos) à une concentration de 1/8 DL50.

Après trois (3) semaines d'adaptation, les injections par voie intrapéritonéale (IP) sont réalisées à intervalle de 72heures.



Figure 07 : Photographie originale représentant le traitement d'une souris par injection intra-péritonéale.

II.2.3. Tests de comportements

Les souris sont soumises à différents test comportementaux dans le but d'évaluer de nombreux paramètres, notamment l'anxiété, la mémoire et capacité d'apprentissage, l'activité locomotrice, et la dépression.

Trois (3) séries de tests ont été effectuées (excepté le test de Morris et Barnes) à intervalle de 20 jours entre chaque série. Afin de supprimer toute anxiété due à un changement de salle, les souris sont placées dans la salle de tests 30min avec le début de chaque expérimentation.

II.2.3.1. Tests d'anxiété

II.2.3.1.1. *Dark/Light box*

- **Description du dispositif et du protocole suivi**

Dark light box est basé sur l'aversion naturelle des rongeurs pour les endroits lumineux. Le dispositif comprend deux compartiments séparés par une cloison dans laquelle il y a une ouverture centrale. Le compartiment lumineux dispose d'une forte lumière blanche froide. Les souris ont été individuellement placées au milieu du compartiment sombre. Leur comportement est enregistré pendant 5 minutes. En prenant en considération le nombre d'entrées dans le compartiment lumineux et le temps passé de ce dernier.



Figure 8 : Photographie originale du dispositif du test de *Dark light box*.

II.2.3.1.2. *Elevated zero maze (EPM) & Elevated zero maze (EZM)*

- **Description du dispositif et du protocole suivi**

Le labyrinthe surélevé (EPM) est un test de choix pour l'évaluation du comportement anxieux des rongeurs ce test consiste en deux bras fermés et deux bras ouverts perpendiculaires avec une plate-forme au centre. Ce test est conçu sur la base de l'aversion naturelle des rongeurs à un champ non protégé et élevé. La souris est placée sur la plate-forme centrale face à l'un des bras ouverts et laissée explorer librement le labyrinthe durant 5min. Afin d'éliminer, le biais éventuel dû à la plateforme centrale, le test EZM consistant en une plate-forme circulaire haute avec quatre quadrants dont deux sont fermés (délimités par des murs intérieurs et extérieurs) et deux autres ouverts, est utilisé. Ainsi ces tests permettent de mesurer le temps passé et le nombre d'entrées dans les bras ouverts, ainsi que le nombre total d'entrées dans les bras ouverts et fermés.



Figure 9 : Photographie originale des dispositifs
(A) : *Elevated plus maze*. (B) : *Elevated zero maze*.

II.2.3.1.4. *Open Field*

▪ Description du dispositif et du protocole suivi

Le test open field est effectué pour évaluer les changements possibles dans l'activité locomotrice et le comportement anxieux. L'appareil consiste en une boîte blanche rectangulaire avec une hauteur suffisante pour empêcher la souris de voir le milieu extérieur. Les souris ont été placées dans le centre de la boîte et ont été autorisées à explorer pendant 5 min. La mesure de la distance totale parcourue ainsi que du temps passé au centre du dispositif renseigne sur l'état anxieux et la mobilité de la souris.

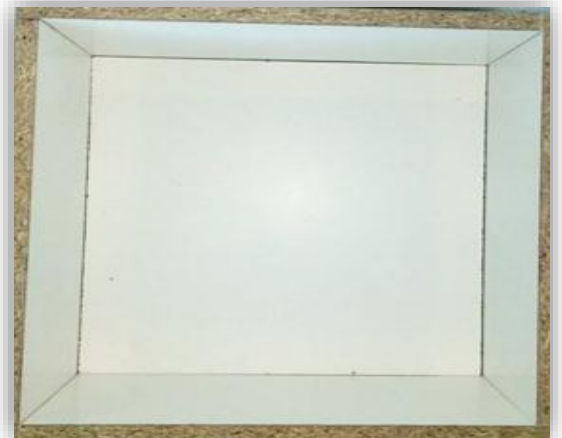


Figure 10 : Photographie originale du dispositif du test *Open Field*.

II.2.3.1. Tests de mémoire et d'apprentissage

II.2.3.1.1. *Barnes maze*

▪ Description du dispositif et du protocole suivi

Barnes maze est conçu pour tester l'apprentissage et la mémoire spatiale, en calculant le temps de latence nécessaire afin de trouver la boîte d'évacuation. Il se compose d'une plate-forme circulaire à 20 trous dont l'un est utilisé comme abri. Quatre types différents d'indices visuels sont maintenus constants durant l'expérience.

Un son aigüe est lancée au début de chaque essai afin de motiver les souris à entrer dans la boîte d'évacuation. Entre les souris, le labyrinthe est nettoyé avec de l'eau, et tourné à 40° dans le sens des aiguilles d'une montre pour effacer tout indice olfactif.



Figure 11 : Photographie originale du dispositif de *Barnes maze*.

II.2.3.1.2. La piscine de Morris (MWM)

- **Description du dispositif et du protocole suivi**

Le test de Morris permet d'examiner l'apprentissage et la mémoire spatiale des souris. Une piscine est remplie d'eau à $22 \pm 1^\circ\text{C}$ avec 15 cm de profondeur et rendue opaque par l'addition d'un faible volume de lait. Le protocole adapté consiste en 4 jours d'entraînement durant lesquels les souris subissent 4 essais identiques et successifs à intervalle de 5 minutes. La durée de nage maximale a été fixée à 180 secondes. Lorsque la souris échoue dans l'identification de la plateforme elle est guidée vers la cible et maintenue en place durant 20 secondes. Le test de la mémoire de référence spatiale est réalisé dans les mêmes conditions expérimentales avec suppression de la plateforme d'appui.

Il est réalisé 24 heures après la dernière séance d'entraînement.

Ainsi ces tests permettent de mesurer la distance de natation, mais aussi le temps de latence nécessaire pour identifier la plate-forme. Ces deux outils de mesure permettent d'évaluer les paramètres voulus.



Figure 12 : Photographie originale du dispositif du test de *Morris Water Maze*.

II.2.3.2. Test de dépression

II.2.3.1. La nage forcée (FST)

- **Description du dispositif et du protocole suivi**

La nage forcée FST, également connue sous le nom de test de désespoir comportemental, est utilisée pour l'évaluation de la dépression et du désespoir chez la souris. Pour ce faire, la souris est placée dans un réservoir contenant de l'eau à une hauteur équivalente à la mi-hauteur du dispositif et à une température de 22 °C. Le temps d'immobilité est examiné pendant 5 min. Selon Borsini et Meli, une souris est considérée comme immobile quand les mouvements réalisés servent uniquement au maintien de la tête hors de l'eau.



Figure 13: photographie originale du dispositif de FST.

II.2.3.2. Test d'activité locomotrice et du déséquilibre moteur

- **Description du dispositif et du protocole suivi**

Un simple test de comportement, il est utilisé pour détecter un déséquilibre moteur. Les souris sont placées au sommet d'un pôle vertical (50cm de longueur et 1cm de diamètre) où elles saisissent le pôle avec quatre pattes et la tête pointée vers le haut. Afin de motiver les animaux à descendre, de la sciure et nourriture sont placées en bas du poteau. Chaque souris effectue trois essais consécutifs (la durée maximale de chaque essai était de 80 s) avec un intervalle interessai de 30s. Ce test permet de mesurer l'habilité des souris à descendre tête en bas (rotation à 180°), sans glissement ou chutes brutales.



Figure 14 : Photographie originale du dispositif du test de pole.

II.2.4. Sacrifice des animaux

Après 11 semaines d'exposition aux pesticides, les souris ont été euthanasier en utilisant du chloroforme puis disséqués dans le but de récupérer leur sang pour l'évaluation des paramètres biochimiques et leurs organes pour la réalisation des études macroscopiques et microscopiques.

Dissection cervicale : afin de récupérer les différents organes et d'effectuer les études macroscopique et microscopique.

II.2.4.1 Etude macroscopique

Observation des organes à l'œil nu et au microscope Optique

II.2.4.1 Etude microscopique (histologique)

Après le sacrifice des souris et le prélèvement des organes on a procédé à l'anapath (anatomopathologie) afin d'étudier de probables lésions microscopiques des tissus prélevés de divers organes de souris à savoir le cerveau, le foie, les reins, les testicules qui consistent en plusieurs étapes dont on distingue :

La fixation : Retiens la composition chimique des tissus, durcis les cellules ou les tissus pour la coupe et retarde la dégradation. Elle consiste à maitre les différents organes prélevés dans du formol à 10%.

La déshydratation: Dans cette étape, les différents tissus sont déshydratés dans des concentrations croissantes de l'éthanol, nettoyé dans le xylène puis incorporé dans la paraffine. Le but est d'éliminer l'eau des tissus sélectionnés pour les solidifier et faciliter le découpage de fines lames de diapositives.

L'enrobage: le processus d'enrobage est fait en utilisant de la paraffine pour faciliter l'extraction de structures cellulaires.

Le sectionnement: En histologie sectionnement se réfère à la préparation à l'aide d'un microtome de fines tranches «rubans» d'un tissu après fixation dans le but de le monter sur une lame de microscope pour l'observation.

La coloration: La coloration avec hématoxyline et l'éosine est utilisée pour mettre en évidence les caractéristiques importantes du tissu ainsi que pour améliorer le contraste des tissus.

L'observation microscopique

Une fois l'histologie terminée, les lames sont observées à l'aide d'un microscope optique de type Leica DM1000LED muni d'une caméra Leica MC170HD. Les images obtenues par cette caméra sont transférées sur l'écran d'ordinateur à l'aide du logiciel LeicaApplication EZ (LASEZ).

II.2.5. Analyses numériques

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

II.2.6. Analyses statistiques

Les données obtenues sont analysées en utilisant le logiciel Graphpad Prism 7. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes \pm S.E.M (erreur-type de moyenne). L'étude statistique est réalisée en utilisant le modèle d'analyse des variances one-way ANOVA pour comparer entre les différents groupes, puis dans la mesure du possible, des tests supplémentaires pour comparer entre un groupe traité et le groupe témoin sont réalisés en utilisant le test de Mann-Whitney. La signification statistique a été conventionnellement fixée à $p < 0,05$.

L'indice d'anxiété a été calculé en utilisant la formule suivante :

Elevated plus maze et elevated zero maze:

Indice d'anxiété = $1 - \left(\frac{[\text{temps passé dans les bras ouvert} / \text{temps total}] + [\text{nombre d'entrée dans le bras ouvert} / \text{nombre total d'entrée}]}{2} \right)$

Dark/light box :

Indice d'anxiété = $1 - \left(\frac{[\text{temps passé dans le compartiment lumineux} / \text{temps total}] + [\text{nombre d'entrée dans le compartiment lumineux} / \text{nombre total d'entrée}]}{2} \right)$

CHAPITRE III

RESULTATS

ET

DISCUSSIONS

III.1. Effet du Glyphosate et du Mélange sur le poids corporel

Les mesures du poids corporel ont été effectuées au cours de séances d'injections à l'intra-péritonéale du glyphosate à une dose de 1/8, 1/10, 1/12 de la DL50 ou du mélange (Glyphosate et Chlorperifos) ou du NaCl 0.9%, pendant 77 jours.

Les souris femelles exposées à 1/8, 1/10/ de la DL50 du Glyphosate ou au mélange évoluent presque de la même façon que les témoins avec une 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. La même évolution est observée chez les souris males excepté le groupe exposé à 1/12 de la DL50 du Glyphosate qui quant à lui présentait une perte progressive du poids.

Les figures représentant l'évolution du poids corporel des souris sont dans l'**annexe N° 3**

III.2.Effets du Glyphosate et du Mélange sur le comportement

III.2.1.Effet du Glyphosate et du Mélange sur l'anxiété

III.2.1.1.Test d'Open field

Les résultats obtenus au cours du test Champ Ouvert montrent que pour les males exposés aux différentes doses de Glyphosate, seul les souris ayant reçu une dose de 1/12 de la DL50 montrent une diminution significative ($p=0.0341$) de la distance parcourue (5m Vs 8m) (Figure A). Contrairement à ce groupe, les souris ayant reçu des doses de 1/8 de DL50 ou le mélange de pesticide, semble parcourir des distances plus importante par rapport au lot de souris contrôle (11m Vs 8m) et (12Vs 8) respectivement (**Figure A**). Toutefois, ces différences restent non significatives. De façon intéressante, les différences observées en terme de distances parcourues, ne se retrouve pas lorsqu'on analyse le temps passé au centre du dispositif. En effet, pour ce paramètre aucune différence significative n'est enregistrée entre les souris ayant reçu des pesticides et les souris contrôles. Les Tracks Plots montrant l'activité des souris males sont représentés dans l'**annexe N°4**. Contrairement aux males, l'ensemble des lots femelles montrent des distances moins importantes que le lot contrôle, néanmoins, ces différences de distances parcourues restent minimales et non significatives. Que cela soit pour la distance parcourue ou pour le temps passé au centre, les souris femelles ayant reçu des injections de mélange de pesticide montre un profil identique à celui du lot contrôle. Ceci contrairement au souris ayant reçu uniquement des injections de Glyphosate où on enregistre un temps passé au centre supérieur chez le lot 1/12, mais cette différence avec le

contrôle reste non significative. Les Tracks Plots montrant l'activité des souris femelles sont représentés dans l'annexe N°5.

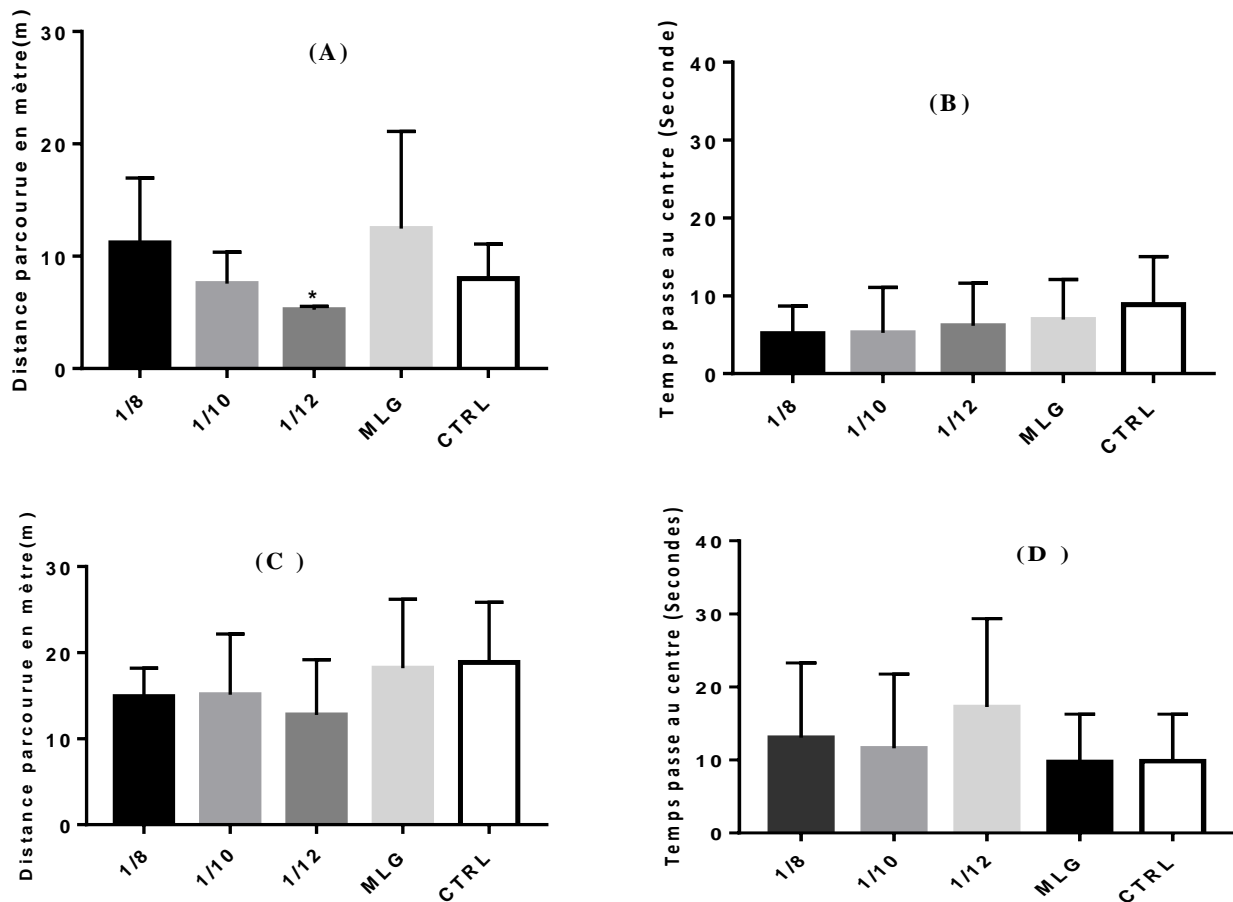


Figure15 : Evaluation de l'anxiété par le test d'open field.

A : Temps passé en seconde des souris males au centre. **B** : Nombre d'entrées des souris males au centre. **C** : Temps passé en seconde des souris femelles au centre **D** : Nombre d'entrées des souris femelles au centre. * : p-value<0.05. Utilisation du test statistique Mann-Whitney. Les souris reçoivent différentes injections chaque 72heures par voie intrapéritonéale. Les lots 1/8^{ème}, 1/10^{ème} et 1/12^{ème} traités avec le GLY reçoivent respectivement 1/8, 1/10 et 1/12 de la DL50 par poids corporel. Le témoin correspond à l'injection par IP d'eau physiologique (NaCL à 0.9%). Le mélange est constitué de chlorpyrifos et de glyphosate à une concentration équivalente à 1/8 de la DL50 par poids corporel. Chaque lot contient 04 souris.

III.2.1.2. Le test Elevated plus maze (EPM)

Les résultats révèlent que tous les lots de souris Males exposés aux pesticides passent moins de temps dans le BO accompagné d'un nombre d'entré plus élevé dans ce compartiment comparant au lot de souris contrôle (**Figure A et B**).

Concernant les femelles, seule les groupes exposés à une dose de 1/12 ou au mélange de pesticide passent moins de temps et effectuent moins d'entrés dans les BO comparant au

groupe contrôle. Toutefois, cette différence est statistiquement non significative. Les groupes 1/8 et 1/10 semblent indifférent des témoins en ce qui concerne le temps passé dans le BO mais présente un Nb d'entré assez important par rapport au control (n=14 vs n=9 et n=12 vs n=9 pour 1/8 et 1/10 respectivement), cette différence est statistiquement non significatif (**Figure C et D**).

L'indice d'anxiété correspondant au rapport temps passé dans le bras ouvert par rapport au nombre d'entré dans ce bras, révèle que l'ensemble des lots de souris mâles et femelles traitées au pesticides ont un indice supérieur à celui des souris du lot contrôle. Cette augmentation de l'indice semble être dose indépendante (**Annexe N° 6**).

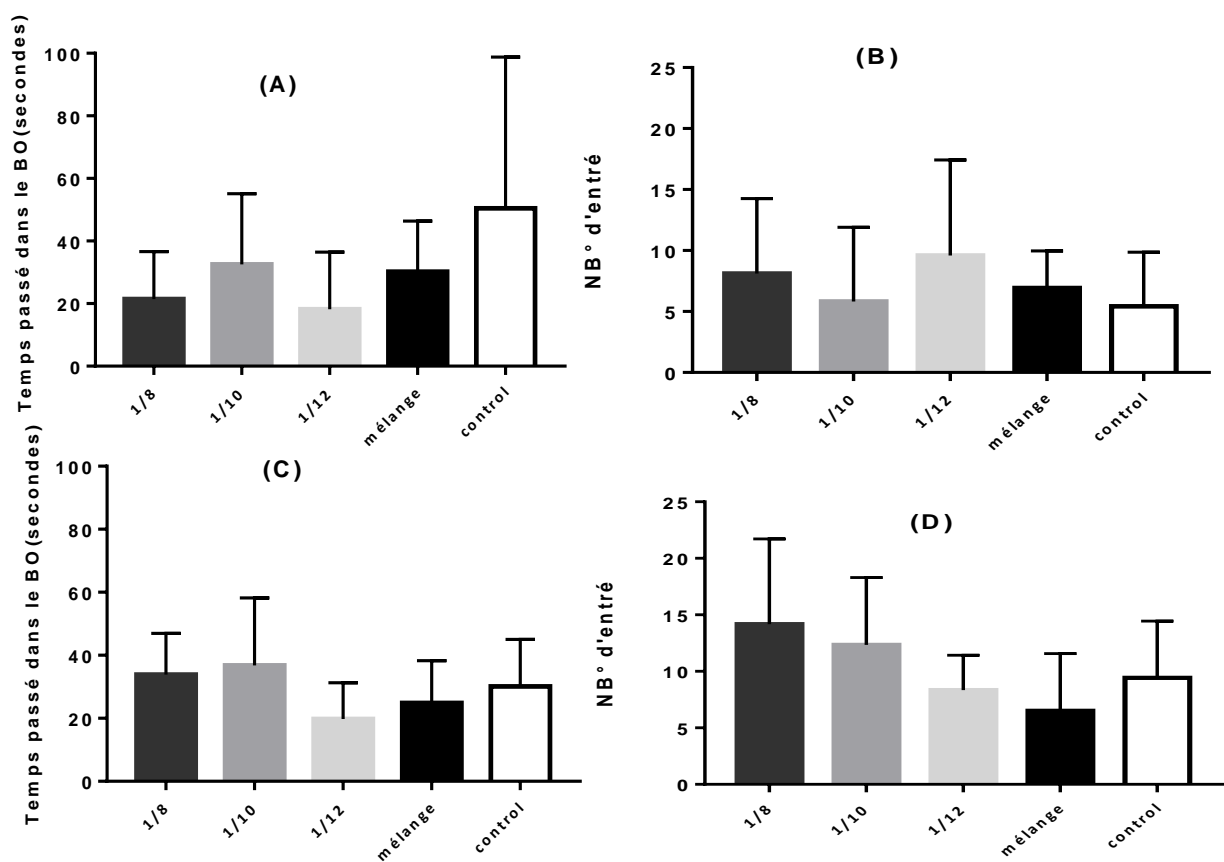


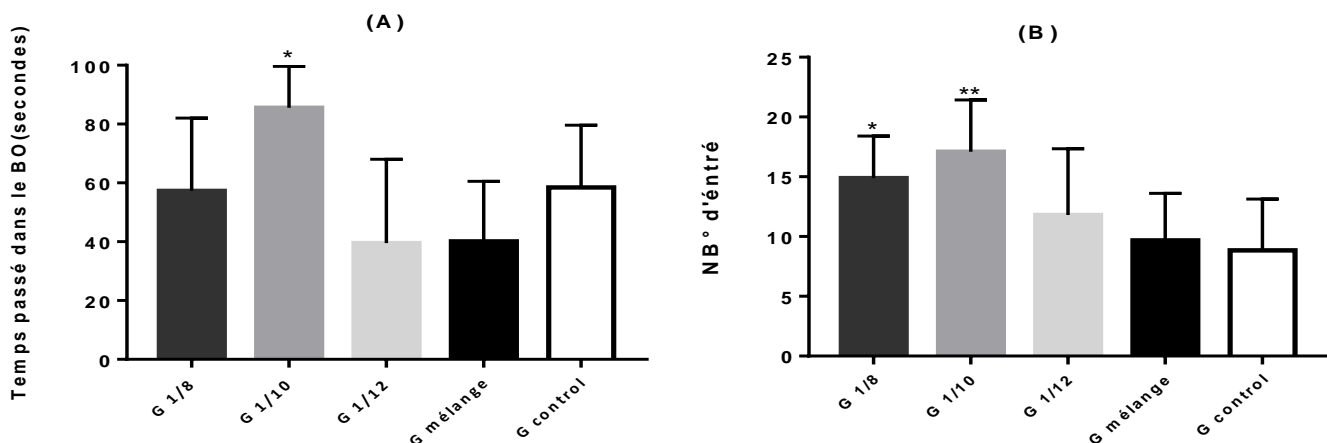
Figure 16 : Evaluation de l'anxiété par le test EPM

A: Temps passé en seconde des souris mâles dans le BO. **B :** Nombre d'entrées des souris mâles dans le BO. **C :** Temps passé en seconde des souris femelles dans le BO. **D :** Nombre d'entrées des souris femelles dans le BO. Utilisation du test statistique Mann-Whitney. Les souris reçoivent différentes injections chaque 72heures par voie intrapéritonéale. Les lots 1/8^{ème}, 1/10^{ème} et 1/12^{ème} traités avec le GLY reçoivent respectivement 1/8, 1/10 et 1/12 de la DL50 par poids corporel. Le témoin correspond à l'injection par IP d'eau physiologique (NaCl à 0.9%). Le mélange est constitué de Chlorpyrifos et de Glyphosate à une concentration équivalente à 1/8 de la DL50 par poids corporel. Chaque lot contient 04 souris.

III.2.1.3. Test elevated Zero maze (EZM)

Dans ce test, on remarque que pour les mâles, les lots 1/8, 1/12 et le mélange passent moins de temps dans le bras ouvert par rapport au contrôle et cela contrairement au lot de souris exposé à une dose de 1/10 de la DL50 de Glyphosate qui quant à eux passent un temps statistiquement plus important (85s Vs 58s) ($p=0.0186$) dans le bras ouvert. On remarque aussi que ce groupe de 1/10, présente un nombre d'entrée dans le bras ouvert, statistiquement supérieur au contrôle (17 entrées Vs 8 entrées) ($p=0.0044$), tout comme c'est le cas pour le lot 1/8 (**Figure A et B**). L'indice d'anxiété correspondant au rapport temps passé dans le bras ouvert par rapport au nombre d'entrée dans ce bras, révèle que l'ensemble des lots de souris mâles traitées aux pesticides ont un indice supérieur à celui des souris du lot contrôle excepté le groupe 1/10. (**Annexe N°7**).

Pour les femelles, que ce soit pour le temps passé ou le nombre d'entrées dans le BO, aucune différence n'a été marquée entre les lots traités ou non aux pesticides, excepté le groupe 1/8 qui quant à lui présente un nombre d'entrée supérieur par rapport au contrôle ($N=14$ vs $N=10$) mais qui reste statistiquement non significatif. (**Figure C et D**); tout de même, l'indice d'anxiété semble être stable et inchangé (**Annexe N 8**).



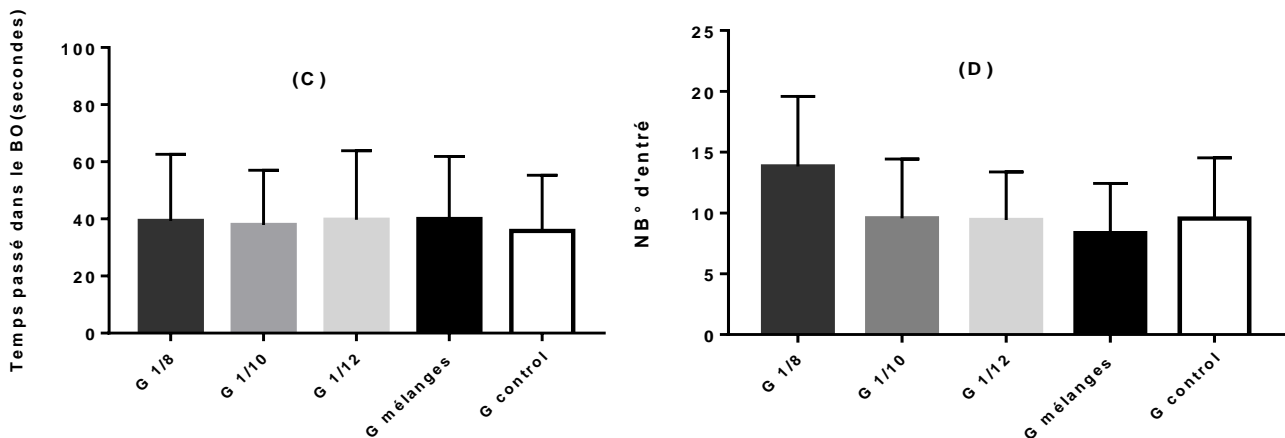


Figure 17: Evaluation de l'anxiété par le test EZM

A: Temps passé en seconde des souris males dans le BO. **B :** Nombre d'entrées des souris males dans le BO. **C :** Temps passé en seconde des souris femelles dans le BO. **D :** Nombre d'entrées des souris femelles dans le BO. * : p-value<0.05. ** : p-value<0.005. Utilisation du test statistique Mann-Whitney. Les souris reçoivent différentes injections chaque 72heures par voie intrapéritonéale. Les lots 1/8^{ème}, 1/10^{ème} et 1/12^{ème} traités avec le GLY reçoivent respectivement 1/8, 1/10 et 1/12 de la DL50 par poids corporel. Le témoin correspond à l'injection par IP d'eau physiologique (NaCL à 0.9%). Le mélange est constitué de chlorpyrifos et de glyphosate à une concentration équivalente à 1/8 de la DL50 par poids corporel. Chaque lot contient 04 souris.

III.2.1.4. Test de Dark-light box

Les résultats montrent que les groupes males traités avec glyphosate seul, passent plus de temps dans le compartiment lumineux avec un nombre d'entrée moindre par rapport au mélange et au control (**figure A et B**). Selon l'étude statistique, le groupe 1/10 enregistre une significativité avec une p-value de 0.0253.

Comparant au contrôle, les femelles 1/10 et 1/12 passent moins de temps dans le compartiment lumineux (53s vs 110s et 79s vs 110s respectivement) et présentent un nombre d'entrée réduit (n=7 vs n=9 et n=6 vs n=9 respectivement) (**figure C et D**). Cependant, ces différences sont statistiquement significatives avec une P-value=0.0079 pour 1/10 vs contrôle et une P-value=0.0046 pour 1/12 vs contrôle.

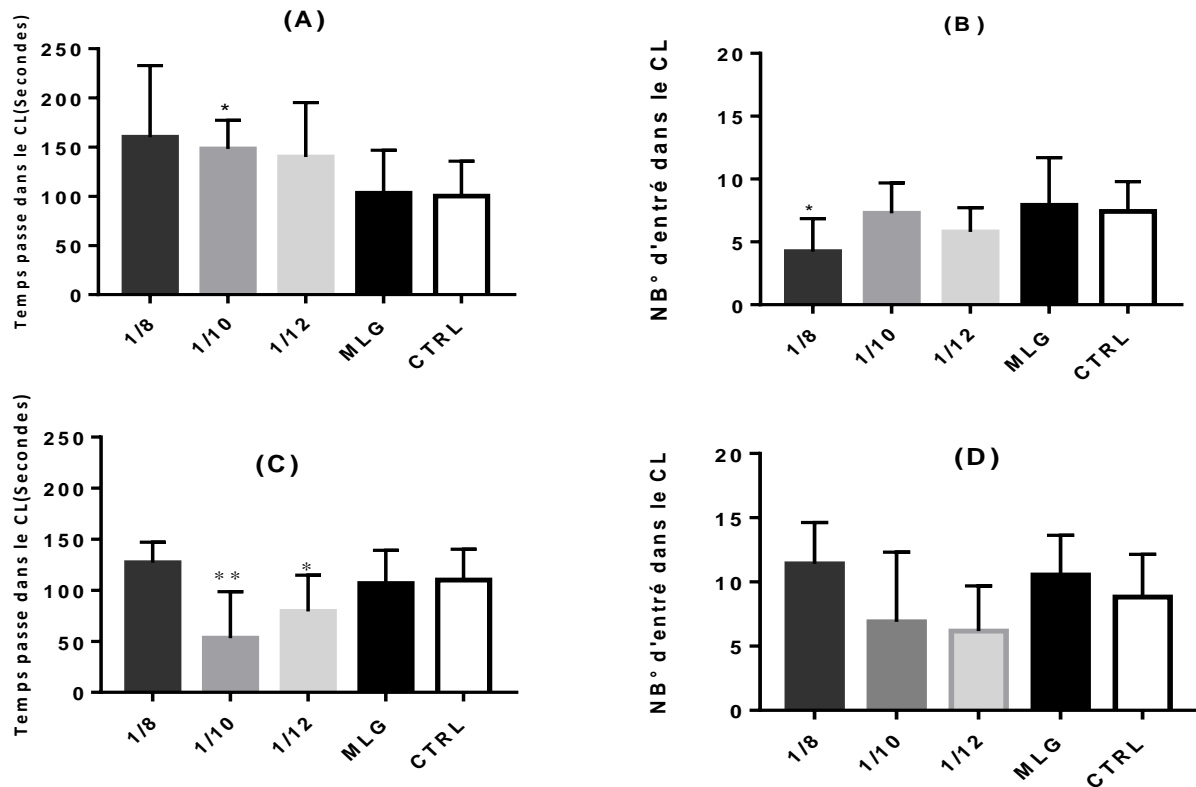


Figure 18 : évaluation de l'anxiété par le test Dark/light

A : Temps passé en seconde des souris mâles dans le CL. **B** : Nombre d'entrées des souris mâles dans le CL. **C** : Temps passé en seconde des souris femelles dans le CL. **D** : Nombre d'entrées des souris femelles dans le CL. * : p-value < 0.05. Utilisation du test statistique Mann-Whitney. Les souris reçoivent différentes injections chaque 72 heures par voie intrapéritonéale. Les lots 1/8^{ème}, 1/10^{ème} et 1/12^{ème} traités avec le GLY reçoivent respectivement 1/8, 1/10 et 1/12 de la DL50 par poids corporel. Le témoin correspond à l'injection par IP d'eau physiologique (NaCl à 0.9%). Le mélange est constitué de chlorpyrifos et de glyphosate à une concentration équivalente à 1/8 de la DL50 par poids corporel. Chaque lot contient 04 souris.

III.2.2. effet du glyphosate sur l'activité locomotrice

Durant le test de Pol utilisé pour détecter tout déséquilibre moteur, les souris mâles et femelles exposées à 1/8 de la dl50 du GLY ou au mélange descendent le long du dispositif tête vers le bas et correctement alignées, ce même comportement est observé chez les groupes témoins pour les deux sexes. De manière intéressante, les souris exposées à 1/10 ou 1/12 de la dl50 du GLY glissaient le long du poteau, exprimaient une difficulté d'accrochage, et présentaient des cas de chute brutale ; de telles situations ne sont pas signalés chez les groupes femelles ayant reçu la même dose de Glyphosate.

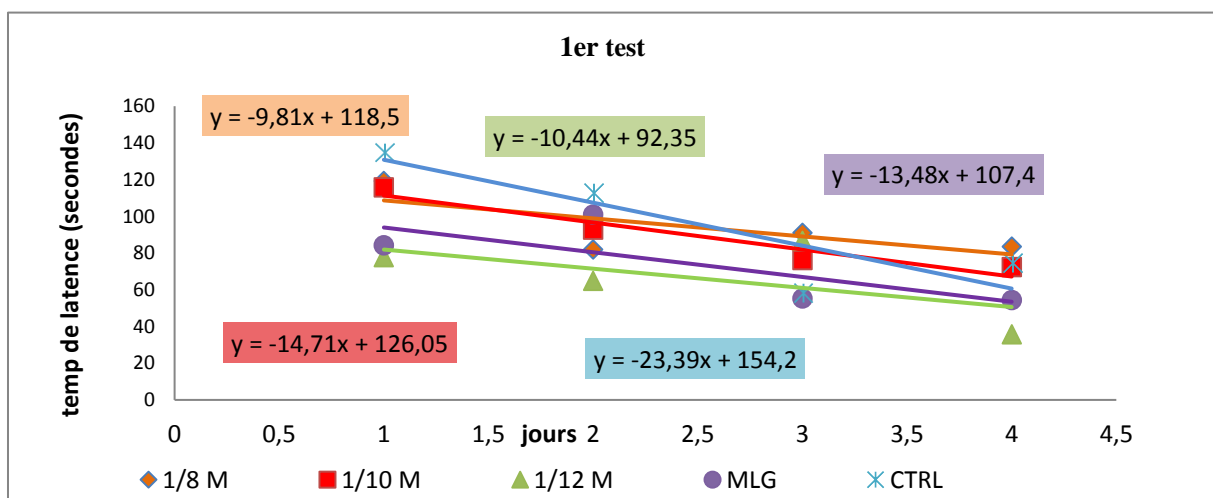
Tableau : résultats des souris au cours du test de POL.

Comportement		Lots de souris mâles		Lots de souris femelles	
moteur	Sexe				
Descente alignée et correcte	et	1/8 – contrôle	mélange	1/8- mélange-	1/10- contrôle
Descente altérée (glissement et/ou chute)		1/10 – 1/12			

III.2.3.Effet du Glyphosate et du Mélange sur la mémoire et l'apprentissage

III.2.3.2 Test de Morris water maze (MWM)

Le test de Morris permet d'évaluer l'apprentissage et la mémoire des souris via le temps de latence nécessaire pour identifier la plateforme. Chez les souris mâles, les souris ayant reçu de l'eau physiologique (souris contrôle), ont une amélioration du temps de latence deux fois plus importantes que l'ensemble des lots traités aux pesticides. Concernant le paramètre de la mémoire, les souris ayant reçu des doses de 1/10 et 1/12 de la DL50, leur temps de latence lors du 1er jour du 2eme test est presque identique à celui du 4eme jour du 1er test. Toutefois, seule les souris ayant reçu une dose de 1/12 de la DL50 de Glyphosate marquent un temps de latence qui diminue lors du 2eme test (**Figure 19**).



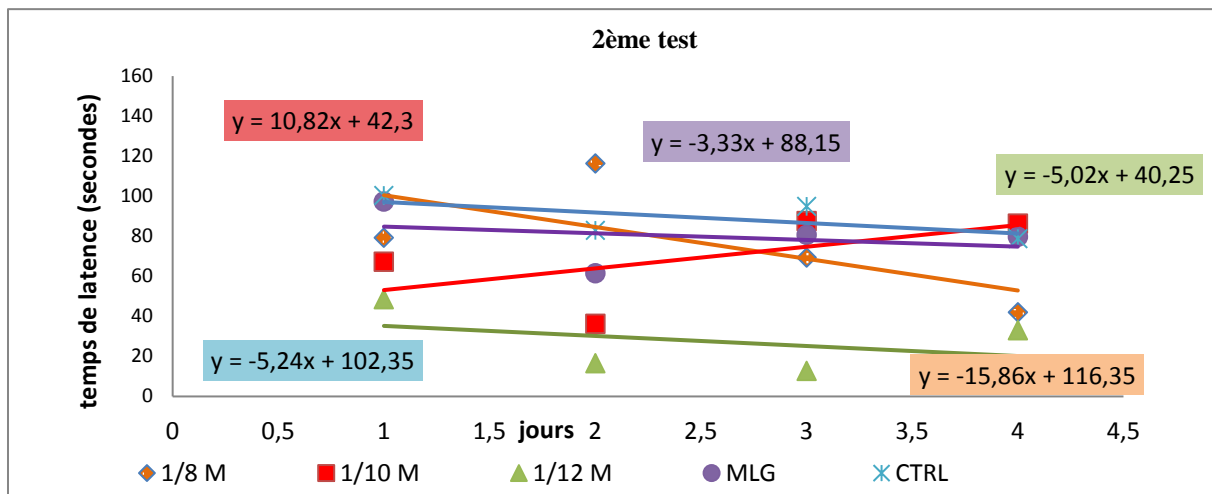


Figure 19 : représentation graphique de la capacité d'apprentissage des souris Males en utilisant la piscine de Morris.

Contrairement aux mâles, lors du premier test on remarque que les souris contrôle ont un temps de latence stable durant les 4 jours du test. De façon intéressante les souris ayant reçu des doses de pesticides seul ou en mélange, montrent des temps de latence qui diminuent en fonction des jours des tests, comme l'indique les courbes de tendances. Toutefois, les différents lots de souris ne montrent pas la même évolution du temps de la tenue, car les souris ayant reçu les doses de mélange ont une diminution du temps de la tenue plus importante par rapport aux autres (130s à 50s pour le mélange vs 110s à 50s, 80 à 50, 90 à 60 pour 1/8, 1/10, 1/12 respectivement). La 2ème série de tests de Morris, permet d'évaluer l'apprentissage et la mémoire. C'est pour cette raison, il est réalisé 21 jours après le premier test. Les souris ayant reçu des doses de 1/8 et 1/12 de la DL50 et des doses de mélange, ont un temps de latence équivalent à celui enregistré durant le 4^{ème} jour du 1er test. Contrairement à ces groupes, les souris, ayant reçu des doses de 1/10 de la DL50 ; le temps de latence du premier jour du second test est supérieur à celui du 4ème jour du 1er test, il est même identique à celui du 1er jour d'apprentissage du 1er test (**Figure 20**).

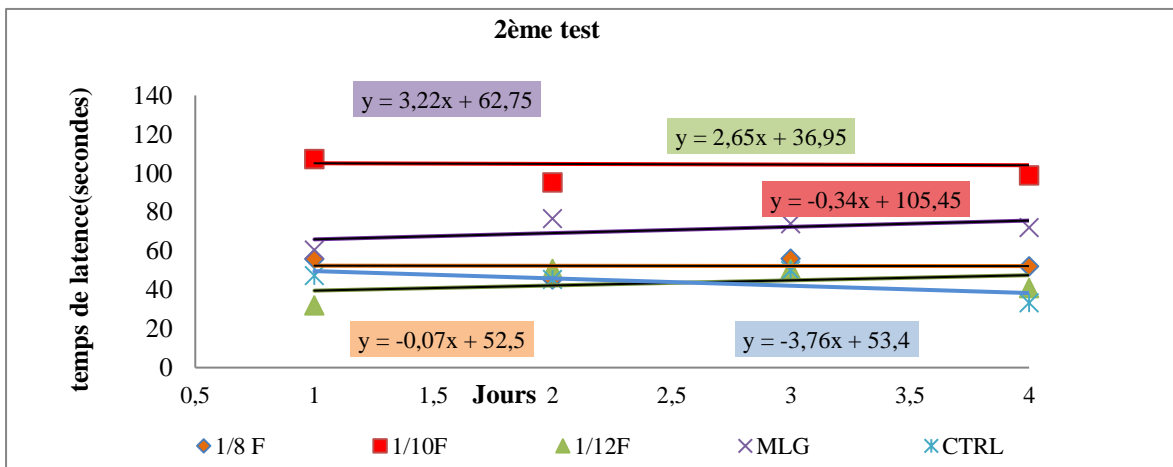
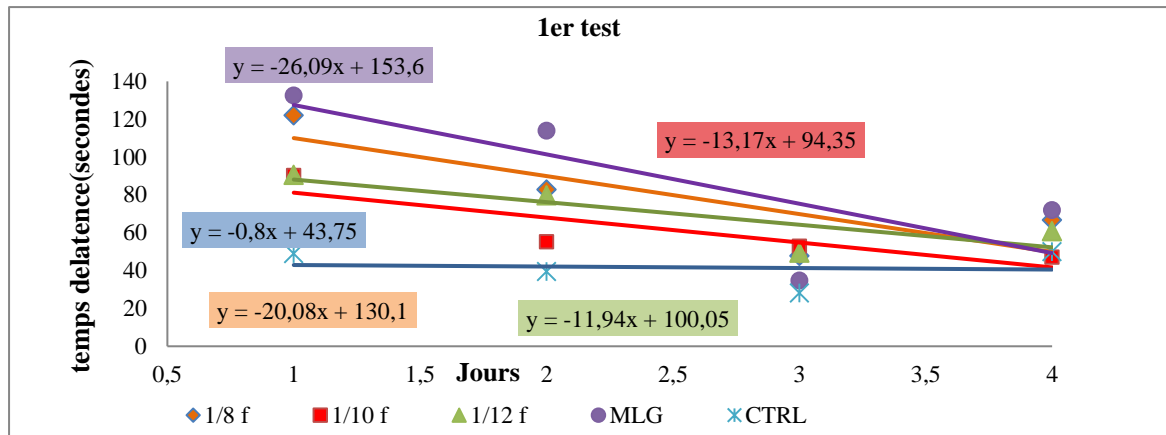


Figure 20 : représentation graphique de la mémoire et de l'apprentissage des souris Femelles par le test de Morris.

III.2.3.1. Test de Barnes Maze

Au cours du test de Barnes, concernant les mâles, les souris contrôle ont un temps de latence stable durant les 4 jours du test. De façon intéressante les souris ayant reçus des doses de 1/8 ou 1/10 de la DL 50 du Glyphosate, montrent des temps de latence qui diminuent en fonction des jours des tests, comme l'indique les courbes de tendances. Contrairement aux femelles, seul le groupe exposé à 1/8 de la DL50 du Glyphosate montre une évolution dans le temps de latence assez importante comparant au contrôle.

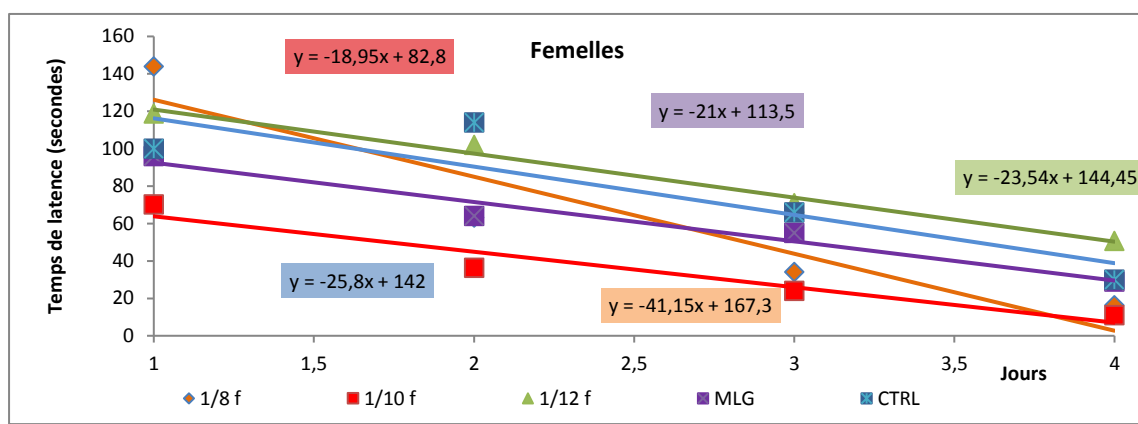
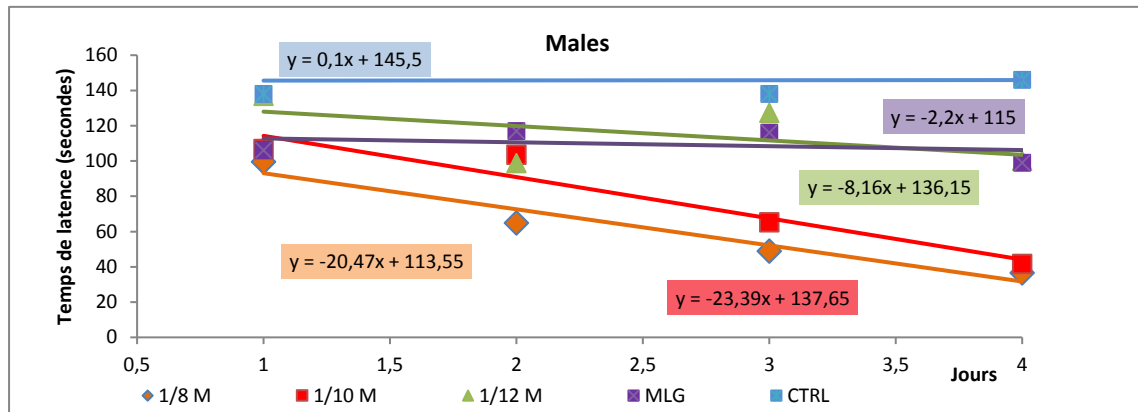


Figure 21: représentation graphique de la capacité d'apprentissage des souris mâles et femelles en utilisant le test de Barnes maze.

III.2.4.Effet du Gly et du Mélange sur la dépression

III.2.4.1.Test de la nage forcé

La figure (A) montre qu'au cours des trois tests de nage forcé, les mâles deviennent de plus en plus immobiles. Allant d'un % d'immobilité compris entre 2% et 20% au cours du premier test, les groupes se retrouvent à des % de plus en plus supérieurs comparant au contrôle au cours du 2^{ème} et du 3^{ème} test où : le groupe mélange et le groupe 1/10 évoluent presque de la même façon et marquent un seuil de 20% qui est de 20 fois supérieur au contrôle. Le groupe 1/8 et 1/12 passent en moyenne 60% de leurs temps immobile sans combat et sans lutte dans l'eau. Selon l'étude statistique, une différence significative a été enregistrée durant le 3^{ème} test avec une P-value=0.001.

La figure (B) représente le comportement des souris femelles. Au cours des trois tests effectués, les femelles deviennent de moins en moins immobiles selon le pourcentage du temps d'immobilité qui diminue remarquablement au fil des expériences. Toutefois, cette observation ne s'applique pas au groupe contrôle, car ce dernier présente un taux d'immobilité stable et inchangé durant l'ensemble des tests.

Allant de 80% à 100% du temps immobile au cours du 1^{er} test (13^{ème} injection), les groupes 1/12, 1/8 et mélange se retrouvent à 42%, 24%, 9% d'immobilité respectivement au cours du 3^{ème} test (25^{ème} injection). L'étude statistique révèle une significativité au cours du 3^{ème} test avec une $p\text{-value}=0.0089$.

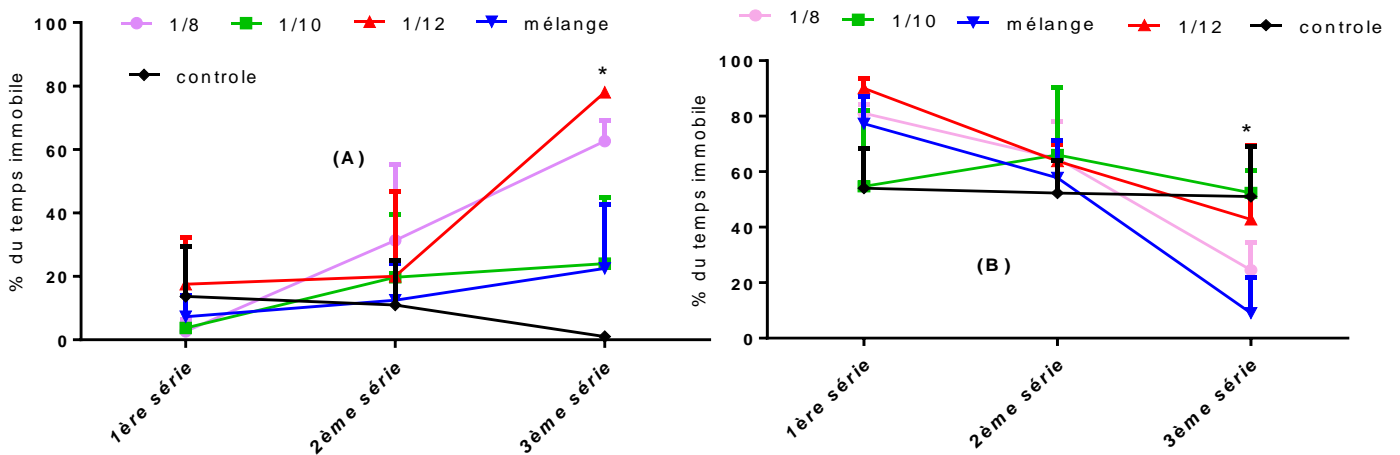


Figure 22: évaluation de la dépression par le test de la Nage Forcé

A: Pourcentage(%) du temps d'immobilité des souris mâles. **B :** Pourcentage(%) du temps d'immobilité des souris femelles. * : $p\text{-value}<0.05$. Utilisation du test statistique Mann-Whitney. Les souris reçoivent différentes injections chaque 72 heures par voie intrapéritonéale. Les lots 1/8^{ème}, 1/10^{ème} et 1/12^{ème} traités avec le GLY reçoivent respectivement 1/8, 1/10 et 1/12 de la DL50 par poids corporel. Le témoin correspond à l'injection par IP d'eau physiologique (NaCl à 0.9%). Le mélange est constitué de chlorpyrifos et de glyphosate à une concentration équivalente à 1/8 de la DL50 par poids corporel. Chaque lot contient 04 souris.

III.3 Etudes histologiques

III.3.1 Résultats Macroscopiques

L'étude macroscopique des cerveaux de souris témoins, montre une forme de cerveau vascularisé avec une conservation totale de l'anatomie cérébrale, présence des scissures et un cervelet de taille normal. Les cerveaux des souris traitées aux pesticides quant à eux, présentent une réduction du réseau vasculaire, ceci s'observe au niveau des deux lobes ou bien au niveau d'une région particulière, de plus on remarque une augmentation de la taille du cervelet, un effacement des invaginations caractéristiques des cerveaux et présence de zones de couleur blanchâtre.

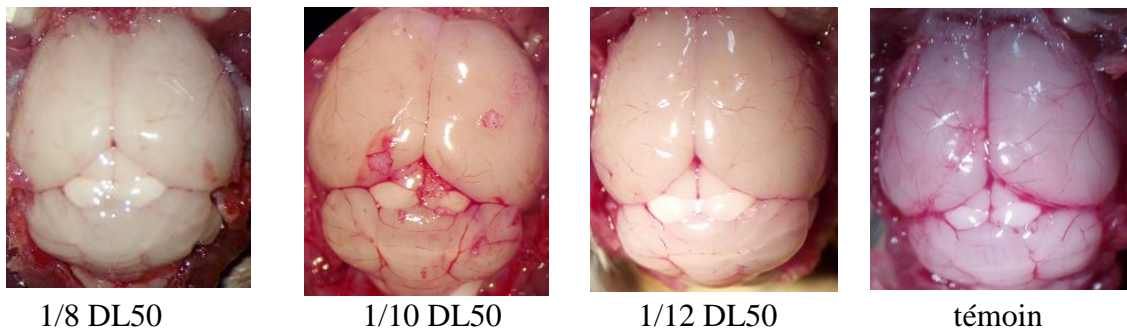


Figure 23: Photographie des souris traitées et non traitées aux pesticides.

III.3.2 Résultats Microscopiques

Les résultats microscopiques montrent que les différentes régions du cerveau observées chez les témoins ont un aspect : Dense avec peu de perte cellulaire et une architecture tissulaire homogène d'aspect normale. Contrairement aux différentes coupes réalisées chez les sujets sains, l'analyse histologique de différentes régions du cerveau des souris injectées aux pesticides tendent à démontrer une désorganisation de l'architecture tissulaire (B, D, F) avec des cellules apoptotiques (comme en témoigne la perte des contours cytoplasmiques ↗), mais aussi des foyers microkystiques. De façon intéressante, nous observons aussi la présence d'anomalies de divisions cellulaire (↘) ainsi que des zones d'infiltrat immunitaires. Ces résultats semblent être en accord avec les différentes manifestations neurologiques observées chez nos différents lots de souris.

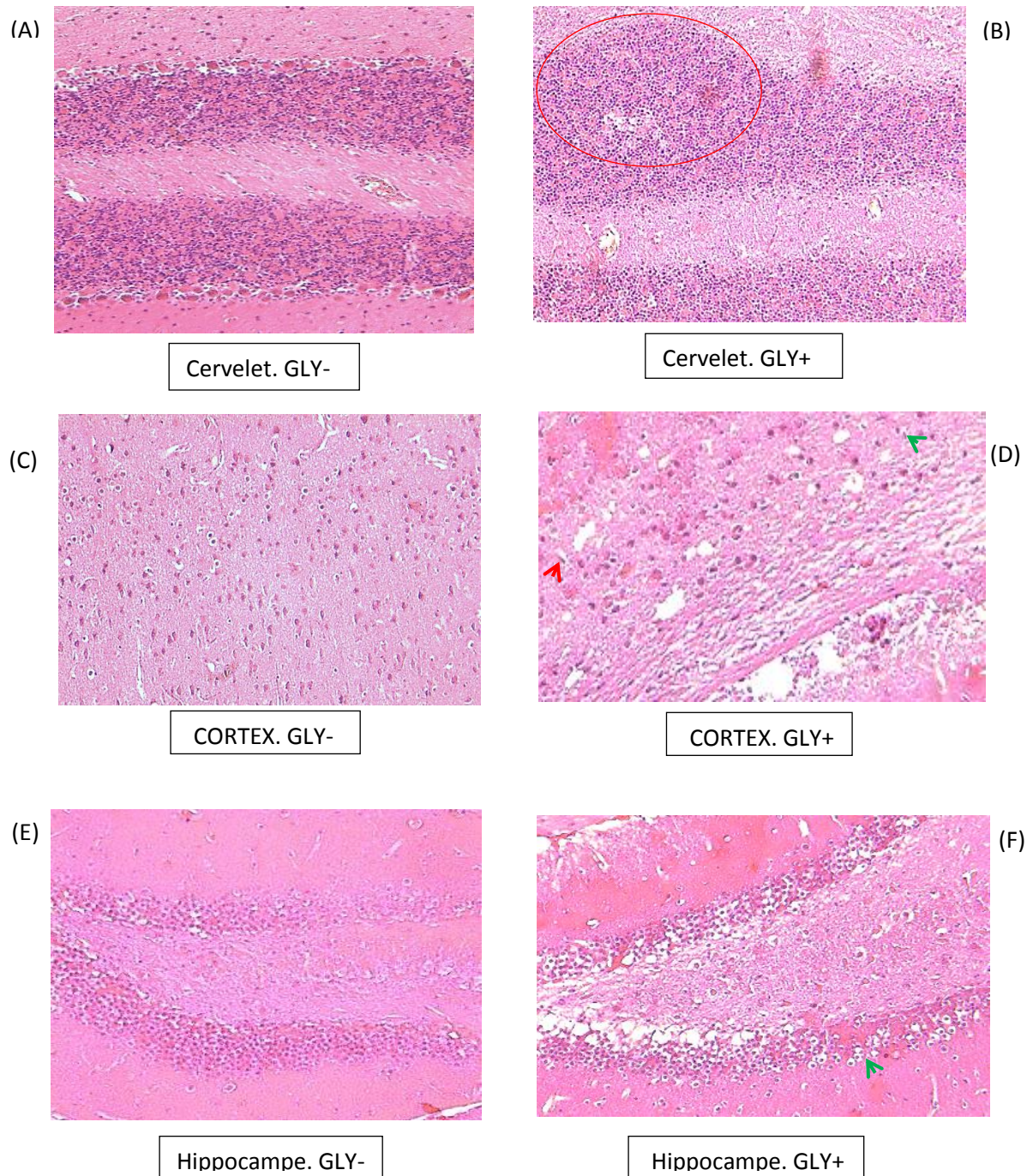


Figure 24: Observation au microscope optique des coupes histologiques du cerveau au niveau du cervelet, cortex et hippocampe des souris témoin GLY- et traité GLY+. (Coloration a H&E, Gr x10).

Les lames sont observées à l'aide d'un microscope optique de type Leica DM1000LED muni d'une caméra Leica MC170HD. Les images obtenues par cette caméra sont transférées sur l'écran d'ordinateur à l'aide du logiciel LeicaApplication EZ (LASEZ).

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. Celles-ci tiennent compte de nombreux paramètres, comme le stade de vie (prénatale/postnatale, enfants, adulte), le sexe, la dose et la voie d'administration, la durée d'exposition, les effets de la matière active et de ses métabolites.

Dans la présente étude, nous démontrons que l'exposition chronique aux pesticides (GLY et CPF ou GLY seul) chez les souris, par injection de doses Sub-chroniques par voie intraperitoneale ; semble provoquer des altérations neurocomportementales de manière doses et sexe dépendante, en impliquant un désordre de la locomotion, de l'anxiété, de la dépression et des changements des comportements mémoriels.

III.3.1.Effet sur le comportement anxieux

Pour les Males :

Les différents tests réalisés nous permettent de suggérer que les groupes exposés aux 1/8, 1/12, de la DL50 du GLY et même du mélange indiquent un état anxieux puisqu'ils passaient moins de temps dans les champs ouverts et lumineux et effectuaient moins d'entrées dans ces compartiments. En plus de ce caractère anxieux, le test d'Of nous laisse suggérer que les sujets males exposés à 1/8 de la DL50 du GLY et au mélange de pesticides, sont hyperactifs et cela contrairement aux sujets ayant reçu une dose équivalente à 1/12 de DL50 qui quant à eux présentent une hypoactivité. Cette hypoactivité -aussi observée pour les souris males ayant reçu la dose de 1/10 de la DL50- semble être liée non pas à un dérèglement psychique, mais plutôt à un déficit locomoteur comme le montre les résultats du test de Pol. De façon intéressante, même si on enregistre un déficit locomoteur pour les sujets exposés à 1/12 et 1/10 de la DL50, le comportement anxieux de ces deux groupes est différent. En effet, comme cité précédemment, les souris males soumises à 1/12 de la DL50 sont plus anxieuses, contrairement à celles ayant reçu une dose de 1/10 de la DL50 qui elles par contre, montrent une désinhibition, illustrée par la suppression de l'aversion naturelle à la lumière et une augmentation du potentiel explorateur.

Sur la base rationnelle de l'indice d'anxiété, il semble qu'une exposition à des doses équivalentes à 1/12 de la DL50 de Glyphostae induit un caractère anxieux chez les males. Ce caractère est plus prononcé chez ce groupe par rapport aux groupes exposés au mélange et à une dose de 1/8 de la DL50. Nos résultats sont conformes aux résultats de plusieurs études

précédemment effectuées. En effet, l'exposition répétée à des injections par voie intrapéritonéale de dose de 1/2.6- 1/1.3- 1/0.86 de la DL50 du Glyphosate induit une hypoactivité et une augmentation de l'anxiété. Les mêmes résultats ont été observés lors de l'exposition chronique au Glyphosate 1/0.52 et 1/0.26 de la DL 50 du glyphosate par voie orale (**Ait Bali et al, 2017**) ou par voie intranasale (1/2.6 de la DL 50 du glyphosate) (**Baier et al, 2017**). De même que pour nos données, **Chen et ses collaborateurs 2011** ont constatés que l'exposition répétée des rats au Chlorpyrifos induit un comportement de type anxiogène. Dans un autre cas, aucune altération locomotrice n'a été observée au cours du test d'OF lors d'une exposition orale des rats à 1/1000 de la DL50 durant 60 jours (**Cattani et al, 2017**). Toutefois et contrairement aux études précédemment citées, nous avons observé que pour la dose de 1/10 de la DL50, les sujets mâles ont une désinhibition ou en d'autres termes un comportement anxiolytique. Notre observation, n'est pas la première du genre, en effet pour des herbicides à base de Glyphosate (GBH), des études in vivo antérieures ont rapporté que l'exposition prénatale à 1/13 et à 1/0.65 de la DL50 du glyphosate produisait un effet anxiolytique chez le rat (**Gallegos et al, 2016**).

Pour les Femelles :

Contrairement aux souris mâles, seuls deux tests comportementaux démontrent un effet anxiogène des doses de Glyphosate. De façon intéressante, la dose de 1/10 provoquant un effet anxiolytique chez les mâles, semble induire l'effet opposé chez les femelles. Toutefois, il n'est pas possible de conclure que le Glyphosate se comporte différemment chez les mâles et les femelles, car la dose de 1/12 de la DL50 qui représente le plus grand effet anxiogène chez les mâles produit des effets identiques chez les femelles. De ce fait, nous supposons que les effets du Glyphosate sont doses et sexe dépendants. L'hypoactivité déduite chez les mâles a pour origine un déficit locomoteur.

Contrairement aux mâles où l'ensemble des tests ont permis d'observer des résultats homogènes, chez les femelles le test d'OF génère des résultats contradictoires par rapport aux tests. Ceci s'explique par le biais inhérent aux tests comportementaux. Toutefois, ce résultat ne remet pas en cause les conclusions précédentes, car seul ce test donne un résultat contradictoire pour un comportement précis à savoir l'anxiété.

III.3.2.Effet sur le comportement dépressif

Pour les Males :

Nos résultats montrent une augmentation du pourcentage du temps d'immobilité chez les males dans le test de la nage forcée, suggérant un comportement de type dépressif chez les souris males exposés au Gly ou au mélange de pesticide. Nos résultats sont en accord avec **Cattani *et al*, (2017)** qui montre que des rats adolescents exposés à 1/1000 de la DL 50 du Glyphosate par voie orale pendant 60 joursont présentés une augmentation du temps d'immobilité dans le test de nage forcée, suggérant l'induction d'un profil de type dépressif qui est associée à l'excitotoxicité du glutamate et/ou a des changements dans les marqueurs neurochimiques de la 5-HT. En effet, des recherches antérieures ayant étudié les effets de l'exposition chronique au Gly (1/0.86 et 1/0.26 de la DL 50 du glyphosate par gavage pendant 12semaine) chez les souris induit des changements comportementaux associés à la dépression (**Ait Bali *et al*, 2018**). L'induction d'un état dépressif ne semble pas être uniquement liée à l'administration du Glyphosate, mais elle semble être liée à l'ensemble de sa famille chimique. En effet ; des études montrent que d'autres pesticides organophosphoré comme l'ométhoate (pesticide organophosphoré) augmente le temps d'immobilité dans les tests comportementaux et induit des lésions neuronales, qui se manifestent par un comportement de type dépressif (**Qiao *et al*, 2017**). Dans une autre étude réalisée dans notre laboratoire sur l'exposition chronique au chlorpéryfos, nous avons observé le même résultat.

Pour les femelles :

Nos résultats montrent que contrairement aux males, les souris femelles traités à 1/8, 1/12 de la DL50 du Glyphosate ou au mélange,deviennent de moins en moins dépressives au cours de l'exposition aux pesticides. Le niveau élevé de dépression lors des primo expositions, est probablement dû à l'interaction directe des pesticides avec le système nerveux. Mais du fait que notre étude explore le caractère chronique de l'exposition, il est possible que le pesticide ait induit un changement hormonal. De façon intéressante, les données scientifiques actuelles confirment le rôle de perturbateur endocrinien joué par les pesticides notamment le Glyphosate, dérégulant ainsi la croissance le développement et le comportement physiologiquement normale (**Thaddeus *et al*, 2015**). Étant donné que le système nerveux interagit avec le système endocrinien, ces différences d'observation entre les mâleset les femelles peuvent être dues à une dérégulation indirecte du système nerveux via le système hormonale.

III.3.3.Effet du glyphosate sur la mémoire

Pour les Males :

L'administration du Glyphosate aux souris de notre étude semble induire une dégradation des capacités d'apprentissage. Toutefois, chez les souris traitées à 1/8 de la DL50, on remarque une amélioration des capacités d'apprentissage lors du second test. Contrairement aux capacités d'apprentissage, l'administration de doses de 1/10 et 1/12 de la DL50 semblent augmenter le pouvoir mémoriel des souris. Toutefois, seule les souris ayant reçu une dose de 1/12 de la DL50 de Glyphosate semblent maintenir cette mémoire et au cours du 2eme test Ce résultat peut sembler incongru par rapport aux connaissances générales sur les pesticides. Toutefois, notre constatation n'est rien d'autre qu'une confirmation d'observation réalisées par d'autres équipes que cela soit chez des modèles animaux ou chez l'humain. En effet, Fiedler et ses collaborateurs (2015) dans l'étude de l'effet neurocomportemental des organophosphorés chez des enfants vivant dans des fermes en Thaïlande dont ils ont révélés que ses derniers présentent une amélioration de la latence de la réponse aux tests neurocomportementaux.

Dans le test de Barnes maze, comparant au contrôle, tous les groupes traités excepté le mélange montre une amélioration de la capacité mémorielle et d'apprentissage mais qui est observé uniquement lors d'un seule test (mémoire à court terme). Les résultats sont comme pour certaines données de la littérature, dépendants du dispositif utilisé. Toutefois, l'analyse détaillée de cette étude, révèle aussi que selon le test utilisé des résultats différents peuvent être obtenus. Ceci est due aux stratégies de reconnaissance spatiale utilisées par les rongeurs dans un test par rapport à un autre (**Inoue et al, 2015**).

Pour les femelles :

Les souris ayant reçu des doses de 1/8 et 1/12 de de la DL50 et des doses de mélange, semble avoir maintenu une certaine mémoire. Contrairement à ces groupes, les souris, ayant reçu des doses de 1/10 de la DL50, n'ont montré aucun signe de mémorisation. De façon intéressante, aucun lot de souris ne montre une amélioration de l'apprentissage durant cette 2^{eme} série de tests.

Les résultats des tests effectués révélant les différents niveaux d'anxiété, motricité, dépression et mémoire peuvent être argumentés par des études plus approfondies. En effet, la revue de la littérature donne déjà certaines pistes moléculaires permettant d'expliquer ces résultats.

Concernant le caractère anxieux, l'influence de la 5-hydroxytryptamine (sérotonine), l'acide- γ -aminobutyrique (GABA), l'AD, le glutamate et l'acétylcholine, ainsi que ses récepteurs ont été documentés. Que ce soit une augmentation de l'activité GABA ou une diminution de la neurotransmission 5-HT, l'effet anxiolytique est déclenché. Par exemple on a observé que l'administration de GABA à des rats Wistar produit un effet anxiolytique. Il a également été rapporté que l'administration orale de Gly chez le rat diminue les niveaux 5-HT et DA dans le cortex frontal, le striatum et le mésencéphale, alors qu'il augmente les métabolites 5-HT et DA (5 hydroxyindole-3-acétique pour 5-HT Acide 3,4-dihydroxyphénylacétique et acide homovanillique, pour DA) (Ait Bali *et al*, 2017).

L'activité locomotrice est positivement corrélée avec les niveaux de DA et / ou de sa liaison spécifique au récepteurs D1-DA dans le noyau accumbens (Hernandez *et al*, 2015). L'hippocampe est l'une des nombreuses structures limbiques qui ont été largement étudiées chez les personnes souffrant de dépression. On pense que le phénomène d'excitotoxicité glutamatergique est l'une des causes du trouble dépressif et en tant que tel, est considéré comme une cible pharmacologique potentielle pour le traitement de la dépression (Qiao *et al*, 2017). L'excitotoxicité du glutamate est due à l'augmentation de la libération du glutamate dans les fentes synaptique, diminution de sa recapture et l'interaction du Gly avec les récepteurs NMDA induisant l'augmentation de l'influx de Ca^{2+} dans l'hippocampe. Ces événements sont reliés au stress oxydatif, au dysfonctionnement des astrocytes et au comportement dépressif. Parmi les mécanismes qui argumente cette neurotoxicité on y trouve : activation des récepteurs du glutamate, l'augmentation de la S100B, sur-activation des ERK 1/2 et phosphorylation de la p65 de l'INF-kB (Cattani *et al*, 2017).

Le système nerveux interagit avec le système endocrinien, de ce fait chacun influence le bon fonctionnement de l'autre. Il a été démontré que les perturbateurs endocriniens exercent des effets neurotoxiques complexes et entraînent des altérations subtiles indépendantes de leurs effets sur les hormones ou indirectement liées à leurs effets. Par exemple, les pesticides peuvent perturber la synthèse, le transport et la libération de nombreux neurotransmetteurs, dont la dopamine, la sérotonine, la norépinéphrine et le glutamate, qui jouent un rôle clé dans la modulation du comportement, de la cognition, de l'apprentissage et de la mémoire. En

outre, de nombreux neurones co-expriment des récepteurs hormonaux stéroïdiens au cours de différents stades de développement, ce qui en fait des cibles potentielles des pesticides.

Par conséquent, les perturbateurs endocriniens affectant les circuits sensibles aux stéroïdes dans le cerveau peuvent exercer des effets sur la cognition, l'apprentissage, la mémoire et d'autres comportements, tels que le métabolisme, ainsi que les systèmes reproducteurs (**Thaddeus *et al*, 2015**).

Concernant la mémoire il convient de noter que, les composés OP agissent au-delà de leur capacité à inhiber l'acétylcholine estérase, on ne peut plus supposer qu'ils agiront tous de la même manière, puisque les différents agents peuvent diverger dans leurs actions médiées par d'autres mécanismes. En outre, le Glyphosate est un faible inhibiteur de acétylcholine estérase donc cela renforce l'hypothèse que les composés OP agissent également par des voies non cholinergiques, en particulier ceux liés aux processus cognitifs. Par exemple, le métrifonate et son métabolite dichlorvos exercent une amélioration cognitive en inhibant l'acylpeptide hydrolase qui a été identifiée comme une nouvelle cible pour les pesticides organophosphorés (Cette enzyme est plus sensible que l'AChE à certains organophosphorés OP) (**Pancetti *et al*, 2007**).

CONCLUSIONS

ET

PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nos résultats montrent que l'administration de dose de 1/8, 1/10, 1/12 de la DL50 du Glyphosate ou du mélange (Glyphosate + Chloperfos) à des sujets murins par voie intrapéritonale induit des changements comportementaux altérant l'anxiété, l'activité locomotrice, la mémoire et la dépression de façon doses indépendante et sexes dépendante. Ces observations pourraient être une conséquence d'altérations des systèmes de neurotransmission comprenant les systèmes GABAergique, dopaminergique, sérotoninergique et / ou cholinergique.

La dose de 1/12 de la DL50 est la plus répondeuse car elle affecte presque tous les paramètres étudiés. Cela nous pousse à s'investir plus dans l'étude de la toxicité du Glyphosate, car ceci nous semble être en accord avec les constatations épidémiologiques où on observe des augmentations des taux de dépression conduisant dans certain cas au suicide. Toutefois, cette étude reste préliminaire. Afin de confirmer les résultats obtenus, il est important de réaliser des investigations plus poussées tel que:

- Augmenter la cohorte des animaux.
- Prolonger la durée d'exposition des animaux (3 mois de plus) afin de savoir si les perturbations fonctionnelles et moléculaires pourraient aboutir à l'apparition des pathologies chroniques
- Utiliser des animaux à différents stades de développement pour voir si l'âge influencerait sur le degré de toxicité du glyphosate.
- Réalisation d'analyse moléculaires et d'analyses biochimiques car Il serait intéressant d'étudier le taux des résidus de pesticide à long terme.
- Il serait aussi indispensable de tester leur bioaccumulation et bioconcentration chez les animaux pour mieux étudier leurs méfaits sur la santé.
- Sensibiliser les populations agricoles aux risques liés à l'utilisation des pesticides notamment de leurs effets sur le système nerveux.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

Aguiar, L. M., et al. (2016). "Glyphosate-based herbicide exposure causes antioxidant defence responses in the fruit fly *Drosophila melanogaster*." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **185**: 94-101.

Ait Bali, Y., et al. (2017). "Behavioral and Immunohistochemical Study of the Effects of Subchronic and Chronic Exposure to Glyphosate in Mice." *Frontiers in behavioral neuroscience* **11**: 146.

Ait bali, Y., et al. (2018). "Glyphosate based-herbicide exposure affects gut microbiota, anxiety and depression-like behaviors in mice." *Neurotoxicology and teratology* **67**: 44-49.

B

Bellé, R., et al. (2007). "Sea urchin embryo, DNA-damaged cell cycle checkpoint and the mechanisms initiating cancer development." *Journal de la Societe de Biologie* **201**(3): 317-327.

Benbrook, C. M. (2016). "Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally." *Environmental Sciences Europe* **28**(1): 3.

Bouziani, M. (2007). "L'usage immodéré des pesticides. De graves conséquences sanitaires." *Le Guide de la Médecine et de la Santé*.

Baier.C.J., et al. (2017). "Behavioral impairments following repeated intranasal glyphosate-based herbicide administration in mice". *Neurotoxicology and Teratology* **64**: 63–72

C

Cacabelos, R. (2017). "Parkinson's disease: from pathogenesis to pharmacogenomics." *International journal of molecular sciences* **18**(3): 551.

Cattani, D., et al. (2014). "Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: involvement of glutamate excitotoxicity." *Toxicology* **320**: 34-45.

Cattani, D., et al. (2017). "Developmental exposure to glyphosate-based herbicide and depressive-like behavior in adult offspring: implication of glutamate excitotoxicity and oxidative stress". *Toxicology*

Chen, W-Q., et al. (2011). "Repeated exposure to chlorpyrifos alters the performance of adolescent male rats in animal models of depression and anxiety." *NeuroToxicology* **32** 355–361.70.

Chorfa, A., et al. (2013). "Specific pesticide-dependent increases in α -synuclein levels in human neuroblastoma (SH-SY5Y) and melanoma (SK-MEL-2) cell lines." *toxicological sciences* **133**(2): 289-297.

Clair, É., et al. (2012). "A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells in vitro, and testosterone decrease at lower levels." *Toxicology in vitro* **26**(2): 269-279.

Conrad, A., et al. (2017). "Glyphosate in German adults—Time trend (2001 to 2015) of human exposure to a widely used herbicide." *International journal of hygiene and environmental health* **220**(1): 8-16.

D

Dill, G. M. (2005). "Glyphosate-resistant crops: history, status and future." *Pest management science* **61**(3): 219-224.

E

Evrard, E., et al. (2010). "Impacts of mixtures of herbicides on molecular and physiological responses of the European flounder *Platichthys flesus*." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **152**(3): 321-331.

F

Fiedler, N., et al. (2015). "Neurobehavioral effects of exposure to organophosphates 3 and pyrethroid pesticides among Thai children." *Neurotoxicology* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2015.02.003>

G

Gallegos, C. E., et al. (2016). "Exposure to a glyphosate-based herbicide during pregnancy and lactation induces neurobehavioral alterations in rat offspring." *Neurotoxicology***53**: 20-28.

H

Hatcher, J. M., et al. (2017). "Parkinson's disease and pesticides: a toxicological perspective." *HHS Public Access***29**(6): 322–329

Hernández-Plata, I., et al. (2015). "The herbicide glyphosate causes behavioral changes and alterations in dopaminergic markers in male Sprague-Dawley rat." *Neurotoxicology***46**: 79-91.

I

Inoue, K., *et al.* (2015). " Long-term mild exercise training enhances hippocampusdependent memory in rats." *Int J Sports Med***36**: 280-285

K

Kongtip, P., et al. (2017). "Glyphosate and Paraquat in maternal and fetal serums in Thai women." *Journal of agromedicine***22**(3): 282-289.

Kwiatkowska, M., et al. (2017). "DNA damage and methylation induced by glyphosate in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study)." *Food and Chemical Toxicology***105**: 93-98.

L

Li, Q., et al. (2013). "Glyphosate and AMPA inhibit cancer cell growth through inhibiting intracellular glycine synthesis." *Drug design, development and therapy***7**: 635.

M

Martínez, M.-A., et al. (2018). "Neurotransmitter changes in rat brain regions following glyphosate exposure." *Environmental research***161**: 212-219.

Manéas, F., et al. (2009a). " Genotoxicity of AMPA, the environmental metabolite of glyphosate, assessed by the Comet assay and cytogenetic tests. " *Ecotoxicol. EnViron. Saf.***72**, 834–837.

N

Nishiyori, Y., et al. (2014). "Unilateral hippocampal infarction associated with an attempted suicide: a case report." *Journal of medical case reports* **8**(1): 219.

P

Poulsen, M. S., et al. (2009). "Modeling placental transport: correlation of in vitro BeWo cell permeability and ex vivo human placental perfusion." *Toxicology in vitro* **23**(7): 1380-1386.

Qiao, J., et al. (2017). "Involvement of Akt/GSK3beta/CREB signaling pathway on chronic omethoate induced depressive-like behavior and improvement effects of combined lithium chloride and astaxanthin treatment". *NeurosciLett*, 649, pp. 55-61.

S

Samsel, A. and S. Seneff (2016). "Glyphosate pathways to modern diseases V: Amino acid analogue of glycine in diverse proteins." *J. Biol. Phys. Chem***16**: 9-46.

Séralini, G.-E., et al. (2012). **RETRACTED**: Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize, Elsevier.

Sinhorin, V. D. G., et al. (2014). "Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystomas*p)." *Ecotoxicology and environmental safety***106**: 181-187.

R

Romina, P., et al. (2016). "Neuronal development and axon growth are altered by glyphosate through a WNT non-canonical signaling pathway". *NeuroToxicology***52**:150-161

Rondón-Barragán, I.S., et al. (2012). " El glifosato (Roundup®) y Cosmoflux® 411F inducen estrés oxidativo en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). " Orinoquia Supl. Univ. los Llanos **16**, 162–176.

T

Thaddeus, T., et al. (2015). "Elucidating the Links Between Endocrine Disruptors and Neurodevelopment." *Endocrinology* **156**: 1941–1951.

P

Pancetti, F., et al. (2007). " Non cholinesterase effects induced by organophosphate pesticides and their relationship to cognitive processes: implication for the action of acyl peptide. " *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* **10**:623-30.

V

Van Bruggen, A., et al. (2018). "Environmental and health effects of the herbicide glyphosate." *Science of The Total Environment* **616**: 255-268.

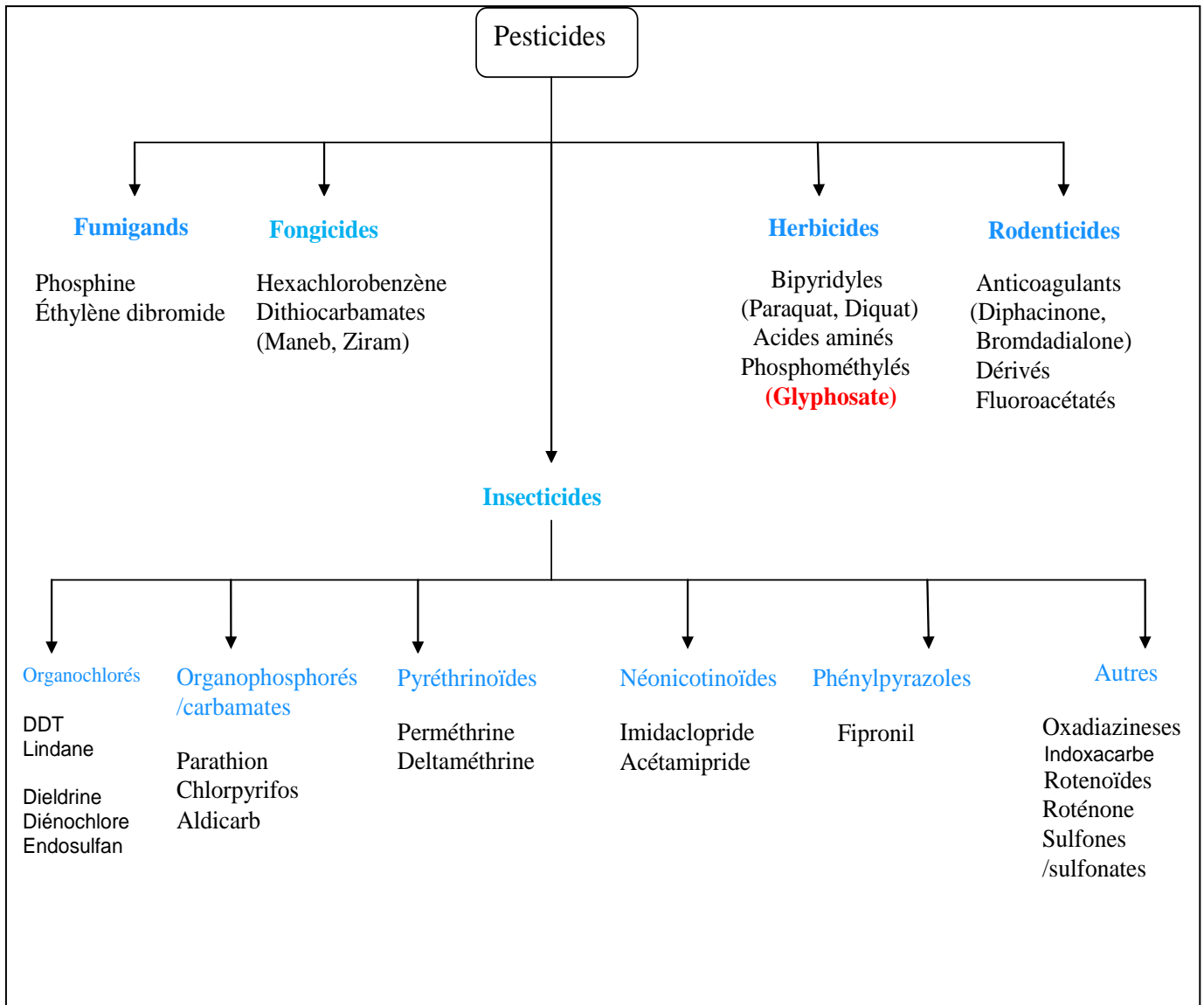
VoPham, T., et al. (2017). "Pesticide exposure and liver cancer: a review." *Cancer Causes & Control* **28**(3): 177-190.

W

Wang, G., et al. (2011). "Parkinsonism after chronic occupational exposure to glyphosate." *Parkinsonism & related disorders* **17**(6): 486-487.

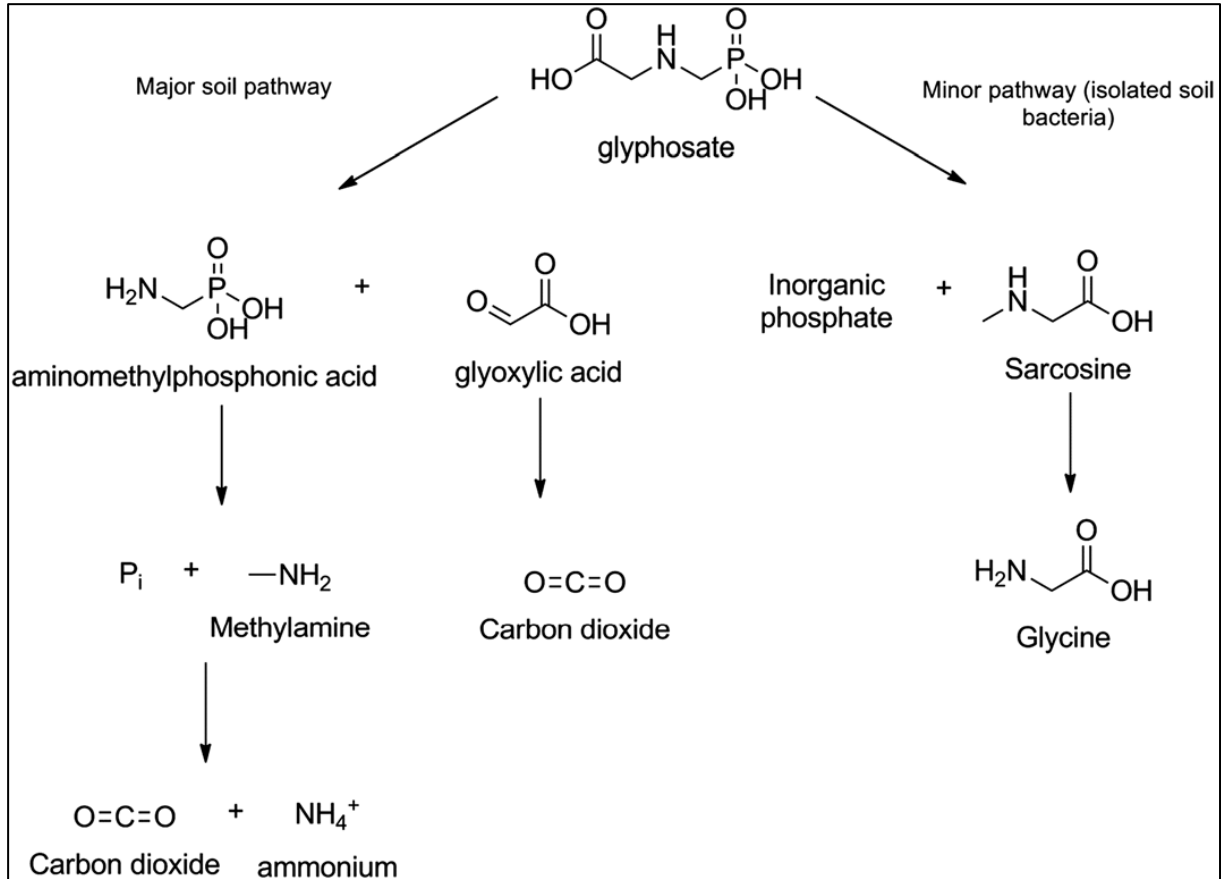
ANNEXES

ANNEXE N°1



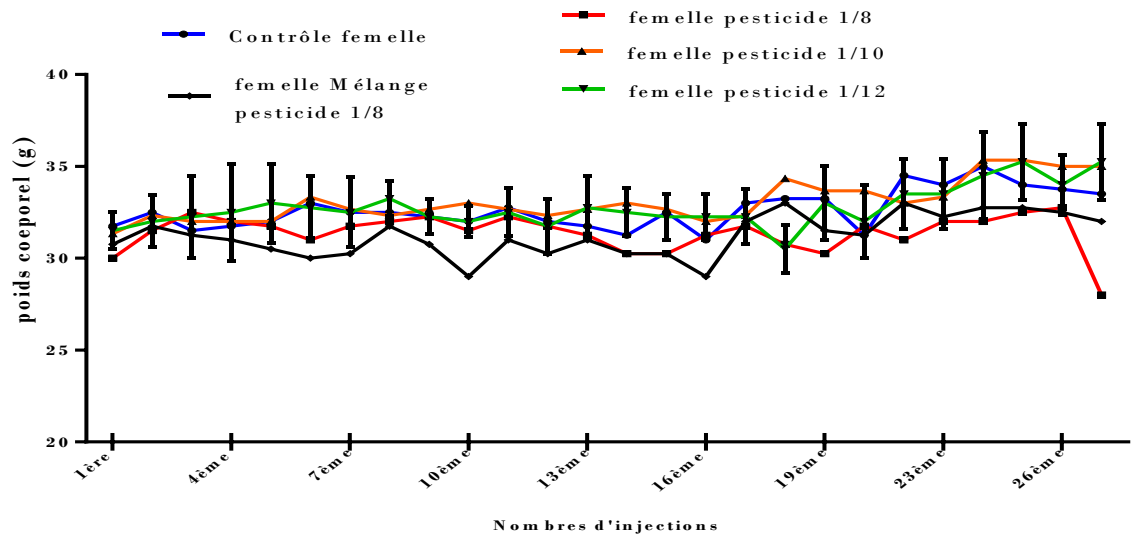
Classification des pesticides selon leur famille chimique et organisme cible

ANNEXE N°2

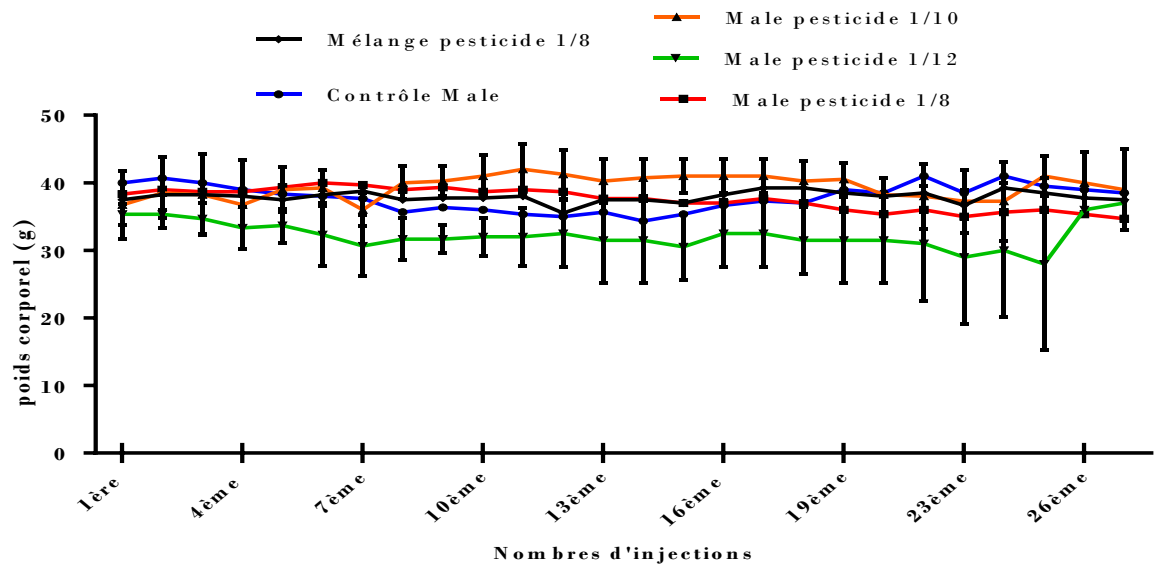


Voies de dégradation primaire et secondaire du Glyphosate par les bactérie du sol

ANNEXE N°3



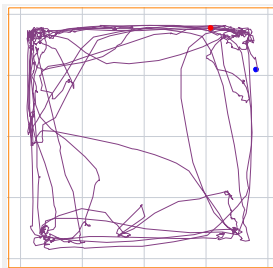
Evolution du poids corporel des souris femelles



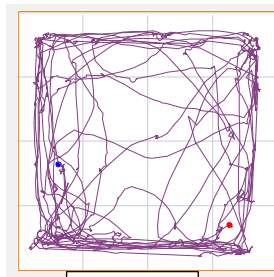
Evolution du poids corporel des souris males

ANNEXE N°4

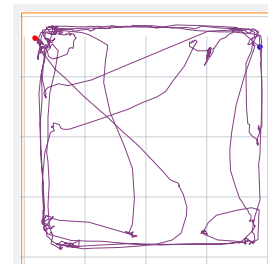
Tracks Plots des souris Males au cours du test OF



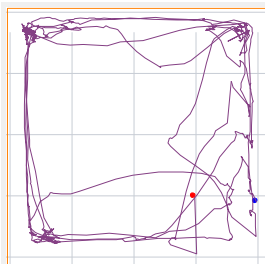
1/8



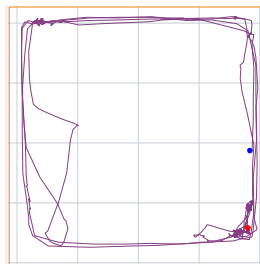
Mélang



Contrôle



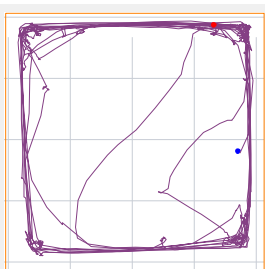
1/10



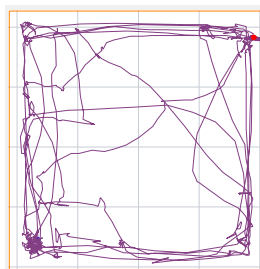
1/12

ANNEXE N°5

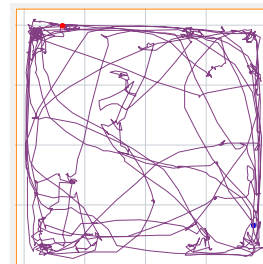
Tracks Plots des souris femelles au cours du test OF



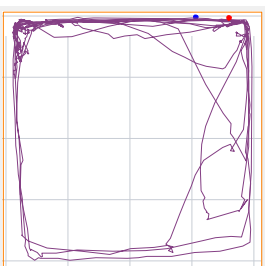
1/8



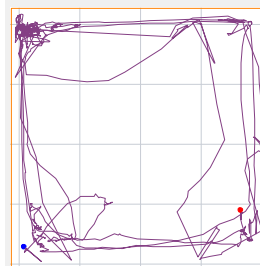
Mélang



Contrôle

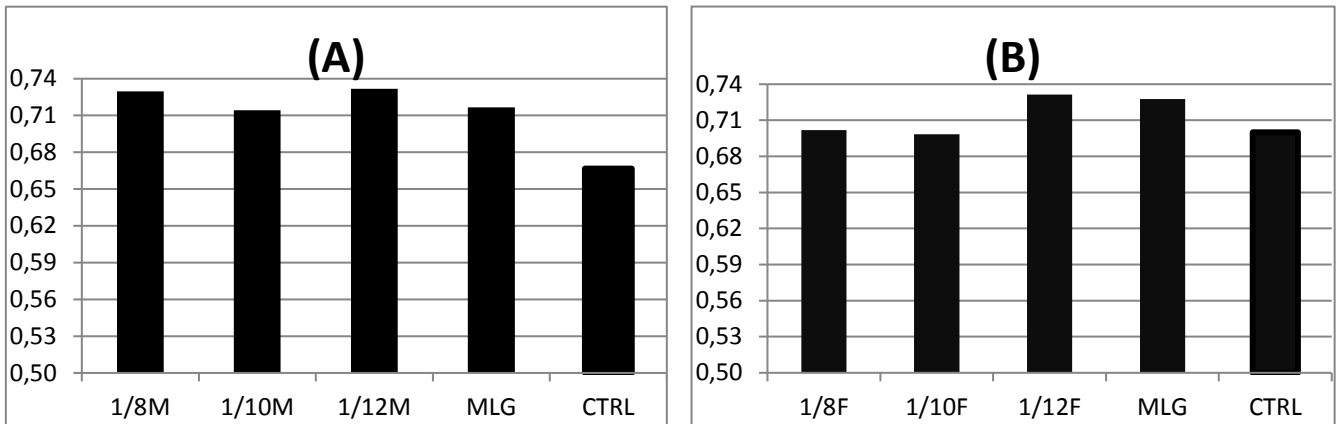


1/10



1/12

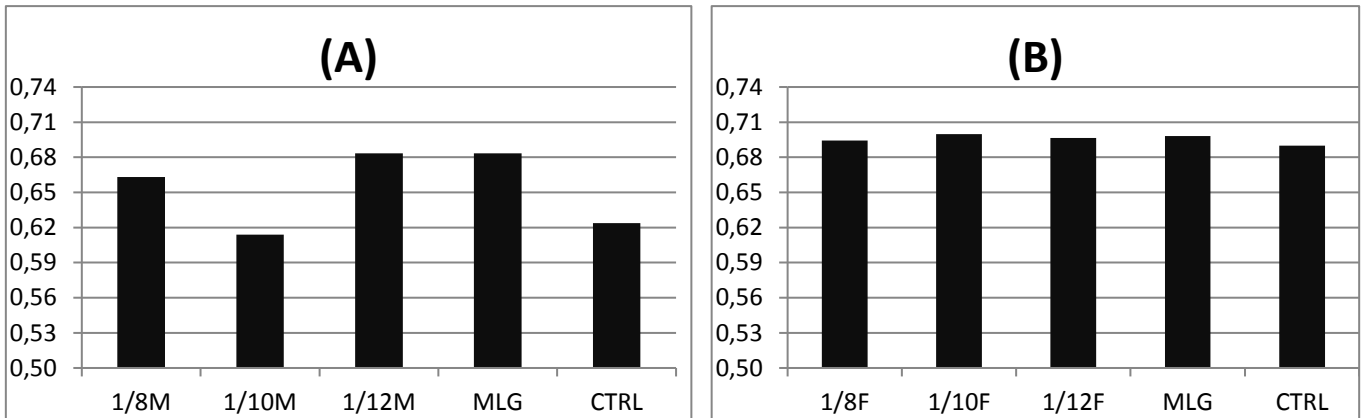
ANNEXE N°6



Histogrammes représentant l'Indice d'anxiété dans le test EPM

A) MALE vs B) FEMELLE

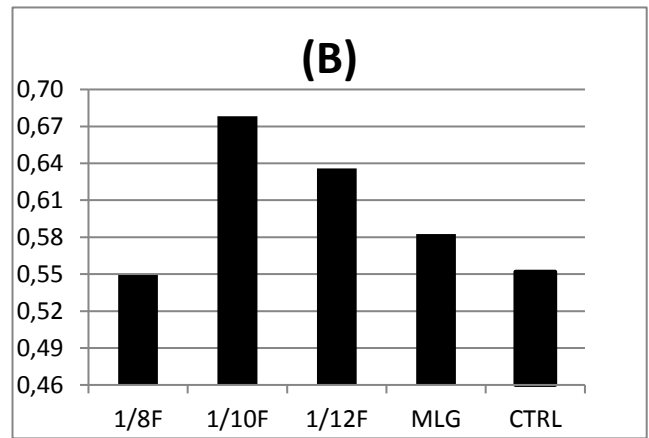
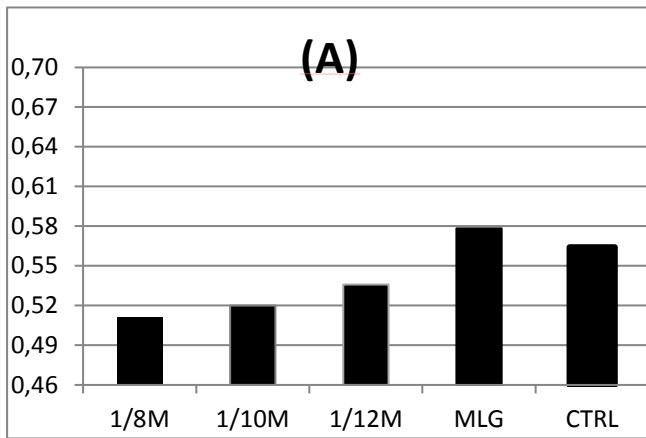
ANNEXE N° 7



Histogrammes représentant l'Indice d'anxiété dans le test EZM.

A) MALE vs B) FEMELLE

ANNEXE N° 8



Histogrammes représentant l'Indice d'anxiété dans le test Dark/Light-Box

A) MALE vs B) FEMELLE

Résumé

L'utilisation des pesticides dans l'usage agricole ou domestique n'est pas sans impact négatif sur la santé humaine et animale. En effet l'exposition chronique aux pesticide via l'administration par voie intra-péritonéal des doses de 1/8, 1/10, 1/12 de la DL50 du Glyphosate ou du mélange de Glyphosate et de Clorperlyfos à une dose de 1/8 de leur DL50 à des sujet murins pendant 77 jours, induit des altérations neurocomportementales dont l'anxiété, la locomotion, la dépression, la mémoire et l'apprentissage reflétant ainsi une dérégulation des mécanismes moléculaires impliqués dans la régulations des fonctions affectives et cognitives. L'étude microscopique appuie les résultats obtenue au cours des tests du comportement et de la mémoire, car différente région du cerveau à savoir l'hippocampe, le cortex, et le cervelet témoignent d'altérations critiques dans une mesure de comparaison aux souris contrôles. De telles constatations nous permettent de conclure que de mêmes affections peuvent toucher l'être humain.

Mots clés : Glyphosate, Comportement, système nerveux, toxicité chronique, herbicide.

Summary

The use of pesticides in agricultural or domestic use is not without negative impact on human and animal health. In fact, chronic exposure to the pesticide via intraperitoneal administration of doses of 1/8, 1/10, 1/12 of the LD50 of Glyphosate or the mixture of Glyphosate and Clorperlyfos at a dose of 1 / 8 of their LD50 to murine subjects for 77 days, induces neurobehavioral alterations including anxiety, locomotion, depression, memory and learning reflecting a deregulation of the molecular mechanisms involved in the regulation of affective and cognitive functions. The microscopic study supports the results obtained during the tests of the behavior and the memory, because different region of the brain namely the hippocampus, the cortex, and the cerebellum testify of critical alterations in a measure of comparison with the control mice. Such observations allow us to conclude that the same affections can affect the human being.

Key words: Glyphosate, Behavior, nervous system, chronic toxicity, herbicide.