

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



**جامعة بجاية**  
**Tasdawit n Bgayet**  
**Université de Béjaïa**

**Réf : .....**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Biologie Physico-Chimique**  
**Promotion Biochimie et Biologie Moléculaire**

## **Mémoire de fin de cycle**

### **Master II**

**Filière : Sciences Biologiques**  
**Option : Biochimie et Biologie Moléculaire**

### **Thème**

**Impact des pesticides sur la progression  
des glioblastomes dans des modèles  
animaux**

**Présenté par :**

**OUAR Katia & REZGUI Lydia**

### **Composition du jury**

**M<sup>me</sup> F. BEDJOU**  
**M<sup>r</sup> A. GHIDOUCHE**  
**M<sup>me</sup> N. DEBACHE**  
**M<sup>r</sup> S. TLIBA**

**Pr, A/MIRA BEJAIA**  
**MCB, A/MIRA BEJAIA**  
**MCB A/MIRA BEJAIA**  
**Pr, A/MIRA BEJAIA**

**Présidente**  
**Encadreur**  
**Examinatrice**  
**Co- encadreur**

**Année universitaire : 2016 / 2017**

# Remerciement

*Nous tenons tout d'abord à remercier et témoigner notre gratitude pour notre encadreur M<sup>r</sup> GHIDOUCHE Abdelrezak pour sa gentillesse, sa confiance ainsi que ces conseils qui nous ont été précieux afin de mener notre travail à bon port. Qu'il trouve dans ce travail un hommage à sa haute personnalité.*

*Un grand merci pour notre co-promotrice M<sup>lle</sup> AIT ALI pour son soutien, ses conseils ainsi qu'sa disponibilité et sa gentillesse.*

*Merci à KHIREDDINE Lydia et à BOUCHEMAL Amina pour leurs aides et leurs serviabilités.*

*On remercie également le personnel technique du laboratoire de Biologie Moléculaire : M<sup>me</sup> Hakima, M<sup>me</sup> Louisa ainsi que M<sup>lle</sup> Linda de mettre à notre disposition le matériel nécessaires et leurs aide précieuse dans nos manipulations.*

*Nous souhaitant adresser nos remerciements au service de neurochirurgie du CHU de Bejaia, de mettre en notre disposition les échantillons nécessaires pour effectuer ce travail.*

*Un grand merci pour D<sup>r</sup> KASSA (service d'anatomopathologie CHU de Douera) de partager avec nous ces connaissances dans le domaine d'histopathologie*

*Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury : M<sup>me</sup> BEDJOU, M<sup>me</sup> DEBACHE pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.*

*Enfin, on n'oublie pas nos parents pour leur contribution, leur soutien et leur patience. Ainsi pour leurs conseils et compréhension. Nous adressons nos plus sincères remerciements à tous nos proches et amis, qui nous ont toujours encouragées au cours de la réalisation de ce mémoire.*

*Je dédie ce modeste travail et ma profonde gratitude*

*A ma mère et mon père 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 : Amine, Riad et Saber.*

*A mon très cher fiancé Sifeddine pour ces encouragements permanents, et son soutien moral ainsi que sa disponibilité*

*A toute ma famille surtout : Mouhamed, Houcine, Dida et Djidja pour leurs aides précieuses dans l'élaboration de ce travail.*

*A ma précieuse amie Lydia que je remercie pour sa ponctualité, sa patience ainsi sa volonté tout au long de la réalisation de ce travail.*

*A mes adorables amies : Nadia, Djidja, Hizia, Mina et Ryma avec lesquelles j'ai partagée des moments de joie et de bonheur*

*A Mr GHIDOUCHE, M<sup>lle</sup>AITALI et Lydia pour leurs orientations, explications et leurs disponibilités tout au long de ce travail et pour les moments de joies inoubliable passés ensemble.*

*Katia*

*Je dédie ce modeste 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 et sœurs : Dalila, razika, Hassiba et moulou*

*A mon très cher fiancé Jugourta que je remercie infiniment pour ces encouragements permanents, son soutien moral, sa confiance ainsi que sa disponibilité. Je remercie le destin de t'avoir mis sur ma route afin que tu m'apporte la joie et le bonheur.*

*A mes beaux-frères : Saïd, Toufik et Salim*

*A mes nièces et mon neveu*

*A ma précieuse amie Katia que je remercie pour sa ponctualité, son perfectionnisme ainsi que sa volonté tout au long de la réalisation de ce travail.*

*A mes adorables amies : Nadia, Djidja, Hizia, Mina et Ryma avec lesquelles j'ai partagée des moments de joie et de bonheur*

*A M<sup>r</sup> GHIDOUCHE, M<sup>lle</sup> AIT ALI et Lydia pour leurs orientations, explications et leurs disponibilités tout au long de ce travail.*

*Lydia*

Table des matières

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

<b>Introduction</b> .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Chapitre I : Synthèse bibliographique</b> .....	
<b>I.1 Tumeurs cérébrales</b> .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
I.1.1 Epidémiologie des tumeurs cérébrales .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
I.1.2 Classification des tumeurs cérébrales.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
I.1.3 Les gliomes.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>I.2 Glioblastomes</b> .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
I.2.1 Origine des glioblastomes .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
I.2.2 Hétérogénéité des glioblastomes .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
I.2.3 Altérations moléculaires des glioblastomes .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>I.3 Les pesticides</b> .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
I.3.1 Classification des pesticides .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
I.3.2 Les effets néfastes dans l'utilisation des pesticides.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
I.3.2.1 Risques environnementaux.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
I.3.2.2 Risque sur la santé humaine .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
I.3.3 Effets immunotoxiques et cancérigènes des pesticides .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
I.3.3.1 Effets immunotoxiques.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
I.3.3.2 Effets cancérigènes.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Chapitre II : Matériels et méthodes</b> .....	
<b>II.1 Matériels</b> .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
II.1.1 Matériels biologiques .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
II.1.1.1 Modèles animaux .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
II.1.1.2 Tissus tumoraux .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
II.1.1.3 Liquides biologiques .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
II.1.2 Matériels chimiques .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>II.2 Méthodes</b> .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
II.2.1 Préparation du mélange de pesticides.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
II.2.2 Analyse quantitative des protéines du LCR .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
II.2.2.1 Méthode de Bradford.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
II.2.3 Test in vivo.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>

II.2.3.1	Administration des pesticides.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
II.2.3.2	Xénogreffe de cellules de glioblastome .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
II.2.4	Etude histologique.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
	<b>Chapitre III : Resultats et discussions .....</b>	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>III.1</b>	<b>Analyses quantitative et qualitatives du matériel biologique.....</b>	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
III.1.1	IRM et aspect histologique du glioblastome .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
III.1.2	Analyse quantitative du LCR .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>III.2</b>	<b>Analyse différentielle de l'état du model animal.....</b>	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
III.2.1	Effets des pesticides sur le poids des souris .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>III.3</b>	<b>Effets physiopathologiques des pesticides.....</b>	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
III.3.1	Etude macroscopique des organes.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>III.4</b>	<b>Impact tumorigène des pesticides .....</b>	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
III.4.1	Etude macroscopique des masses au site de la xénogreffe.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
III.4.2	Etude microscopique des masses au site de la xénogreffe .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>III.5</b>	<b>Effets des pesticides sur l'homéostasie cérébrale .....</b>	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
III.5.1	Etude macroscopique des cerveaux.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
III.5.2	Etude microscopique des cerveaux .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
	<b>Conclusions et perspectives .....</b>	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
	<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>

## Liste des abréviations

**$\alpha$ -KG** : Alpha cetoglutarate

**ADN** : Acide désoxyribonucléique.

**AKT** : Protéine Kinase B.

**AMPA** : acide aminométhylphosphonique.

**ARF** : ADP-riboxylation factor.

**Bcl-xL** : B-cell lymphoma-extra large.

**Bcl-2** : B-cell lymphoma 2.

**CCL2** : Chemokine ligand 2.

**CDK** : kinase dépendante des cyclines.

**CHU** : Center Hospital-Universitaire.

**CIRC** : Centre International de Recherche Cancer.

**CMV** : Cytomegalovirus

**CSC** : Cellule Souche Cancéreuse.

**DDD** : dichlorodiphényldichloroéthane

**DDE** : dichlorodiphényldichloroéthylène

**DDT** : dichlorodiphényltrichloroéthane

**EGFR** : Epidermal Growth Factor Receptor

**EGF** : Facteur de croissance épithélial.

**HER** : Human Epidermal Growth Factor Receptor

**IDH** : Isocitrate Déshydrogénase

**IDO** : indoleamine 2,3-dioxygénase

**IL-2** : interleukine 2

**IL-2R** : interleukin-2 receptor

**IgM** : immunoglobuline M.

**LCR** : LiquideCéphalo-Rachidien.

**LNH** : lymphome non hodgkinien.

**MAPK** : Mitogen Activated Protein Kinase.

**MDM2** : Murine double minute 2.

**MDSC** : cellules myéloïdes suppressives.

**NF1** : Neurofibromatose

**NK** : Natural Killer.

**OC** : organochloré.

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé.

**OP** : organophosphoré.

**PI3K** : Phosphoinositide 3-kinase

**PTEN** : phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten.

**RAS** : Reticular Activating system.

**Rb** : Rétinoblastome.

**SEER** : Surveillance, Epidemiology, and End Results.

**SOCS3** : Suppressor of cytokine signaling 3.

**STAT** : Signal transducers and activators of transcription.

**TAM** : macrophages associés aux tumeurs

**TCP** : **3,5,6-trichloro-2-pyridino**

**TGF** : Transforming Growth Factor.

**TGF-β** : transforming growth factor -β

**TP53** : Tumor protein 53

**VEGF** : Vascular Epidermal Growth Factor.

**2HG** : 2-hydroxyglutarate.







## *Liste des figures*

<b>Figure 1:</b> Répartition des différents types de gliomes .....	4
<b>Figure 2:</b> Illustration de l'aspect macroscopique et microscopique d'un glioblastome .....	5
<b>Figure 3:</b> Représentation des deux modèles expliquant l'hétérogénéité tumorale .....	6
<b>Figure 4:</b> Principales voies de signalisation impliquées dans la gliomagenèse .....	8
<b>Figure 5:</b> Interactions entre les cellules de glioblastome et le microenvironnement tumoral ...	9
<b>Figure 6:</b> Répartition des pesticides utilisés en Algérie .....	13
<b>Figure 7:</b> Représentation des différentes sources de contamination environnementales des pesticides .....	14
<b>Figure 8:</b> Mécanismes d'immunotoxicité des pesticides organochlorés et organophosphorés.	15
<b>Figure 9 :</b> Photographie du conditionnement des souris dans l'animalerie de GBC .....	17
<b>Figure 10 :</b> Photographie des différentes instrumentations utilisées .....	18
<b>Figure 11 :</b> Les différentes solutions du mélange de pesticides selon le poids des souris .....	19
<b>Figure 12:</b> Les concentrations de la gamme étalon .....	20
<b>Figure13:</b> Etapes de préparation de la suspension cellulaire de glioblastome .....	22
<b>Figure 14 :</b> Photographie d'une démonstration de la Réalisation de la xénogreffe sous cutanée des cellules de glioblastome humaine .....	23
<b>Figure 15:</b> Etapes de réalisation des coupes histologiques .....	24
<b>Figure 16 :</b> Illustration de l'IRM et de la coupe histologique de glioblastome .....	25
<b>Figure 17 :</b> Représentation de la courbe d'étalonnage .....	26
<b>Figure 18 :</b> Représentation graphique des concentrations protéiques des échantillons du LCR .....	27

<b>Figure 19 :</b> Evolution du poids des souris témoins et souris traités aux pesticides .....	28
<b>Figure 20 :</b> Evolution du poids des souris males témoins et males traités aux pesticides .....	28
<b>Figure 21 :</b> Evolution du poids des souris femelles témoins et femelles traitées aux pesticides .....	29
<b>Figure 22 :</b> Représentation du poids des souris lors de la dernière injection ainsi que leurs IMC .....	31
<b>Figure 23:</b> Photographie des souris témoins et souris traitées aux pesticides .....	32
<b>Figure 24 :</b> Photographie des anomalies observées au niveau du foie des souris traitées aux pesticides .....	32
<b>Figure 25 :</b> Représentation des anomalies observées au niveau du foie des souris traitées aux pesticides .....	33
<b>Figure 26 :</b> Photographie des anomalies observées au niveau du tissu adipeux et colo-rectale .....	33
<b>Figure 27 :</b> Représentation de la prise probable du greffon chez les souris traitées aux pesticides .....	34
<b>Figure 28:</b> Photographie des masses observées au niveau du site de la xéno greffe .....	35
<b>Figure 29 :</b> Photographie du site d'implantation des cellules tumorales ainsi que le greffon des souris traitées aux pesticides .....	36
<b>Figure 30 :</b> représentation du taux des ganglions et de xéno greffes retrouvé chez les souris traitées aux pesticides .....	37
<b>Figure 31 :</b> Coupes histologiques du greffon récupéré au niveau des souris traitées aux pesticides .....	38
<b>Figure 32 :</b> Coupes histologiques d'un ganglion réactionnelles récupéré au niveau des souris traitées aux pesticides .....	38

<b>Figure 33 : Photographie des cerveaux des souris traitées et souris non traitées aux</b>	
Pesticides .....	40
<b>Figure 34 : Représentation de la taille des cerveaux de souris témoins et souris traitées aux</b>	
pesticides .....	40
<b>Figure 35 : Représentation des anomalies histologiques retrouvées au niveau des souris traitées</b>	
aux pesticides .....	42
<b>Figure 36 : Coupes histologique des cerveaux des souris témoins et souris traitées aux</b>	
pesticides .....	42
<b>Figure 37 : Coupes histologiques avec un infiltrat immunitaire au niveau des cerveaux des</b>	
souris traitées aux pesticides .....	43

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau I:</b> classification des gliomes selon l’OMS .....	3
<b>Tableau II :</b> Tableau récapitulatif des mutations retrouvées dans les glioblastomes primaires et secondaires .....	8
<b>Tableau III:</b> Classification des pesticides selon leurs groupements chimiques .....	12
<b>Tableau IV :</b> Représentation des DL50 et des doses de pesticides utilisés .....	19
<b>Tableau V :</b> Résultats d’absorbance de la gamme étalon .....	25
<b>Tableau VI :</b> Résultat d’absorbances et des concentrations protéiques des échantillons .....	27

## *Introduction*

Les cancers sont un problème majeur de santé publique, ils représentent la deuxième cause de mortalité et de morbidité mondiale.

Les tumeurs cérébrales qui résultent d'une transformation néoplasique des cellules du système nerveux, représentent 2 % de la globalité des cancers. Contrairement au pays développés ces tumeurs sont plus fréquentes dans les pays en voie de développement.

En effet, en Algérie les tumeurs cérébrales sont classées selon l'OMS au 6<sup>ème</sup> rang en termes d'incidence et 5<sup>ème</sup> en termes de mortalité. En plus de l'incidence importante, ces tumeurs présentent un âge médian d'apparitions de 47ans, âge relativement précoce par rapport au niveau mondial qui est de 58ans (**GLOBOCON, 2012**).

Actuellement, les facteurs de risques des tumeurs cérébrales sont mal établis. De ce fait, cette augmentation de l'incidence ainsi que la précocité d'apparition de ces tumeurs, laissent suggérer l'implication de facteurs génétiques, mais aussi de façon importante des facteurs environnementaux, notamment les agents viraux (CMV) et des agents chimiques tels que les pesticides.

L'Algérie est considérée comme l'un des pays qui consomment le plus de pesticides au monde, cette utilisation accrue des produits phytosanitaires pourrait avoir des effets néfastes sur la santé publique, notamment dans l'apparition de certain cancer dont les tumeurs cérébrales.

Afin d'évalué la relation entre l'exposition aux pesticides et l'initiation et/ou la progression des tumeurs cérébrales, nous avons réalisés des xénogreffes de cellules tumorales du sous type histologique le plus agressif des tumeurs cérébrales, à savoir le glioblastome, dans des souris immunocompétentes traitées avec un mélange de pesticides, composé de chlorpyriphos-éthyl, N-(phosphonométhyl) glycine (glyphosate) et le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT).

# 1. SYNTHÈSE

# BIBLIOGRAPHIQUE

## I.1 Tumeurs cérébrales

Les tumeurs cérébrales constituent un ensemble de pathologies bénignes ou malignes. Elles résultent d'un déséquilibre de l'hémostase cellulaire avec une diminution de l'apoptose et une augmentation de la prolifération des cellules du système nerveux central (SNC). Les tumeurs cérébrales peuvent être primitives c'est-à-dire qu'elles se développent à partir des cellules du cerveau, ou secondaires autrement appelées métastases dont l'origine tissulaire est autre que cérébrale (poumons, seins, reins...) (**Janati Idrissi M, 2015**).

### I.1.1 Epidémiologie des tumeurs cérébrales

Bien que peu fréquentes (moins de 2% de la globalité des cancers), les tumeurs cérébrales sont néanmoins agressives. En effet, selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), les tumeurs cérébrales sont au 17<sup>ème</sup> rang en termes d'incidence (3.4/100000) et au 12<sup>ème</sup> rang en termes de mortalité (**GLOBOCAN., 2012**). Avec un sexe-ratio ( $\frac{\text{♂}}{\text{♀}}$ ) de 1.4 :1, elles sont alors plus fréquentes chez les mâles. Elles représentent la pathologie cancéreuse la plus fréquente chez l'enfant après les leucémies.

En Algérie, les tumeurs cérébrales semblent être plus fréquentes, car les données de l'OMS montrent une incidence de 5,4/100000 habitants, ce qui les place au 6<sup>ème</sup> rang en termes d'incidence et 5<sup>ème</sup> en termes de mortalité. De plus, cette incidence semble plus importante par rapport aux autres pays maghrébins (**GLOBOCAN., 2012**), ce qui fait de ces tumeurs un problème de santé publique majeur en Algérie.

D'après les études épidémiologiques menées notamment au niveau de la région de Bejaia, l'incidence et l'âge médian d'apparition des tumeurs cérébrales sont respectivement de 7.16/100000 et de 47ans, (**Khiredine L et al., 2017**), une incidence trois fois supérieure et un âge relativement précoce (58ans) par rapport au niveau mondial selon la *Surveillance, Epidemiology, and End Results* (SEER).

### I.1.2 Classification des tumeurs cérébrales

Il existe plusieurs classifications des tumeurs cérébrales, elles se basent sur plusieurs paramètres. Néanmoins, la classification la plus répandue est la classification de l'OMS (**Louis et al., 2007**), Celle-ci s'appuie sur des critères histologiques ainsi que sur le grade de malignité et plus récemment sur l'aspect moléculaire. Les critères histologiques tiennent compte du type cellulaire d'origine et du grade, allant de I (moins agressif) jusqu'au IV (plus agressif) qui est défini par la vitesse d'évolution et l'agressivité.

Selon les deux critères cités (histologie, grade de malignité), trois grandes familles des tumeurs cérébrales se dessinent :

- **Les tumeurs neuro-épithéliales** : Tumeurs cérébrales les plus fréquentes. Elles sont d'origine neuronale et/ou gliale. Les gliomes représentent les types histologiques caractéristiques de ce groupe.
- **Les tumeurs des nerfs périphériques** : autrement appelées schwannome ou neurinome, elles se développent à partir des nerfs crâniens ou spinaux et plus précisément au niveau des cellules de schwannes.
- **Les tumeurs des méninges** : Ce sont majoritairement des méningiomes. Elles se développent à partir des méninges et plus spécifiquement à partir de la membrane arachnoïdienne. Il existe des méningiomes de grade I, II et III (**Leh B, 2011**).

Comme cité précédemment, l'émergence d'une nouvelle classification basée sur les critères moléculaires a permis l'amélioration des moyens de diagnostic et de pronostic et donc une meilleure prise en charge des tumeurs cérébrales. L'un des principaux marqueurs moléculaires intégrés dans cette classification est les marqueurs IDH, un marqueur caractéristique des gliomes

(**Louis et al., 2016**).

### I.1.3 Les gliomes

Les tumeurs gliales autrement appelées gliomes regroupent tous les types de tumeurs cérébrales ayant pour origines des cellules gliales. Avec environ 60% des tumeurs cérébrales primitives intracrâniennes, elles sont considérées comme étant le type le plus fréquent. Selon l'OMS les gliomes sont divisés en trois classes : Astrocytomes/Oligodendrogliomes/Oligoastrocytomes (**Tableau I**).

**Tableau I** : classification des gliomes selon l'OMS.

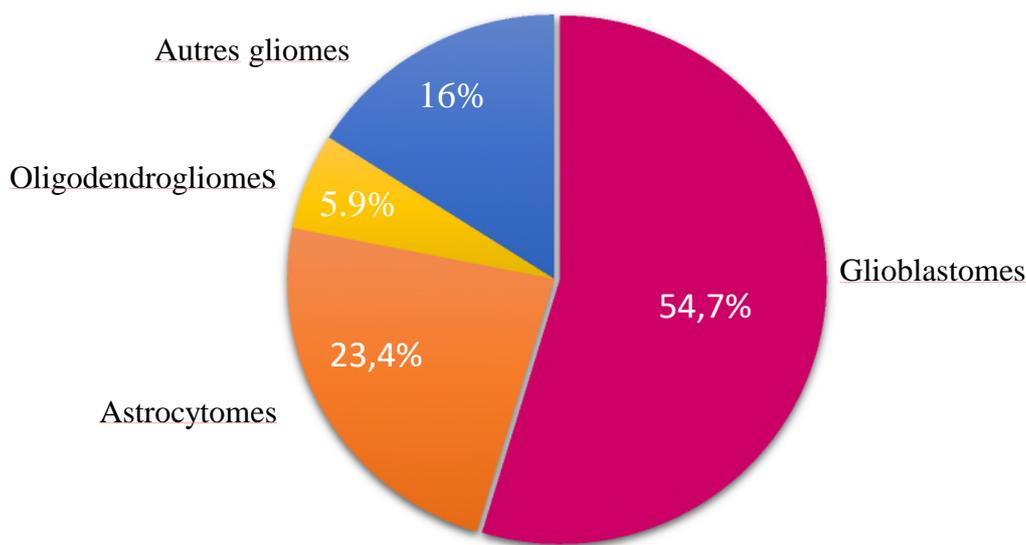
Tableau adapté de (**Lacave R et al., 2005**)

Cellules gliales	Grade I	Grade II	Grade III	Grade IV
Astrocyte	Astrocytome Pilocyrique	Astrocytome de diffus	Astrocytome anaplasique	Glioblastome Multiforme
Oligodendrocyte		Oligodendrogliome de bas grade	Oligodendrogliome anaplasique	Glioblastome Multiforme
Mixte : astrocyte Et oligodendrocyte		Oligo-astrocytome	Oligo-astrocytome	

Dans notre travail on développera les caractéristiques cellulaires et moléculaires des tumeurs gliales et plus précisément celles des glioblastomes.

## I.2 Glioblastomes

Considérés comme étant astrocytomes de grade IV, les glioblastomes ou glioblastomes multiformes (GBM), sont des tumeurs cérébrales malignes représentant plus de 50% des gliomes, faisant d'elle le sous type histologique gliale le plus fréquent (**Figure 1**).

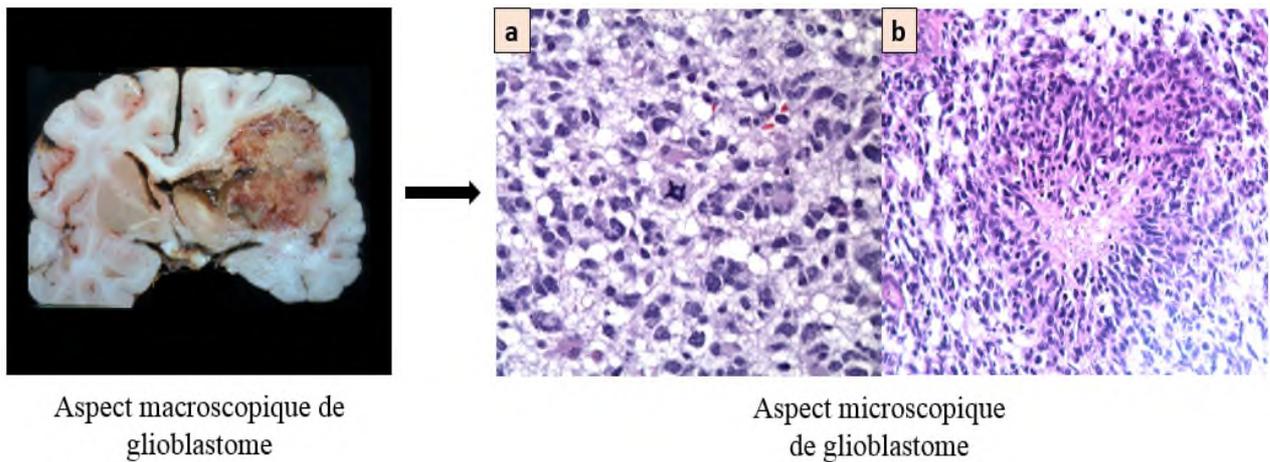


**Figure 1** : Répartition des différents types de gliomes.

*Les glioblastomes représentent plus de la moitié des cas de gliomes. Figure adaptée du central Brain Tumor Registry of the united States (CBTRUS).*

Les GBM sont des tumeurs avec un fort pouvoir, néo-angiogénique, prolifératif et invasif. Ce qui fait d'elles le sous-type histologique de mauvais pronostic avec un fort taux de mortalité et morbidité (médiane de survie de 10 à 14 mois) (**Lai Y et al., 2017**). Ils sont localisés au niveau de la substance blanche, principalement dans les lobes temporaux et frontaux (**Figure 2**). Ils sont considérés comme étant des tumeurs de l'adulte à prédominance masculine avec un sexe-ratio (♂/♀) de 1.6 :1 et un âge médian d'apparition de 64 ans (**Davis M.E, 2016**).

Contrairement aux données mondiales, en Algérie l'âge-médian d'apparition des glioblastomes semble être plus précoce. En effet, celui-ci est de 54ans (Vs 64ans). De plus ils représentent le deuxième sous type histologique le plus fréquent juste derrière les méningiomes (26.23% glioblastome, 33.33 % méningiomes) (**Khireddine L et al., 2017**).



**Figure 2 :** Illustration de l'aspect macroscopique et microscopique d'un glioblastome. *L'aspect histologique des glioblastomes se caractérise par une activité mitotique élevée (a) et un foyer de nécrose entouré de cellules tumorales (b).*

### I.2.1 Origine des glioblastomes

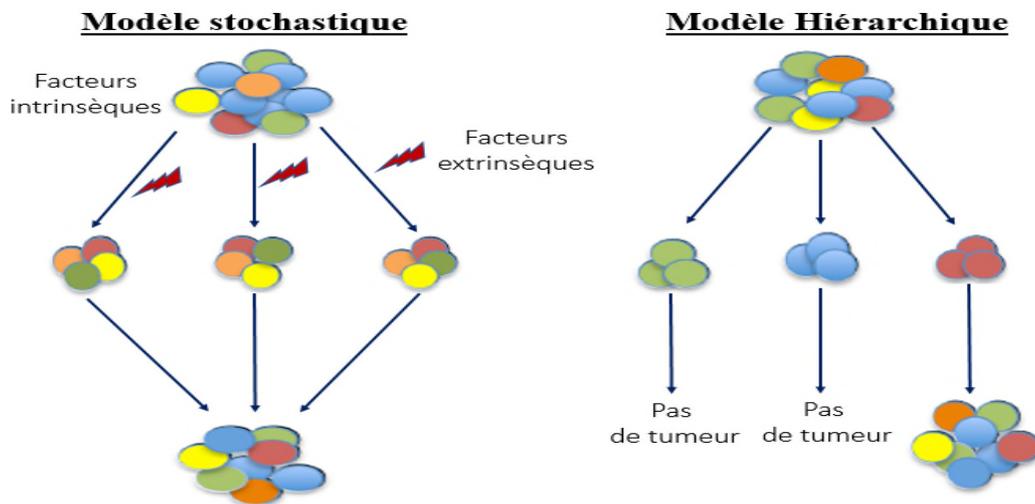
Deux hypothèses principales ont été décrites sur l'origine des glioblastomes, la première stipule que les GBM sont issus de cellules souches du cerveau, ils sont dénommés alors glioblastome primaire ou *de novo*, ces derniers représentent le sous type prédominant (90% des GBM). Alors que la deuxième hypothèse suppose qu'ils proviennent de la transformation de gliomes (astrocytomes, oligodendrocytomes) de grade II ou III, dans ce cas ils sont appelés glioblastomes secondaires (Fève M, 2012).

### I.2.2 Hétérogénéité des glioblastomes

Les glioblastomes sont des tumeurs hétérogènes, cette hétérogénéité des glioblastomes peut être expliquée par deux modèles distincts : un *modèle stochastique* suggère que toute sous-population tumorale a la capacité de proliférer et donner naissance à une tumeur. Le *modèle hiérarchique* quant à lui, stipule qu'une seule population dite cellule souche cancéreuse en est capable (Figure 3). En effet, les GBM sont constitués de plusieurs types cellulaires, notamment des cellules tumorales proliférantes et des cellules souches cancéreuses appelées cellules souches de glioblastomes (CSGs). Ces dernières partagent les mêmes caractéristiques que les cellules souches neurales, car elles sont indifférenciées, pluripotentes et ont une capacité d'auto-renouvellement. Elles possèdent également un potentiel tumorigène, indispensable pour l'initiation et le maintien des glioblastomes (Yi Y *et al.*, 2016).

Les CSGs semblent être à l'origine du mauvais pronostic des GBM car elles sont résistantes aux différentes thérapies, conduisant à une récurrence de ces tumeurs. De plus, elles ont

la capacité de reformer un glioblastome après transplantation secondaire (xénogreffes) en gardant les mêmes caractéristiques de la tumeur initiale (Catalano V *et al.*, 2011).



**Figure 3** : Représentation des deux modèles expliquant l'hétérogénéité tumorale. Figure adaptée de (Catalano V *et al.*, 2011). Dans le Modèle stochastique, toute population cellulaire d'un tissu même différencié peut proliférer indéfiniment et former une tumeur suite à l'accumulation d'évènements géniques. Dans le modèle hiérarchique, seule une cellule souche cancéreuse (en rouge) peut proliférer indéfiniment et former une tumeur.

### I.2.3 Altérations moléculaires des glioblastomes

Comme toutes tumeurs, les glioblastomes résultent d'une transformation néoplasique des cellules qui les composent, ce phénomène est dû à l'accumulation d'altérations géniques qui provoquent l'activation d'oncogènes et/ou l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs engendrant ainsi une perte d'homéostasie cellulaire et une transformation néoplasique.

Les altérations géniques majeures observées dans les glioblastomes ont pour cible les voies de transduction du signal et le cycle cellulaire. Elles consistent principalement en des mutations gains de fonctions des récepteurs à activité tyrosine kinase, des mutations pertes de fonctions de gènes suppresseurs de tumeurs, ainsi qu'à la surexpression de facteurs de croissance et les pertes chromosomiques (Figarella-Branger D *et al.*, 2010).

- **Altération de la voie EGFR/PI3K/AKT**

L'EGFR autrement dit HER1 est un récepteur transmembranaire à domaine tyrosine kinase de classe I, codé par le proto-oncogène c-erbB1. La fixation du ligand, notamment l'EGF, induit l'activation des voies RAS/MAPK et PI3K/AKT, deux voies impliquées dans l'inhibition de l'apoptose, la migration, prolifération, la survie, la régulation du cycle cellulaire, et la néo-

angiogénèse. Retrouvé muté dans son domaine tyrosine kinase, L'EGFR devient constitutivement actif de manière indépendante de son ligand provoquant ainsi une sur-activation des deux voies précédemment citées, jouant de ce fait un rôle dans la progression tumorale **(Denis Musquer M, 2012)**

- **Mutation de l'enzyme isocitrate déshydrogénase (IDH)**

Il existe deux isoformes principaux de l'enzyme, IDH cytosolique, autrement dit l'IDH-1 (chromosome 2) et IDH mitochondriale codés par le gène IDH-2 (chromosome 15). Ces enzymes catalysent la conversion de l'isocitrate en alpha-cétoglutarate dans le cycle de Krebs. Des mutations d'IDH1/2 sont observées dans les gliomes et plus fréquemment celles d'IDH1, elles sont identifiées dans 12% des glioblastomes. Ces mutations (codon 132 pour IDH-1 & codant 172 pour IDH-2), provoquent un changement de conformation du site catalytique de l'enzyme, ce qui engendre la transformation de l' $\alpha$ -Kétoglutarate ( $\alpha$ -KG) en 2-hydroxyglutarate (2HG). L'accumulation de ce dernier dans la cellule, entraîne l'activation des voies néo-angiogéniques **(Ward and Thompson, 2012)**.

- **Altération de la voie P53/MDM2/P14 ARF**

La p53 est un facteur de transcription intervenant dans le contrôle du cycle cellulaire (notamment la transition G1/S), l'apoptose et la réparation de l'ADN. Elle est activée suite à un état de stress (carence métabolique, dommage d'ADN, hypoxie...), entraînant ainsi l'expression de p21, molécule impliquée dans l'arrêt du cycle pour la réparation de l'ADN.

D'autre part, p53 permet la transcription de MDM2 qui exerce un rétrocontrôle négatif sur p53, en provoquant son ubiquitinylation et sa dégradation par voie protéasomale. D'un autre côté, la protéine p14/ARF exerce un second rétrocontrôle en inhibant MDM2 **(Chezeau L, 2015)**.

La majorité des glioblastomes présentent une altération de cette voie, elle consiste soit en des mutations de p53, des pertes de copie du gène P14/ARF ou en des surexpressions de MDM2, conduisant ainsi à une diminution drastique du transcrit de TP53, ce qui aura comme résultat, la perte de contrôle du point de transition G1/S accompagné d'une instabilité génomique importante augmentant ainsi la malignité des cellules tumorales.

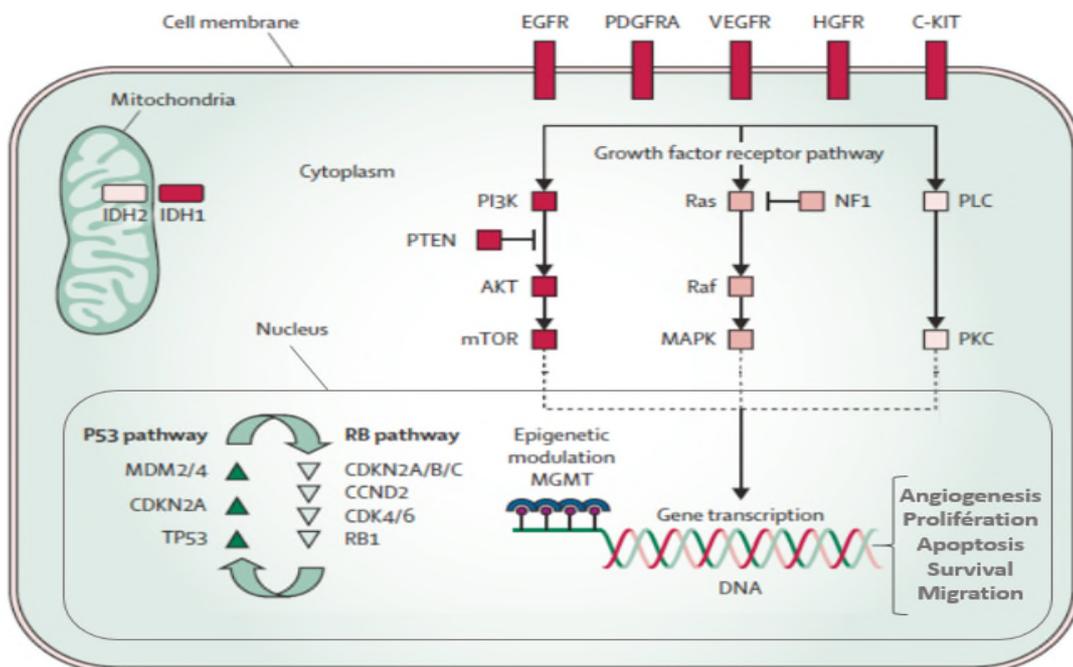
- **Altération de la voie Rb/ p16 INK4a**

Le gène suppresseur de tumeur Rb (Rétinoblastome) intervient dans le contrôle du cycle cellulaire au niveau de la transition G1/S. la protéine P16 INK4a inhibe le complexe CDK4,6/D1, le rendant ainsi incapable de phosphoryler Rb. Ce qui provoque la séquestration du facteur E2F nécessaire à l'expression des gènes des phases S. Des altérations de la voie Rb sont observées dans 78% des GBM, il peut s'agir de la perte d'expression de p16 INK4a, de la surexpression de CDK4 ou une inactivation de Rb suite à la méthylation de son promoteur (Denis Musquer M, 2012).

Il est important de noter que les altérations de ces deux voies p53 et Rb sont observés de façon concomitante dans les glioblastomes, ce qui explique le fort pouvoir prolifératif de ce sous type histologique. Sur le plan moléculaire, les profils sont différents dans les 2 types de GBM. Les proportions de quelques altérations géniques sont représentées dans le tableau ci-dessous :

**Tableau II :** Tableau récapitulatif des mutations retrouvées dans les glioblastomes primaires et secondaires.

Altération moléculaire	GBM primaire	GBM secondaire
EGFR	40%	8%
TP53	28%	65%
IDH1/2	< 10%	50-85 %



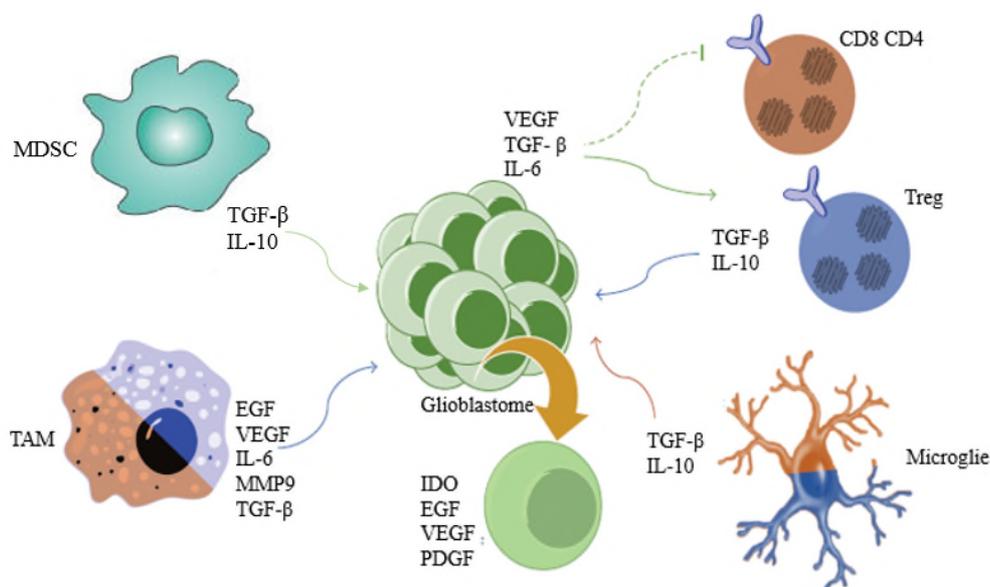
**Figure 4 :** Principales voies de signalisation impliquées dans la gliomagenèse. Figure adapté de (Darlix M, 2013).

*Comme c'est le cas pour de nombreux autres types de cancers, des voies oncogéniques largement documentées telle que la voie ras ou PI3K, sont consécutivement actives. En plus de certaines mutations de gènes caractéristiques comme IDH, ces voies aboutissent à une augmentation de l'instabilité génomique.*

#### I.2.4 Interactions moléculaires entre les cellules de glioblastomes et le microenvironnement

En plus des dérégulations génomiques, les interactions des cellules tumorales gliales (glioblastome) avec leur microenvironnement favorisent la croissance et la progression des glioblastomes, en agissant soit sur les cellules tumorales elles-mêmes ou bien par action sur les cellules immunitaires infiltrantes. En effet, on observe une diminution drastique du nombre de lymphocytes T cytotoxiques infiltrant la tumeur. Mais aussi, une augmentation du pouvoir angiogénique et invasif des cellules tumorales et cela par recrutement de diverses cellules telles que, les microglies, les lymphocytes T régulateurs (LTreg), les macrophages associés aux tumeurs (TAM) et les cellules myéloïdes suppressives (MDSC). Ainsi que la libération de cytokines et de facteurs de croissances incluant IL-6, IL-10, EGF, CSF- 1, TGF- $\beta$  et CCL2.

De plus, les cellules de glioblastomes elles-mêmes influencent ce microenvironnement par la sécrétion de certaines molécules telles que le VEGF et IDO, qui sont des molécules nécessaires à leurs progressions (Magaña-Maldonado R *et al.*, 2016).



**Figure 5 :** interactions entre les cellules de glioblastome et le microenvironnement tumoral. Figure adaptée de (Magaña-Maldonado R *et al.*, 2016).

*L'interaction des cellules du glioblastome avec les cellules immunitaires est bidirectionnelles, ce qui permet la création d'un environnement favorable à la croissance tumorale.*

L'ensemble du tissu cérébral est au contact d'un liquide particulier en l'occurrence, le liquide céphalo-rachidien (LCR), ce dernier est au contact avec l'ensemble du tissu cérébral et cela grâce à la circulation via notamment les ventricules. Dans un contexte tumoral, les facteurs de croissance et les cytokines influençant la progression tumorale citée précédemment, semble être retrouvé au niveau du LCR. En effet, de nombreuses et récentes études (**Khwaja W *et al.*, 2007**) montrent une différence quantitative et qualitative de la composition protéique du LCR dans un contexte tumoral ou non tumoral, certaines de ces études montrent même la présence d'ADN tumoral au niveau du LCR de patients atteints de gliomes (**Wang Y *et al.*, 2015**).

### **I.2.5 Etiologie et facteurs de risque des glioblastomes**

Le développement des tumeurs est lié à certain facteurs intrinsèques et extrinsèques, néanmoins dans le cas des tumeurs cérébrales ces facteurs sont mal établis. En effet seuls certains syndromes de prédisposition génétique sont reconnus comme facteurs de risque intrinsèque. Parmi ces syndromes certains sont associés au développement des gliomes : Neurofibromatose de type I et II, le syndrome de turcot et le syndrome de Li-Fraumeni. Alors que pour les facteurs extrinsèques, l'exposition aux radiations ionisantes est parmi les rares facteurs environnementaux prouvés comme risque des gliomes (**Davis M.E, 2016**).

D'autres facteurs de risque environnementaux sont actuellement débattus concernant leur implication dans l'apparition des tumeurs cérébrales, tels que les radiations non ionisantes (champs électromagnétiques), les infections virale (CMV) et les agents chimiques comme les pesticides (**A. Benouach-Amiel *et al.*, 2014**).

## **I.3 Les pesticides**

On considère comme pesticides autrement appelés produits phytosanitaires toute substance chimique dotée de propriétés toxicologiques, utilisées pour la prévention, le contrôle ou l'élimination d'organismes considérés indésirables (plantes, animaux, insectes, champignons ou bactéries). Ils sont utilisés dans différents domaines (Hygiène publique, la désinfection...) et de façon plus importante dans le domaine agricole (**Batsch D, 2011**).

### **I.3.1 Classification des pesticides**

Les pesticides sont classés en fonction de leurs modes d'action ou en fonction de leurs structures chimiques.

- **Classification selon leurs modes d'action**

Dans cette classification, les pesticides sont répartis selon la nature de l'organisme cible correspondant. On distingue principalement trois grandes familles, les herbicides, les insecticides et les fongicides.

- **Les herbicides** : sont des pesticides destinés à éliminer les végétaux indésirables ou réduire la croissance des adventices.
- **Les insecticides** : sont des produits consacrés à éliminer les insectes nuisibles, ils interviennent en les éliminant ou en empêchant leurs reproductions.
- **Les fongicides** : sont conçus pour lutter contre les champignons parasites des végétaux (ERRAMI M, 2012).

- **Classification selon leurs structures chimiques :**

En tenant compte de la nature chimique de la substance active qui compose majoritairement les pesticides, cette classification regroupe de nombreuses familles. Les plus répandues sont les organochlorées, organophosphorées, les carbamates et les pyréthroides. Nous développerons dans cette partie que les organochlorés et organophosphorés, classes auxquelles appartiennent les pesticides étudiés dans notre travail.

- **Les pesticides organochlorés (OCs)**

Les organochlorés sont des composés organiques de hauts poids moléculaires (290-545 g/mol) avec des structures variées, mais possèdent tous en commun un ou plusieurs atomes de chlore (Cl). Les OC sont caractérisés par une faible solubilité dans l'eau, mais sont potentiellement solubles dans les solvants organiques. De plus, ils sont résistants à la dégradation (biologique et chimique) ce qui conduit à leurs persistances et leurs accumulations dans les sols (plus de 10 ans) provoquant de ce fait la contamination des autres compartiments de l'environnement ainsi que la chaîne trophique.

En plus du caractère lipophile, les organochlorés présentent un fort pouvoir bioaccumulatif, ce qui explique leur prédominance dans les tissus riches en graisse des organismes vivants (foie, tissu adipeux). Ils sont considérés comme des insecticides systémiques (pénètrent profondément les tissus de l'organisme cible) qui altèrent le fonctionnement des canaux sodiques essentiels à la transmission de l'influx nerveux (Savary C, 2014).

➤ **Les pesticides organophosphorés (OPs) :**

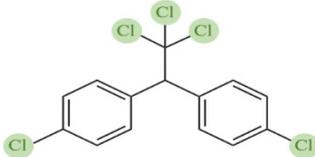
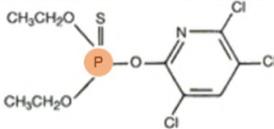
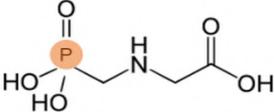
Les OP sont des composés organiques possédant au moins un atome de phosphore (P). Ce sont des insecticides qui ont en commun un mode d'action sur le système nerveux en inhibant l'acétylcholinestérase. Bien que ces pesticides ont une persistance limitée dans l'environnement, ils présentent néanmoins une toxicité aigüe plus élevée plus que les OCs (Savary C, 2014).

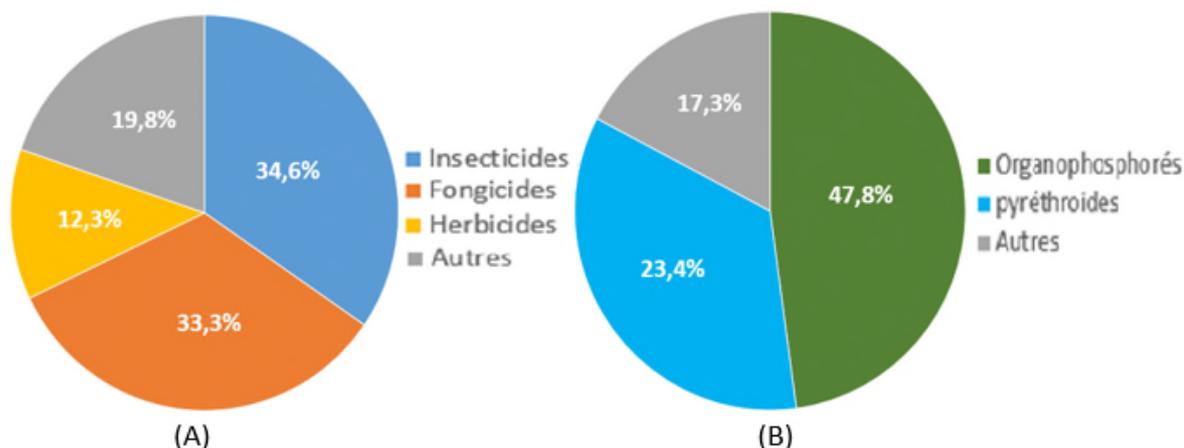
Des exemples de pesticides ainsi que les structures chimiques caractéristiques de chacune de ces deux familles sont représentés dans le **Tableau III**.

L'usage des pesticides est en constante augmentation dans le monde, L'Algérie est l'un des pays qui consomme le plus de pesticides (importation en moyenne de 8827 tonnes de pesticides/an). D'après l'étude menée par KHEDDAM (Keddam-Benadja N, 2012), la majorité des pesticides employés dans notre pays sont des insecticides suivie de fongicide et d'herbicides. Toutefois, la catégorie d'insecticides la plus utilisée en tenant compte du groupement chimique est celle des organophosphorés (**Figure6**).

L'utilisation des insecticides organochlorés est interdite dans la majorité des pays y compris l'Algérie (1966), malgré cette interdiction, les produits de dégradation pourraient avoir des impacts sur l'homme et l'environnement (Keddam-Benadja N, 2012).

**Tableau III** : Classification des pesticides selon leurs groupements chimiques.

Familles	Structures chimiques		Produits de dégradation
Organochlorés (OCs)	DDT (Insecticide)		DDE/DDD
Organophosphorés (OPs)	Chlorpyrifos (Insecticides)		TCP
	Glyphosate (Herbicide)		AMPA



**Figure 6 :** Répartition des pesticides utilisés en Algérie.

*Les pesticides les plus utilisés en Algérie sont des insecticides, (A) notamment ceux appartenant à la famille des organophosphorés (B).*

### 1.3.2 Les effets néfastes dans l'utilisation des pesticides

Bien que l'utilisation des pesticides ait apporté de nombreux avantages dans les domaines agricoles, sanitaires et industriels. Toutefois ces substances présentent des effets néfastes sur l'environnement ainsi que sur des espèces non ciblées y compris l'homme.

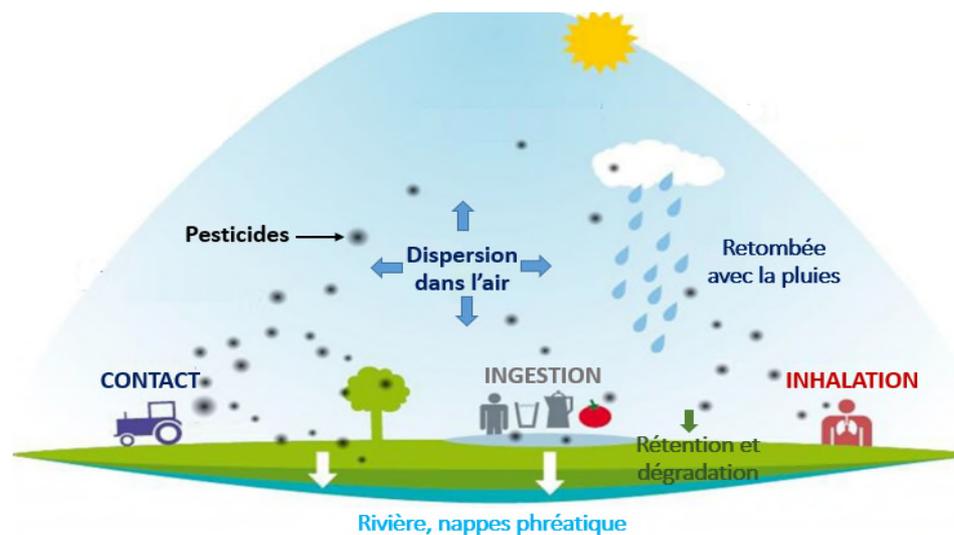
#### 1.3.2.1 Risques environnementaux

Les pesticides sont largement utilisés depuis plusieurs années, Ce qui a conduit à leur dispersion et accumulation dans tous les milieux de l'environnement, cette accumulation à un impact sur ce dernier en polluant ces différents compartiments (le sol, l'air, l'eau.) mais aussi en contaminant les fruits et légumes, Comme ils présentent aussi un impact sur les animaux (Figure7)

#### 1.3.2.2 Risque sur la santé humaine

La population humaine est exposée par différentes voies (inhalation, absorption cutanée ou ingestion) à des mélanges de pesticides à faibles doses et pendant une longue durée, via les différentes sources de contamination. Cette exposition semble avoir des effets néfastes sur la santé humaine, mais cela reste toujours un sujet à controverse. Toutefois des études démontrent l'effet des pesticides sur l'homme notamment, sur la reproduction (infertilité), le tissu hépatique (hépatotoxicité), le système nerveux (troubles neurologiques), système immunitaire et pathologies néoplasiques (Savary C, 2014).

Les mécanismes cellulaires et moléculaires liés à ces pathologies suite à l'exposition à certains pesticides ne sont pas actuellement bien établis. Toutefois certains modes d'action de ces substances, tels que des dommages sur ADN (effet génotoxique) ainsi que des perturbations de certaines voies de signalisation (effet non génotoxique) semble être lié à des altérations du système immunitaire et l'induction de certains processus de cancérisation. La plupart de ces troubles sont induits par des insecticides et des herbicides, notamment les organophosphorés et les organochlorés (Mostafalou and Abdollahi, 2017).



**Figure 7 :** Représentation des différentes sources de contamination environnementales et voie d'exposition aux pesticides.

*Les pesticides présentent des effets néfastes sur la population humaine suite à la contamination de l'environnement*

### 1.3.3 Effets immunotoxiques et cancérigènes des pesticides

#### 1.3.3.1 Effets immunotoxiques

L'effet immunotoxique des pesticides se présente en général soit par une immunostimulation (hypersensibilité, maladies auto-immunes) ou une immunosuppression. Celle-ci conduit à la diminution de la réponse immunitaire, augmentant ainsi la sensibilité aux infections et développement de certains cancers (Merlet-Billon M *et al.*, 2012). Parmi ces pesticides nous citons la famille des organochlorés et organophosphorés.

- **Pesticides Organochlorés**

Les pesticides organochlorés modulent le système immunitaire par l'inhibition de certaines fonctions des macrophages et des lymphocytes ainsi que par diminution du nombre de basophiles et lymphocytes. Le DDT l'un des pesticides OC les plus utilisés, cible les cellules NK humaines

soit en altérant leur fonction lytique ou leur capacité de fixation aux cellules cibles (cellules tumorales), et cela par diminution de l'expression des marqueurs CD16 et CD56 respectivement.

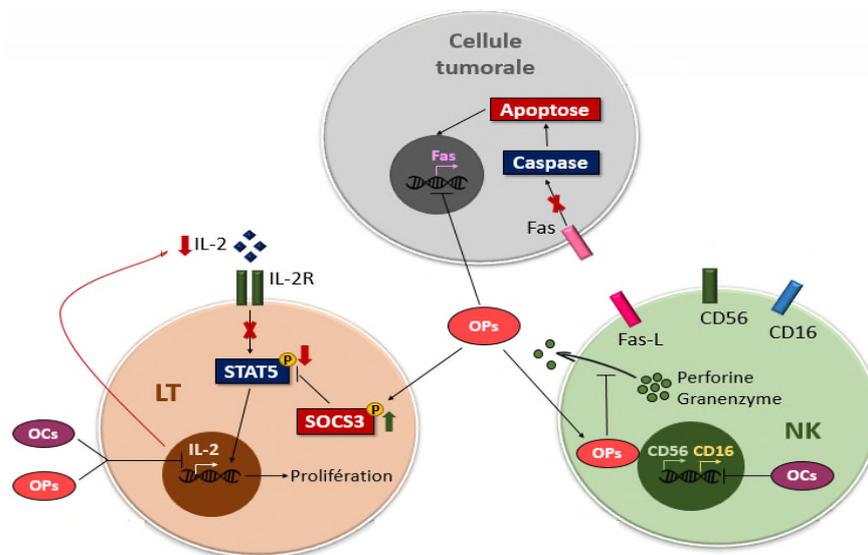
D'autre part ce pesticide provoque la diminution d'IL-2, cytokine clé pour la stimulation du système immunitaire (**Hurd-Brown T *et al.*, 2013**).

- **Pesticides Organophosphorés**

Des études démontrent que les pesticides organophosphorés affectent le système immunitaire par diminution du pourcentage de lymphocytes, de monocytes et de basophiles ou par altération de l'activité des cellules NK, d'une part en diminuant leur activité cytolytique (diminution de l'exocytose des granules) et d'autre part en réduisant les signaux proapoptotiques des cellules cibles (cellule tumorale) par altération de la voie de Fas/FasL. De plus ces pesticides ciblent la voie STAT nécessaire à la prolifération des cellules immunitaires et ceci par deux mécanismes, soit en réduisant la sécrétion d'IL-2, modifiant ainsi la signalisation via l'IL-2R et donc l'état de phosphorylation de STAT5, soit en augmentant la phosphorylation de SOCS3 qui agit sur l'inhibition de la phosphorylation de STAT5 (**Díaz-Resendiz K.J.G *et al.*, 2015**).

En outre, des études montrent que les immunoglobulines sont altérées par les OP. En effet, il a été publié que le chlorpyrifos diminue la concentration des IgM (**Díaz-Resendiz, K.J.G., and Girón-Pérez, M.I, 2014**). De plus ce pesticide induit l'apoptose et la nécrose des cellules lymphocytaires.

Les pesticides autrement dit perturbateurs endocriniens, peuvent moduler l'immunité par une action indirecte, en affectant d'autres systèmes dont le système endocrinien.



**Figure 8 :** Mécanismes d'immunotoxicité des pesticides organochlorés et organophosphorés.

*Agissant principalement par blocage de l'expression génique de molécule importante dans la réponse immunitaire comme c'est le cas pour l'IL-2, CD16 ou CD56, les pesticides induisent une baisse de l'efficacité de la réponse immunitaire.*

### **I.3.3.2 Effets cancérigènes**

Des études épidémiologiques, montrent une corrélation positive entre l'exposition aux pesticides et le risque de développement des cancers, tel que le lymphome non hodgkinien (LNH), les leucémies et les tumeurs cérébrales. En effet, plusieurs pesticides présentent des propriétés génotoxique et épigénétiques qui sont associées aux processus de cancérogénicité, ceci à mener le CIRC à les intégrer dans le tableau d'indication de cancérogénicité (**Annexe 1**). Parmi les pesticides figurant dans ce tableau, on cite le glyphosate et le DDT qui appartiennent au groupe 2A, ainsi que le chlorpyrifos qui appartient au groupe trois (**Guha N *et al.*, 2016**).

Certains pesticides sont impliqués dans la cancérogénèse, en entraînant la surexpression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL conduisant ainsi à l'inhibition de l'apoptose des cellules, suivi d'une perturbation de l'autophagie, ce qui favorise une mort cellulaire par nécrose. Ce phénomène va créer un processus inflammatoire qui va être en faveur du développement tumoral (**Zucchini N *et al.*, 2005**). D'un autre côté, ces pesticides favorisent la progression tumorale d'une part, en augmentant l'expression du gène MDM2 et en réduisant l'expression de p53. D'autre part, en augmentant la transcription de la cycline D1, ainsi que le facteur de transcription E2F et en maintenant une phosphorylation continue de la protéine Rb, favorisant ainsi une prolifération des cellules tumorales. De plus, ces produits phytosanitaires provoquent la surexpression du facteur de croissance VEGF, molécule clé pour la néo-angiogenèse (**Nahta R *et al.*, 2015**).

Afin d'évaluer la relation entre l'exposition aux pesticides et l'initiation et/ou la progression des tumeurs cérébrales, nous allons réaliser une xénogreffe d'amas cellulaire de glioblastome humain dans des souris immunocompétentes prétraitées avec un mélange de pesticides largement utilisés en Algérie

# **1 MATERIELS ET METHODES**

## II.1 Matériels

### II.1.1 Matériels biologiques

#### II.1.1.1 Modèles animaux

Pour l'étude *in vivo* nous avons utilisé des souris mâles et femelles de souche albinos BALB/c consanguines, âgées de quatre à huit semaines fournies par l'institut pasteur d'Alger (**Annexe 2**). Gardées au niveau de l'animalerie du laboratoire de génie biologique des cancers (GBC) sis au campus d'aboudaou, sous des conditions contrôlées avec une température de 25°C, une humidité constante et un cycle de luminosité/obscurité de 12h/12h. Dans les cages de polypropylène les souris, ont un accès libre à l'eau et à la nourriture (croquettes, Ets ONAB El Kseur, Bejaia) dont la composition est citée dans l'**Annexe 3**. La litière (sciure) est renouvelée quotidiennement. Une période de 15 jours est respectée entre la récupération des souris et le début des expérimentations.



**Figure 9** : Photographie des souris dans l'animalerie de laboratoire GBC.

*Les souris sont gardées dans les cages en polypropylène sous des conditions contrôlées et un accès libre à l'eau et à la nourriture*

#### II.1.1.2 Tissus tumoraux

Les cellules tumorales utilisées lors de la xénogreffe correspondent à un fragment tissulaire de type tumoral et plus précisément à un glioblastome récupéré suite à une exérèse sur un patient de sexe male âgé de 74 ans, opéré au niveau du service de neurochirurgie du CHU de Bejaia.

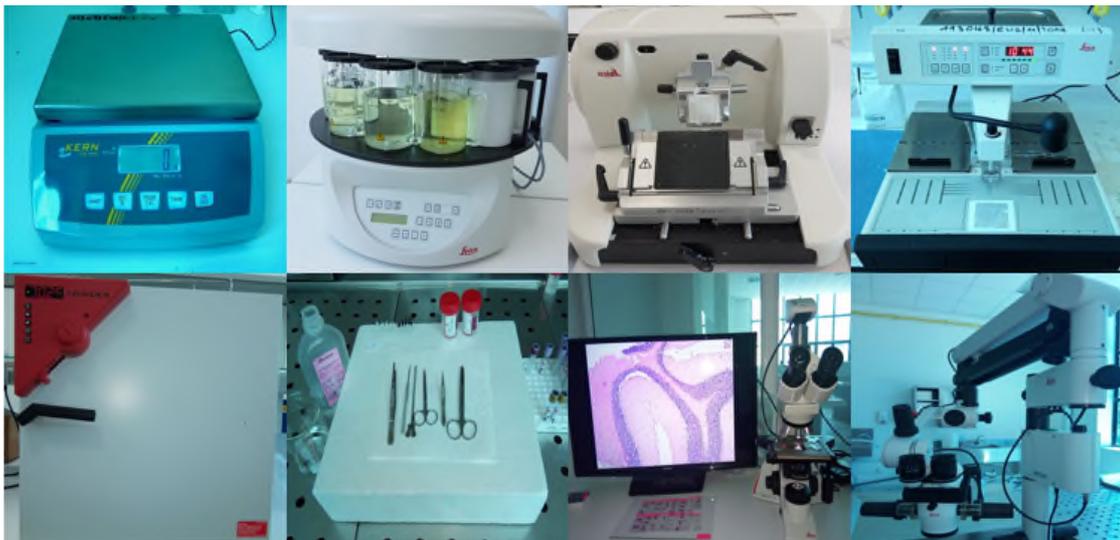
#### II.1.1.3 Liquides biologiques

Deux liquides biologiques furent utilisés dans notre étude, un LCR d'un patient âgé de 24 ans atteint d'un glioblastome et un LCR d'hydrocéphalie d'un enfant âgé de 8 mois. Ces deux

liquides biologiques sont récupérés en peropérateur au niveau du service de neurochirurgie du CHU de Bejaia. Les échantillons sont recueillis dans des flacons stériles et conservé à 4°C.

- **Instrumentation**

Spectrophotomètre UV visible, Balance, Centrifugeuse, seringue G27, boîtes de pétri, Scalpel, automate de déshydratation, microtome, étuve, station d'enrobage, histocassettes, matériels de dissection et un microscope de dissection.



**Figure 10** : Photo des instrumentations utilisées.

## II.1.2 Matériels chimiques

Le souris ont reçus un mélange de pesticides constitué De : DDT/Glyphosate/Chlorpyrifos. Nous disposons d'une solution commerciale de glyphosate et de chlorpyrifos à une concentration de 480 g/l et du DDT sous forme de poudre.

## II.2 Méthodes

### II.2.1 Préparation du mélange de pesticides

Des solutions mères à 10g/l sont préparées à partir des solutions commerciales des pesticides (glyphosate, chlorpyrifos). Pour cela nous avons mélangé 10,5ml du pesticide commercial dans 489,5 d'eau physiologique stérile (NaCl 0.9%). Alors que pour le DDT une dissolution préalable de la poudre dans de l'éther est nécessaire, puis le même procédé est effectué pour la préparation de la solution 10g/l.

A partir de cette solution mère de 10g/l nous avons effectué des dilutions au 1/8 de la DL50 pour chacun des pesticides glyphosate, chlorpyrifos et une dilution au 1/112 pour le DDT afin de préparer des solutions filles à injecter aux souris selon leurs poids (**Figure11**).

En ce qui concerne les DL50 des pesticides nous nous sommes référés aux données de la littérature. Celles-ci sont représentées dans le tableau ci-dessous.

**Tableau IV** : Représentation des DL50 et les doses des pesticides utilisés.

Pesticides	Glyphosate	Chlorpyrifos	DDT
DL50	130mg/kg	192mg/kg	77mg/kg
Doses utilisées	16,25mg/kg	24mg/kg	0,68mg/kg



**Figure 11** : Les différentes solutions du mélange de pesticides selon le poids des souris

*Les solutions du mélange de pesticides à injecté aux souris sont préparé selon les poids des souris compris entre 30 et 39g.*

## II.2.2 Analyses quantitative des protéines du LCR

Il existe différentes méthodes pour le dosage des protéines, les plus utilisées sont la méthode de Lowry, biuret et la méthode de Bradford. Pour la détermination de la concentration protéique de notre échantillon nous avons opté pour la méthode de Bradford en raison de sa sensibilité et sa facilité de manipulation.

### II.2.2.1 Méthode de Bradford

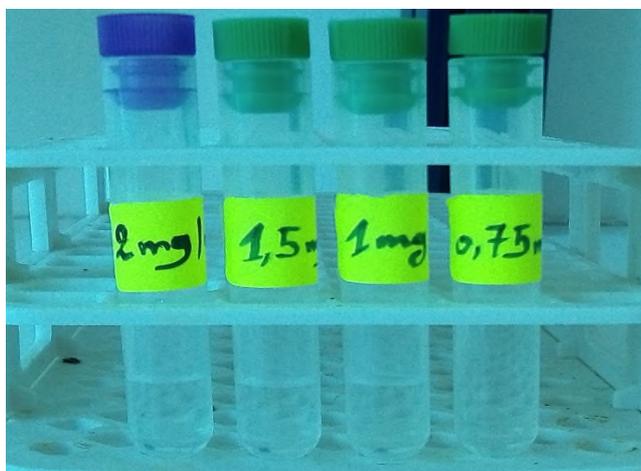
La méthode de Bradford est une méthode quantitative basée sur un dosage colorimétrique au bleu de coomassie G250. Une fois ce pigment complexé aux protéines présentes en solution, sa longueur d'onde d'absorbance maximale est déplacée de 465 nm à 595nm avec un changement de couleur du marron au bleu, ce changement est proportionnel à la concentration en protéine de l'échantillon (**Bradford MM, 1976**). Pour la réalisation de cette méthode nous avons besoin de :

- L'échantillon dont on veut déterminer la concentration en protéines (LCR glioblastome)
- Une solution de BSA prise comme protéine de référence pour la constitution d'une gamme étalon
- Réactif de Bradford pour le dosage des protéines. Sa composition est décrite dans l'**Annexe 4**.
- **Préparation des échantillons**

Le LCR est centrifugé à 3000 rpm pendant 10min.

- **Réalisation de la gamme d'étalonnage :**

Une solution mère de BSA à 2mg/ml est préparée, à partir de celle-ci nous avons effectué des dilutions limites pour obtenir la gamme étalon avec des concentrations connu en protéines (**Figure12**).



**Figure 12** : les différentes concentrations de la gamme étalon utilisées.

Un mélange protéique (BSA ou l'échantillon) est dilué au 1/30 dans le réactif de Bradford. Une incubation de 20-30 min à l'obscurité est respectée pour chaque mélange. Ensuite une analyse par spectrophotométrie est réalisée à une longueur d'onde  $\lambda = 599\text{nm}$  (longueur d'onde déduite à partir du balayage réalisé sur le réactif de Bradford préparé pour l'étude).

### II.2.3 Test in vivo

En fonction d'injection de pesticide et du LCR, Les souris sont réparties en quatre groupes dont chacun est constitué de six souris. Les groupes sont comme suit :

**Groupe I** : pesticides + / LCR + /xénogreffe +

**Groupe II** : pesticides + / LCR - /xénogreffe +

**Groupe III** : pesticides - /LCR +/xénogreffe +

**Groupe IV** : pesticides - / LCR - / xénogreffe +

#### II.2.3.1 Administration des pesticides

Plusieurs voies d'administration de pesticides sont possibles telles que, la voie orale, intraveineuse, la voie sous-cutanée et la voie intrapéritonéale. Dans le but d'une meilleure disponibilité des pesticides au niveau de l'organisme, la voie d'administration choisie dans notre étude est la voie intrapéritonéale (i.p).Ainsi dans notre expérimentation, les deux groupes I et II ont reçus des injections de mélange de pesticides (précédemment expliqué) avec un volume de 400ul par voie intrapéritonéale. Les groupes trois et quatre ont reçu le même procédé expérimental, mais avec remplacements des pesticides par de l'eau physiologiques stérile (NaCl 0,9%).

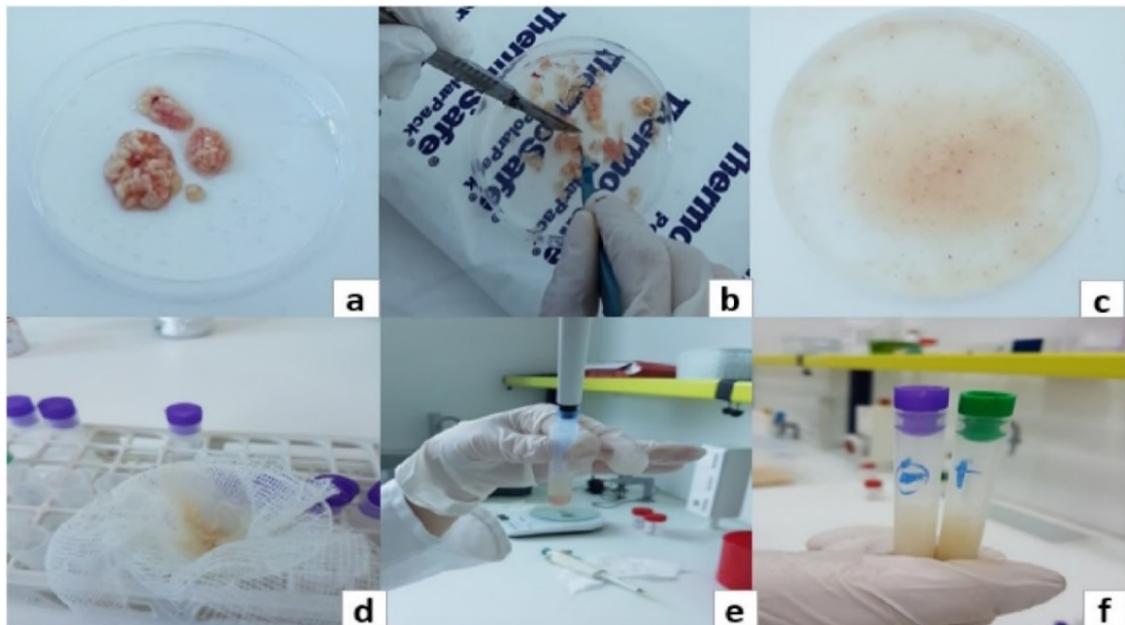
Il est important de noter que lors de nos injections réalisées chaque trois jours durant l'ensemble de notre expérimentation, nous avons alterné les sites d'injections entre le côté droit et gauche.

#### II.2.3.2 Xénogreffe de celles de glioblastome

Afin d'évaluer l'effet du mélange de pesticides sur la progression et/ou l'initiation des tumeurs cérébrales, nous avons effectué des greffes de cellules tumorales par injection sous cutanée au niveau du flanc droit des quatre groupes de souris préalablement cités. La xénogreffe a été effectuée trois semaines post-traitement avec les pesticides. Les modalités de dissection et préparation de la suspension cellulaire à injecter sont les suivantes :

- **Préparation des cellules de glioblastome**
  - La dissection mécanique du fragment tumoral est réalisée dans une boite de pétri contenant de l'EDTA à 0,25M (EDTA 0,5M + eau physiologique/pénicilline) et disséqué mécaniquement à l'aide d'un bistouri.
  - Incubation pendant 30-40 min à une température ambiante.

- Reprise de la dissection jusqu'à obtention d'amas cellulaire homogène.
- Transfert de la suspension dans des tubes, Centrifugation à 3000 rpm pendant 10min et récupération du culot
- Reprise de la dissection du culot dans une solution d'EDTA à 0,5M.
- Filtration à l'aide d'un entonnoir en verre et de la bande à gaz.
- Centrifugation à 3000 rpm pendant 5min.
- Récupération du culot et resuspension dans de l'eau physiologique.
- Distribution de la suspension cellulaire avec un volume égale dans deux tubes
- Centrifugation à 2000 rpm pendant 5min.
- Récupération du culot et resuspension des cellules dans les deux tubes, l'un avec du LCR tumoral et l'autre avec du LCR non tumoral.



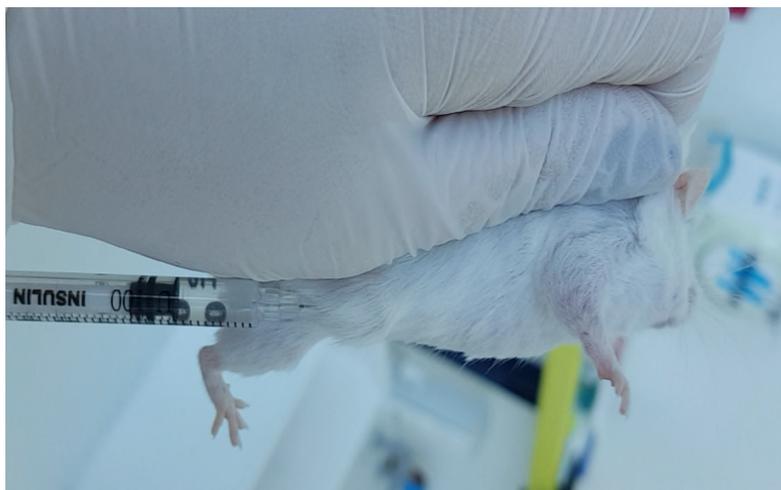
**Figure13** : Etapes de préparation de la suspension cellulaire de glioblastome.

(a) dépôt du fragment tumoral, (b) dissection mécanique, (c) homogénéisation, (d) filtration, (e) resuspension, (f) suspension cellulaire finale

- **Réalisation des xénogreffes de cellules de glioblastome**

Une fois les suspensions cellulaires prêtes, les quatre groupes de souris ont reçus à l'aide d'une seringue G27, un volume de 150ul contenant  $10^{E07}$  cellules. Il est à noter que le site d'injection est désinfecté avant chaque injection et la seringue est changée après chaque usage.

Le traitement des souris avec le mélange de pesticides est poursuivi Cinq jours après xénogreffe et ceci pendant un mois.



**Figure 14** : Photographie d'une démonstration de la Réalisation de la xénogreffe sous cutanée des cellules de glioblastome humain.

*Les cellules de glioblastome humain sont injectées en sous cutanée à l'aide d'une seringue G27.*

## II.2.4 Etude histologique

Après anesthésie des souris au chloroforme, une dissection est réalisée. Les cerveaux et les masses au site de la xénogreffe sont prélevés et transféré dans des flacons stériles, contenant du formol 10% et conservés à 4°C pendant 48h.

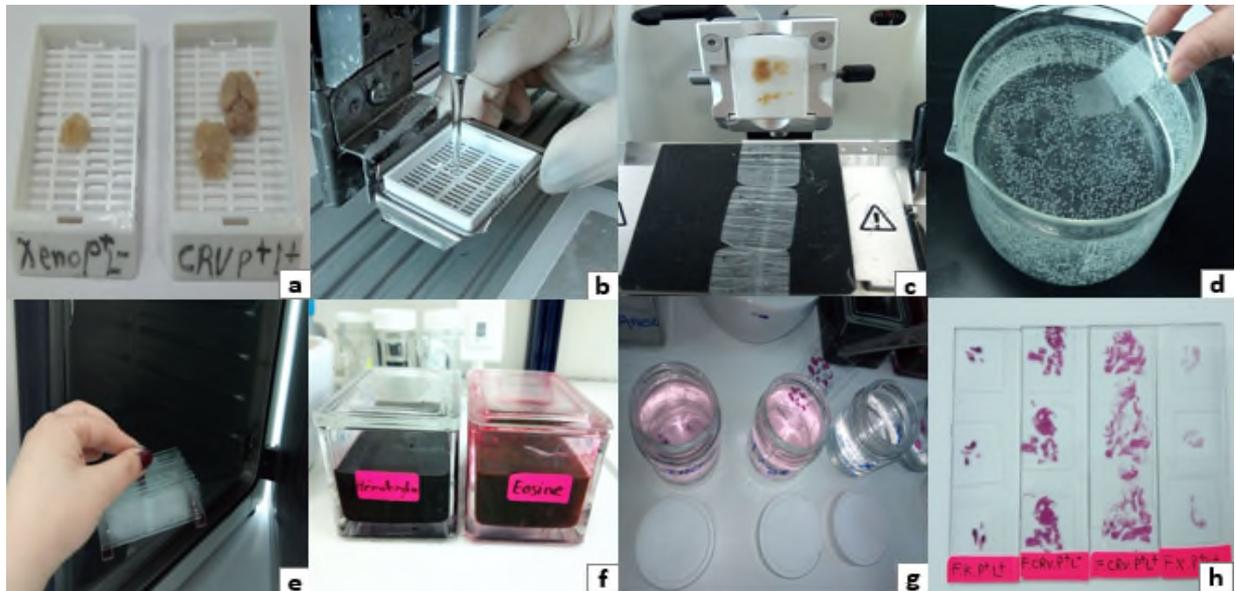
- **Traitement des prélèvements histologiques**

Les prélèvements de xénogreffes et des cerveaux sont transférés dans des histo-cassette identifiées, puis misent dans un automate de déshydratation et cela par passages successifs dans différents bains d'alcool de concentration croissante 75% 100%. Les prélèvements sont ensuite enrobés en paraffine dans une station d'enrobage.

A l'aide d'un microtome, des coupes à une épaisseur de 3µm sont effectuées, les rubans obtenus sont immergés dans un bain-marie à 69°C puis étalés sur des lames en verre, ensuite elles sont incubées à l'étuve une nuit à 70°C.

Après déparaffinage à l'étuve et par un bain de xylène (30min), les coupes sont déshydratées dans un bain d'éthanol (10min) ensuite réhydraté avec l'eau du robinet. Pour une coloration des noyaux, les coupes sont transférées dans un bain d'hématoxyline pendant 3min puis rincées à l'eau du robinet. Pour la mise en évidence du cytoplasme, une coloration par

l'éosine est réalisée (2 à 3min). Après rinçage à l'eau, les coupes ont été transférées dans trois bains contenant respectivement, l'éthanol, xylènes/éthanol, xylènes. Enfin pour une observation au microscope optique, un montage des lames est réalisé par recouvrement de celle-ci avec des lamelles en utilisant l'Eukitt.



**Figure 15 :** Etapes de réalisation des coupes histologiques.

(a) Dépôt des prélèvements dans des hostocassettes, (b) enrobage, (c) coupes au microtome, (d) étalement, (e) déparaffinage, (f) coloration, (g) bains d'alcool, (h) montage des lames.

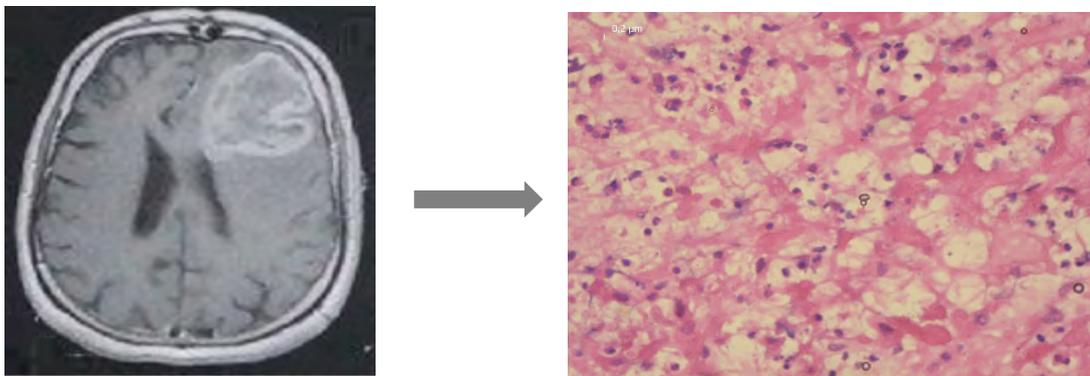
## 2 RESULTAS ET DISCUSSION

### III.1 Analyses quantitative et qualitatives du matériel biologique

#### III.1.1 IRM et aspect histologique du glioblastome

L'étude microscopique du fragment tumorale révèle la présence d'un profile mitotique élevé ainsi qu'une prolifération gliale dense hautement maligne largement nécrosée. Les cellules gliales sont sous formes indifférenciées et parfois pléomorphe. De plus ce tissu présente une prolifération endothélio-capillaire (micro-vascularisation) (**Figure 16**).

Les résultats microscopiques ainsi que les résultats d'IRM révèlent que le fragment, correspond à un glioblastome primaire (*de novo*) de siège frontal.



**Figure 16 :** Illustration de l'IRM et de la coupe histologique de glioblastome

#### III.1.2 Analyse quantitative du LCR

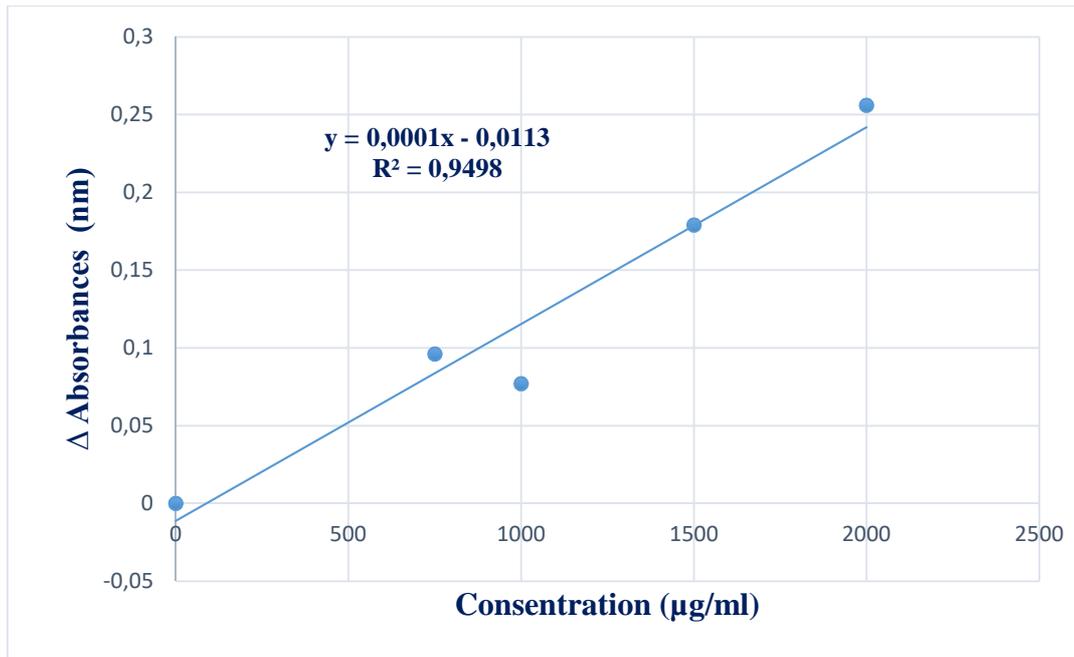
- **Courbe d'étalonnage**

La méthode de Bradford utilisant la gamme étalon et la BSA comme protéine de référence, nous permet d'obtenir des résultats d'absorbances qui sont représentés dans le **Tableau V**. Suite à ces résultats, la courbe d'étalonnage a été tracée (**Figure 17**).

**Tableau V :** Résultats d'absorbances de la gamme étalon

*La mesure des absorbances de la gamme étalon de la BSA est effectuée à une longueur d'onde  $\lambda=599\text{nm}$ .*

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	0	750	1000	1500	2000
Absorbances à $\lambda= 599 \text{ nm}$	0.835	0.931	0.912	1.014	1.091
$\Delta$ Absorbance	0	0.096	0.077	0.179	0.256



**Figure 17 :** Représentation de la courbe d’étalonnage.

*La courbe d’étalonnage est effectuée suite à la mesure des Δabsorbances de la gamme étalon de la BSA.*

La courbe d’étalonnage obtenue, montre un  $R^2=0.94$ , ce qui est synonyme d’une bonne linéarité. De ce fait, cette courbe est validée et pourra servir pour la détermination de la concentration protéique des échantillons de l’étude.

- **Concentrations protéiques des échantillons**

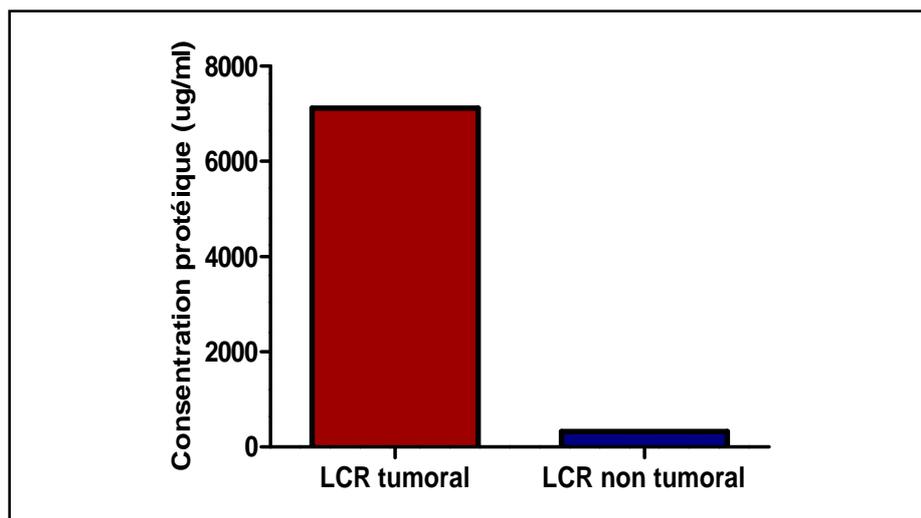
La mesure de la concentration protéique des liquides céphalo-rachidiens utilisés dans notre étude à savoir le LCR tumoral et non tumoral est effectuée dans les mêmes conditions que celle ayant permis la mesure de la courbe d’étalonnage. Ainsi, nous avons utilisé l’équation :

$Y= 0,0001X+0,0113$  (Y : Absorbance, X : Concentration) obtenue à partir de la courbe d’étalonnage, Les résultats sont représentés dans le **Tableau VI**.

**Tableau VI :** Résultats d’absorbances et concentration des échantillons

*La mesure des absorbances de la gamme étalon de la BSA est effectuée à une longueur d’onde  $\lambda=599nm$ .*

Echantillon	Absorbance (nm)	Δ Absorbance (nm)	Concentration (µg/ml)
LCR tumoral	1,558	0,723	7117
LCR non tumoral	0,879	0.044	327



**Figure 18 :** Représentation graphique des concentrations protéiques des échantillons du LCR. Les concentrations protéiques du LCR tumoral correspondant au LCR d'un patient atteint d'un glioblastome et du LCR d'un patient atteint d'hydrocéphalie, sont quantifiées par la méthode de Bradford.

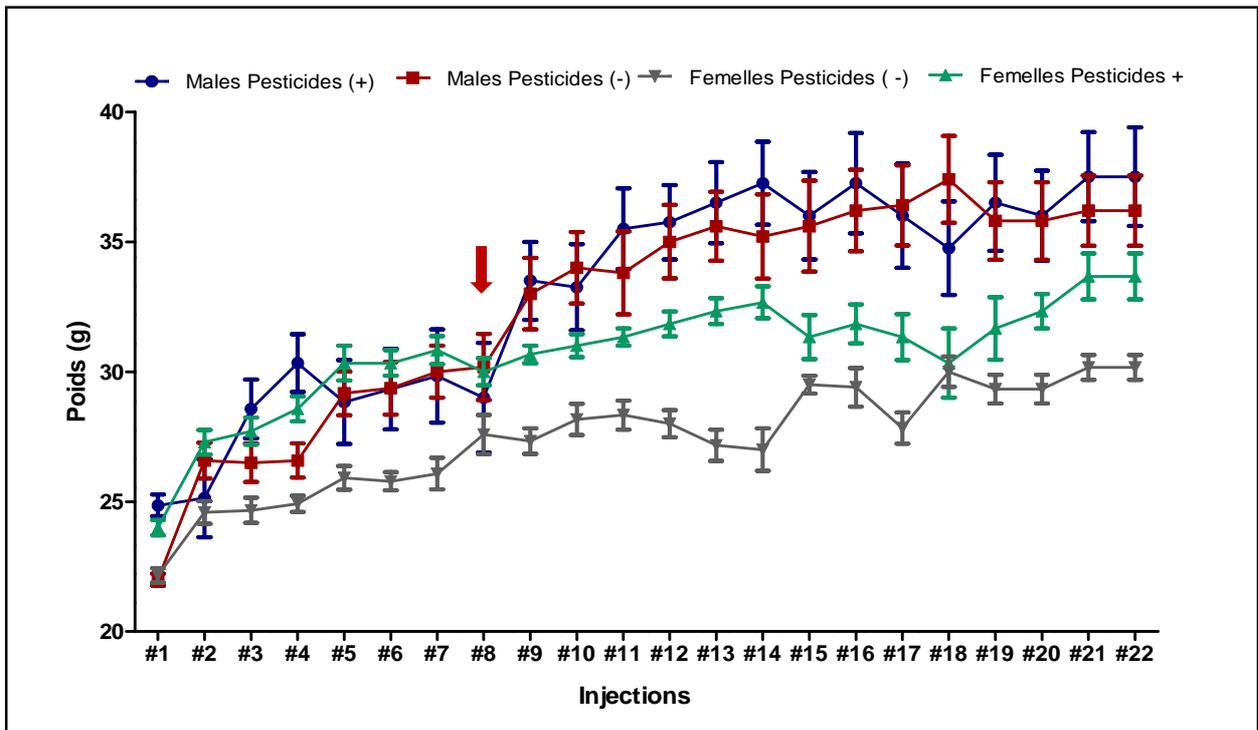
On observe la présence de protéines dans les deux échantillons. Toutefois, la concentration de ces protéines est environ 20 fois supérieures (7117  $\mu\text{g/ml}$ ) au niveau du LCR tumoral par rapport au LCR non tumoral (327  $\mu\text{g/ml}$ ).

La différence en termes de concentration protéique entre les échantillons tumoraux et non tumoraux est en accord avec les travaux antérieurs réalisés au sein du laboratoire (**Boutrid L and Hama L, 2015**). Mais aussi par rapport aux données mondiales. En effet, le LCR des sujets atteints de tumeurs cérébrales, notamment des formes les plus agressives (ex : glioblastome) sont qualitativement et quantitativement différents, avec des concentrations plus élevées et une diversité protéique plus importante, voir même la présence d'ADN tumoral (**Wang Y et al., 2015**).

## III.2 Analyse différentielle de l'état du model animal

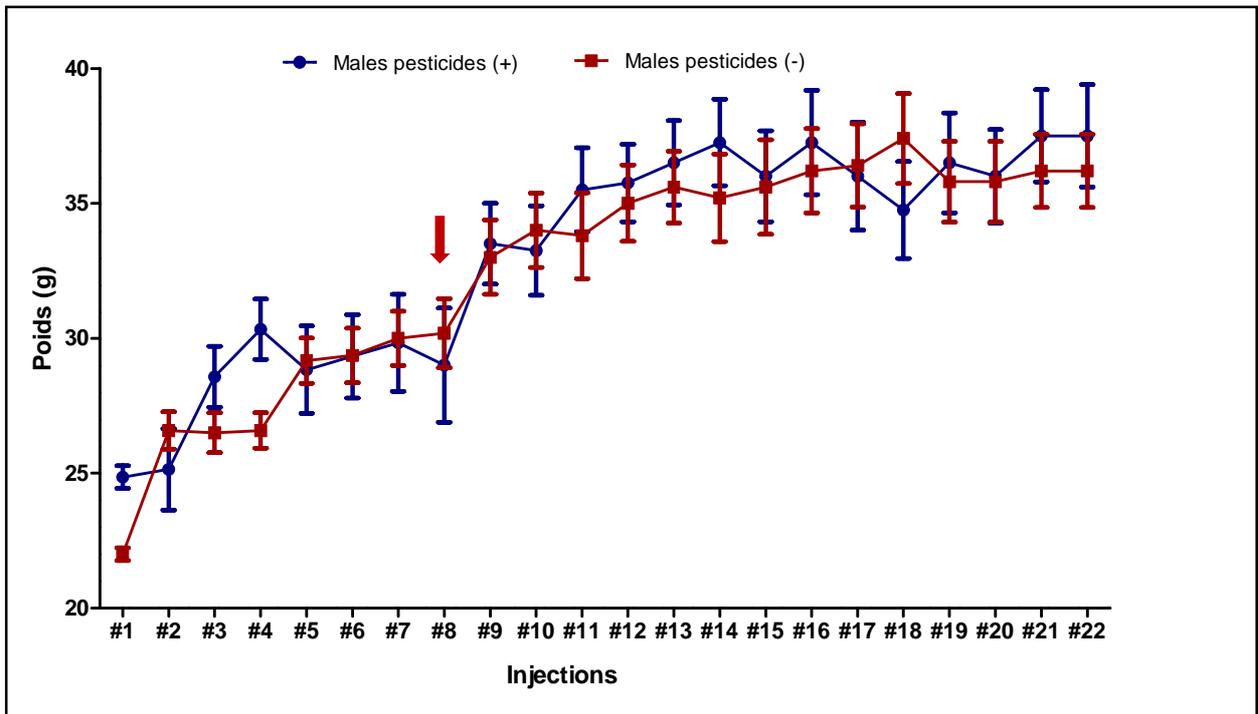
### III.2.1 Effets des pesticides sur le poids des souris

La mesure du poids des souris est réalisée chaque jour d'injection du mélange de pesticides, c'est-à-dire toute les 72heures. Cette mesure est effectuée avant l'injection, car ceci est primordial afin de calculer la dose nécessaire pour chaque souris, dose qui est exprimée en ppm (mg du composé chimique  $\times \text{kg}^{-1}$  de poids souris).



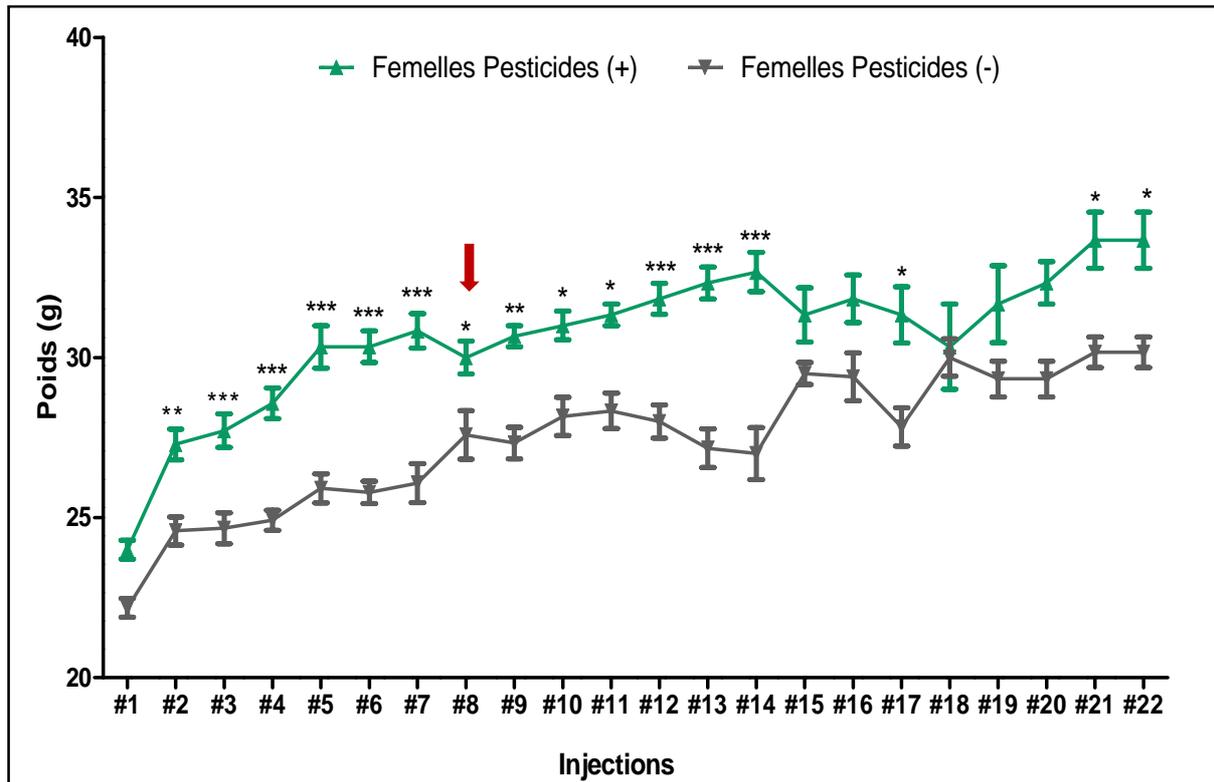
**Figure 19 :** Evolution du poids des souris témoins et souris traités aux pesticides.

La mesure des poids des souris s'effectue toute les 72h et chaque poids correspond à la moyenne de 6 souris (n=6). La flèche correspond au jour de la réalisation de la xénogreffe.



**Figure 20 :** Evolution du poids des souris males témoins et males traités aux pesticides.

La mesure des poids des souris s'effectue toute les 72h et chaque poids correspond à la moyenne de 6 souris (n=6). La flèche correspond au jour de la réalisation de la xénogreffe.



**Figure 21 :** Evolution du poids des souris femelles témoins et femelles traitées aux pesticides. La mesure des poids des souris s'effectue toute les 72h et chaque poids correspond à la moyenne de 6 souris ( $n=6$ ). La flèche correspond au jour de la réalisation de la xénogreffe. \* :  $p$ -value 0.05, \*\* :  $p$ -value 0.01, \*\*\* :  $p$ -value 0.001.

Avec des poids de 24g, 22g, 24g, 22g des groupes I, II, III, IV, respectivement. L'ensemble des souris ont au début de l'expérimentation un poids équivalent ( $p>0.05$ ).

De façon générale, sur l'ensemble de l'expérimentation, on observe une évolution positive des poids des différents groupes de souris. Cette évolution semble être différente d'un groupe à un autre. De plus, il est à noter que les mâles ont une évolution du poids plus importante par rapport aux femelles (**Figure 19**).

La prise de poids continue de l'ensemble des groupes démontre que les souris se sont acclimatées aux conditions de l'animalerie et l'acte d'injection ne semble pas perturber cette acclimatation. Le différentiel de poids entre mâle et femelle est un phénomène physiologique normal.

De façon intéressante, aucune différence significative n'est observée en termes d'évolution du poids entre les mâles traité ou non traité aux pesticides (**Figure 20**), contrairement aux femelles chez lesquelles on observe une différence significative dans l'évolution du poids ( $p<0.05$ ) (**Figure 21**). En effet, les poids des femelles traitées avec les pesticides semblent

évoluer de manière plus importante que celui des femelles non traitées, et cela dès la 2<sup>ème</sup> injection. Cette différence ne cesse d'évoluer jusqu'à trois semaines du début du traitement où on remarque une faible différence de poids entre les deux groupes de souris femelles, différence qui reste néanmoins significative ( $p < 0.05$ ). Il est important de noter que cette 8<sup>ème</sup> injection correspond au moment de la xénogreffe des cellules de glioblastome. Celles-ci ne semblent pas avoir un impact sur l'évolution des poids qui continuent à évoluer de façon significativement différente dans les deux groupes et cela jusqu'à la fin de l'expérimentation.

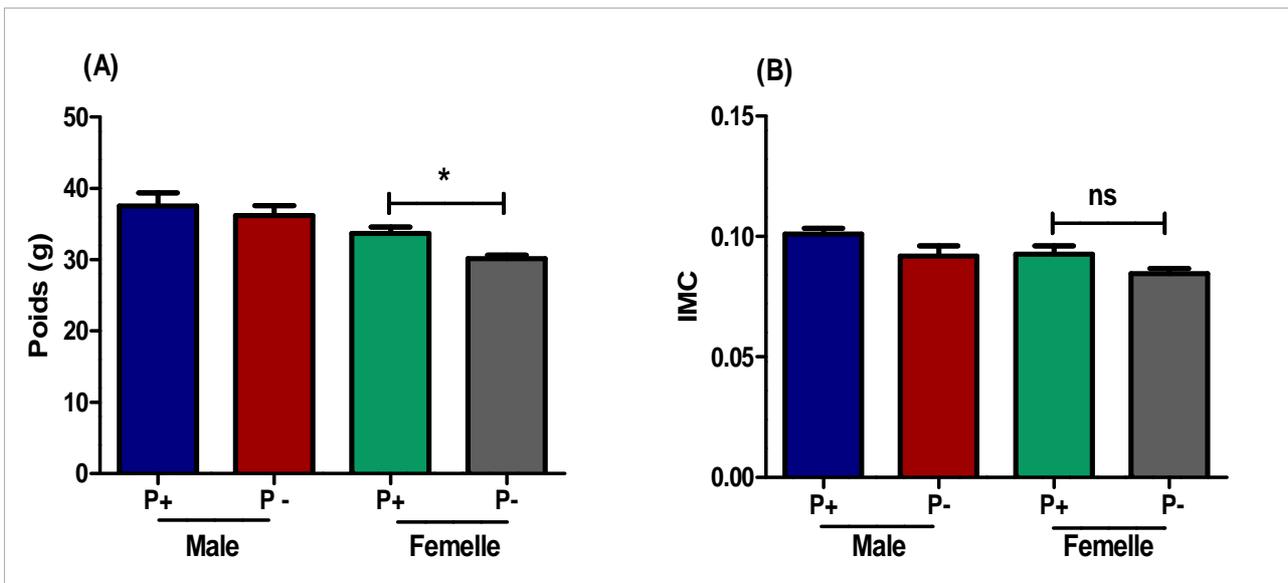
L'augmentation du poids des souris dans l'ensemble des groupes notamment chez les souris traitées aux pesticides démontre que la dose de pesticide choisie ainsi que le mode d'administration (Intrapéritonéale) ne provoque pas de toxicité aigüe.

La différence significative en faveur des femelles traités aux pesticides, semble indiquer que ces derniers induisent une toxicité tissulaire au niveau pancréatique et hépatique, ou un changement de l'homéostasie du tissu adipeux, Ce dernier se complexe avec les pesticides et change de structure influençant sa dégradation et engendrant ainsi son accumulation et cela est dû à leurs caractère lipophile. Toutefois, la non présence de différence significative dans les poids des souris males, suggèrent que le mélange de pesticide n'a pas d'effet toxique sur les tissus pancréatique et hépatique.

De plus, cette absence de significativité chez les souris males, tend à démontrer que les pesticides utilisés dans notre étude agissent comme des perturbateurs endocriniens. Notamment en dérégulant la production et la signalisation induite par les hormones femelles, notamment en agissant comme agoniste d'œstrogènes. Ces dernières, se fixe notamment au niveau des adipocyte. L'activation des RE contribuent à une augmentation du nombre d'adipocytes (**Casals-Casas C and Desvergne B, 2011**).

Il est important de noter que plusieurs études ont démontré que les pesticides se fixent sur les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR) qui jouent un rôle critique dans l'adipogenèse. La stimulation des PPAR par ces pesticides serait susceptible d'entraîner une obésité avec une activation requise de la différenciation adipocytaire et le stockage des graisses. (**Gervois P and Fruchart J.C, 2003**).

Pour mieux comprendre et confirmer si cette différence d'évolution de poids est due réellement aux perturbations endocriniennes et au métabolisme des souris, nous avons effectué une comparaison entre les poids des souris lors de la dernière injection et leurs indices de masse corporelle (IMC). Les résultats sont décrits ci-dessous :



**Figure 22** : Représentation du poids des souris lors de la dernière injection ainsi que leurs IMC.

*Une différence significative d'évolution du poids entre les femelles témoins et femelles traitées aux pesticides est enregistrée. Néanmoins, la différence entre les IMC de ces deux groupes est non significative. A : poids des souris à la dernière injection. B : : IMC des souris à la dernière injection.  $IMC = \text{poids}/\text{Taille}^2$*

La comparaison des graphes de la **Figure 22 (A & B)**, montre comme cité précédemment une différence significative d'évolution des poids entre les femelles traitées ou non aux pesticides. Toutefois, cette différence ne se retrouve plus en termes d'IMC ( $p < 0.05$ ) entre ces deux groupes, ceci confirme l'hypothèse stipulant que les pesticides agissent comme perturbateurs endocriniens et influence le métabolisme des souris femelles.

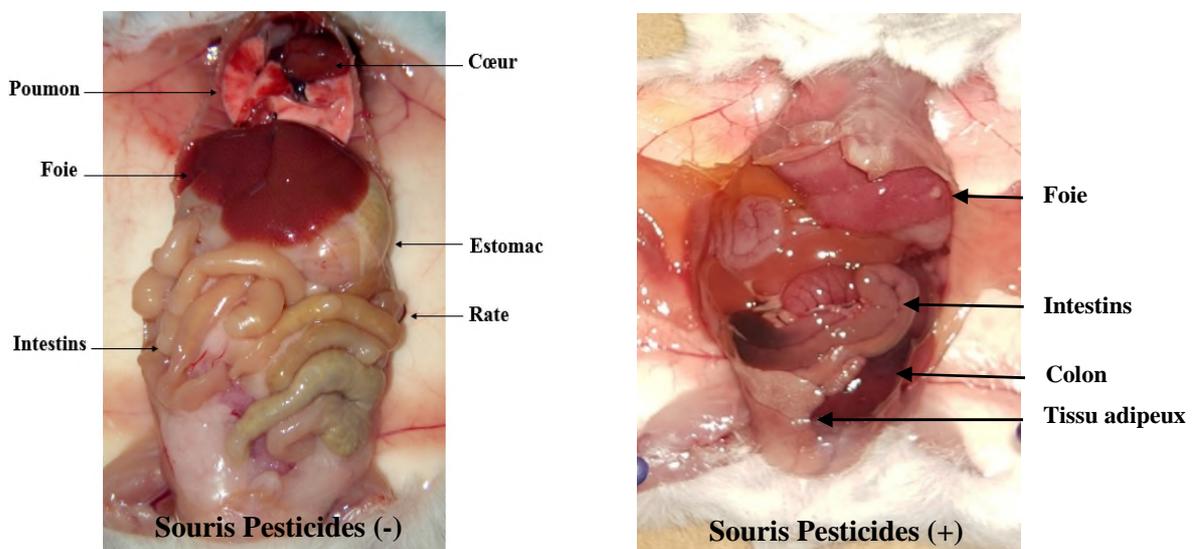
*L'analyse des poids des souris en fonction du traitement par les pesticides, montre une différence significative entre les femelles traitées ou non traitées aux pesticides. Ceci confirme l'aspect de perturbateur endocrinien et métabolique du mélange des pesticides utilisés dans notre étude.*

### III.3 Effets physiopathologiques des pesticides

#### III.3.1 Etude macroscopique des organes

Pour répondre aux conditions d'éthiques, une anesthésie au chloroforme est effectuée, afin de réaliser une dissection des souris. Une fois cette opération réalisée, une observation de l'état général des souris est effectuée. Les résultats de l'observation pour chacun des groupes (témoins & traités avec les pesticides) (**Figure 23**) sont présentés comme suite :

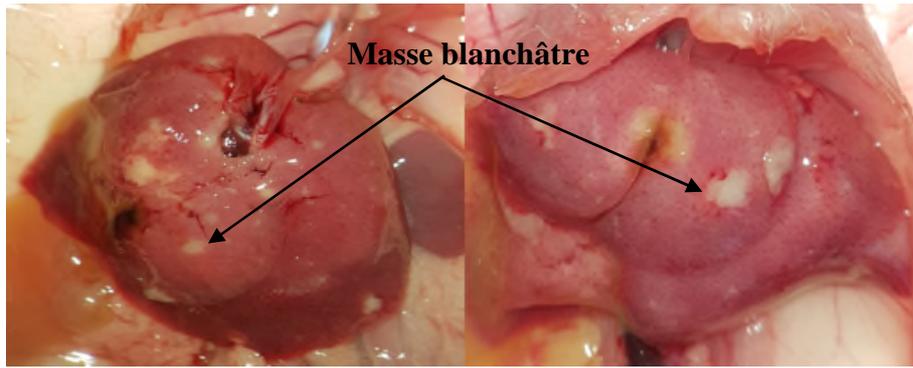
Dans l'ensemble des groupes, le péritoine des souris semble être d'aspect histologique normal et ne présente aucune anomalie. De plus, cette observation au microscope opératoire à différents grossissements ne montre aucune anomalie structurelle au niveau de l'ensemble des organes des souris témoins (**Figure 23A**). En effet, le foie est de taille normale et présente un aspect rouge brunâtre et homogène. L'ensemble de l'appareil gastro-intestinal est d'aspect normal et non inflammé. Les poumons quant à eux sont bien vascularisés avec une homogénéité tissulaire physiologique. Contrairement aux souris non-traitées, l'observation effectuée sur les souris Pesticides (+), révèle la présence d'anomalie, notamment au niveau du foie, tissu adipeux et au niveau colorectal (**Figure 23B**).



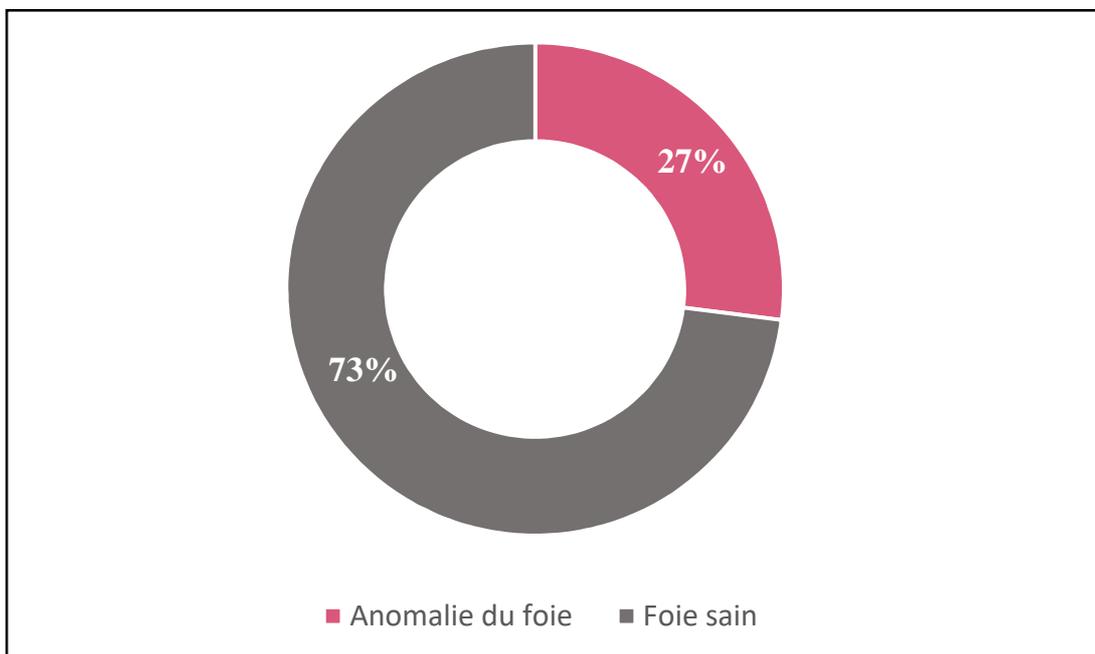
**Figure 23** : Photographie des souris témoins et souris traitées aux pesticides.

*L'observation sous microscope opératoire après sacrifice révèle des différences au niveau de l'architecture tissulaire de nombreux organes. A : souris non traitée au pesticide. B : souris traitée aux pesticides.*

Parmi les anomalies observées au sein des souris traitées, 27% présentent une masse blanchâtre au niveau du foie et une décoloration partielle ainsi qu'une hépatomégalie de ce dernier (**Figure 24 & Figure 25**). De plus, on observe une structure luisante du tissu adipeux dans 16% des souris, ainsi qu'une atteinte colorectale (mégacôlon) chez 8% des souris traitées (**Figure 26**).



**Figure 24 :** Photographie des anomalies observées au niveau du foie des souris traitées aux pesticides. Les anomalies observées se caractérisent par la présence de masses kystiques et une décoloration partielle du foie.



**Figure 25 :** Représentation des anomalies observées au niveau du foie des souris traitées aux pesticides. Les anomalies au niveau du foie sont observées chez 27% des souris traitées aux pesticides.



**Figure 26 :** Photographie des anomalies observées au niveau du tissu adipeux et colo-rectale. Les souris traitées aux pesticides présentes des anomalies au niveau du tissu adipeux et colorectal.

Le foie est le premier organe cible des pesticides. En effet, les pesticides sont catabolisés de façon principale dans le tissu hépatique, c'est pour cela que les anomalies observées montrent l'effet modulateur des pesticides sur le tissu hépatique. En effet, la décoloration de ce dernier nous renseigne sur son dysfonctionnement. Alors que les masses blanchâtres correspondent probablement à une stéatose hépatique. Autrement dit, une croissance et prolifération des adipocytes au niveau hépatique. Cette stéatose hépatique est probablement due aux effets des pesticides sur le foie. En effet, des études ont montré la relation entre l'exposition aux pesticides et le développement de stéatose hépatique (Al-Eryani L *et al.*, 2015).

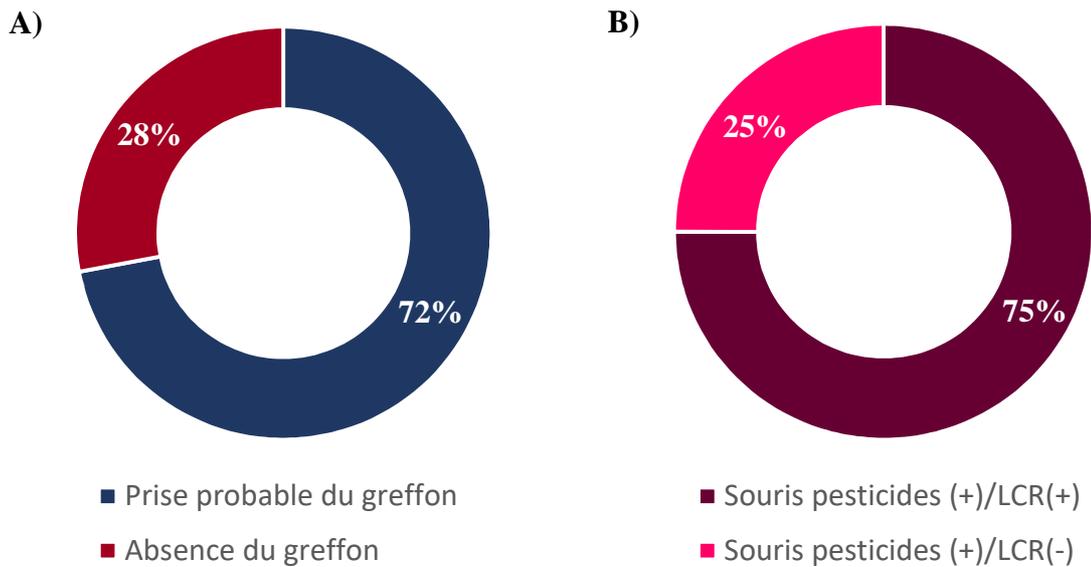
Comme nous l'avons suggéré précédemment, il s'avère que les pesticides qui sont connus pour être lipophile, se condensent au niveau du tissu adipeux, ce qui explique l'aspect luisant de ce dernier, chez nos souris. De plus, la présence d'un foyer inflammatoire notamment au niveau intestinal, est synonyme d'un dérèglement du système immunitaire causé probablement par le traitement des pesticides.

*L'injection du mélange de pesticides par voie intra-péritonéale, induit des changements structuraux au niveau de nombreux organes et principalement au niveau hépatique et colorectal. Les pesticides utilisés dans l'étude semblent être stockés au niveau du tissu adipeux et plus particulièrement du tissu adipeux abdominal. L'observation macroscopique confirme l'hypothèse selon laquelle la prise de poids significative chez les souris femelles traitées, est due à un dérèglement métabolique et hormonal associé à un effet de toxicité tissulaire modéré.*

### III.4 Impact tumorigène des pesticides

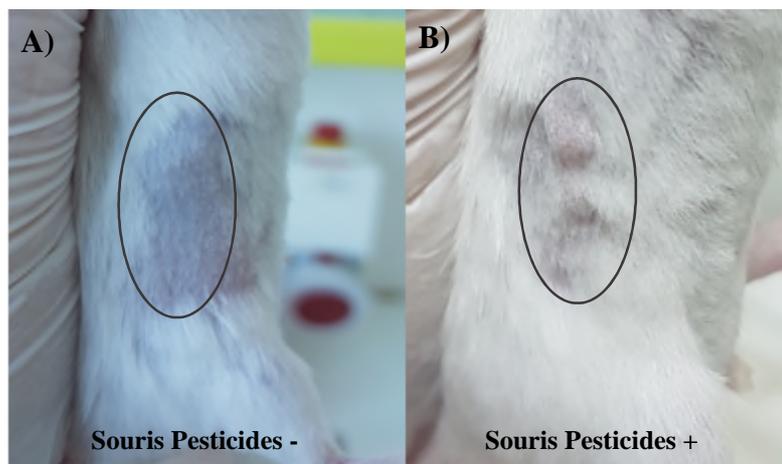
Après la réalisation de la greffe sous-cutané des cellules de glioblastome au niveau du flanc droit, le site d'injection est observé de façon quotidienne afin de contrôler la prise de la greffe. Suite à ce contrôle et après une période d'un mois, nous avons observé une prise probable du greffon dans 72% des souris traitées dont 75% sont des souris pesticides (+)/ LCR(+) et 25% sont des souris pesticides (+)/ LCR(-). Par contre, nous n'avons observé aucune prise du greffon chez les souris non traitées (Figure 27).





**Figure 27 :** Représentation de la prise probable du greffon chez les souris traitées aux pesticides.

*Prise probable du greffon dans 72% des souris traitées aux pesticides. (A) prise probable du greffon chez les souris traitées au pesticides, (B) prise probable du greffon chez les souris pesticides (+)/LCR (+), et souris pesticides (+)/LCR(-).*



**Figure 28 :** Photographie des masses observées au niveau du site de la xénogreffe.

*Photographie réalisée quatre semaines post xénogreffe. Les souris ont été rasées avant l'observation, (A) absence de masse au niveau du site de la xénogreffe chez les souris témoins, (B) présence de masse au niveau du site de la xénogreffe chez les souris traitées aux pesticides.*

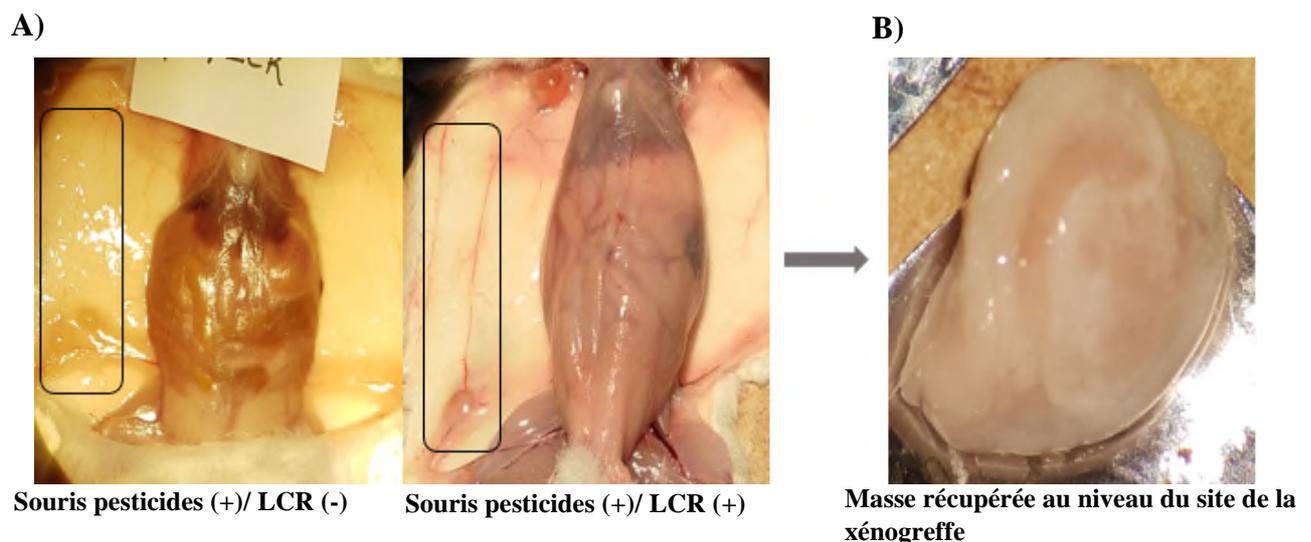
La présence d'une masse au niveau des souris qui ont reçus une greffe sous-cutanée composée d'amas cellulaires de glioblastome mis en culture avec du LCR tumoral, suggère que la prise du greffon nécessite la présence d'un microenvironnement favorable ressemblant au microenvironnement cérébral dans un contexte tumoral. En effet, comme indiqué dans la **Figure 18**, le LCR tumoral utilisé est riche en protéines, probablement des facteurs de croissance

secrétées par la tumeur elle-même, voir même l'ADN tumoral présent dans ce liquide, ce qui favorise la création d'un microenvironnement favorable à la croissance des cellules tumorale en facilitant la transition mesechymateu-epithéliale.

Toutefois, l'installation de cette niche tumorale, ne semble être possible qu'au niveau des souris traitées aux pesticides. Ceci suggère que le LCR tumoral à lui seul n'est pas suffisant pour induire la prise de la xénogreffe, mais nécessite des changements homéostatiques au niveau de l'organisme des souris receveuse. L'un des changements important c'est l'induction d'un phénomène d'immuno-modulation, permettant l'échappement des cellules tumorales au contrôle du système immunitaire ou autrement dit une perte de l'immuno-surveillance et ceci par la diminution du taux de lymphocytes, de monocytes et de basophiles ou par altération de l'activité des cellules NK (Díaz-Resendiz K.J.G *et al.*, 2015).

#### III.4.1 Etude macroscopique des masses au site de la xénogreffe

A l'aide d'un microscope opératoire, chacune des masses présentent au niveau du site de l'implantation (côté droit) a été observée. Il est à noter que les masses tissulaires observées au niveau des souris pesticides (+)/LCR(+) été entourées d'un réseau vasculaire important, comparant au site d'implantation chez les souris pesticides (+)/LCR(-) (**Figure 29**).



**Figure 29 :** Photographie du site d'implantation des cellules tumorales ainsi que le greffon des souris traitées aux pesticides.

(A) différence du réseau vasculaire entre les souris pesticides (+)/LCR(+) et les souris pesticides (+)/LCR(-), (B) structure tissulaire du greffon récupérées chez une souris pesticides (+)/LCR(+).

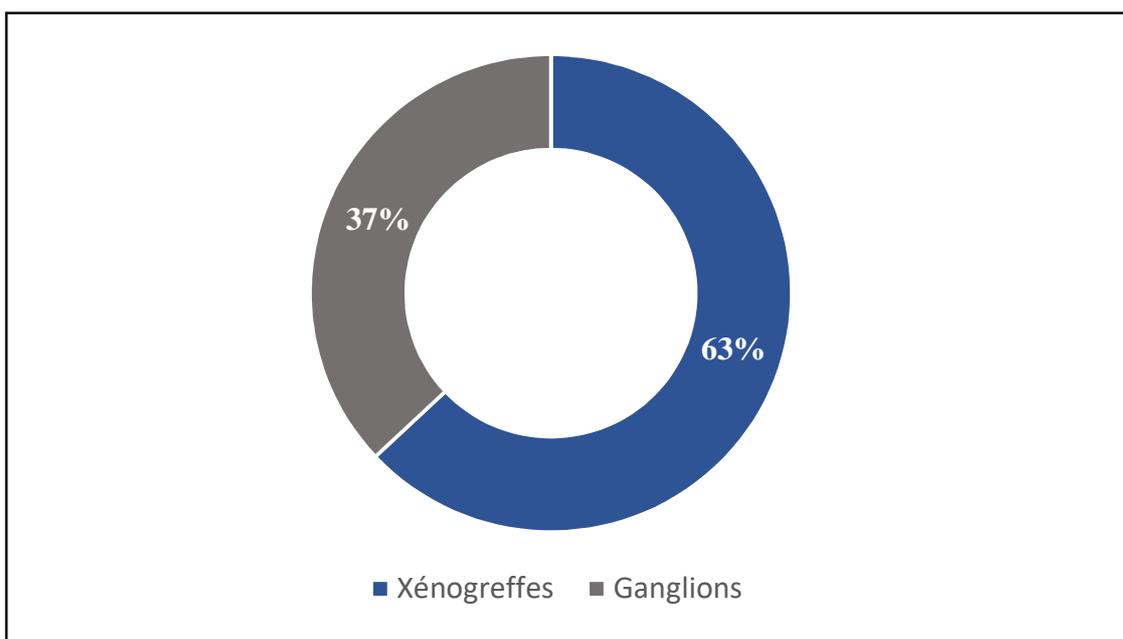
Les masses tissulaires observées sont effectivement visibles en sous-cutanée et n'adhèrent pas au péritoine, mais semble bien ancrées au niveau sous-cutané. De plus, un réseau vasculaire dense semble être mis en place d'une façon importante au niveau du site d'injection chez les souris pesticides+/LCR+. Les greffons sont de formes sphériques bien délimités, entourés du tissu adipeux et d'îlots cellulaires, le tout traversé par une vascularisation dense.

La présence des formes tissulaires au site de l'injection sous-cutanée, avec une vascularisation dense, suggère que les cellules tumorales injectées se sont regroupées sous forme de colonies ayant eu une capacité proliférative importante.

### III.4.2 Etude microscopique des masses au site de la xénogreffe

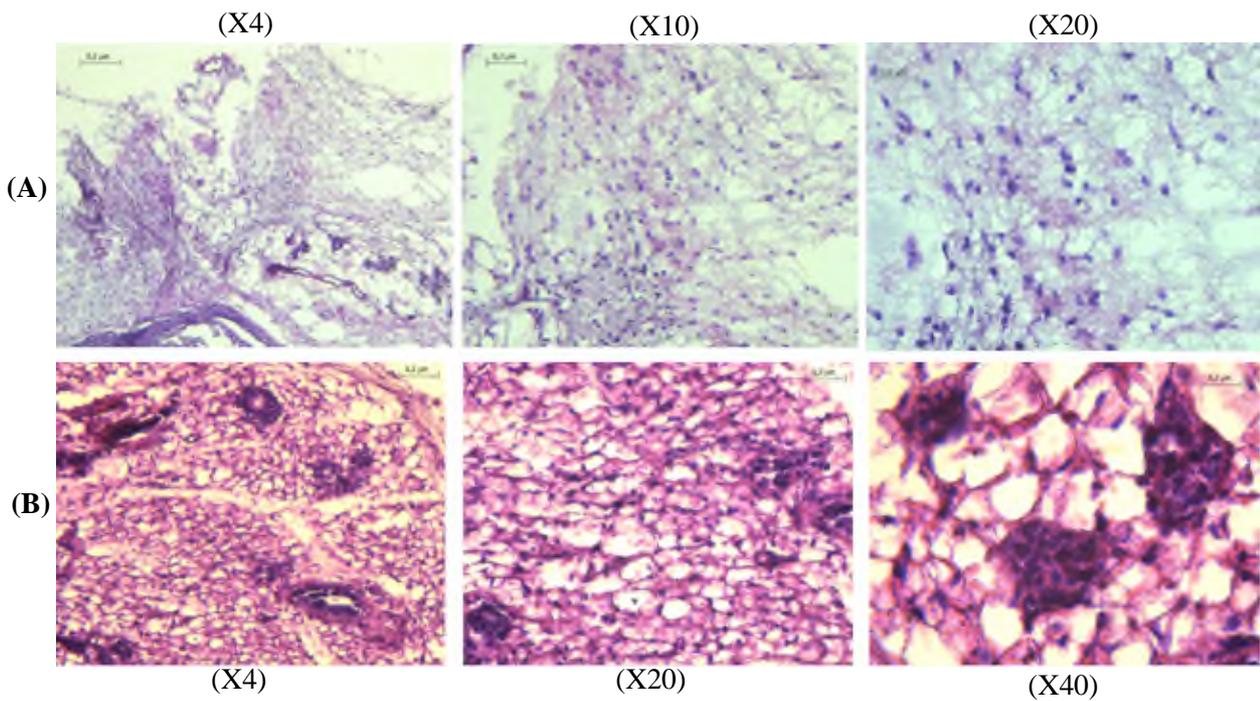
La lecture des coupes histologiques au microscope optique aux différents grossissements, révèle la présence d'un tissu adipeux avec signes de nécrose tissulaire et de cellules atypiques correspondant probablement à des cellules astrocytaires avec présence de cellules myofibroblastiques réactionnelles (**Figure 31**). Ces structures sont retrouvées dans 63 % des souris traitées aux pesticides (**Figure 30**).

En plus de la présence de la prise de la greffe sous cutanée, l'analyse histologique révèle que certaines masses présentent à proximité du site de la greffe sous cutanée, correspondent à des ganglions réactionnels. En d'autres termes, ces ganglions sont sièges d'intenses interactions immunitaires et sont ainsi infiltrés par des cellules du glioblastome injectées en sous cutanée. Ces ganglions réactionnels sont retrouvés au niveau de 37% des souris traitées aux pesticides. (**Figure 30**)



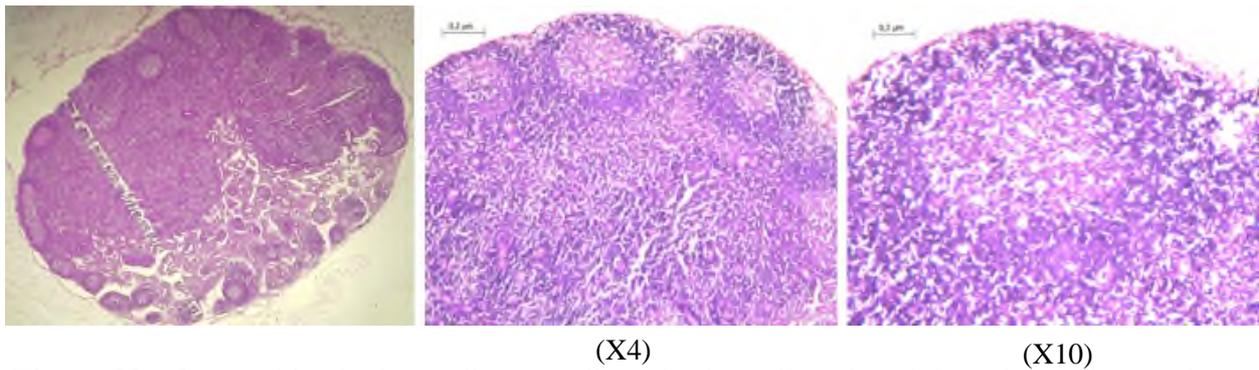
**Figure 30 :** Représentation du taux des ganglions et de xénogreffes retrouver chez les souris traitées aux pesticides.

*Parmi les masses observées chez les souris traitées aux pesticides, 37% correspondent à des ganglions et 63% a des xénogreffes*



**Figure 31 :** Coupes histologiques du greffon récupéré au niveau des souris traitées aux pesticides.

*Les X4, X10 & X20 correspondent aux différents grossissements. (A) coupes histologiques des xénogreffes récupérées à partir des souris pesticides (+)/LCR(-), (B) coupes histologiques des xénogreffes prélevées chez les souris pesticides (+)/LCR(+).*



**Figure 32 :** Coupes histologiques d'un ganglion réactionnelles récupéré au niveau des souris traitées aux pesticides. Les X4, X10 correspondent aux différents grossissements.

Les pesticides agissent sur de nombreuses signalisations cellulaires notamment sur des molécules clés dans le processus prolifératif comme c'est le cas de mdm2, p53 et RB. De plus, de nombreuses études font état de la perturbation du système immunitaire en induisant notamment une *down-regulation* de l'activité des cellules NK, des lymphocytes T ; conduisant ainsi à une perte de la surveillance de cellules cancéreuses par le système immunitaire ; élément clé de l'échappement tumoral. Les différences de structure tissulaires sont observées entre les cellules xéno greffées issues de l'injection sous-cutanée d'amas cellulaires en présence ou absence de LCR tumoral. Ce dernier favorise la formation de colonies de formes sphériques. Ceci concorde avec les données de la littérature qui montrent que l'agressivité des cellules tumorales corrèle avec la formation de structures sphériques tridimensionnelles (Gillies GE and McArthur S, 2010). Ceci semble être favorisé par la présence du LCR tumoral, car ce dernier est riche en molécules pro-tumorales et pro-angiogéniques, voir même de matériel génétique tumoral.

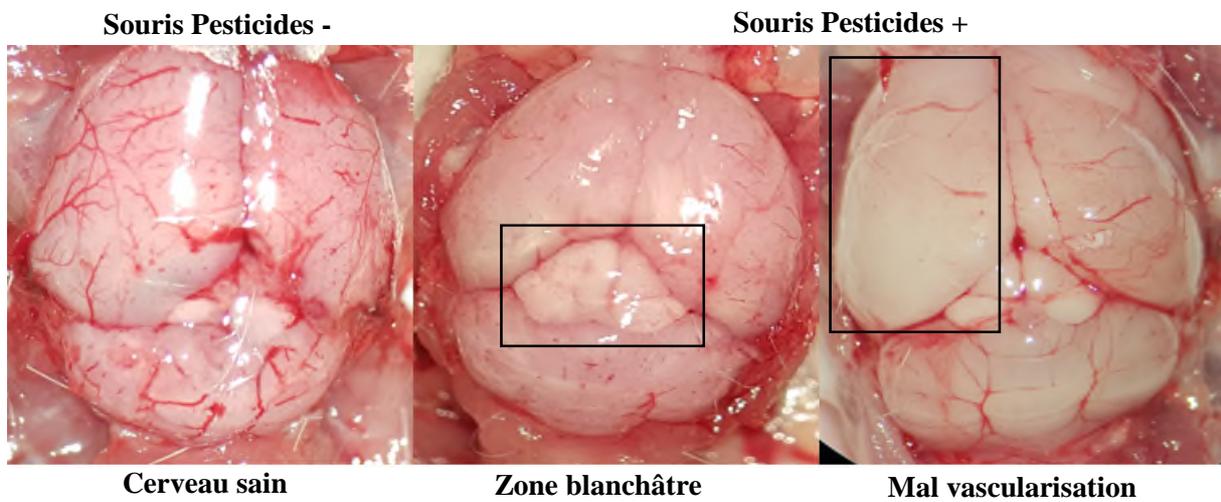
*Les résultats de l'étude histologique confirment que les masses observées lors de l'analyse macroscopiques, correspondent à la croissance des amas cellulaires injectés en sous-cutanées formant ainsi des xéno greffes d'aspect cellulaire analogue à la tumeur primaire correspondante. La présence de ganglions réactionnels confirme la viabilité et le pouvoir invasif des cellules injectées, ayant eu la capacité de migrer vers les ganglions axillaires. L'observation de ces masses uniquement au niveau des souris traitées aux pesticides, confirme que le potentiel invasif et prolifératif des cellules de glioblastome injectées est dû directement ou indirectement à la concentration de pesticides dans l'organisme.*

### III.5 Effets des pesticides sur l'homéostasie cérébrale

#### III.5.1 Etude macroscopique des cerveaux

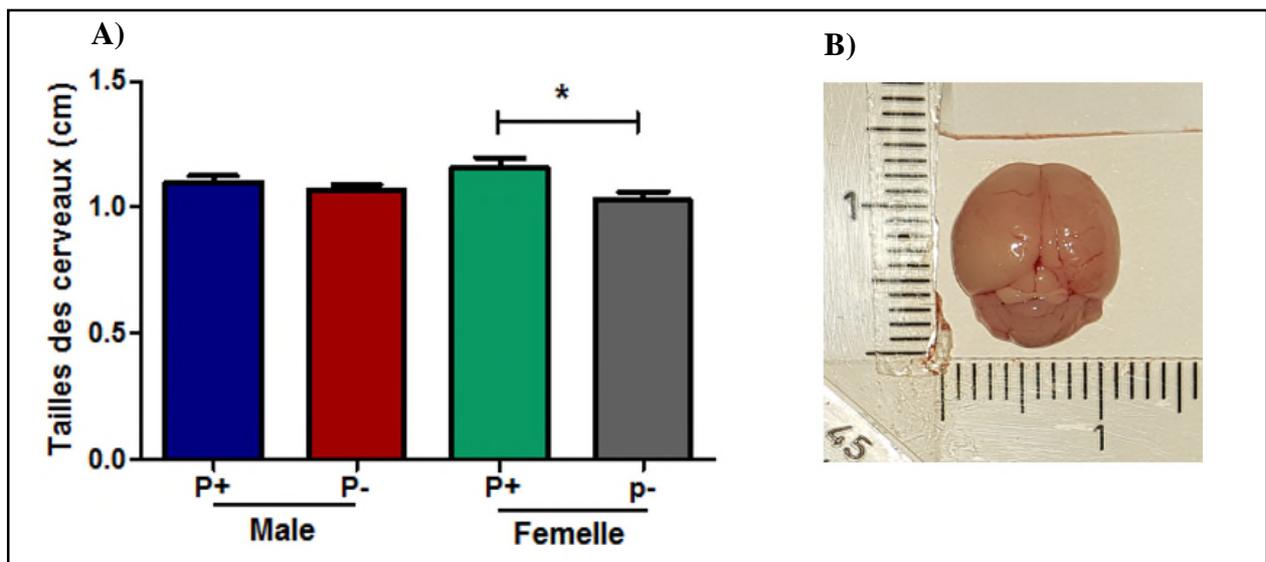
L'étude macroscopique des cerveaux de souris témoins, montre une forme de cerveau vascularisé avec une conservation totale de l'anatomie cérébrale, présence des scissures et un

cervelet de taille normale. Les cerveaux des souris traitées aux pesticides (DDT, chlorpyrifos et le glyphosate) quant à eux, présentent une réduction du réseau vasculaire (63% des cas), 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 (45% des cas), un effacement des invaginations caractéristiques des cerveaux et présence de zones de couleur blanchâtre (9% des cas). (**Figure 33**). De plus, une différence significative ( $p < 0.05$ ) de la taille globale des cerveaux est observée, notamment chez les femelles (**Figure 34**).



**Figure 33** : Photographie des cerveaux des souris traitées et souris non traitées aux pesticides.

*Les souris témoins présentent des cerveaux sains, contrairement aux cerveaux des souris traitées qui sont dépourvu de circonvolution, et présentent des zones blanchâtres ainsi qu'une avascularisation.*



**Figure 34** : Représentation de la taille des cerveaux de souris témoins et souris traitées aux pesticides.

*Contrairement aux deux groupes de souris males (traitées & témoins), la différence entre la taille des cerveaux des deux groupes femelles (traitées & témoins) est significative (A). La mesure des tailles des cerveaux est réalisée post-mortem (B). Le nombre de souris de chaque groupe est de 6 (n=6). \*: p-value 0,05*

Les résultats obtenus montrant un effet sur l'homéostasie cérébrale, ceci confirme l'hypothèse selon laquelle les pesticides traverse la barrière-hémato-encéphalique et cela est probablement dû à leur caractère lipophile. Cette présence au niveau cérébral engendre un dérèglement de son homéostasie via l'augmentation des effets ischémiques avec apparition de zone nécrotique. Ceci est en accord avec les études internationales montrant une relation entre l'exposition aux pesticides et l'apparition de maladies neurodégénératives, plus particulièrement Alzheimer (**Yan D et al., 2016**).

On observe aussi une modulation de l'architecture par l'intermédiaire de l'augmentation de la prolifération des cellules gliales, expliquant ainsi la taille plus importante des cerveaux des souris traitées. En effet, de nombreuses études font état de la relation existante entre l'exposition aux pesticides, notamment au niveau fœtal et le risque d'apparition et progression de tumeurs cérébrales d'origines gliale, notamment les astrocytomes (**van W et al., 2003**).

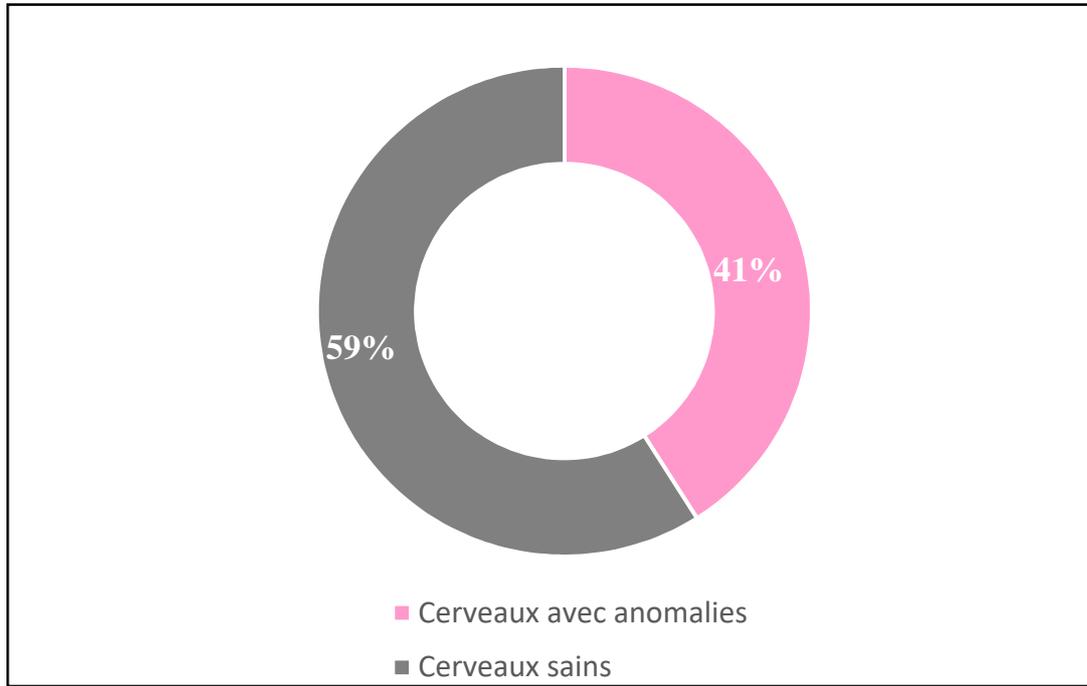
En accord avec nos résultats et suggestion précédentes, la taille plus importante du cerveau des souris femelles traitées aux pesticides par rapport aux souris non traitées est probablement due à l'implication des hormones sexuelles féminines. En effet, de nombreuses études rapportent l'existence d'un lien moléculaire entre les œstrogène et la modulation de la taille cérébrale (**Gillies GE and McArthur S, 2010**). Ceci fut possible dans notre étude, car nous avons commencé le traitement des souris à un âge précoce où leurs croissants étaient toujours en cours.

### III.5.2 Etude microscopique des cerveaux

Suite à la lecture des coupes histologiques au microscope optique aux différents grossissements, les résultats révèlent un aspect histologique normal dans 59% (**Figure 35**) des cerveaux des souris témoins (pesticides -) qui présentent une densité cellulaire à priori normale, une répartition cellulaire homogène avec une absence de signes d'apoptose ou de mitose. De plus, ces cerveaux présentent une vascularisation régulière (**Figure 36A**).

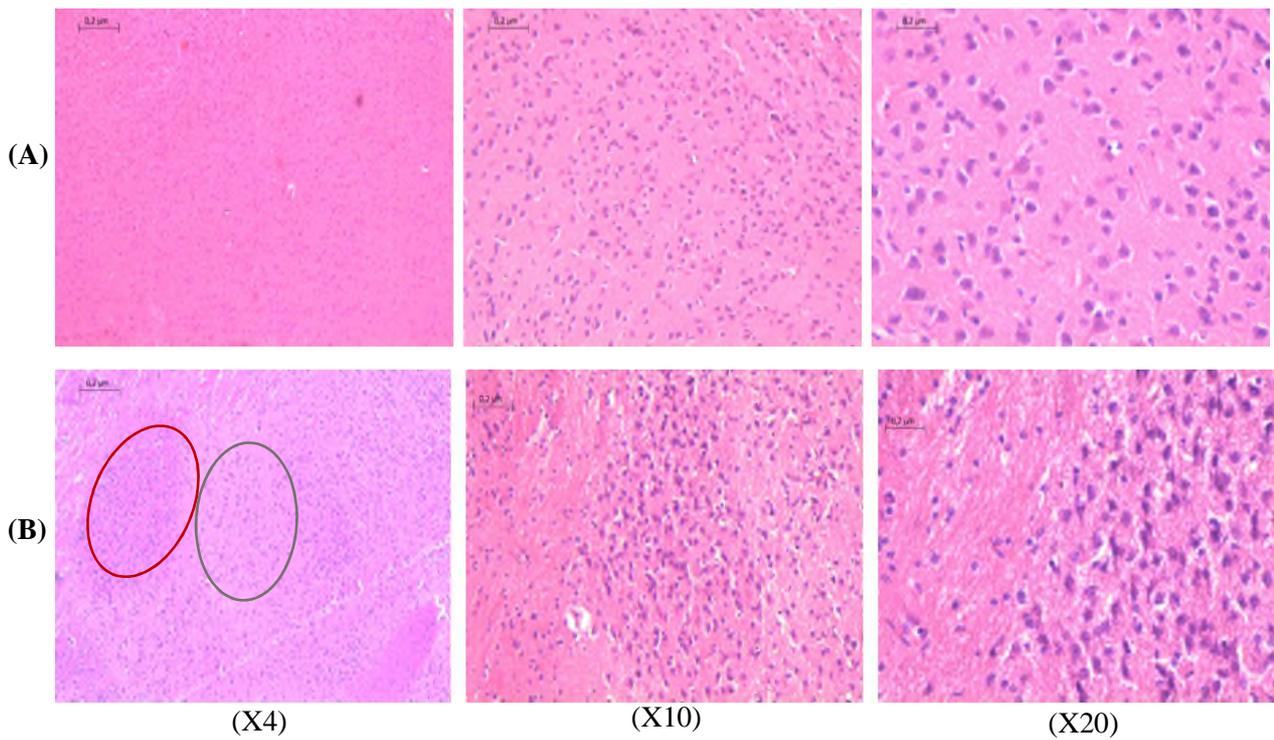
Contrairement aux souris témoins, les résultats de l'analyse des coupes histologique des cerveaux des souris traitées aux pesticides, montrent dans 41% des cas (**Figure 35**), une densité cellulaire anormale des avec présence de zone de condensation cellulaire élevées et des zones moins denses avec une perte de contour cytoplasmique et condensation de certains noyaux (**Figure 36B**), ceci pourrait être potentiellement lié à des signes ischémiques ou de glioses. De

façon intéressante, ces résultats révèlent une présence abondante des éosinophiles au sein de certains cerveaux de souris traitées aux pesticides (**Figure 37**).



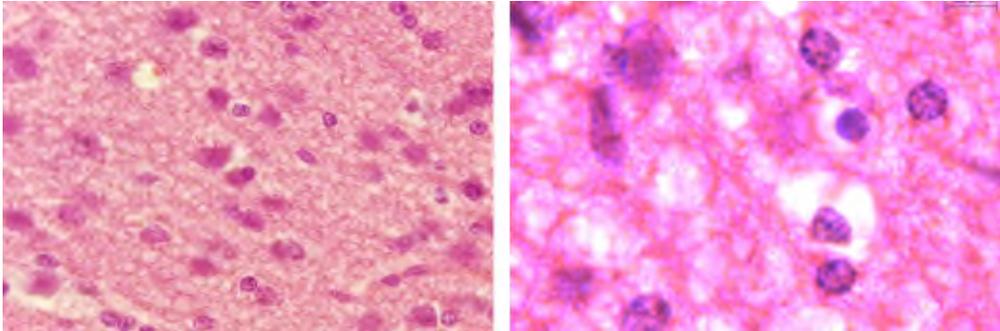
**Figure 35 :** Représentation des anomalies histologiques retrouvées au niveau des souris traitées aux pesticides.

*Des anomalies au niveau du cerveau sont observées chez 41% des souris traitées aux pesticides.*



**Figure 36 :** Coupes histologique des cerveaux des souris témoins et souris traitées aux pesticides.

(A) coupes histologiques d'un cerveau d'une souris témoins, (B) coupes histologiques d'un cerveau d'une souris traitées aux pesticides. En rouge les zones avec une densité cellulaires élevé, en noir une faible densité cellulaire.



(X100)

**Figure 37 :** Coupes histologiques avec un infiltrat immunitaire au niveau des cerveaux des souris traitées aux pesticides.

*Le tissu cérébral des souris traitées aux pesticides est infiltré par des cellules immunitaires notamment les éosinophiles.*

Ces résultats histologiques sur les cerveaux des souris traitées aux pesticides, confirment que ces derniers agissent sur l'homéostasie cérébrale en provoquant des ischémies cérébrales et la mise en place de foyer nécrotique, ainsi que des processus de glioses. Les phénomènes nécrotiques et ischémiques sont probablement à l'origine de l'infiltration du tissu cérébral des souris traitées par les cellules immunitaires, notamment les éosinophiles. De haut poids moléculaire, mais présentant un caractère lipophile, les pesticides utilisés dans notre étude, ont ainsi le potentiel de traverser la barrière hémato-encéphalique et perturber l'homéostasie du tissu cérébral.

## *Conclusions et perspectives*

Les résultats de l'exposition des souris immunocompétentes par voie intrapéritonéale à un mélange, composé de chlorpyrifos, DDT et de glyphosate, pesticides largement employés dans l'agriculture en algérie, montrent des effets sur l'évolution du poids des souris femelles suggérant ainsi une perturbation des hormones sexuelles féminines ces hormones probablement impliquées dans le développement cérébral, notamment dans l'augmentant son volume. En plus de la perturbation hormonale, les pesticides traversent la barrière hémato-encéphalique, affectant ainsi l'homéostasie cérébrale, en induisant des nécroses, des glioses, et des ischémies. Le développement de xénogreffe, dérivée à partir de glioblastome, chez les souris traitées aux pesticides, démontre l'effet immunomodulateur de ces derniers, cela permet d'une part, aux cellules tumorales d'échapper au contrôle du système immunitaire, d'autre part, l'augmentation du pouvoir invasif des cellules de glioblastomes.

L'ensemble de ces résultats suggère que les pesticides sont un facteur de risque dans la progression des tumeurs cérébrales. Car ils agissent, en modulant le système immunitaire, mais aussi en désorganisant l'homéostasie du tissu cérébral permettant ainsi aux cellules de glioblastome de s'implanter de proliférer de façon importante. Ces phénomènes pourraient donc engendrés chez des personnes prédisposées ou ayant une première transformation maligne, une progression tumorale.

Le travail effectuer ouvre de nouvelles voies de recherches, notamment l'analyses immunohistochimiques sur le tissu cérébral et la xénogreffe afin de mieux identifier les caractéristiques moléculaires du tissu étudié, en plus du tissu cérébrale, objet de notre étude, une analyse approfondie de l'ensembles des organes des souris traitées aux pesticides serait intéressante à réaliser. L'implication probable des perturbation hormonales dans la progression des xénogreffes pourrait être élucider par le dosage hormonal des souri traitées. Pour évaluer l'effet immunomodulateur, il serait aussi important d'effectuer une formule de numération sanguine (FNS) sur le sang des souris traitées aux pesticides

Enfin il serait intéressant d'augmenter l'effectif du model animal, un traitement à long terme aux pesticides ainsi que la réalisation des xénogreffes de cellules de tumeurs cérébrales en intracrâniennes.



1. **A. Benouach-Amiel, I. Catalaa, V. Lubrano, E. Cohen-Jonathan Moyal, and E. Uro-Coste** (2014). Gliome de haut grade : astrocytome anaplasique et glioblastome.
2. **Al-Eryani, L., Wahlang, B., Falkner, K.C., Guardiola, J.J., Clair, H.B., Prough, R.A., and Cave, M.** (2015). Identification of Environmental Chemicals Associated with the Development of Toxicant-associated Fatty Liver Disease in Rodents. *Toxicol. Pathol.* *43*, 482–497.
3. **BATSCH, D.** (2011). L'IMPACT DES PESTICIDES SUR LA SANTÉ HUMAINE.
4. **Borowicz, S., Van Scoyk, M., Avasarala, S., Karuppusamy Rathinam, M.K., Tauler, J., Bikkavilli, R.K., and Winn, R.A.** (2014). The Soft Agar Colony Formation Assay. *J. Vis. Exp.*
5. **Boutrid L., Hamma L.** (2015). Etude biochimique et protéomique du Liquide Céphalo-Rachidien de patients atteints de tumeurs cérébrales.
6. **Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* *72*, 248–254.
7. **Casals-Casas, C., and Desvergne, B.** (2011). Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annu. Rev. Physiol.* *73*, 135–162.
8. **Catalano, V., Gaggianesi, M., Spina, V., Iovino, F., Dieli, F., Stassi, G., and Todaro, M.** (2011). Colorectal Cancer Stem Cells and Cell Death. *Cancers* *3*, 1929–1946.
9. **CHEZEAU, L.** (2015). Cellules souches cancéreuses et glioblastome : Etude du mode d'action d'un composé actif.
10. **Darlix, A.** (2013). TRAITEMENT PROLONGE PAR TEMOZOLOMIDE APRES RADIOCHIMIOThERAPIE DANS LES GLIOBLASTOMES DE L'ADULTE. UNE ETUDE RETROSPECTIVE BICENTRIQUE.
11. **Davis, M.** (2016). Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clin. J. Oncol. Nurs.* *20*, S2–S8.
12. **DENIS MUSQUER, M.** (2012). ETUDE DES FACTEURS HISTOPATHOLOGIQUES ET MOLECULAIRES PRONOSTIQUES DE LONGUE SURVIE CHEZ DES PATIENTS ATTEINTS DE GLIOBLASTOME PRIMAIRE.
13. **Díaz-Resendiz, K.J.G., Toledo-Ibarra, G.A., and Girón-Pérez, M.I.** (2015). Modulation of immune response by organophosphorus pesticides: fishes as a potential model in immunotoxicology. *J. Immunol. Res.* *2015*, 213836.
14. **Díaz-Resendiz, K.J.G., and Girón-Pérez, M.I.** (2014). Effect of chlorpyrifos on the immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).
15. **ERRAMI, M.** (2012). Devenir atmosphérique de bupirimate et transfert de ses métabolites (les diazines) dans l'atmosphère, sa dissipation dans les fruits de tomate et sa dégradation électrochimique.

16. **FEVE, M.** (2012). Utilisation d'une approche de chimie biologie intégrative dans la recherche de nouvelles molécules actives sur la prolifération et la différenciation des cellules souches cancéreuses.
17. **Figarella-Branger, D., Colin, C., Tchoghandjian, A., Baeza, N., and Bouvier, C.** (2010). [Glioblastomas: gliomagenesis, genetics, angiogenesis, and microenvironment]. *Neurochirurgie*. 56, 441–448.
18. **Gervois, P., and Fruchart, J.-C.** (2003). PPAR $\gamma$  : un récepteur nucléaire majeur de l'adipogenèse. *Médecine/Sciences* 19, 20–22.
19. **Gillies, G.E., and McArthur, S.** (2010). Estrogen actions in the brain and the basis for differential action in men and women: a case for sex-specific medicines. *Pharmacol. Rev.* 62, 155–198.
20. **Guha, N., Guyton, K.Z., Loomis, D., and Barupal, D.K.** (2016). Prioritizing Chemicals for Risk Assessment Using Chemoinformatics: Examples from the IARC Monographs on Pesticides. *Environ. Health Perspect.* 124, 1823–1829.
21. **Hurd-Brown, T., Udoji, F., Martin, T., and Whalen, M.M.** (2013). Effects of DDT and triclosan on tumor-cell binding capacity and cell-surface protein expression of human natural killer cells: DDT and TCS decrease NK cell binding and cell-surface proteins. *J. Appl. Toxicol.* 33, 495–502.
22. **Kheddam-Benadja, N.** (2012). Enquete sur la gestion des pesticides en Algérie et recherche d'une méthode de lutte alternative contre *Meloidogyne incognita* (Nematoda : Meloidogynidae).
23. **Khiredine, L., Ait-Ali, D., Takbou, I., Bouchemal, A., Khechfoud, H., Himeur, H., Ait Bachir, M., Bedjou, F., Tliba, S., and Ghidouche, A.** (2017). High incidence and early median-age at onset of primary brain and nervous system tumors in Algeria: Case of Bejaia state.
24. **Khwaja, F.W., Reed, M.S., Olson, J.J., Schmotzer, B.J., Gillespie, G.Y., Guha, A., Groves, M.D., Kesari, S., Pohl, J., and Van Meir, E.G.** (2007). Proteomic Identification of Biomarkers in the Cerebrospinal Fluid (CSF) of Astrocytoma Patients. *J. Proteome Res.* 6, 559–570.
25. **Lacave R, Larsen C.J, and Robert J.** (2005). *Cancérologie fondamentale* (Paris).
26. **Lai, Y.-J., Tsai, J.-C., Tseng, Y.-T., Wu, M.-S., Liu, W.-S., Lam, H.-I., Yu, J.-H., Nozell, S.E., and Benveniste, E.N.** (2017). Small G protein Rac GTPases regulate the maintenance of glioblastoma stem-like cells in vitro and in vivo. *Oncotarget* 8, 18031–18049.
27. **Leh, B.** (2011). Caractérisation par autofluorescence de tissus cérébraux tumoraux : Mesures sur fantômes et modèle animal.
28. **Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvett, A., Scheithauer, B.W., and Kleihues, P.** (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 114, 97–109.

29. **Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., and Ellison, D.W.** (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *131*, 803–820.
30. **Magaña-Maldonado, R., Chávez-Cortez, E.G., Olascoaga-Arellano, N.K., López-Mejía, M., Maldonado-Leal, F.M., Sotelo, J., and Pineda, B.** (2016). Immunological Evasion in Glioblastoma. *BioMed Res. Int.* *2016*, 1–7.
31. **MERLET-BILLON, M., MIREUR, A., and MORIN, L.** (2012). L'immunotoxicité des pesticides.
32. **M.JANATI IDRISSE, K.** (2015). MORBI-MORTALITE EN PATHOLOGIE TUMORALE CEREBRALE.
33. **Mostafalou, S., and Abdollahi, M.** (2017). Pesticides: an update of human exposure and toxicity. *Arch. Toxicol.* *91*, 549–599.
34. **Nahta, R., Al-Mulla, F., Al-Temaimi, R., Amedei, A., Andrade-Vieira, R., Bay, S.N., Brown, D.G., Calaf, G.M., Castellino, R.C., Cohen-Solal, K.A., et al.** (2015). Mechanisms of environmental chemicals that enable the cancer hallmark of evasion of growth suppression. *Carcinogenesis* *36 Suppl 1*, S2-18.
35. **Savary, C.** (2014). Étude de la toxicité chronique et du potentiel cancérigène de contaminants de l'environnement séparément et en mélange sur les cellules HepaRG.
36. **Wang, Y., Springer, S., Zhang, M., McMahon, K.W., Kinde, I., Dobbyn, L., Ptak, J., Brem, H., Chaichana, K., Gallia, G.L., et al.** (2015). Detection of tumor-derived DNA in cerebrospinal fluid of patients with primary tumors of the brain and spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 9704–9709.
37. **Ward, P.S., and Thompson, C.B.** (2012). Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. *Cancer Cell* *21*, 297–308.
38. **van Wijngaarden, E., Stewart, P.A., Olshan, A.F., Savitz, D.A., and Bunin, G.R.** (2003). Parental occupational exposure to pesticides and childhood brain cancer. *Am. J. Epidemiol.* *157*, 989–997.
39. **Yi, Y., Hsieh, I.-Y., Huang, X., Li, J., and Zhao, W.** (2016). Glioblastoma Stem-Like Cells: Characteristics, Microenvironment, and Therapy. *Front. Pharmacol.* *7*.
40. **Zucchini, N., de Sousa, G., Bailly-Maitre, B., Gugenheim, J., Bars, R., Lemaire, G., and Rahmani, R.** (2005). Regulation of Bcl-2 and Bcl-xL anti-apoptotic protein expression by nuclear receptor PXR in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* *1745*, 48–58.

## Annexe 1

**Tableau :** Les critères de classement des agents selon le degré d'indication de cancérogénicité.

Classe d'agents	Critères de détermination du degré d'indication de risque pour l'homme et pour l'animal de laboratoire	Nombre d'agents classés
Agent cancérogène pour l'homme <b>(Groupe 1)</b>	<b>Principe général :</b> Indications suffisantes de cancérogénicité pour l'homme.	107 agents Ex : Arsenic/ EBV/ Formaldéhydes
Agent probablement cancérogène pour l'homme <b>(Groupe 2A)</b>	<b>Principe général :</b> Indications limitées de cancérogénicité chez l'homme et suffisantes chez l'animal.	58 agents Ex : Acrylamide/ DDT/ Glyphosate
Agent peut être cancérogène pour l'homme <b>(Groupe 2B)</b>	<b>Principe général (2 formes) :</b> Forme 1 : Indications limitées de cancérogénicité chez l'homme et insuffisantes chez l'animal. Forme 2 : Indications insuffisantes chez l'homme et suffisantes chez l'animal.	249 agents EX : Trypan blue /HIV-2/ HPV 26,53,30,34
Agent inclassable quant à sa cancérogénicité pour l'homme <b>(Groupe 3)</b>	<b>Principe général :</b> Indications insuffisantes chez l'homme et insuffisantes ou limitées chez l'animal.	512 agents EX : Vitamine K / 5-Fluorouracil /Chlorpyrifos
Agent n'est probablement pas cancérogène pour l'homme <b>(Groupe 4)</b>	<b>Principe général :</b> Indications suggérant une absence de cancérogénicité chez l'homme et chez l'animal de laboratoire.	1 agent : caprolactame

### Annexe 3

**Tableau :** Composition d'aliment de souris

#### *Composition*

---

Mais, Tourteaux de soja, Issues de Meunerie, Calcaire, Phosphates, Sel, Acides Aminés, Oligo-éléments, Poly-vitamines, Antioxydant.

#### *Supplément*

---

Antioxydant : BHT  
Vitamines : A, E, D3

### Annexe 4

**Tableau :** Composition du réactif de Bradford.

Réactifs	Quantités
Bleu de coomassie G250	57 mg
Méthanol	28,5 ml
Acide phosphorique 85%	57 ml
Eau distillée	484,5 ml



## Résumé

**Introduction** les tumeurs cérébrales constituent un problème de santé publique majeur en Algérie, car elles présentent une incidence importante et âge médian d'apparition relativement précoce. Cette augmentation de l'incidence ainsi que la précocité d'apparition de ces tumeurs sont probablement liées aux facteurs génétiques ou environnementaux tels que les pesticides.

**Matériels et méthodes** Afin d'évaluer l'effet des pesticides sur l'initiation et/ou la progression des tumeurs cérébrales, des souris immunocompétentes âgées de 4 à 6 semaines sont traitées en intrapéritonéales chaque 72 heures durant 8 semaines par un mélange de pesticide composé de chlorpyrifos-éthyl, N-(phosphonométhyl) glycine et le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT). Trois semaines post traitement, une xéno greffe en sous-cutanée d'amas cellulaires de glioblastome humain est réalisée.

**Résultats** L'exposition des souris immunocompétentes à ce mélange de pesticides, engendre un dérèglement métabolique et hormonal, une perte de l'homéostasie du tissu cérébrale (41%), ainsi que la prise de la xéno greffe (63%).

**Conclusion** Ces résultats suggèrent que les pesticides sont un facteur de risque dans la progression des tumeurs cérébrales, notamment en agissant d'une manière directe sur les cellules tumorales elles-mêmes, ou d'une façon indirecte par une immunomodulation ou désorganisant de l'homéostasie du tissu cérébral

**Mots clés** : tumeurs cérébrales, microenvironnement tumoral, système immunitaire, pesticides.

## Abstract

**Background** Brain tumors is a major public health problem in Algeria, as they have a significant incidence and median age of onset relatively early. This increase in incidence and the early onset of these tumors are probably related to genetic or environmental factors such as pesticides.

**Materials and methods** In order to evaluate the effect of pesticides on the initiation and / or progression of brain tumors, immunocompetent mice aged 4 to 6 weeks are treated intraperitoneally every 72 hours for 8 weeks with a pesticide mixture composed of chlorpyrifos- Ethyl, N- (phosphonomethyl) glycine and dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT). Three weeks after treatment, a subcutaneous xenograft of cell clusters of human glioblastoma is performed.

**Results** Exposure of immunocompetent mice to this mixture of pesticides results in metabolic and hormonal disorders, loss of cerebral tissue homeostasis (41%), and xenograft ingestion (63%).

**Conclusions** These results suggest that pesticides are a risk factor in the progression of brain tumors, in particular by acting directly on the tumor cells itself, or indirectly by immunomodulation or disorganization of brain tissue the homeostasis.

**Keywords** : Brain tumors, tumor microenvironment, immune system, pesticides.

