

Résumé

La protection des cultures (fruits, légumes, céréales, légumineuses, etc.) contre les ravageurs (insectes, acariens, autres arthropodes) et maladies (champignons, bactéries, virus, etc.) se fait principalement par des produits chimiques appelés produits phytosanitaires (insecticides, fongicides, herbicides, etc.).

Ces pesticides sont très mal utilisés dans la majorité des cas : utilisation le plus souvent de produits très toxiques, aucun respect des doses d'emplois (surdosage), réalisation de plusieurs applications chimiques au cours du cycle de la culture, non respect du délai avant récolte, et par conséquent, une pollution accrue des différentes composantes de l'environnement (nappe phréatique, sol, air, etc.) mais surtout des quantités énormes de résidus de pesticides dans les fruits et légumes (dépassement des limites maximales de résidus) qui peuvent avoir des effets néfastes sur l'organisme d'un individu ou sur ses descendants. Le fœtus et le jeune enfant sont les plus menacés par ces substances.

Afin de montrer l'urgence de l'action préventive dans ce domaine, nous avons mené une enquête sur l'utilisation des pesticides en établissant différents questionnaires que nous avons adressés à des utilisateurs et des vendeurs, l'étude a couvert la région Tadla Azilal,

Nous avons également mené l'étude de l'effet des pesticides sur des souris, et plus particulièrement durant le développement. Nous avons analysé des paramètres physiologiques et physiques chez des souris témoins et des souris intoxiquées.

Nos résultats montrent que L'exposition prénatale au pesticides provoque des effets délétères au niveau de l'organisme se traduisant par ; un effet négatif sur la croissance corporelle, un effet hépatotoxique (nécrose hépatique), néphrotoxique (Atrophie glomérulaire) et un effet négatif cérébral (diminution de l'activité de l'enzyme acétylcholinestérase). Nous avons noté que l'utilisation continue des pesticides est à l'origine aussi de l'apparition d'un état de stress oxydant démontré par une augmentation de la peroxydation lipidique, signalée suite à une détermination des concentrations de malondialdéhyde tissulaires chez les traités par rapport aux témoins.

Mots clé

Malathion - Intoxication – cerveau - mémoire - troubles comportementaux



UNIVERSITE SULTAN MOULAY SLIMANE
Faculté des Sciences et Techniques
Béni-Mellal



Centre d'Etudes Doctorales : Sciences et Techniques

Formation Doctorale : **Ressources Naturelles, Environnement ET Santé**

THÈSE

Présentée par

OUARDI FATIMA ZOHRA

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR

Spécialité : Biologie

Option : Neurobiologie-Toxicologie

**Impact de l'exposition au Malathion sur le neurodéveloppement des souris :
aspects comportementaux et physiologiques.**

Soutenue le Lundi 23 Décembre 2019 à 10h devant la commission d'examen:

Pr.Mohamed Najimi	Professeur, Université Sultan Moulay Slimane, F.S.T. Béni-Mellal, Maroc.	Président
Pr. Ahmed O.T Ahami	Professeur, Université Ibn Tofail, F.S, kénitra, Maroc	Rapporteur
Pr. Ahmed AIT CHAOUI	Professeur, Université Sultan Moulay Slimane, F.S.T. Béni-Mellal, Maroc	Rapporteur
Pr. Noureddine El Abbadi	Professeur, Université Sultan Moulay Slimane, F.S.T. Béni-Mellal, Maroc	Rapporteur
Pr.Samira Boulbroud	Professeur, Université Sultan Moulay Slimane, F.P. Béni-Mellal, Maroc	Examinateur
Pr. Mohamed Merzouki	Professeur, Université Sultan Moulay Slimane, F.S.T. Béni-Mellal, Maroc	Examinateur
Pr.Mohammed Chigr	Professeur, Université Sultan Moulay Slimane, F.S.T. Béni-Mellal, Maroc	Encadrant
Pr.Fatiha Chigr	Professeur, Université Sultan Moulay Slimane, F.S.T. Béni-Mellal, Maroc	Co-Encadrant

N°d'ordre : 238/2019

Impact de l'exposition au malathion sur le neurodéveloppement des souris :
aspects comportementaux et physiologiques

OUARDI FATIMA ZOHRA

*Au nom de Dieu dont le nom ouvre tout parcours et sans lui rien ne sera
accompli.
Que Dieu bénisse notre travail*

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de mon doctorat et qui m'ont aidée lors de la rédaction de mon rapport de thèses.

Je voudrais dans un premier temps remercier, mon directeur de thèse, Monsieur Mohammed Chigr pour ses sages conseils, son soutien et surtout la confiance particulière dont il m'a témoignée.

Je remercie particulièrement Madame Fatiha Chigr. Merci pour m'avoir fait confiance. Merci aussi pour votre disponibilité. Votre dynamisme, votre motivation sans limites et votre passion pour les neurosciences resteront pour moi des exemples à suivre. Merci pour ce que vous avez fait pour l'équipe et pour le laboratoire et pour tout le reste.

Monsieur Najimi Mohamed, pour m'avoir accordé des entretiens et avoir répondu à mes questions concernant mes expériences scientifiques, ainsi que son savoir scientifique. Il a été d'un grand soutien dans l'élaboration de mes travaux de recherche.

Je remercie tout particulièrement les membres de jury :

Monsieur Ahmed O. T. AHAMI, Professeur de la Faculté des Sciences de Kenitra.

Monsieur Nouredine EL ABBADI, Professeur de la Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal.

Monsieur Ahmed AIT CHAOUI, Professeur de la Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal.

Madame Samira BOULBAROUD, Professeur Habilité de la Faculté Polydisciplinaire de Béni Mellal.

Monsieur Mohammed MERZOUKI, Professeur Habilité, Faculté des Sciences et Techniques Béni Mellal

Je remercie également toute l'équipe scientifique de notre laboratoire Maryama, Hafsa, Nabila, Nouhaila, Hamou, Rachid, Amine de l'Université Sultan Moulay Slimane, Faculté de Sciences et Technique de Béni Mella.

Dédicaces

Je dédie ce travail

A ma famille, elle qui m'a doté d'une éducation digne, son amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui :

Particulièrement à mon père Ouardi Mustapha, pour le goût à l'effort qu'il a suscité en moi, de par sa rigueur.

A toi ma chère Maman, ceci est ma profonde gratitude pour ton éternel amour, que ce rapport soit le meilleur cadeau que je puisse t'offrir.

A vous mes frères (Youssef, Akram) et sœurs (Hajar, Ibtissam) qui m'avez toujours soutenu et encouragé durant ces années d'études.

A Mon Mari Hicham. Aucun mot ne saurait t'exprimer mon profond attachement et ma reconnaissance pour l'amour, la tendresse et la gentillesse dont tu m'as toujours entouré.

A mes enfants Imrane et Sérine pour l'espoir que vous gravez de jour en jour dans mon coeur.

DOCTORAL THESIS

**Impact de l'exposition au Malathion sur le
neurodéveloppement des souris : aspects com-
portementaux et physiologiques**

Author :

Supervisor :

Sommaire

I	Enquête sur l'utilisation des pesticides et leurs effets sur la santé des agriculteurs dans la région du Tadla Azilal	1
1	Introduction	2
2	Etude bibliographique	4
2.1	Généralités sur les pesticides	4
2.2	Utilisation des pesticides au Maroc	6
2.3	Modes d'expositions aux pesticides	7
2.4	Santé et pesticides	8
2.5	Equipements de protection individuelle	10
3	Matériels et Méthodes	13
3.1	Cadre général de l'étude	13
3.2	Outils et méthodes de collecte	13
3.3	Difficultés	14
4	Résultats	15
4.1	Les matières actives utilisées par les Agriculteurs	16
4.2	le choix des produits utilisés	20
4.3	La quantité de produit à appliquer	20
4.4	Moyens de protection utilisés lors de la dilution et de l'application des pesticides	21
4.5	Destination des emballages vides	22
4.6	Fréquence des intoxications constatées :	23
5	Discussion et Conclusion	25

II	Les effets du Malathion sur le développement de la progéniture des souris Wistar : Aspect comportemental et physiologique	28
0.1	Introduction	29
1	Le Malathion	30
1.1	Propriétés physico-chimiques du malathion	30
1.2	Effets toxiques du malathion	32
1.3	Toxicologie	33
1.4	Effet sur la Reproduction	36
1.5	Effet sur le Métabolisme	37
1.6	Effet sur le Développement	38
1.7	Effet sur la Neurotoxicité	39
2	partie pratique	40
2.1	Matériel et méthodes	40
2.1.1	Etudes de développement	41
2.1.2	Tests du développement sensori-moteur	43
2.2	Exploration du stress oxydant	53
2.2.1	Préparation de l'homogénat	53
2.2.2	Détermination de la peroxydation lipidique (LPO) par le taux du malondialdéhyde (MDA)	53
2.2.3	Détermination de l'activité de l'acétylcholinestérase	54
2.2.4	Détermination de l'activité de quelques enzymes antioxydantes au niveau tissulaire	55
2.2.5	Dosage des protéines	57
2.2.6	Technique histologique	58
2.2.7	Analyse Statistique	60
2.2.8	protocole expérimental	61
3	Résultats	65
3.0.1	Caractérisation des paramètres de la gestation	65
3.0.2	Effet de Malathion sur le comportement maternel	67
3.1	Effets du traitement au Malathion sur le développement physique des Souriceaux	70
3.2	Effet du traitement au Malathion sur le développement neuro-moteur des Souriceaux	74

3.3	Effet sur le développement comportemental et cognitif des souriceaux	81
3.4	Détermination de la peroxydation lipidique (LPO) par le taux du malondialdéhyde (MDA) chez les souriceaux	84
3.5	Dosage de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) chez les souriceaux	85
3.6	Détermination de l'activité de quelques enzymes antioxydantes chez les souriceaux	85
3.7	Effet du traitement sur le développement cognitif et comportemental des souris à l'âge adulte	90
3.8	Détermination de la peroxydation lipidique (LPO) par le taux du malondialdéhyde (MDA) chez les adultes	96
3.9	Dosage de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) chez les adultes	97
3.10	Détermination de l'activité de quelques enzymes antioxydantes au niveau tissulaire chez les adultes	98
3.11	Histologie des organes étudiés	102
4	Discussion	106
4.1	Exposition au malathion et reprotoxicité	106
4.2	Effet de malathion sur Le comportement maternel	108
4.3	Effet de malathion sur les paramètres de la croissance globale	109
4.4	Effet de malathion sur le développement sensori-moteur	110
4.5	Effet du Malathion sur le développement cognitif et comportemental des souris	111
4.6	effet de malathion sur l'anxiété :	111
4.7	Effet de malathion sur l'activité locomotrice :	112
4.8	Effet de malathion sur la mémoire :	113
4.9	Effets de malathion sur le statut redox	114
5	Conclusion	117
	Références bibliographiques	122

Table des figures

2.1	Modes d'exposition de l'homme et des milieux par les pesticides. (Merhi, 2008).	8
3.1	Localisation géographique de la région de Tadla Azilal	13
4.1	Les différentes classes de pesticides utilisées dans la région de Tadla Azilal . .	16
4.2	Le choix des produits par les agriculteurs	20
4.3	Gestion des emballages vides	23
4.4	Fréquence des intoxications constatées	24
1.1	Formule semi-développée du malathion	31
1.2	Hydrolyse du malathion suivie de son oxydation dans l'eau du réservoir Ross Barnett (Mississippi)	31
1.3	schéma de métabolisme de malathion (ATSDR 2003)	38
2.1	Les paramètres physiologiques de souris (THIEL R, 1997)	43
2.2	Test de retournement	44
2.3	Test d'évitement de falaise (Cliff Avoidance)	45
2.4	Test de réaction anti-gravitaire (negative geotaxis)	46
2.5	Test de développement de la natation (Swiming Developpement)	47
2.6	test de saut avec le choix des cages	48
2.7	Test de Labyrinthe en croix surélevé (LCS)	49
2.8	Test de l' Open-field	50
2.9	Test de Labyrinthe en y	51
2.10	Test de l'interaction sociale	52
2.11	Courbe d'étalonnage des protéines dosées par la méthode de Lowry	58
2.12	protocole expérimental chez les souris mères	62
2.13	protocole expérimental chez les nouveaux nés	63
2.14	protocole expérimental chez les adultes	64
3.1	Effet de l'exposition au Malathion sur le poids des femelle au cours de la gestation	67

3.2	Effets de Malathion sur le L'allaitement dans le test d'observation	69
3.3	Effet de l'exposition au Malathion sur le test de récupération pendant la période d'allaitement (PD 1–12)	70
3.4	Poids corporel des souriceaux pendant la période d'allaitement	71
3.5	La longueur du corps des souriceaux pendant la période d'allaitement	72
3.6	La longueur de la queue des souriceaux pendant la période d'allaitement	73
3.7	le temps de latence de retournements des souriceaux pendant la période d'allaitement	75
3.8	L'effet du traitement du Malathion sur les réponses du test du Cliff avoidance pendant la période d'allaitement	76
3.9	L'effet du traitement du Malathion sur la réaction antigravitaire des souriceaux pendant la période d'allaitement	77
3.10	Effet du traitement par le Malathion sur les réponses des souriceaux au test Jumping	78
3.11	Le développement de la natation chez les souriceaux traités par le Malathion	80
3.12	Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle du Malathion sur le comportement des souriceaux dans le test d'Open Field	82
3.13	Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle du Malathion sur le comportement des souriceaux dans le test d'interaction sociale	83
3.14	ffet de l'administration gestationnelle et lactationnelle du Malathion chez des souriceaux pendant la période postnatale sur les taux de MDA	84
3.15	Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle du Malathion, chez des souriceaux pendant la période postnatale sur l'activité cérébrale de l'AChE	85
3.16	Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle du Malathion chez des souriceaux pendant la période postnatale sur l'activité enzymatique de la CAT	86
3.17	Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle du Malathion chez des souriceaux pendant la période postnatale sur l'activité de SOD	87
3.18	Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle du Malathion chez des souriceaux pendant la période postnatale sur sur l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase	88
3.19	Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle du Malathion chez des souriceaux pendant la période postnatale sur sur l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase	89

3.20	Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle du Malathion sur le comportement des souris adultes lors d'un test d'Open Field	91
3.21	Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle du Malathion sur le comportement des souris adultes dans le test du labyrinthe en Y	92
3.22	Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle du Malathion sur le comportement des souris adultes dans le test de reconnaissance des objets . .	93
3.23	Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle du Malathion sur le comportement des souris adultes lors d'un test de labyrinthe en croix surélevé	94
3.24	Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle du Malathion sur le comportement des souris adultes dans le test d'interaction sociale	95
3.25	Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle de Malathion chez des souris adultes au niveau de MDA dans le cerveau, le foie et les reins	97
3.26	Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle du Malathion chez des souris adultes sur l'activité cérébrale de l'AChE	98
3.27	Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle de Malathion de souris adultes au niveau de la CAT dans les tissus du cerveau, du foie et des reins .	99
3.28	Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle du Malathion chez des souris adultes au niveau de SOD dans le cerveau, le foie et les reins	100
3.29	Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle de Malathion chez des souris adultes au niveau GPX dans les tissus du cerveau, du foie et des reins .	101
3.30	Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle du Malathion chez des souris adultes au niveau de la GST dans le cerveau, le foie et les reins	102
3.31	Coupes histologiques du foie montrant l'effet de l'exposition au Malathion pendant 60 jours chez des souris mâles prépubères	104
3.32	Coupes histologiques des reins montrant l'effet de l'exposition au Malathion (15 et 5 mg/ kg) pendant 60 jours chez des souris mâles	105

Liste des tableaux

4.1	Pourcentage de pesticides utilisées dans la région de tadla azilal	15
4.2	l'utilisation de chlorpyrophos par les agriculteurs	16
4.3	l'utilisation de malathion par les agriculteurs	16
4.4	l'utilisation de l-cyhalothrine par les agriculteurs	17
4.5	l'utilisation de méthidathion par les agriculteurs	17
4.6	l'utilisation de méthomyl par les agriculteurs	17
4.7	l'utilisation de carbofuran par les agriculteurs	17
4.8	l'utilisation de carbamate par les agriculteurs	17
4.9	l'utilisation du carbendazin par les agriculteurs	18
4.10	l'utilisation du cuivre par les agriculteurs	18
4.11	l'utilisation d'apoxiconazol par les agriculteurs	18
4.12	l'utilisation de mancozebe par les agriculteurs	18
4.13	l'utilisation de metaconazol par les agriculteurs	19
4.14	l'utilisation de tridemorphe par les agriculteurs	19
4.15	l'utilisation du thiophanate par les agriculteurs	19
4.16	l'utilisation de Glyphosate par les agriculteurs	19
4.17	l'utilisation de 2.4D(l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique) par les agriculteurs	20
4.18	quantité de produit à appliquer par les agriculteurs	21
4.19	l'usage des gants de protection par les agriculteurs	21
4.20	l'usage des masques de protection par les agriculteurs	21
4.21	l'usage des lunettes de protection par les agriculteurs	21
4.22	l'usage des combinaisons de protection par les agriculteurs	22
4.23	l'usage des bottes de protection par les agriculteurs	22
4.24	l'usage des équipements de protection par les agriculteurs	22
1.1	Toxicité aiguë du malaoxon	34
2.1	Protocole utilisé pour le dosage de l'activité du CAT	55

2.2	Protocole utilisé pour le dosage de l'activité du glutathion S-transférase (GST)	57
3.1	Effet de l'exposition de Malathion sur les paramètres de gestation	66
3.2	Effet de l'exposition de Malathion pendant la période post-partum sur les activités maternel et non-maternel des femelles	67
3.3	effet de Malathion sur les parametres physique des souriceaux	74
3.4	Variation du poids relatif des reins, cerveau et foie chez les souriceaux à PN5	80
3.5	Variation du poids relatif des reins, cerveau et foie chez les souriceaux à PN15	81
3.6	Variation du poids relatif des reins, cerveau et foie chez les souriceaux à PN21	81

List of Abbreviations

<i>ACh</i>	Acétylcholine
<i>AChE</i>	Acétylcholinestérase
<i>AChE</i>	Acétylcholinestérase
<i>ANOVA</i>	Analyse de variance
<i>BEDTA</i>	Acide Ethylène-Diamine-Tétraacétique
<i>BHE</i>	Barriere hémato-encéphalique
<i>BHT</i>	Butyl hydroxy toluene
<i>BBSA</i>	Bovine Sérum Albumine
Ca^{2+}	ion calcium
<i>CAT</i>	Catalase
<i>CAPM</i>	Centre Anti Poison du Maroc
<i>CDNB</i>	1-chloro, 2,4-dinitrobenzène
<i>CL₅₀</i>	Concentration létal 50
<i>-CN</i>	radical cyanide
<i>CO₂</i>	Dioxyde de carbone
<i>CPF</i>	Chlorpyrifos
<i>Cu</i>	Cuivre
<i>DAR</i>	Délai Avant Récolte
<i>DJA</i>	Dose journalière admissible
<i>DL₅₀</i>	Dose mortel 50
<i>EOA</i>	Espèces Oxygénées Activées
<i>EPI</i>	Equipement de Protection Individuelle
<i>ERO</i>	Espèces Réactives Oxydantes
<i>Fe</i>	Fer
Fe^{2+}	Ion fer
<i>GPx</i>	Glutathion peroxydase
<i>GSH</i>	Glutathion réduit
<i>GSSG</i>	Disulfure de glutathion (Glutathion oxydé)

<i>GST</i>	Glutathion S-transférase
<i>H₂O</i>	Eau
<i>H₂O₂</i>	Peroxyde d'hydrogène
<i>INRA</i>	Institut National de la Recherche Agronomique
<i>LOO•</i>	Radical peroxyde
<i>LPO</i>	Peroxydation lipidique
<i>MDA</i>	Malondialdéhyde
<i>MET</i>	Méthomyl
<i>•NO</i>	Oxyde nitrique ou monoxyde d'azote
<i>NBT</i>	NITROBLUE-TETRAZOLIUM
<i>O₂</i>	Oxygène
<i>O₂^{•-}</i>	Anion superoxyde
<i>1O₂</i>	Oxygène singulet
<i>HO•</i>	Radical hydroxyle
<i>OMS</i>	Organisation Mondiale de la Santé
<i>ONU</i>	Organisation des Nations Unies
<i>OR</i>	Odds Ratios
<i>ORP</i>	Observatoire des résidus de pesticides
<i>OP</i>	organophosphoré
<i>SPSS</i>	Statistical Package for the Social Sciences
<i>TBA</i>	acide thiobarbiturique
<i>TCA</i>	acide trichloracétique

production scientifiques

Articles scientifiques :

Fatima Zahra Ouardi , Hammou Anarghou ,Hafsa Malqui , Nabila Ouasmi , Mohamed Chigr ,Mohamed Najimi , Fatiha Chigr(2018)«Gestational and Lactational Exposure to Malathion Affects Antioxidant Status and Neurobehavior in Mice Pups and Offspring »In Journal of Molecular Neuroscience 31.

Hafsa Malqui , Hammou Anarghou, Fatima Zahra Ouardi,Nabila Ouasmi, Mohamed Najimi,Fatiha Chigr (2018) «Continuous Exposure to Inorganic Mercury Affects Neurobehavioral and Physiological Parameters in Mice » In Molecular Neuroscience 66,291-305.

Participations aux événements scientifiques :

Fatima Zohra Ouardi, Mohamed Droussi, Mohamed Chigr, Vieillessement des ovules de la carpe argentée, Recherche Scientifiques : innovation et développement, faculté des sciences et techniques de Béni Mellal, 10-11 juin 2014.

Fatima Zohra Ouardi, N.Ouasmi, H.Malqui, M.Najimi, M.Chigr, Les actions neurotoxicologiques des pesticides, Mediterranean Neuroscience School “Food intake regulation : physiological and physiopathological aspects“ , faculté des sciences et techniques de Béni Mellal 17-21 novembre 2014

Fatima Zohra Ouardi, Nabila Ouasmi, Fatiha Chigr, Effet post-natale du malathion sur le comportement alimentaire chez les souris, 2eme édition de la journée doctorale (JDOC15), faculté des sciences et techniques de Béni Mellal, 26-28 Mars 2015.

Fatima Zohra Ouardi, Malki Hafsa, Nabila Ouasmi, Fatiha Chigr, Mohamed Najimi, Effet de l'exposition prénatal et postnatal du malathion sur les paramètres développementaux et comportementaux chez la souris, faculté Poly disciplinaire de Béni Mellal Avril 18 au 20 ,2018

Participation aux formations scientifiques :

Fatima Zohra Ouardi « The first Maghreb courses on parkinson's Diseases and Related Disorders » .Marrakech janvier 19 et 20,2015.

Fatima Zohra Ouardi « Rédaction scientifique et publication électronique » faculté des sciences et techniques de Béni Mellal Mai 21,2016.

Fatima Zohra Ouardi « symposium international des jeunes chercheurs en Neurosciences » faculté Poly disciplinaire de Béni Mellal Avril 18 au 20 ,2018.

Fatima Zohra Ouardi « workshop sur les techniques appliquées aux neurosciences (stéréotaxie, histologie et immunohistochimie » faculté Poly disciplinaire de Béni Mellal Avril 18 au 20 ,2018.

résumé

La protection des cultures (fruits, légumes, céréales, légumineuses, etc.) contre les ravageurs (insectes, acariens, autres arthropodes) et maladies (champignons, bactéries, virus, etc.) se fait principalement par des produits chimiques appelés produits phytosanitaires (insecticides, fongicides, herbicides, etc.).

Ces pesticides sont très mal utilisés dans la majorité des cas : utilisation le plus souvent de produits très toxiques, aucun respect des doses d'emplois (surdosage), réalisation de plusieurs applications chimiques au cours du cycle de la culture, non respect du délai avant récolte, et par conséquent, une pollution accrue des différentes composantes de l'environnement (nappe phréatique, sol, air, etc.) mais surtout des quantités énormes de résidus de pesticides dans les fruits et légumes (dépassement des limites maximales de résidus) qui peuvent avoir des effets néfastes sur l'organisme d'un individu ou sur ses descendants. Le fœtus et le jeune enfant sont les plus menacés par ces substances.

Afin de montrer l'urgence de l'action préventive dans ce domaine, nous avons mené une enquête sur l'utilisation des pesticides en établissant différents questionnaires que nous avons adressés à des utilisateurs et des vendeurs, l'étude a couvert la région Tadla Azilal.

Nous avons également mené l'étude de l'effet des pesticides sur des souris, et plus particulièrement durant le développement. Nous avons analysé des paramètres physiologiques et physiques chez des souris témoins et des souris intoxiquées.

Nos résultats montrent que L'exposition prénatale au pesticides provoque des effets délétères au niveau de l'organisme se traduisant par ; un effet négatif sur la croissance corporelle, un effet hépatotoxique (nécrose hépatique), néphrotoxique (Atrophie glomérulaire) et un effet négatif cérébral (diminution de l'activité de l'enzyme acétylcholinestérase).

Nous avons noté que l'utilisation continue des pesticides est à l'origine aussi de l'apparition d'un état de stress oxydant démontré par une augmentation de la peroxydation lipidique, signalée suite à une détermination des concentrations de malondialdéhyde tissulaires chez les traités par rapport aux témoins.

Mots clé : Malathion - Intoxication – cerveau - mémoire - troubles comportementaux

Introduction Générale

Les pesticides sont des produits chimiques économiquement importants dans l'agriculture, et leur utilisation a augmenté le rendement des plantes pour la nourriture, entraînant une réduction des coûts des aliments. Cependant, ils persistent généralement dans les produits agricoles et dans l'environnement, provoquant ainsi une pollution environnementale grave et des risques potentiels pour la santé, y compris des cas d'intoxication humaine aiguë et chronique (YEN et al., 2000, DALLEGRAVE et al., 2007).

Les pesticides organophosphorés (OP) sont largement utilisés et comprennent certains agents chimiques très toxiques. Récemment, plus de 100 composés organophosphorés différents ont été synthétisés et sont largement utilisés dans le monde entier dans les programmes agricoles et de santé publique comme insecticides, acaricides et nématotides, en médecine vétérinaire comme ectoparasitocides, et en tant que lubrifiants, plastifiants. (YURUMUZ et al., 2007, BALALI-MOOD, 2008).

L'insecticide OP malathion [S-1,2 (bis-éthoxycarbonyl) éthyl O, O-diméthyl phosphorodithioate] est largement utilisé dans le monde entier pour lutter contre les arthropodes majeurs dans les programmes de santé publique, les ectoparasites animaux, les poux et les poux humains, les insectes domestiques et protéger le grain entreposé ((MARONI et al., 2000)).

Le malathion est connu pour induire une excitotoxicité par son analogue bioactif, le malaoxon (HAZARIKA et al., 2003). De plus, plusieurs études ont rapporté des effets neurotoxiques de l'exposition au malathion chez les humains (VIDAIR, 2004) et les animaux expérimentaux (BROCARDI et al., 2005).

Il a été rapporté que les pesticides OP, y compris le malathion, exercent leurs effets toxiques primaires en phosphorylant le résidu sérine au site actif de l'acétylcholinestérase (AChE), inhibant ainsi cette enzyme dans les tissus neuronaux et non neuronaux. Cette enzyme est responsable de l'hydrolyse rapide de l'acétylcholine neurotransmetteur (ACh) en choline et acétate lors de la neurotransmission dans les synapses cholinergiques (WANG et al., 2009).

Les neurotransmetteurs, comme l'acétylcholine, jouent de multiples rôles développementaux, le cerveau en développement est extrêmement vulnérable aux substances chimiques neuroactives qui déclenchent ou bloquent les réponses neurotransmetteurs pendant les périodes de croissance cérébrale rapide, du stade embryonnaire précoce à l'adolescence.

Compte tenu des effets toxiques du OP, on s'inquiète de plus en plus de l'exposition des femmes enceintes, des nourrissons et des enfants à ces composés. Les enfants des communautés agricoles ou des communautés urbaines, où des pesticides domestiques sont utilisés,

courent le risque d'être exposés aux inhibiteurs de l'acétylcholinestérase par un contact main à bouche (ESKENAZI, 1999).

Les enfants sont considérés comme plus vulnérables en raison des changements anatomiques et de maturation significative qui se produisent dans le cerveau pendant les périodes de développement (ANDERSEN, NIELSEN et GRANDJEAN, 2000).

D'énormes preuves scientifiques suggèrent que l'exposition au OP est une menace toxicologique majeure pouvant affecter la santé humaine et animale en raison de leurs diverses toxicités telles que la neurotoxicité, la toxicité endocrinienne, l'immunotoxicité, la toxicité reproductive, la génotoxicité et l'altération des organes.

Des échantillons d'eau brute et en bouteille auraient été contaminés par divers résidus d'OPI, dont certains étaient beaucoup plus élevés que les niveaux recommandés (MATHUR et al., 2003). (SANGHI et al., 2003) ont signalé des niveaux de résidus d'OPI dans des échantillons de lait maternel en Inde.

Sur la base des niveaux de résidus d'OPI, il a été spéculé que les nourrissons peuvent consommer 4,1 fois plus de malathion que les niveaux d'apport quotidiens moyens recommandés par l'Organisation mondiale de la santé. De même, des échantillons de sang humain auraient été contaminés par des résidus de monocrotophos, de chlorpyrifos, de malathion et de phosphamidon (MATHUR et al., 2005).

Ainsi, les OP présentent une menace environnementale réaliste pouvant affecter diverses facettes de la santé humaine.

Actuellement, la question du risque sanitaire liée à une exposition environnementale à des doses subtoxiques est de plus en plus émergente, l'impact d'une telle exposition ne se mesure pas immédiatement mais peut être retardé dans le temps. Si les effets délétères des OP sur la physiologie des organes à savoir effets hépatotoxiques, cancérigènes, génotoxiques et neurotoxique ont été bien documentés, peu d'études ont été consacrées à leurs effets développementaux sur le cerveau et ses fonctions cognitives.

Le développement du SNC passe par plusieurs stades avant d'atteindre sa maturation, l'une des étapes les plus importantes s'étale entre le 3^{ème} et la 4^{ème} semaines après la naissance (Dobbing et Sauds. 1979). Cette étape se caractérise par une augmentation rapide de la taille du cerveau, par le début de synaptogenèse, de la prolifération neuronale et de la myélinisation (Dowison et dobbing, 1966). Au cours de cette période le développement de cerveau est plus vulnérable aux agressions toxiques que celui de l'adulte. L'adolescence est également une période critique du développement du cerveau (van wals et al, 2011).

Elle est caractérisée par la maturation des processus cérébraux impliqués des fonctions cognitives, les comportements sociaux et émotionnels (Spear, 2000).

Des études de toxicité neurodéveloppementale sont justifiées au niveau de la grande vulnérabilité du SNC pendant le développement, d'une part c'est une période caractérisée anatomique, biochimique et moléculaires, d'autre part l'exposition au malathion aux différents stades de développement et de maturation du SNC présenterait un risque neurotoxique à court et/ou à long terme.

Le présent travail s'inscrit dans cette optique et comporte deux parties complémentaires : La première partie est consacrée à une étude sur la nature des pesticides utilisés, leur formulation, les pratiques d'utilisation, ainsi que les mesures de protection dans la région de Tadla-Azilal.

La seconde partie a comme objectif principal d'étudier expérimentalement les effets neurotoxiques à court terme et à long terme d'une exposition orale au malathion. Pour cela, nous avons réalisé plusieurs approches :

- Étude de l'impact du protocole d'exposition sur le comportement maternel. En effet, ce dernier peut avoir des répercussions significatives sur le développement de la portée. Notre approche est basée sur des tests pour observer la qualité des soins apportés et les interactions mère-jeunes.

- Évaluation des effets du Malathion sur le développement sensorimoteur des souriceaux au cours des quatre premières semaines de la vie postnatale.

- Étude des effets du traitement à long terme sur le développement cognitif (apprentissage et différentes formes de la mémoire) et comportemental (activité locomotrice, anxiété, dépression, comportement social) chez les souris adultes.

- Évaluation des enzymes afin d'examiner le pouvoir potentiel de malathion d'induire un état de stress oxydatif.

- Étude histologique au niveau du foie et des reins .

Première partie

Enquête sur l'utilisation des pesticides et leurs effets sur la santé des agriculteurs dans la région du Tadla Azilal

1 Introduction

la plupart des agriculteurs utilisent des pesticides chimiques pour lutter contre les mauvaises herbes, les parasites et les maladies . Des résidus de ces pesticides peuvent encore se trouver dans les aliments qui sont consommés par la suite par l'homme

En effet beaucoup de ces substances ne sont pas facilement dégradables ; ils s'attardent dans les sols, se lessivent dans les eaux souterraines et contaminent l'environnement dans une large mesure. Ils peuvent également pénétrer dans le corps des organismes, s'accumuler dans la chaîne alimentaire et nuire par conséquent à la santé humaine (KISHI M, 1995). Au Maroc, l'économie dépend avant tout de l'agriculture.

Elle emploie 40% de la population active au Maroc et assure 30% des exportations (GHALIB M., 1992). La pression humaine sur l'environnement au Maroc a entraîné une augmentation croissante à des besoins alimentaires et industriels et ce changement est en partie dû à l'intensification des systèmes de production agricole. Le Maroc importe chaque année entre 6 000 et 6 500 tonnes de produits phytosanitaires par l'intermédiaire de 28 entreprises environ. Il existe actuellement sur le marché environ 210 principes actifs représentés par 1 400 spécialités commerciales (ANONYME, 1989b).

Les effets des pesticides sur la santé publique sont connus depuis longtemps et les effets indésirables des pesticides chimiques ont été reconnus comme un grave problème de santé publique au cours des dernières décennies. Selon une étude de marché, environ 5,684 millions de livres de pesticides (principes actifs) sont appliqués chaque année dans le monde (ANON, 1986).

L'Organisation mondiale de la santé estime qu'il y a trois millions d'intoxications aiguës dans le monde chaque année, dont environ 2 000 000 sont imputables à des pesticides, dont 1% dans les pays industrialisés (SATAKA M Y, 1997). Les mêmes travailleurs ont en outre signalé que le système immunitaire humain pouvait également être endommagé et sur-stimulé par la variété de pesticides.

Les pesticides demeurant un outil pour l'agriculture moderne, il est donc important de concevoir des stratégies permettant de réduire l'impact des pesticides (EKSTRÖM, 2011). Ceci peut être réalisé avec une utilisation minimale de pesticides en utilisant un diagnostic précis et une

connaissance avancée des problèmes de nuisibles, un timing optimisé des interventions pour une efficacité maximale à long terme, la sélection d'un produit pesticide ayant un impact minimal sur les organismes non ciblés et l'opérateur, et une application améliorée du produit sélectionné pour un transfert de dose maximale à la cible biologique (DENT, 2005).

Notre projet vise à étudier les effets des pesticides sur la santé et l'environnement dans la région de Tadla Azilal. Pour ce faire, notre laboratoire en collaboration avec l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) ont lancé cette enquête dans la région de Tadla Azilal durant la période octobre- juin 2016.

L'emploi de tout pesticide doit se faire selon les bonnes pratiques agricoles (BPA) afin d'améliorer d'une part la santé des utilisateurs et des consommateurs de produits agricoles qui ont subi des traitements phytosanitaires et d'autre part de préserver les écosystèmes. Au Maroc les études qui se sont intéressées à étudier le non respect des BPA par les producteurs sont rares ou bien absentes. Les rares analyses des pratiques agricoles ont souligné le fait que les producteurs ne mettaient pas en oeuvre les BPA. Ces faits démontrent que la gestion non sécurisante des pesticides peut causer des risques importants pour les utilisateurs, les consommateurs et l'environnement.

L'objectif principal de cette étude est de collecter des données sur les cas d'intoxication par les pesticides en particulier dans la région de Tadla Azilal afin de contribuer à l'amélioration de la santé des populations et à la préservation de l'environnement.

Nos objectifs spécifiques déclineront comme suit :

- déterminer la nature des pesticides utilisés et leur formulation ;
- évaluer le respect des conditions d'emploi des produits phytosanitaires par les agriculteurs ;
- d'évaluer leur connaissance des risques associés à l'utilisation de ces produits ;
- identifier les problèmes de santé et environnementaux causés par l'utilisation des pesticides ;

2 Etude bibliographique

2.1 Généralités sur les pesticides

Définition

Les pesticides sont, par définition, des produits dangereux.

En effet, ce terme désigne l'ensemble des produits chimiques utilisés pour tuer ou contrôler les nuisibles indésirables, tels que les insectes, les mauvaises herbes, les rongeurs, les champignons, les bactéries ou d'autres organismes.

Le terme "pesticide" comprend des insecticides, des herbicides, des rodenticides, ainsi que des désinfectants et des fumigènes.

Ces composés ont un rôle vital dans le contrôle des ravageurs agricoles, industriels, dans les maisons et jardins. Parce qu'ils ont la capacité de réduire le niveau des maladies végétales à moindre coût, l'opinion publique a toléré leur utilisation (ASPELIN, 1998).

Les pesticides à usage agricole sont considérés comme des substances et des préparations destinées à assurer la destruction ou à prévenir l'action des animaux, végétaux, et micro-organismes nuisibles aux cultures (El Gorchi, 2008).

Les pesticides appelés aussi produits phytosanitaires, produits agro-pharmaceutiques ou bien même produits antiparasitaires à usage agricole, sont utilisés actuellement pour :

- Augmenter les rendements des cultures ;
- Conserver les réserves alimentaires contre les parasites ;
- Lutter contre les vecteurs de maladies ;
- Protéger certaines espèces, etc ;

Historique

Depuis les prémices de l'agriculture, l'homme a toujours cherché à protéger ses récoltes. Cette volonté propre à l'être humain a permis au fil du temps, le développement de méthodes limitant l'expansion des ravageurs, parasites ou maladies.

L'amélioration de la qualité de la production alimentaire fut, sans nul doute, à l'origine de

l'utilisation des tout premiers pesticides dès 800 ans avant Jésus-Christ. Pour exemple, l'utilisation du soufre dans les œuvres d'Homère comme agent de fumigation y est mentionné.

Ce procédé, utilisé depuis la Grèce antique pour « purifier l'air », avait la propriété de chasser les insectes et d'éloigner la « vermine ». L'observation de son action létale contre les animaux et les plantes, a probablement conduit à l'utilisation et à la marginalisation de ce produit (BLANCOU, 1995). De la même manière, l'usage de l'arsenic comme insecticide fut décrit par le naturaliste romain Pline l'Ancien, 50 ans avant Jésus-Christ. Par la suite, de nombreuses découvertes relatives aux propriétés toxiques des plantes ont pu être faites.

Vers la fin du XVIème siècle, la roténone extraite de diverses plantes tropicales de sols acides (*Derris elliptica*, *Tephrosia vogelii* ou encore *Onchocarpus nico*), fut également utilisée comme insecticide en Inde. Un siècle plus tard, Jean de la Quintinie, jardinier et agronome français, a décrit les propriétés insecticides de la nicotine (BONNEFOY, 2012). Un grand pas dans l'histoire des « pesticides » a été franchi avec l'expansion de la chimie minérale vers la fin du XIXème siècle.

Effectivement, un très grand nombre de « pesticides minéraux » tirés de sels de cuivre ont été mis en évidence. Un des exemples les plus marquants fut l'invention de la bouillie bordelaise. Ce mélange d'eau, de sulfate de cuivre et de chaux est utilisé comme fongicide contre *Plasmopara viticola* (mildiou de la vigne) par les vignerons français (Blancou, 1995 ; Bonnefoy, 2012).

L'apparition du machinisme agricole, couplé à l'augmentation de la population ainsi que les connaissances de plus en plus poussées en chimie organique de synthèse, ont permis d'assister au véritable essor de l'utilisation des pesticides dès le début du XXème siècle.

D'un point de vue chronologique, une des premières familles synthétisées est celle des organochlorés, avec le DDT en 1874. La découverte des propriétés insecticides du Dichlorodiphényltrichloroéthane en 1939 ne représente que le début de cette nouvelle ère de développement.

La première utilisation du DDT fut destinée à lutter contre les anophèles, vecteurs du paludisme, ou certains arthropodes vecteurs du typhus épidémique (BRENGUES et COOSEMANS, 1997). Depuis la seconde guerre mondiale, cet insecticide a également été appliqué de manière intensive dans de nombreuses cultures agricoles : 334 cultures différentes et sur 240 espèces de ravageurs (MIQUEL, 2003).

De nos jours, le Dichlorodiphényltrichloroéthane est toujours utilisé dans certains pays tropicaux principalement à l'intérieur des habitations pour lutter contre certains moustiques du genre *Anopheles*, vecteurs du paludisme.

Par la suite, et ce grâce à la recherche sur les gaz de combat, la famille des organophosphorés

a été découverte en 1944. Le Parathion, le Malathion ou encore le Chlorpyrifos-éthyl en sont quelques exemples. À partir de ce moment, l'utilisation des pesticides s'est généralisée au niveau mondial et leur consommation a tout simplement doublé entre 1945 et 1985.

Cette seconde moitié du XXème siècle a vu l'émergence de nouvelles familles de pesticides. Tout d'abord, les carbamates en 1957, dont le premier représentant fut le Carbaryl, puis le Carbofuran ou encore l'Aldicarbe. D'autres pesticides, également efficaces et peu coûteux, se sont imposés dans les années 1970-1980 comme les Pyréthrinoïdes. Les cibles potentielles des pesticides se sont également multipliées, amplifiant par voie de conséquence leurs potentiels d'action (MCEWEN et STEPHENSON, 1979).

Au cours des cinquante dernières années, l'agriculture s'est construite autour de l'utilisation des pesticides, ceux-ci permettant de diminuer l'action des ravageurs de culture, donc considérés comme un facteur de productivité, mais aussi comme le moyen de proposer des produits végétaux d'aspect irréprochables, tels qu'attendus en partie par le consommateur. Parallèlement à l'essor de ces produits chimiques, des phénomènes de résistance sont apparus à la fois chez les insectes, chez les plantes adventives (mauvaises herbes) et chez certains champignons, par le biais de mécanismes de mutation du gène de la cible, de détoxification, de séquestration (impossibilité pour le produit de pénétrer dans les cellules cibles), ou d'hérédité de gènes de résistance.

Il est donc important pour l'industrie de continuer la recherche et le développement de nouvelles molécules, pour limiter ces phénomènes de résistance (Historique des pesticides par l'ORP (« [Observatoire des résidus des pesticides \(ORP\)](#) »)).

2.2 Utilisation des pesticides au Maroc

Dans le domaine de la protection des végétaux, l'utilisation des pesticides s'avère indispensable pour soigner ou prévenir les maladies des organismes végétaux (Detroux, 1996), ou du moins à limiter la croissance de certains végétaux nuisibles aux cultures, tel dans les cultures maraichères, les céréales, les rosacées, les agrumes et en particulier, les cultures intensives basées surtout au niveau des grands périmètres irrigués (Gharb, Loukkos, Abda, , Doukkala, Tadla, Haouz et Souss-Massa).

Le secteur de pesticides au Maroc demeure parmi les moins maîtrisés sur le plan statistique et de l'information. Cette situation est due en grande partie à l'absence d'une coordination interprofessionnelle des sociétés opérantes dans l'importation et la formulation et celles de la distribution des produits phytosanitaires (BAKOURI, 2006).

L'absence d'unités de fabrication de produit phytosanitaire dans notre pays, fait que 95 % des produits sont importés prêt à l'emploi (en moyenne 15425 tonnes/ an), le reste est formulé à base de pré-mix ou de concentré. Par contre 35 % à 45 % de ce qui est importé est reconditionné en petits emballages adaptés pour satisfaire les besoins des petits agriculteurs. Le marché de pesticides est tenu à 90 % par des privés et se chiffre à environ 730.4 Millions de Dirhams soit 0.2 % du marché mondial (LIFE, 2011).

2.3 Modes d'expositions aux pesticides

Les pesticides sont utilisés, non seulement dans l'agriculture, mais aussi dans divers secteurs (industries, collectivités territoriales) ainsi qu'en usage domestique et vétérinaire. Des problèmes de résidus dans les légumes, les fruits etc..., sont aussi mis en évidence (BELHAOUCHET, 2014).

Les pesticides peuvent contaminer les organismes vivants via multiple voies d'exposition (voir figure 2.1). En effet ces polluants pouvant pénétrer dans l'organisme par contact cutané, par ingestion des matrices alimentaires contaminées et encore par inhalation de l'air pollué (UTIP et al., 2013).

La grande variété de produits rend difficile l'évaluation des expositions chez les populations, qu'il s'agisse de la population exposée professionnellement (agriculteurs ou manipulateurs), ou de la population générale. (BOURBIA, 2013).

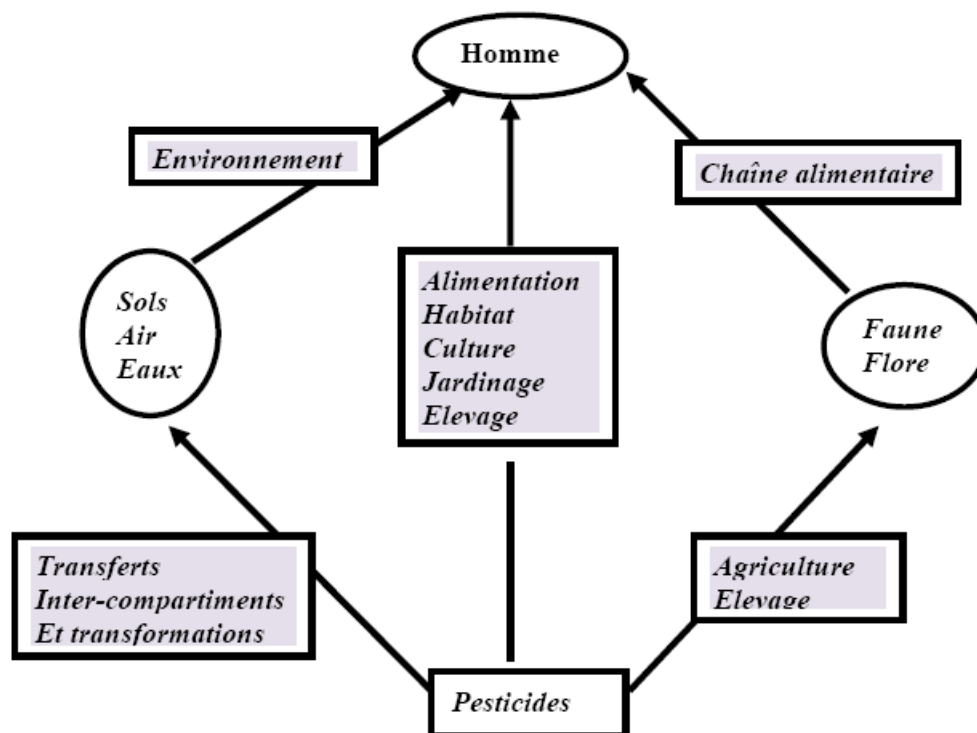


FIGURE 2.1 – Modes d'exposition de l'homme et des milieux par les pesticides.
(Merhi, 2008).

2.4 Santé et pesticides

Les effets des pesticides sur la santé dépendent du type du pesticide lui-même. Il peut être absorbé par différentes voies, telles que l'inhalation, l'ingestion et l'absorption cutanée. Des problèmes de santé peuvent survenir chez les travailleurs qui manipulent des pesticides, principalement les agriculteurs, tels que des douleurs abdominales, des vertiges, des maux de tête, des nausées, des vomissements, ainsi que des problèmes de peau et des yeux (ECOBICHON, 1996).

Certains pesticides peuvent affecter le système nerveux ou le système endocrinien, ils peuvent être également cancérigènes.

L'évaluation des risques pour la santé humaine est donc nécessaire pour tous les pesticides même s'ils ont eu une autorisation de mise sur le marché (AMM). La difficulté de l'évaluation est en partie liée au fait que les effets des pesticides sur la santé peuvent être immédiats ou retardés suite à l'exposition (EPA, 2007).

Des études montrent d'autres conséquences néfastes de l'exposition aux pesticides, et notamment des problèmes neurologiques, des malformations congénitales, la mort foetale (SANBORN et al., 2007), et des troubles neurodéveloppementaux (JUREWICZ et HANKE, 2008).

Au plan international, plusieurs enquêtes ont confirmé que les pesticides sont responsables à des effets néfastes sur la santé des agriculteurs.

L'enquête de BELL, 2001, menée dans 10 régions agricoles en Californie, a recherché s'il y avait une relation entre la mort du fœtus (73 mort-nés et 611 contrôles) due à des malformations congénitales et le fait, pour la mère, d'habiter dans une région d'usage intensif de pesticides. Elle a montré un risque accru pour toutes les classes de pesticides entre la 3^{ème} et la 8^{ème} semaine de la grossesse tant pour les enfants résidant dans un large périmètre autour des cultures traitées (9 x 1 mile) que pour les enfants résidant dans un périmètre proche (1 mile).

une autre étude écologique de SCHREINEMACHERS, 2003, a comparé les 43.634 naissances enregistrées entre 1995-1997 dans le Minnesota, le Montana, le Sud et le Nord Dakota dans une population divisée en deux groupes : celle habitant une région de culture du froment à haute utilisation d'herbicides et celle habitant dans une région dans laquelle l'usage des herbicides est plus faible. Une augmentation significative des anomalies du système circulatoire/respiratoire a été observée chez les enfants des deux sexes (OR : 1.65) dans la région de culture du froment. Le risque était significativement plus élevé chez les garçons. Une association plus élevée a également été observée pour un autre type d'anomalies du système circulatoire/respiratoire excluant le coeur (OR : 2.03). Le risque était également plus élevé chez les garçons. Le risque augmentait lorsque la conception avait eu lieu au printemps (avril-juin). Une analyse séparée a montré que les garçons conçus au printemps dans la région de culture à faible utilisation d'herbicides (groupe témoin) présentaient le même risque pour les anomalies du système circulatoire/respiratoire. Ce doublement du risque observé dans les deux groupes d'enfants conçus au printemps laisse supposer que les herbicides ne seraient pas les seuls responsables.

L'enquête de SCHWARTZ, 1986, réalisée en Californie, a comparé les 2.463 naissances survenues dans une communauté agricole. La descendance du groupe dont l'un ou les deux parents étaient occupés dans des activités agricoles n'a pas montré d'excès de troubles de la reproduction (faible poids à la naissance, morti-natalité, malformations mineures ou majeures, mortalité à la naissance) comparée à celle d'un groupe non lié à des occupations agricoles. Seules des anomalies des membres ont été observées plus fréquemment chez les

enfants d'agriculteurs . Les pesticides utilisés dans cette région étaient des insecticides organophosphorés, des carbamates, des herbicides chlorophénoxyacétiques. Certains pesticides de ces familles ont des effets tératogènes sur l'animal d'expérience (SHARDEIN, 1985) .

L'enquête de ENGEL, 2000, en Australie, a rapporté un risque relatif de 3.4 pour l'exposition maternelle pendant la grossesse à des pesticides agricoles et domestiques.

L'enquête de ENGEL, 2000, dans l'Etat de Washington, a comparé un groupe de 4.466 bébés nés de mères employées dans des activités agricoles à deux groupes de référence : 23.512 bébés nés de parents qui n'ont jamais travaillé dans des activités agricoles et un groupe de 5.994 bébés dont seul le père exerçait un travail dans diverses activités agricoles. Une augmentation du risque d'anomalies des membres a été observée avec un PR (« Prevalence Ratio ») de 2.5 chez les enfants dont la mère travaillait dans l'agriculture. Une légère élévation du risque a été également observée dans le groupe des pères occupés dans des activités agricoles avec un PR (non significatif) de 3.0. Chez les travailleuses agricoles espagnoles, le risque était légèrement augmenté (PR : 2.6). d'après ces résultats supportent l'hypothèse qu'une exposition maternelle peut augmenter le risque .

Au plan national le Centre Anti Poison et de Pharmacovigilance du Maroc (CAPM) a collecté 10332 cas d'intoxication aigue aux pesticides, soit 14 % de l'ensemble des déclarations reçues pendant la même période.

L'enquête de Idrissi et al(2010) dans la région de Tadla-Azilal a enregistré 1027 cas d'intoxications aiguës aux pesticides dont 39 cas de décès. Selon les résultats déclarés au CAPM, la région de Tadla-Azilal a enregistré le taux le plus élevé des intoxications aiguës aux pesticides, avec 6,66 pour 100000 habitants.

Cette situation confirme que les intoxications aiguës aux pesticides dans la région de Tadla-Azilal sont loin d'être négligeables.

2.5 Equipements de protection individuelle

L'équipement de protection individuelle (EPI) sert de barrière contre l'exposition aux pesticides. Afin d'assurer la protection des différentes voies d'exposition à ces produits, il faut toujours porter des vêtements et des équipements de protection appropriés au degré et à la nature des risques. Aucun pesticide ne peut être utilisé de façon sécuritaire sans le port de vêtements de protection individuelle.

L'utilisateur devrait toujours débiter sa journée de travail avec des EPI propres et en bon état.

L'équipement de protection individuelle adéquat est indiqué sur les fiches de données de sécurité des produits phytosanitaires (Ministère de l'agriculture, Mars 2012).

Les gants

Les mains constituent le premier lieu d'absorption des produits par la peau. Il faut utiliser des gants en nitrile ou néoprène, conformes aux normes européennes (signe CE). Les gants à manchettes qui recouvrent les mains et les avant-bras sont à privilégier.

Les lunettes

Certains produits sont classés irritants pour les yeux (R36), pouvant causer des lésions oculaires graves (R41), ou pouvant causer des brûlures (R34-35). Des lunettes étanches sont indispensables pour protéger des projections si on ne porte pas de masque intégral.

La combinaison

Il faut porter une combinaison jetable suffisamment large pour être enfilée sur les vêtements. Les combinaisons de protection sont classées selon six types exprimant le degré de protection qu'elles procurent :

- Type 1 : combinaison de protection chimique étanche aux gaz .
- Type 2 : combinaison de protection chimique non étanche aux gaz maintenue en surpression par une alimentation en air respirable.
- Type 3 : vêtement de protection étanche aux liquides sous forme de jet continu .
- Type 4 : vêtement étanche aux pulvérisations .
- Type 5 : vêtement de protection contre les produits chimiques sous forme de particules solides .
- Type 6 : vêtement conçu pour des risques liés à une exposition accidentelle à des pulvérisations ou des éclaboussures de produits chimiques peu dangereux .

Les bottes

Il faut utiliser des bottes réservées à cet usage, en bon état, imperméables, en particulier lors des traitements herbicides.

Le masque

Il faut un masque intégral ou un demi-masque à cartouche (ou galette) filtrante, de type A2P3. Le filtre à particules qualité P3 arrête au moins 99% des particules. Le filtre qualité A2 est un filtre anti-gaz.

3 Matériels et Méthodes

3.1 Cadre général de l'étude

La région de Tadla-Azilal est géographiquement située dans le centre-ouest du Maroc. Sa superficie est de 16 996 km, il représente 3,2% du territoire national. Sa population est estimée à 1 479 000 habitants en 2004, soit 4,85% de la population totale (PLAN, 2006). Au niveau administratif, la région est divisée en trois provinces : Beni Mellal, Fkih Ben Saleh et Azilal (voir figure3.1).

Dans cette région, l'agriculture représente l'activité dominante de la région, à la fois par les emplois offerts (81% de la population active rurale en 2008) et par l'économie régionale. D'autant que la région, avec ses plaines (Tadla) et ses importantes ressources en eau, offre la possibilité de développer une agriculture moderne et industrialisée.

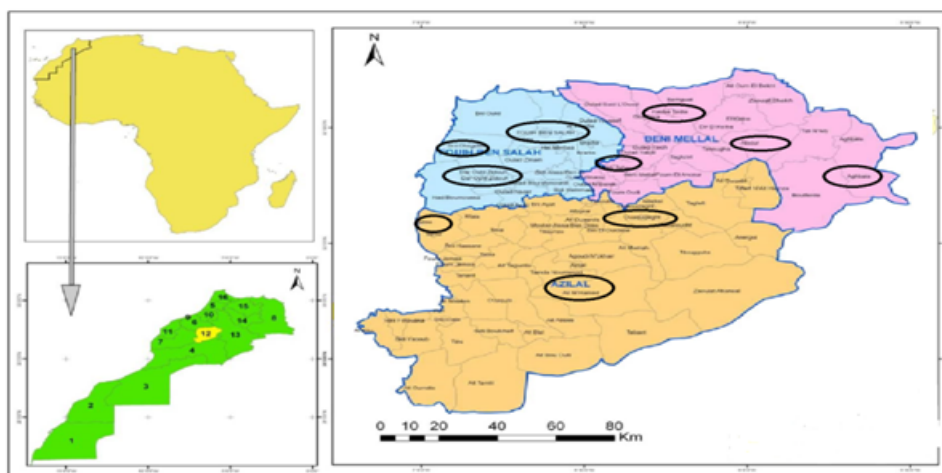


FIGURE 3.1 – Localisation géographique de la région de Tadla Azilal

3.2 Outils et méthodes de collecte

Les enquêtes ont été réalisées auprès de 89 producteurs. Le choix des personnes enquêtées est aléatoire, Le questionnaire a porté sur l'âge des agriculteurs interrogés, le choix du traitement (prix, sélectivité, toxicité, les produits utilisés (matière active, formulation, usage) ,

la quantité de produit à appliquer (dosage), les moyens de protection lors de l'application de ces produits, la sécurité et le devenir des emballages.

Le questionnaire a été rédigé en français et traduit en arabe (la langue nationale comprise par la majorité des agriculteurs). Les sujets explorés ont été identifiés en combinant les informations recueillies lors de discussions avec des agriculteurs, Environ un tiers des questions étaient des questions fermées dans un format à choix multiple, pour que les répondants ne sélectionnent que la ou les réponses appropriées à leur opinion ou leur attitude sur une question donnée. Certaines questions nécessitaient des réponses multiples. Sur la base des commentaires reçus, le questionnaire a été modifié pour assurer que son contenu final soit basé sur une réalité familière aux agriculteurs.

Le questionnaire comprenait trois sections principales. La première section visait à recueillir des informations sur les caractéristiques personnelles des agriculteurs, y compris leur expérience en agriculture et la taille de leur exploitation.

La deuxième section comprenait des questions d'information sur le nom et le ou les principes actifs de chaque pesticide appliqué aux doses recommandées sur l'étiquette .

La troisième section portait sur les perceptions des agriculteurs concernant les risques liés aux pesticides et sur l'expérience des effets des pesticides, la lutte antiparasitaire et l'information sur les pesticides.

3.3 Difficultés

Les difficultés ci-après ont été notées durant l'étude :

- certains producteurs n'ont pas voulu répondre à nos questions pour des raisons que nous Ignorons.
- la communication avec la plupart des producteurs peu alphabétisés en français a nécessité une traduction.
- il a été particulièrement difficile de communiquer avec des inconnus.

4 Résultats

L'âge moyen des agriculteurs interrogés était entre 21 ans et 60 ans. Un nombre important de répondants n'étaient pas à l'école ou n'avaient pas terminé leurs études primaires. La majorité des agriculteurs avaient entre 5 et 10 ans d'expérience dans l'agriculture. La taille des exploitations varie entre 5 ha et de 70 ha.

Plus de 80% des entretiens ont été complétés Comme le montre (tableau 4.1) , il existe trois catégories de pesticides dans la zone d'étude : insecticides, fongicides et herbicides, mais la majorité des produits chimiques utilisés sont des insecticides à 35%, suivis de 30% de fongicides et de 30% d'herbicides. Les nématicides, les raticides et les fumigants (5%) sont d'autres pesticides minoritaires(voir figure 4.1).

TABLEAU 4.1 – Pourcentage de pesticides utilisées dans la région de tadla azilal

class of pesticides	Answers	number of famers	Percentage
Herbicides	yes	10	11.6
	NO	75	87.2
Fongicides	yes	13	15.1
	NO	73	84.9
insecticides	yes	1	1.2
	NO	85	98.8
Others	yes	74	86
	NO	12	14

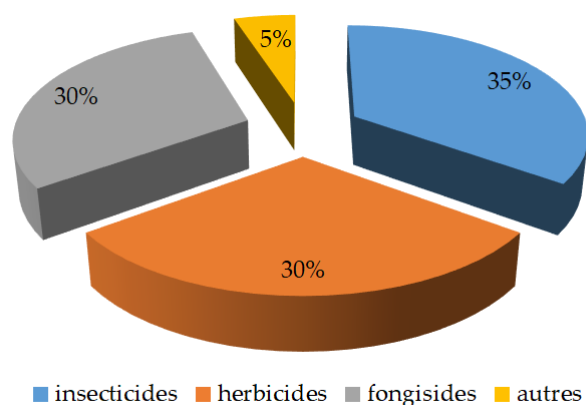


FIGURE 4.1 – Les différentes classes de pesticides utilisées dans la région de Tadla Azilal

4.1 Les matières actives utilisées par les Agriculteurs

Les insecticides

Les produits utilisés en contrôle des ravageurs portent sur 7 matières actives. Parmi ces matières actives ce sont le chlorpyrifos 48%(tableau 4.2), malathion 43%(tableau 4.3, l - cyhalothrine 30%(tableau 4.4), méthidathion 1%(tableau 4.5), méthomyl 5%(tableau 4.6), carbofuran 28%(tableau 4.7) , carbamate 27%(tableau 4.8).

TABLEAU 4.2 – l'utilisation de chlorpyrifos par les agriculteurs

	Effectifs	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
NON	42	48.8	49.4	49.4
OUI	48	50.0	50.6	100,0
Total	85	98.8	100,0	

TABLEAU 4.3 – l'utilisation de malathion par les agriculteurs

	Effectifs	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
NON	36	44.2	44.2	44.2
OUI	43	55.8	55.8	100,0
Total	86	100.0	100,0	

TABLEAU 4.4 – l'utilisation de l-cyhalothrine par les agriculteurs

	Effectifs	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
NON	56	65.1	65.1	65.1
OUI	30	34.9	34.9	100,0
Total	86	100.0	100,0	

TABLEAU 4.5 – l'utilisation de méthidathion par les agriculteurs

	Effectifs	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
NON	85	98.8	98.8	98.8
OUI	1	1.2	1.2	100,0
Total	86	100.0	100,0	

TABLEAU 4.6 – l'utilisation de méthomyl par les agriculteurs

	Effectifs	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
NON	81	94.2	94.2	94.2
OUI	5	5.8	5.8	100,0
Total	86	100.0	100,0	

TABLEAU 4.7 – l'utilisation de carbofuran par les agriculteurs

	Effectifs	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
NON	57	66.3	67.1	67.1
OUI	28	32.6	32.9	100,0
Total	85	98.8	100,0	

TABLEAU 4.8 – l'utilisation de carbamate par les agriculteurs

	Effectifs	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
NON	59	68.6	68.6	68.6
OUI	27	31.4	31.4	100,0
Total	86	100.0	100,0	

les fongicides

Pour les fongicides les agriculteurs utilisent 6 matières actives ,les carbendazimes 29% (voir tableau 4.9, le cuivre 7%(voir tableau 4.10), poxiconazol 8% (voir tableau 4.11), mancozebe 8% (voir tableau 4.12),metaconazol 7% (voir tableau 4.13), tridemorphe 1%(voir tableau 4.14).

TABLEAU 4.9 – l'utilisation du carbendazin par les agriculteurs

	Effectifs	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
NON	62	72.1	72.1	72.1
OUI	24	27.9	27.9	100,0
Total	86	100.0	100,0	

TABLEAU 4.10 – l'utilisation du cuivre par les agriculteurs

	Effectifs	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
NON	79	91.9	92.9	92.9
OUI	6	7.0	7.1	100,0
Total	85	98.8	100,0	

TABLEAU 4.11 – l'utilisation d'apoxiconazol par les agriculteurs

	Effectifs	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
NON	79	91.9	92.9	92.9
OUI	7	8.1	8.1	100,0
Total	86	100.0	100,0	

TABLEAU 4.12 – l'utilisation de mancozebe par les agriculteurs

	Effectifs	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
NON	79	91.9	91.9	91.9
OUI	7	8.1	8.1	100,0
Total	86	100.0	100,0	

TABLEAU 4.13 – l'utilisation de metaconazol par les agriculteurs

	Effectifs	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
NON	80	93.0	93.0	93.0
OUI	6	7.0	7.0	100,0
Total	86	100.0	100,0	

TABLEAU 4.14 – l'utilisation de tridemorphe par les agriculteurs

	Effectifs	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
NON	85	98.8	98.8	98.8
OUI	1	1.2	1.2	100,0
Total	86	100.0	100,0	

Les herbicides

Pour les herbicides les matières actives les plus utilisés ce sont thiophanate 18.6%,(voir tableau 4.15), Glyphosate 19.8% (voir tableau 4.16), 2.4D(l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique) 44.2%(voir tableau 4.17).

TABLEAU 4.15 – l'utilisation du thiophanate par les agriculteurs

	Effectifs	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
NON	69	80.2	81,2	81.2
OUI	16	18.6	18.8	100,0
Total	85	98.8	100,0	
système manquant	1	1.2		

TABLEAU 4.16 – l'utilisation de Glyphosate par les agriculteurs

	Effectifs	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
NON	69	80.2	81,2	80.2
OUI	17	19.8	19.8	100,0
Total	86	100.0	100,0	

TABLEAU 4.17 – l'utilisation de 2.4D(l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique) par les agriculteurs

	Effectifs	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
NON	46	53.3	53.3	53.3
OUI	38	44.2	44.2	97.7
2	1.2	1.2	1.2	98.8
10	1	1.2	1.2	100.0
Total	86	100.0	100,0	

4.2 le choix des produits utilisés

D'après nôtres enquête 79.1 % ont choisi leurs produits par sélectivité et 9.3% par toxicité et 11.6% par rapport au prix (voir figure 4.2).

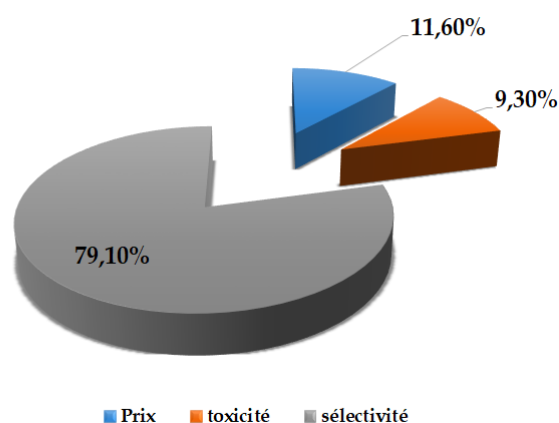


FIGURE 4.2 – Le choix des produits par les agriculteurs

4.3 La quantité de produit à appliquer

Pour les doses recommandées sont plus ou moins respectées par les producteurs 53.5% des producteurs dosent approximativement et 46.5% les dosent a partir des indicateurs sur L'emballage(voir 4.18)

TABLEAU 4.18 – quantité de produit à appliquer par les agriculteurs

	Effectifs	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
emballage	40	46.5	46.5	46.5
approximativement	46	53.5	53.5	100,0
Total	86	100,0	100,0	

4.4 Moyens de protection utilisés lors de la dilution et de l'application des pesticides

Pour la protection des applicateurs était généralement faible. Lors de l'application des pesticides, seuls 29.1 % des producteurs portaient des bottes fermées (voir tableau 4.23 , tous les autres étaient pieds nus. La moitié des producteurs (50%) ne portait qu'un short lors de la préparation et de l'application des pesticides.. Seuls 10 % ont utilisé une combinaison de protection (voir tableau 4.24).

TABLEAU 4.19 – l'usage des gants de protection par les agriculteurs

	Effectifs	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
NON	71	82,6	82,6	82,6
OUI	15	17,4	17,4	100,0
Total	86	100,0	100,0	

TABLEAU 4.20 – l'usage des masques de protection par les agriculteurs

	Effectifs	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
NON	70	81,4	81,4	81,4
OUI	16	18,6	18,6	100,0
Total	86	100,0	100,0	

TABLEAU 4.21 – l'usage des lunettes de protection par les agriculteurs

	Effectifs	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
NON	1	1,2	1,2	100,0
OUI	85	98,8	98,8	98,8
Total	86	100,0	100,0	

TABLEAU 4.22 – l'usage des combinaisons de protection par les agriculteurs

	Effectifs	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
NON	77	89,5	89,5	89,5
OUI	9	10,5	10,5	100,0
Total	86	100,0	100,0	

TABLEAU 4.23 – l'usage des bottes de protection par les agriculteurs

	Effectifs	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
NON	61	70,9	70,9	70,9
OUI	25	29,1	29,1	100,0
Total	86	100,0	100,0	

TABLEAU 4.24 – l'usage des équipements de protection par les agriculteurs

	Effectifs	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
NON	43	50,0	50,0	50,0
OUI	43	50,0	50,0	100,0
Total	86	100,0	100,0	

4.5 Destination des emballages vides

Pour les modes de gestion des emballages vides de pesticides, environ la moitié des producteurs (41 %) les réutilisaient pour s'en procurer à nouveau. Cependant, 36 % des producteurs abandonnaient les flacons dans les champs, d'autres les jetaient dans les poubelles (5 %). Seuls 5 % les rinçaient (voir figure 4.3).

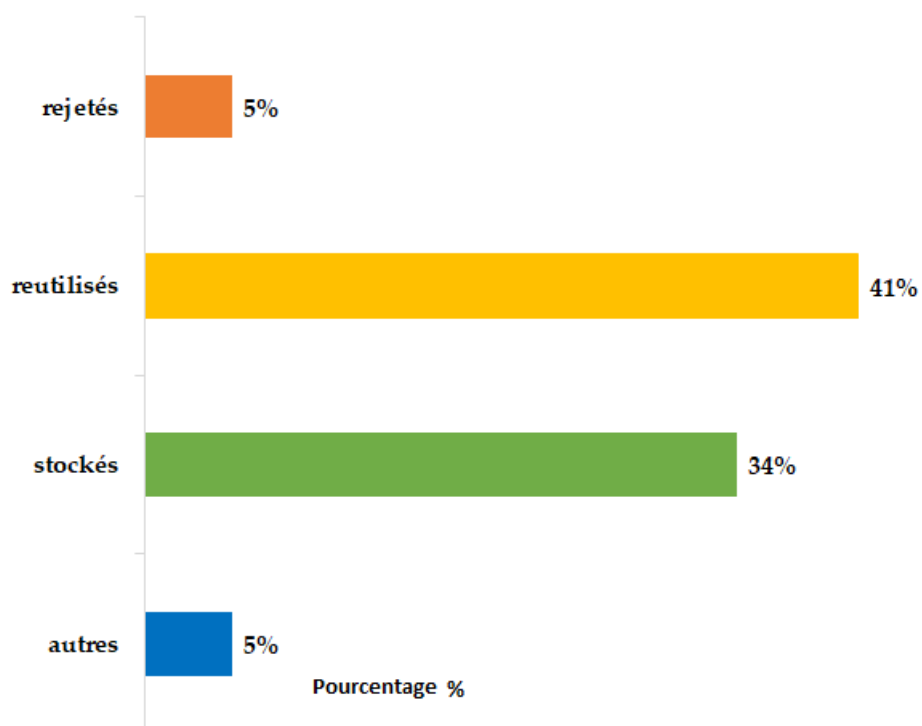


FIGURE 4.3 – Gestion des emballages vides

4.6 Fréquence des intoxications constatées :

Tous les producteurs ont reconnu les dangers que peuvent poser les pesticides pour la santé humaine. La plupart ont rapporté qu'ils ont des irritations de la peau après l'application des pesticides (38 %), qu'ils ont souvent des nausées (29 %), un rhume (32 %), des maux de tête (52 %) ou des problèmes respiratoires (31%) (voir figure 4.4).

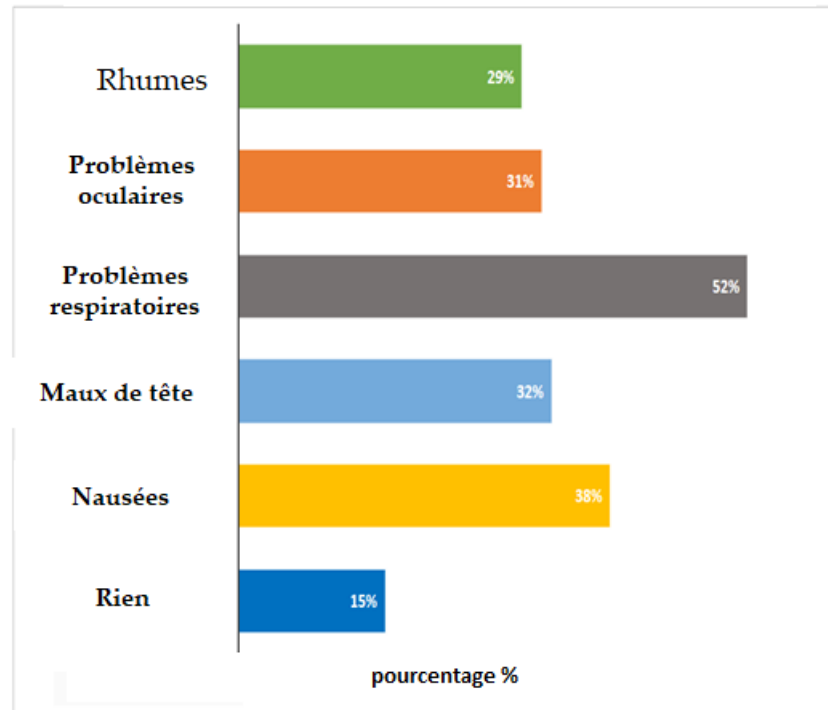


FIGURE 4.4 – Fréquence des intoxications constatées

5 Discussion et Conclusion

Selon le classement de l'organisation mondiale de la santé (OMS, 1996), les matières actives utilisées sont soit très dangereuses (méthomyl), peu dangereuses (malathion), modérément dangereuses (lambda-cyhalothrine) ou ne présentant vraisemblablement pas de risques dans des conditions normales d'utilisation (thiophanate-méthyle).

Nos résultats montrent que les insecticides les plus utilisés dans cette région sont (chlorpyrifos , malathion et lambda-cyhalothrine).

Nos résultats montrent que 30% des agriculteurs utilisent le carbamate qui agit comme un poison nerveux en perturbant l'influx nerveux. Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), il est "extrêmement dangereux". Il a été interdit en Suède et aux Pays-Bas (WATTERSON, 1988).

Pour les fongicides possède le carbendazime le plus utilisé est un agent chimique qui perturbe les hormones,et en plus un potentiel cancérogène pour l'homme. La carbendazime est nocive pour les poissons et les autres formes de vie aquatique (« The UK Pesticide Guide » 2004). En tant que perturbateur hormonal, le carbendazime peut nuire aux populations animales sauvages.

Par ailleurs, la plupart des agriculteurs maîtrisent mal les noms commerciaux des pesticides. Ils les désignent souvent par la couleur ou la forme du contenant et par le coût. Ils se préoccupent très peu des conséquences sur l'homme et sur l'environnement. Ces mêmes observations ont été effectuées par (COSTE, 1998).

Le coût élevé des pesticides dans les magasins agréés dépend non seulement du prix d'achat à la source d'approvisionnement mais aussi des conditions d'obtention d'agrément, des taxes et autres frais. Or les vendeurs non agréés sont de petits commerçants qui contournent les services douaniers. Les mêmes résultats ont été obtenus par (DOUMBIA et KWADJO, 2009) et (KANDA, 2010) au Togo, où la plupart des maraichers préfèrent se procurer des pesticides chez les revendeurs non agrès.

La gestion des emballages vides est un indicateur important du niveau de la perception du risque. La majorité rejette les emballages vides dans la nature comme l'ont montré les travaux de (DOUMBIA et KWADJO, 2009). Cette action peut être une source potentielle d'empoisonnement, ou bien ils stockent les conteneurs vides dans des locaux ouverts à l'intérieur des habitations. Les emballages abandonnés sur le terrain peuvent être nocifs pour l'homme et l'environnement (EPA, 2000a).

Les utilisateurs ne sont pas conscients des risques que présentent pour l'environnement des emballages de pesticides vides, classés comme déchets dangereux. Ils ne doivent pas être utilisés à des fins domestiques telles que la collecte d'eau ou le stockage d'aliments (« [The UK Pesticide Guide](#) » 2004). Ils doivent être correctement vidés, rincés, séchés et stockés séparément des autres déchets agricoles du soleil et il est préférable de les détruire.

Le niveau de connaissance des agriculteurs sur les pesticides est limité, notamment en ce qui concerne les méthodes d'application, les doses à appliquer et les précautions à prendre. L'utilisation de pesticides nécessite un minimum de connaissances théoriques et pratiques pour atténuer tout risque pour la santé des utilisateurs et de l'environnement (SALAMEH et al., 2004).

Salameh et al (2011), ont déjà mentionné que l'utilisation combinée de pesticides dangereux et l'absence de précautions appropriées sont préjudiciables à la santé des agriculteurs. La poursuite simultanée de la pulvérisation de pesticides et d'autres activités agricoles sur le terrain peut entraîner une exposition directe aux pesticides, car ils peuvent encore être distribués dans l'air (ANTONELLA et al., 2002).

La plupart des agriculteurs ne se protègent pas suffisamment. Ils respectent très peu les règles d'hygiène avant, pendant et après un traitement phytosanitaire, comme l'a déjà observé Wade (2003) au Sénégal, Ahouangninou et al (2011) au Bénin (AHOUANGNINO, FAYOMI et MARTIN, 2011), Snelder et al, (2008) aux Philippines (SNELDER, MASIPIQUENA et SNOO, 2008) et Williamson et al, (2008) au Bénin (MATTHEWS, 2008), sachant qu'il est possible de réduire l'exposition des agriculteurs aux pesticides en réduisant leur utilisation et en utilisant de manière appropriée le type d'équipement de protection individuelle approprié à tous les stades de la manipulation des pesticides.

la plupart des agriculteurs interrogés estiment avoir subi au moins une intoxication à la suite d'un traitement à base de pesticides. Les organophosphores sont les plus couramment utilisés

dans ce domaine. Certains des signes rapportés sont principalement les effets muscariniques de l'empoisonnement aux organophosphorés. (Nausée, vomissement, des vertiges) (COMMISSION, 2009).

Ces empoisonnement sont liées à l'absorption progressive et répétée, pendant des périodes plus ou moins longues, de petites quantités de produit qui seront transportées par le sang et s'accumuleront dans le corps (en particulier dans les reins, le foie ou le système nerveux). (SALAMEH et al., 2004)

Conclusion

Ce travail nous a permis d'apporter un éclairage supplémentaire sur les effets des Pesticides sur l'environnement et la santé humaine. Malgré les solutions proposées aux agriculteurs pour limiter le risque lié à l'usage des pesticides, on peut remarquer que certains agriculteurs semblent encore méconnaître l'intérêt de ces mesures et continuent à prendre des risques en ne respectant pas les points clés de la réglementation. Malheureusement toutes ces précautions présentent des failles qui peuvent contaminer l'agriculteur, peu à peu, durant toute sa vie professionnelle. A cette fin, des investigations plus poussées et un effort supplémentaire doit être réalisé pour un inventaire exhaustif et en temps réel, avec des études approfondies et étendues dans le temps gagneraient à d'être initiées, d'autant plus que ce présent travail est une étude pilote.

Deuxième partie

Les effets du Malathion sur le développement de la progéniture des souris Wistar : Aspect comportemental et physiologique

0.1 Introduction

d'après les données de l'enquête , Les matières actives les plus utilisées par les agriculteurs dans la région de tadla azilal sont le chlorpyrifos 48% et le malathion 43%.

Afin d'améliorer la significativité et la fiabilité des données , il serait important d'inclure quelques précisions concernant l'exposition comme la durée, la fréquence (exposition saisonnière ou quotidienne), le type ou la famille du pesticide utilisé ainsi que la période d'exposition (âge, pendant la grossesse) surtout pour la population vulnérable (fœtus, enfants, femmes enceintes).

D'autre part, les enquêtes sont des études rétrospectives (type cas-témoin) qui portent souvent sur un faible nombre de cas et ne permettent donc pas de refléter l'exposition réelle (FREEMAN, BONNER et BLAIR, 2005). Des études cohortes prospectives portant sur une plus large population seraient donc intéressantes pour obtenir une meilleure fiabilité statistique. Ces données que nous l'avons indiqué, restent fragmentaires et ne renseignent pas sur la présence d'un profil toxicologique précis concernant les atteintes chez l'homme. En plus l'exposition professionnelle aux pesticides constitue bien un sujet préoccupant en termes de santé publique, la question reste posée de savoir si l'exposition non professionnelle de l'ensemble de la population qui se fait essentiellement via l'alimentation (80% selon l'OMS) peut exercer un impact sur la santé des consommateurs. L'étude qui s'en suit tentera de mieux étudier les aspects toxicologiques. Pour ceci au cours de la deuxième partie de thèse, nous avons tenté d'apporter des éléments de réponse en testant l'effet de faibles doses de malathion sur l'aspect comportemental et physiologique chez les souris.

1 Le Malathion

Le malathion est un pesticide organophosphoré largement utilisé dans le monde, il est employé comme insecticide en agriculture et en usage vétérinaire, (FLESSEL, QUINTANA et HOOPER, 1993) et appliqué pour l'extermination des poux chez l'homme. En tant qu'insecticide, le malathion est utilisé pour contrôler les pucerons, les mouches, les sauterelles, les poux, les fourmis, les araignées et les moustiques. Il est appliqué sur la luzerne, le trèfle, les pâturages, les récoltes céréalières, le coton, le soja, les betteraves à sucre, le maïs, les haricots, les myrtilles et les grains stockés à l'intérieur des maisons.

1.1 Propriétés physico-chimiques du malathion

Le malathion ((diméthoxy-thioxo-phosphoroanylthio)-2 succinate d'éthyle) est un pesticide organophosphoré (insecticide ou acaricide) commercialisé depuis 1950. Sa formule brute est $C_{10}H_{19}O_6PS_2$ et sa formule semi développée (voir figure 1.1).

Dans les réseaux aquatiques, sa vitesse d'hydrolyse varie en fonction du pH ; d'après les valeurs publiées, sa demi-vie va de 0,2 semaine à un pH de 8,0 à 21 semaines à un pH de 6,0. La biodégradation joue un rôle important dans l'élimination du malathion des eaux naturelles (BETHESDA, 1988).

Cette biodégradation se réalise par son hydrolyse en acide O, O diméthylthiophosphorique, suivie de l'oxydation de ce dernier en acide O, O diméthylthiophosphorique (ZHAO et HWANG, 2009), (voir figure 1.2).

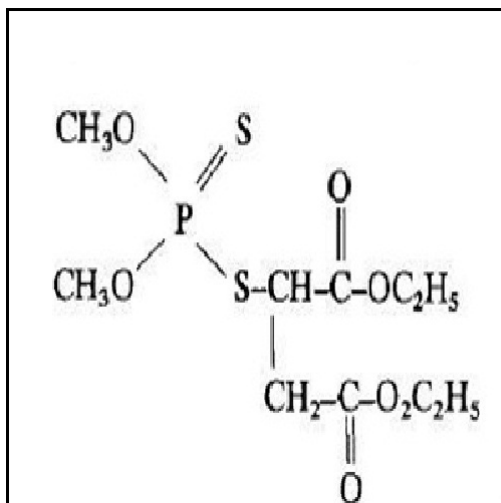


FIGURE 1.1 – Formule semi-développée du malathion

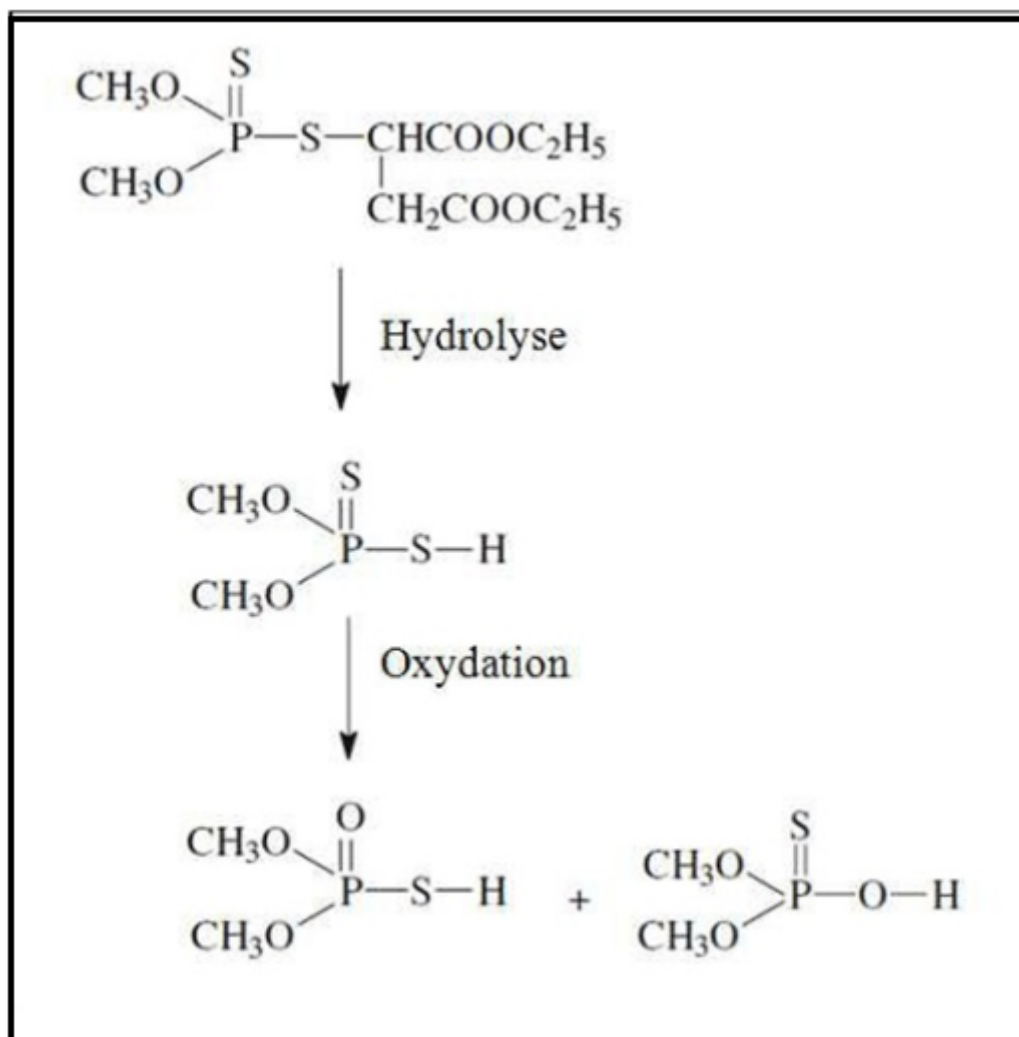


FIGURE 1.2 – Hydrolyse du malathion suivie de son oxydation dans l'eau du réservoir Ross Barnett (Mississippi)

Dans l'eau, le malathion a tendance à se dégrader plus rapidement que les autres insecticides organophosphorés.

1.2 Effets toxiques du malathion

Le malathion présente des effets néfastes sur la faune, les animaux et la santé humaine. En ce qui concerne la santé humaine, bien que le malathion ait été employé auparavant pour l'élimination des poux chez l'homme ainsi qu'en usage domestique, il présente un danger certain. Plusieurs effets toxiques aigus ont été enregistrés suite à des traitements avec du malathion.

Le principal mode d'action concerne l'inhibition de l'AChE dans les tissus nerveux, ce qui se traduit par une accumulation du neurotransmetteur, l'acétylcholine (NIGG et KNAAK, 2000). Par ailleurs PLUTH et al., 1996 ont montré que le malathion, son produit dégradé « malaoxon » ainsi que son contaminant « isomalathion » étaient à l'origine de dommages génétiques sur des cellules lymphocytaires humaines.

Les travaux de Meulenberg (2002) réalisés avec du sérum humain, montrent que le malathion a une affinité pour le SHBG (Sex Hormone Binding Protein) et pourrait donc avoir une activité oestrogénique.

D'autres travaux réalisés avec le malathion sur des rats et des souris ont montré que ce dernier induit un stress oxydant et agit sur la réponse immunitaire de ces animaux (JOHN et al., 2001).

Il est peu toxique comparativement aux autres insecticides organophosphorés et a été classé comme cancérigène potentiel dans le groupe 3 (IARC, 1991). Des travaux récents ont montré que le malathion stimule l'incidence du cancer des mamelles chez la rate (CABELLO et al., 2001).

Une autre étude récente réalisée sur des souris nourries avec du blé contaminé par du malathion a montré que ce dernier induit des effets sur les chromosomes du sperme de la souris (AMER et al., 2002). Le malathion induit aussi un développement anormal de sperme () et diminue la mobilité des spermatozoïdes chez des rats nourris par voie orale (AKBARSHA, LATHA et MURUGAIAN, 2000). En 2002, Le NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health) qualifie le malathion d'agent mutagène en raison des dommages génétiques enregistrés sur des bactéries, drosophiles, souris, hamsters, poissons et cellules humaines. Dans ce même ordre d'idées, les travaux de Galloway et Handy (2003) réalisés sur des invertébrés, des poissons et des vertébrés supérieurs montrent que le système immunitaire est l'un des

cibles du malathion, ce dernier agit par diminution du nombre de cellules immunitaires et du nombre d'anticorps ainsi que via la réduction de l'activité de certaines cellules du système immunitaire.

Les travaux de (MOSER, 2007), réalisés sur la carpe de roseau *Ctenopharyngodon idellus*, ont démontré que l'apoptose est due à l'effet cytotoxique du malathion et qu'elle varie en fonction de la concentration et du temps. Ces mêmes auteurs suggèrent que le malathion exerce ses effets apoptotiques via des effets directs sur la mitochondrie Chez le silure-grenouille (Yogesh et al, 2006).

1.3 Toxicologie

Pharmacocinétique

Chez les mammifères, le malathion est rapidement et efficacement absorbé par le tractus gastrointestinal, Il est métabolisé et excrété promptement en grande partie dans l'urine.

Les principaux métabolites urinaires sont le malathion sous forme d'acides mono 7 et dicarboxylique 8, le Shydrogénophosphorothioate de O, O-diméthyle, le S hydrogénophosphorodithioate de O, O-diméthyle 9 et l'hydrogénophosphate de diméthyle 10.

L'absorption cutanée chez l'humain est non négligeable et varie selon la zone corporelle (HAYES et LAWS, 1991).

Toxicité aiguë

. Le malathion est un inhibiteur de l'activité des cholinestérasés. C'est un insecticide et un acaricide non systémique possédant une action de contact, stomacale ou respiratoire. Il démontre une faible toxicité aiguë orale, cutanée et par inhalation (toxicité de catégorie III ou IV, selon la classification du Federal Insecticid Fongicid and Rodenticid Act) comparativement à d'autres insecticides organophosphorés.

Le produit démontre un léger potentiel d'irritation cutanée et oculaire et ne serait pas un sensibilisant cutané (LIGGETT et PARCELL, 1985a).

Les principaux indices de toxicité aiguë du malaoxon sont présentés au tableau 1.1 . Certaines études plus anciennes indiquent des niveaux de toxicité plus importants pour le malathion. Toutefois, ces résultats ont été affectés de façon significative par certaines impuretés du malathion.

Certaines données indiquent par ailleurs que le malaaxon, le métabolite du malathion responsable de l'inhibition des cholinestérases, serait de 10 à 30 fois plus toxique que le produit mère. (VALERY PC, 2002)

TABLEAU 1.1 – Toxicité aiguë du malaaxon

Étude et espèce	Résultats(mg/kg)	Catégorie de toxicité (FIFRA)
Orale aiguë – souris	215	II
Intrapéritonéale – rat	25	-
Orale aiguë - rat	142 – 175	II

Toxicité subchronique

Lors d'une étude subchronique d'exposition par voie respiratoire avec le malathion, des groupes de rats Sprague-Dawley des 2 sexes ont été exposés 6 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 13 semaines à des concentrations par aérosols dans l'air de 0, 0,1, 0,45 ou 2,01 mg/L (BEATTIE, 1994 dans SIGLIN, 1985a).

Des signes cliniques tels qu'une coloration de la région urogénitale, une salivation excessive ou un pelage mal soigné ont été observés chez les animaux des 2 sexes principalement à la dose la plus élevée mais également de façon sporadique aux doses de 0,1 et 0,45 mg/L. À la fin de l'étude, on pouvait noter une baisse de l'activité des cholinestérases proportionnelle à la dose utilisée. Des lésions microscopiques à la cavité nasale et au larynx ont également été observées chez la plupart des animaux aux différentes doses testées. Aucune dose sans effet nocif observé n'a été déterminée pour cette étude (BEATTIE, 1994).

Lors d'une étude par voie cutanée, des lapins blancs de Nouvelle-Zélande ont reçu du malathion sur la peau durant 6 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 3 semaines et ce, à des doses de 50, 300 ou 1 000 mg/kg/jour (MORENO, 1989). À l'exception d'une baisse de l'activité des cholinestérases proportionnelle à la dose chez les animaux des 2 sexes ayant reçu 300 et 1 000 mg/kg/jour de l'insecticide, aucun effet toxique attribuable au traitement n'a été noté. Aucun signe clinique lié à l'inhibition des cholinestérases ni de changements concernant les paramètres de poids corporel et des organes, de consommation de nourriture, d'hématologie, de la chimie clinique, etc. n'ont été notés. Une dose sans effet nocif observé de 50 mg/kg/jour fut déterminée en raison respectivement de l'inhibition des cholinestérases plasmatiques et érythrocytaires chez les mâles et les femelles et de l'inhibition des cholinestérases du cerveau chez les femelles seulement à la dose de 300 mg/kg/jour (MORENO, 1989).

Dans une autre étude, des groupes de rats de la même souche ont reçu du malathion dans la nourriture pendant 90 jours à des taux de 0, 100, 500, 5 000, 10 000 ou 20 000 ppm équivalent à des doses de 0,66, 34, 340, 680 ou 1400 mg/kg/jour pour les mâles et 0, 7,9, 39, 380, 780 ou 1 600 mg/kg/jour pour les femelles respectivement (DALY, 1993b). Une dose sans effet nocif observé (DSENO) de 500 ppm fut déterminée, soit 34 mg/kg/jour, en raison d'une diminution du volume globulaire moyen et de l'hémoglobine corpusculaire moyenne, de l'augmentation du poids du foie et du poids relatif des reins et d'une néphropathie chronique chez les mâles à la dose de 5 000 ppm. Une diminution de l'hémoglobine globulaire moyenne, une hypertrophie du foie ainsi qu'une augmentation du poids relatif des reins furent aussi notées chez les femelles à la même dose. Une diminution significative de l'activité des cholinestérases du cerveau fut également observée au taux de 5 000 ppm.

Toxicité chronique

L'exposition chronique au malathion peut conduire à une diminution cumulative de l'activité des cholinestérases à un niveau critique et provoquer des symptômes semblables à ceux d'une intoxication aiguë. De plus, des expositions répétées à ce produit peuvent induire une sensibilisation cutanée chez certaines personnes (HAZARIKA et al., 2003).

Le malathion a été classé comme ayant une évidence suggestive de cancérogénicité, même si celle-ci n'est pas suffisante pour évaluer le potentiel cancérigène de ce produit pour l'humain. Outre les effets dus à l'inhibition de l'activité des cholinestérases chez les animaux, il semble que les poumons et le foie puissent subir des dommages lors d'exposition chronique (FLESSEL, QUINTANA et HOOPER, 1993).

Le malathion ne s'est pas avéré tératogène chez le rat et le lapin et ce, même à des doses élevées. Par contre, selon certaines études contradictoires, le produit aurait causé de la stérilité en affectant les organes reproducteurs mâles chez la souris et le rat.

Le malathion a donné des résultats variés dans des tests de génotoxicité in vitro et in vivo. Toutefois, les doses testées étaient à des niveaux rarement rencontrés lors d'expositions normales (KOMORI et al., 1991).

Le malathion a été administré pendant 18 mois à des groupes de souris B6C3F1 BR à des taux dans la nourriture de 0, 100, 800, 8 000 ou 16 000 ppm correspondant à des doses de 0, 17,4-, 143, 1 476 et 2 978 mg/kg/jour pour les mâles et de 0, 20,8-, 167, 1 707 et 3 448 mg/kg/jour pour les femelles (SLAUTER, 1994). La dose sans effet nocif observé était respectivement de 17,4 et 20,8 mg/kg/jour pour les mâles et les femelles sur la base de l'inhibition des cholinestérases plasmatiques et érythrocytaires mesurée au taux de 800 ppm. Des

doses sans effet nocif observé de 143 et 167, pour les mâles et les femelles respectivement, ont également été établies pour les effets systémiques en raison d'une diminution de poids corporel et de consommation de nourriture, d'une augmentation du poids du foie et d'une hypertrophie hépatocellulaire notée aux taux de 8 000 ppm et plus. Une incidence élevée de tumeurs hépatiques a été observée chez les mâles et les femelles aux doses excessives de 8 000 et 16 000 ppm.

Dans une étude combinée de toxicité chronique et d'une durée de 2 ans, du malathion a été administré dans la nourriture à des rats Fisher 344, à des taux de 0, 50, 500, 6 000 ou 12 000 ppm soit l'équivalent de doses de 0, 2,4-, 26, 327 et 677 mg/kg/jour pour les mâles et 0, 2,95-, 32, 386 et 817 mg/kg/jour pour les femelles (DALY, 1996a). Pour cette étude, une dose de 50 ppm a été établie sur la base d'une inhibition significative des cholinestérases plasmatiques. L'OMS avait plutôt proposé une dose globale de 500 ppm, soit l'équivalent de 29 mg/kg/jour sur la base d'une baisse de la survie et du gain de poids corporel, d'une augmentation de la consommation de nourriture, de changements dans les paramètres hématologiques, d'une baisse de l'activité des cholinestérases du cerveau, d'une augmentation du poids du foie, des reins, de la thyroïde et de la parathyroïde et enfin, d'une dégénérescence et d'une hyperplasie de l'épithélium olfactif au taux de 6 000 ppm (DALY, 1996a).

Une augmentation de l'incidence des tumeurs au foie a été notée chez les femelles mais seulement aux doses excessives et leur nombre n'était pas élevé.

1.4 Effet sur la Reproduction

Lors d'une étude sur la reproduction d'une durée de 2 générations chez des groupes de rats Sprague-Dawley, le malathion a été administré dans la nourriture à des taux de 0, 550, 1 700, 5 000 ou 7 000 ppm soit l'équivalent de doses de 0, 43, 131, 394 ou 612 mg/kg/jour pour les mâles et de 0, 51, 153, 451 et 703 mg/kg/jour les femelles (SCHROEDER, 1990). Après 63 jours de traitement, les animaux de la génération parentale F0 ont été accouplés 2 fois pour donner les générations F1a et F1b. Des mâles et des femelles provenant de la litière F1b ont ensuite été choisis au hasard pour devenir la génération parentale F1. Après 79 jours de traitement, ils ont été accouplés pour donner les générations F2a et F2b.

Il n'y a pas eu de mortalité ou de signe clinique de toxicité chez les générations parentales F0 et F1 et ce, quel que soit la dose testée. La dose sans effet nocif observé pour la toxicité parentale fut estimée à 5 000 ppm en raison d'une baisse de poids corporel chez les femelles F0 durant la gestation et la lactation et de la baisse de poids corporel chez les mâles et

femelles F1 lors de la période précédant l'accouplement. La dose sans effet nocif observé pour les nouveaux nés a été établie à 1 700 ppm sur la base d'une baisse de poids corporel des petits des litières F1a et F2b durant la lactation. Aucun effet sur la reproduction n'a été noté lors de cette étude.

1.5 Effet sur le Métabolisme

Chez le rat, le malathion est excrété principalement dans l'urine (80 – 90 %) dans un délai de 24 heures. Une faible quantité est excrétée dans les fèces (EPA, 2000b). Aucune bioaccumulation n'a été observée dans les tissus ou les organes. Les métabolites urinaires principaux sont le malathion sous forme d'acides mono et dicarboxylique (80 % de la radioactivité mesurée).

Entre 4 et 5 % de la dose administrée serait convertie en malaaxon. Lors d'une étude chez des volontaires, l'élimination urinaire du malathion ingéré était très rapide, 90 % de l'excrétion urinaire étant complétée en moins de 12 heures (Jellinek et al, 2000).

L'acide monocarboxylique du malathion représentait 50 % des métabolites urinaires, suivi de l'acide dicarboxylique avec 10 à 20 % et les phosphates d'alkyle avec respectivement 18, 12 et 2 % pour le DMTP, le DMP et le DMDTP (voir figure 1.3). La quantité de malathion excrétée dans l'urine ne représenterait en moyenne que 65 % de la dose administrée.

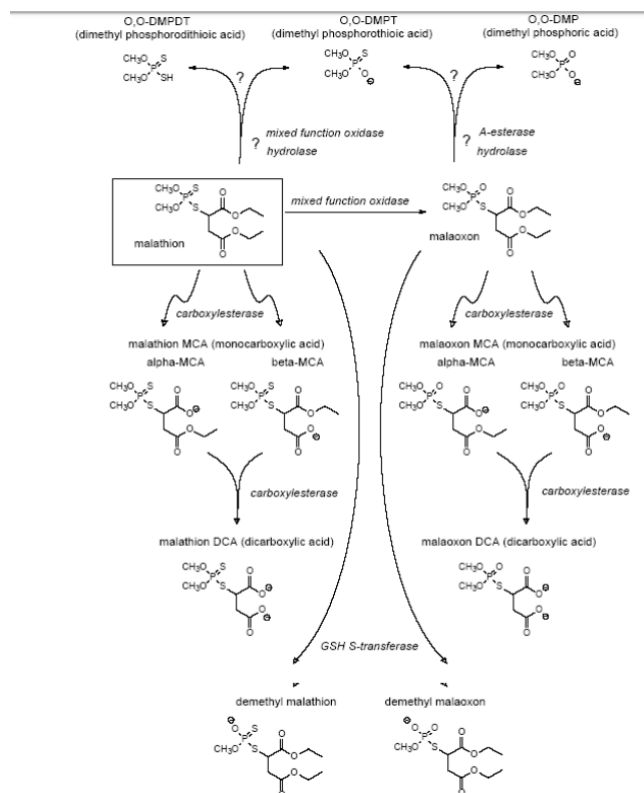


FIGURE 1.3 – schéma de métabolisme de malathion (ATSDR 2003)

1.6 Effet sur le Développement

Dans une étude chez les lapins de Nouvelle-Zélande, on a gavé des groupes de femelles gravides pendant les jours 6 à 18 de la gestation avec des doses de 25, 50 ou 100 mg/kg/jour de malathion (SIGLIN, 1985a). Une légère augmentation de l'incidence moyenne des œufs fécondés non implantés chez les mères a été notée à la dose de 50 mg/kg/jour de même qu'une diminution de gain de poids corporel pendant le traitement. Des doses sans effet nocif observé de 25 et 100 mg/kg/jour ont été déterminées respectivement pour la toxicité maternelle et le développement des fœtus (FAO, 2003).

Les variations de l'activité des cholinestérases n'ont pas été mesurées au cours de cette étude. Une étude préliminaire à cette dernière avait cependant démontré des signes cholinergiques de toxicité dont des tremblements, de la salivation, une baisse de l'activité et de la mortalité aux doses de 200 et 400 mg/kg/jour (SIGLIN, 1985a).

1.7 Effet sur la Neurotoxicité

Une étude aiguë de neuropathie retardée a aussi été effectuée avec des poules. Cette dernière étude n'a pas démontré d'effet lié au traitement. Lors des études aiguës et subchroniques chez les rats, des effets neurotoxiques incluant des signes cliniques, une inhibition des cholinestérases érythrocytaires, des pseudo-cholinestérases et des cholinestérases du cerveau ont été observés (US EPA, 2000b).

Ces études ont été jugées acceptables et satisfaisantes par US EPA. Par ailleurs, l'organisme américain a exigé qu'une étude de neurotoxicité développementale soit effectuée afin de répondre aux nouvelles exigences de l'Agence (US EPA, 2000b). Parallèlement à la requête de US EPA, un document conjoint et récent de la FAO et de l'OMS rapportait une étude de neurotoxicité développementale dans laquelle des rats ont reçu du malathion par voie orale (FAO, 2003). Le malathion a été administré à des groupes de femelles gravides à partir du 6^{ème} jour de la gestation jusqu'au 10^{ème} jour après la mise bas et aux nouveaux nés pendant les jours 11 à 21 suivant leur naissance, à des doses de 5, 50 ou 150 mg/kg/jour.

Des évaluations comportementales ont été effectuées chez les mères et les nouveaux nés . Dans le cas de ces derniers, elles ont été réalisées à intervalle jusqu'au 60^{ème} jour après la naissance.

Une dose de 50 mg/kg/jour a été déterminée pour la neurotoxicité développementale en raison de changements au niveau du réflexe de redressement au 11^{ème} jour post-naissance. Ces modifications n'ont pas été notées les jours subséquents. La dose pour la toxicité maternelle était de 150 mg/kg/jour.

2 partie pratique

2.1 Matériel et méthodes

Matériel

Produits

Le Malathion est obtenu à partir de la solution commerciale : SIF 50(500g de la matière par litre). La concentration du Malathion (50% de purté) de la solution commerciale est diluée dans l'huile de maïs.

Animaux étudiés et condition d'élevage

La présente étude a été réalisée sur des souris mâles et femelles de la souche Wistar au nombre de 64 souris, provenant de l'Institut Pasteur de Casablanca, âgés de 06 à 08 semaines pesant environ 22 à 30 grammes. Les souris ont été répartis en huit (08) lots à raison de huit (08) souris par lot, ils ont été soumis à une période d'adaptation de 10 jours dans l'animalerie de département de biologie de la Faculté des Sciences et Technique de Beni-Mellal, la température ambiante est de 23°C et une photo-période naturelle 12/12 h avec une hygrométrie de 60%.

Les souris sont élevés dans des cages en polyéthylène (04 souris pour chaque cage) qui sont tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois, les cages sont nettoyées et la litière est changée une fois par deux jours jusqu'à la fin de l'expérimentation.

Répartition et traitement des souris

Plusieurs accouplements ont été réalisés dont le but d'avoir des souriceaux pour réaliser les tests de toxicité à partir du jour postnatal 5 jusqu'à 21 jours et au stade adulte (2 mois). Ces accouplements sont répartis selon 2 groupes traités et un groupe témoin :

Groupe ML : traité par le Malathion recevant 15mg/ml/jour pendant 60 jours .

Groupe MAL : traité par le malathion recevant 5mg/ml/jour pendant 60 jours .

Groupe TM : lot témoin (T) reçoit d'huile de maïs par gavage 0,02ml/jour pendant 60jours.

2.1.1 Etudes de développement

Gestation et développement prénatal

Les mères sont observées quotidiennement pour déceler toute trace de comportement anormal ou tout signe de toxicité dès le début de la gestation jusqu'au sevrage, des pesées bihebdomadaires de la nourriture et de l'eau consommée et des pesées hebdomadaires des animaux permettent de s'assurer de l'état de santé, une modification brutale de la courbe de poids au cours des deux derniers tiers de la gestation est considérée comme symptomatique d'un avortement spontané pour chaque femelle, le moment de la mise bas dans la journée (matin ou après-midi) est noté pour calculer précisément la durée de la gestation, tout avortement est enregistré.

Naissances et caractérisation de la portée

A la naissance tous les animaux sont pesés et séparés par sexe.

Le sexe ratio est défini par le rapport du nombre total de mâles sur le nombre total de souris mâles et femelles qui naissent au sein d'un même lot.

Ce rapport est très stable sur une population sauvage et sa valeur normale est généralement de 102 à 108 mâles pour 100 femelles (HOOD., 2005), soit 50.4 à 51.9% de mâles nouveau-nés, une diminution de ce rapport traduit une influence œstrogénique pendant la gestation.

Tous les souriceaux sont examinés afin d'enregistrer des éventuelles malformations.

Évaluation du comportement maternel

Dans les premiers jours de vie post-natale, le jeune souriceau est immature et complètement dépendant de sa mère pour survivre. Celle-ci doit non seulement le nourrir, mais aussi lui apporter des soins, le protéger de l'environnement et lui permettre de maintenir sa température corporelle.

Une des activités principales de la mère dans les jours qui suivent la naissance est la construction d'un nid et le regroupement des jeunes. Le comportement de la mère peut ainsi être appréhendé par l'évaluation de ses caractéristiques.

Face à l'impact connu d'un stress maternel sur la qualité des soins apportés par la mère aux jeunes, et aux conséquences sur le développement du souriceaux (Patin et al., 2002), nous

avons donc choisi d'évaluer le comportement maternel par la mise en place de deux tests, le test d'observation et le test du récupération.

Test d'observation : Le comportement maternel a été observé quotidiennement pendant 50 min dans la cage de chaque mère et sa portée entre PN 1 et PN 22. Le moment de l'observation était pendant la phase de lumière du cycle lumière / obscurité, entre 08 :00 et 09 :00 h. Pendant chaque séance de 50 minutes, chaque mère et chaque portée ont été observées pendant 5 s à intervalles de 5 min.

Onze types d'activités exposé par la mère ont été enregistrés lors de chaque session. Lors de chaque observation "1" a été donné si un comportement s'est produit et un "0" si ce n'est pas le cas. Premièrement, il a été noté si une mère allaitait ou non. Trois positions différentes d'allaitement ont été reconnues : (a) la mère était courbée sur ses souriceaux avec les jambes écartées ; (b) la mère était au-dessus de sa portée et il n'y avait pas d'extension évidente de ses jambes ; et (c) passive nursing- quand la mère était allongée sur le côté ou sur elle de retour avec un ou plusieurs souriceaux à la mamelle. Les deux premiers allaitement ont été désignés comme allaitement actif , et le troisième comme allaitement passif.

En plus d'allaitement , onze caractères ont été enregistrées pendant chaque session : (1) mère hors du nid ; (2) la mère en contact avec l'un de ses petits ; (3) mère toiletant l'un de ses souriceaux ; (4) mère portant des souriceaux ; (5) la mère manipulant les copeaux de nid ; (6) mère au repos avec les yeux fermés ; (7) mère mangeant ; (8) mère buvant ; (9) auto-toilettage (10) reniflement et (11) redressement .

Test de récupération : Les mêmes mères et les souriceaux ont été testés pour le test de récupération toujours après la fin du test d'observation. Le test de récupération réalisée quotidiennement entre PN 1 et PN 12 entre 09h00 et 10 :00 h donc chaque mère et portée ont été testées 12 fois. Tous les souriceaux ont été séparés de leurs mères dans un nouveau cage pendant 5 min. La cage avec des souriceaux a été placée sur un chauffage tampon pour éviter le refroidissement. Après cette brève séparation, l'ensemble de la litière a été retournée à leurs mères dans la cage de maternité et les souriceaux étaient répartis tout autour de la cage. La mère a ensuite été observé pendant 10 min pour les mesures suivantes : (1) le temps pour porter le premier souriceau ; (2) le temps pour retourner le premier souriceau dans le nid ; et (3) le temps pour retourner tous les souriceaux dans le nid.

Évaluation de la maturation des systèmes sensoriels

Au jour après la naissance , les paramètres physiques suivants ont été observés : apparition des poils, éruption des incisives, détachement des oreilles, et l'ouverture bilatérale des yeux, ces paramètres sont des indicateurs qui renseignent sur le développement foetal du souriceau (voir tableau 2.1)

Sevrage (jours)	21
Glandes mammaires (paires)	5
Détermination de l'âge par les caractères extérieur (jours) :	
1^{er} jour	cicatrice ombilicale
	yeux fermés – oreilles collées
	peau rose vif
3^{ème} jour	oreilles décollées
5^{ème} – 6^{ème} jour	début de pousse des poils
8^{ème} jour	fouurrure, incisives
10^{ème} jour	mamelles visibles
15^{ème} jour	1 ou 2 yeux ouverts
Mamelles recouvertes	
16^{ème} jour	Aspect de petites souris
Poids (g) à la naissance	1 – 2
au sevrage	8 – 12

FIGURE 2.1 – Les paramètres physiologiques de souris (THIEL R, 1997)

2.1.2 Tests du développement sensori-moteur

Ces différents tests ont tous été réalisés dans une autre salle de l'animalerie, respectant le même cycle lumineux et les mêmes conditions de température et d'humidité que ceux de la salle d'élevage. Les animaux ont été quotidiennement pesés et observés suivant les procédures décrites ci-dessous.

En fonction des protocoles propres à chaque test, les animaux ont été testés soit une seule fois, soit quotidiennement pendant 3 à 5 jours consécutifs. Durant l'évaluation des jeunes. Dans la mesure du possible, les jeunes ont été testés immédiatement après la séparation, celle-ci ne devant idéalement pas excéder 30 minutes.

1. Test de retournement :

Principe : Le test de retournement est le premier effectué chez le souriceau. Le réflexe mis en jeu permet à l'animal de retrouver une position dorso-ventrale normale en cas

de chute ou de déséquilibre. Structures nerveuses impliquées : Les structures labyrinthiques jouent un rôle important dans le déclenchement du réflexe de retournement. (citeReference229) Le centre d'organisation de réflexe est les régions bulbaire et pontique dans les premiers jours, puis il devient plus mésencéphalique [BIGNALL, 1974].

Dispositif : Le souriceau est testé sur une table .

Procédure : Ce test est réalisé à PN 5, 7 et 13. L'animal est initialement déposé sur la table sur le dos. Aucune impulsion ne doit lui être donnée en le lâchant. La durée maximale du test est 30 secondes.

Réactions de l'animal : Le souriceau placé sur le dos effectue une série de balancements vers la droite et la gauche. La tête amorce le mouvement. Il peut arriver que le retournement ne soit pas complet, si les pattes postérieures restent sous l'abdomen de l'animal. Cette manoeuvre, appelée « pseudo-retournement », ne permet pas à l'animal de rester dans une position stable, et en général le déséquilibre, ce qui le ramène sur le dos, en position initiale (voir photo 2.2).



FIGURE 2.2 – Test de retournement

2. Test d'évitement de falaise (Cliff Avoidance) :

Principe : Ce test permet d'évaluer la capacité de l'animal à éviter le vide. Il met en jeu la coordination des membres de l'animal, ainsi que sa force musculaire.

Dispositif : Le dispositif est composé d'une table en bois (L : 80 cm, l : 60 cm, h : 10 cm) et Les deux mains pour amortir la chute du souriceau .

Procédure : Ce test est réalisé à PN6. L'animal est initialement positionné au bord du vide, la tête et les pattes antérieures dans le vide. La durée maximale de chaque essai est de 2 minutes.

Réactions de l'animal : Par peur du vide, l'animal va tenter de se rétablir complètement sur le pavé en bois, soit en reculant, soit en faisant un demi-tour (voir photo 2.3).

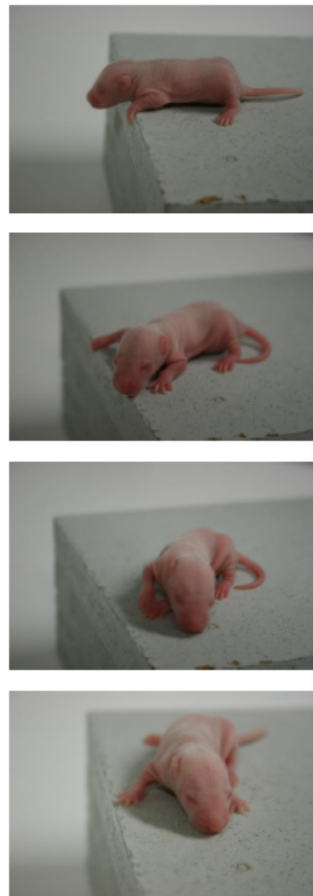


FIGURE 2.3 – Test d'évitement de falaise (Cliff Avoidance)

3. Test de réaction anti-gravitaire (negative geotaxis) :

Principe : Ce test a pour but d'évaluer la réaction motrice mise en oeuvre en réponse à une position inhabituelle dans l'espace. Un très bon niveau de coordination des pattes antérieures est nécessaire pour réussir ce test. Il semble que l'immaturation du système

moteur soit un facteur limitant, car la réaction de la souris face à la position de départ met en oeuvre des structures centrales matures très précocement (HOOKER, 1952).

Structures nerveuses impliquées : Ce test permet de renseigner sur la maturation du système vestibulaire.

Dispositif : Une planche (4540 cm), inclinée de 20 par rapport à l'horizontale et recouverte de feutrine pour éviter que l'animal ne glisse, est utilisée pour ce test (voir photo 2.4).

Procédure : Ce test est réalisé à PN7, 9, 13 et 17. L'animal est initialement placé sur la feutrine, la tête dirigée vers le bas. Le test est terminé lorsque l'animal à effectué une rotation de 180, lui permettant d'avoir la tête dirigée vers le haut. La durée maximale de ce test est de 2 minutes.

Réactions de l'animal : Les mouvements de l'animal sont initiés au niveau de la tête, qui oscille vers la droite ou la gauche. Les pattes antérieures effectuent des mouvements de poussée latérale et vers le haut. Après une rotation de 90, l'animal se trouve dans une position instable. Avec l'âge l'ajustement par rapport à la verticale se fait moins par oscillations, mais avec une grande rapidité et une grande précision.

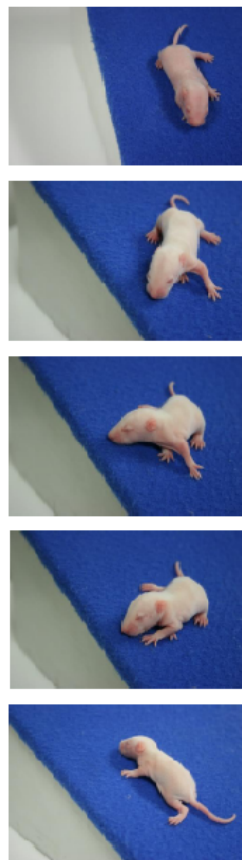


FIGURE 2.4 – Test de réaction anti-gravitaire (negative geotaxis)

4. Test de développement de la natation (Swiming Developpement) :

Principe : Ce test mesure le développement de la coordination neuro-motrice et la capacité de nage.

Chaque souriceau est placé individuellement dans un réservoir d'eau (28C) pendant 10 s. La direction, l'angle et l'utilisation des membres ont été observés.

Dispositif : ce test est composé d'un réservoir rempli de l'eau à une température de 28°C, la hauteur de l'eau dans le réservoir est 12 cm.

Procédure : Ce test est réalisé à PN10, 12 et 21. Si on considère la direction : lorsque le souriceau coule le score est de 0 points, il est de 1 point lorsqu'il flotte, 2 points s'il tourne en faisant un cercle. Le score est de 3 lorsque le souriceau nage tout droit ou presque tout droit.

Pour l'angle de la nage ; le score est de 0 si la tête reste sous l'eau, il est de 1 point si le nez est à la surface de l'eau et de 2 si le nez et le sommet de tête sont au-dessus de la surface de l'eau, mais les oreilles sont toujours sous l'eau. Le score est de 3 si la moitié des oreilles est au-dessus de la surface et il est de 4 si les deux oreilles sont complètement hors de l'eau.

Concernant l'utilisation des membres, le score est de 0 lorsque l'animal n'utilise pas ses membres, il est de 1 lorsque le souriceau patauge avec les membres postérieurs et antérieurs et de 2 lorsqu'il nage uniquement avec les membres antérieurs, les membres postérieurs restent fixes (voir photo 2.5).

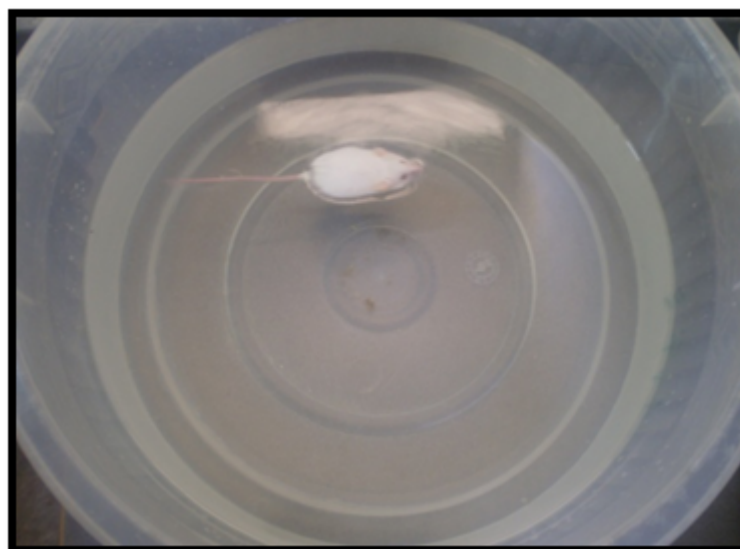


FIGURE 2.5 – Test de développement de la natation (Swiming Developpement)

5. test de saut avec le choix des cages (Jumping Down Choice cage) :

Principe : Ce test reflète le développement de l'orientation, la coordination et les fonctions sensori-motrices.

Dispositif : Le souriceau est placé sur une plate-forme surélevée de 25 cm placés au-dessus de deux cages ; l'une contient la fratrie et l'autre vide. Le temps écoulé pour descendre d'un bond dans l'une des cages ainsi que le choix ont été enregistré. La durée maximale du test est de 120 s.

Procédure : Ce test est réalisé à PN15 et 17. L'animal est initialement placé sur une plate-forme surélevée, Le test est terminé lorsque l'animal saute soit vers le vide soit vers la fratrie. La durée maximale de ce test est de 2 minutes(voir photo 2.6).



FIGURE 2.6 – test de saut avec le choix des cages

Tests à l'âge adulte

1. Labyrinthe en croix surélevé (LCS) :

Principe : Basé sur les travaux de Montgomery (1955), le labyrinthe en croix surélevé a été mis au point par Handley et Mithani (1984) puis validé en 1985 par Pellow et al. Il est considéré comme un modèle éthologique d'anxiété non conditionnée. Le comportement des rongeurs dans le LCS résulte d'un conflit entre la motivation innée

du rongeur à explorer un environnement nouveau, et la tendance à éviter un espace potentiellement dangereux par crainte du vide [citeReference232].

Dispositif : Le LCS est composé de quatre branches surélevées à 70 cm du sol . Deux branches (50 x 10 x 50 cm) entourées de parois verticales opaques, appelées branches fermées (BF), font face à deux branches dépourvues de parois, dites branches ouvertes (BO). L'intersection des branches (10 x 10 cm) est appelée zone centrale (ZC). Les BO sont pourvues d'un rebord de 2 mm qui a pour but de permettre à l'animal de s'agripper et d'éviter de chuter (voir photo 2.7).

Procédure : Au début du test, l'animal est placé dans la ZC, la tête orientée vers une BO. Il est alors laissé libre d'explorer le labyrinthe pendant 5 minutes Variables mesurées : Deux types de variables sont relevées

- Le nombre total de branches visitées, le nombre d'entrées en BO, BF, ZC .
- Le temps passé dans chaque zone (BO, BF, ZC)



FIGURE 2.7 – Test de Labyrinthe en croix surélevé (LCS)

2. Open-field

L'open-field est l'un des tests les plus couramment utilisés pour l'étude du comportement animal en laboratoire. Son succès repose sans doute sur sa simplicité et sa rapidité d'analyse (WALSH et al., 1976).

Principe : A l'âge adulte, ce test permet d'évaluer à la fois le niveau d'activité de l'animal, mais également son niveau d'anxiété. Ce test est basé, comme le LCS, sur le comportement exploratoire spontané de l'animal, et sur le conflit généré par ce comportement et par l'aversion naturelle du souris pour les environnements découverts. La contrainte est par contre moins forte que celle créée dans le LCS, ce qui permet

de détecter des variations plus sensibles du niveau d'anxiété des animaux (CAROLA et al., 2002) .

Dispositif : Il est composé d'un carré (diamètre : 50 cm) délimitée par une paroi verticale de 45 cm de h représente une zone protégée, et la ZC une zone anxieuse, car découverte. Le temps passé dans chacune des zones permet ainsi d'évaluer le niveau d'anxiété de l'animal testé (voir photo 2.8).

Procédure : L'animal est déposé au centre du dispositif et laissé libre de l'explorer pendant 5 minutes.

Variables mesurées : dans ce test nous avons mesurer trois paramètres, le temps passé dans chaque zone, et le nombre total de cases parcourues pour chaque zone, et le pourcentage des carreaux centraux pour chaque groupe.

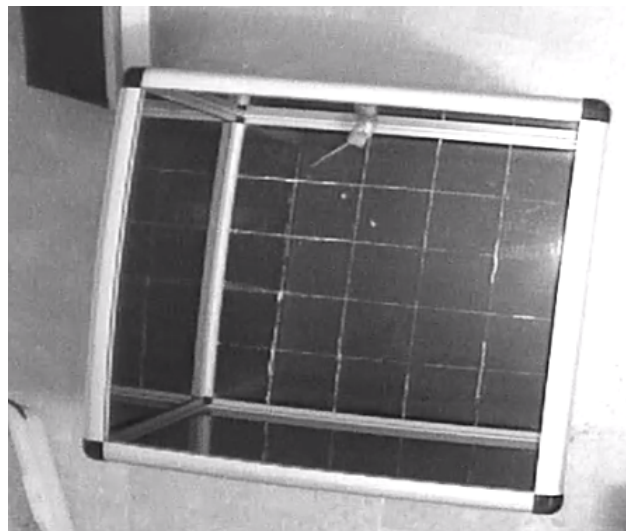


FIGURE 2.8 – Test de l' Open-field

3. Labyrinthe en Y

Principe : Le labyrinthe en Y initié par Tolman en 1925 permet d'évaluer la mémoire à court terme de la souris en déterminant son taux d'alternance spontanée, c'est-à-dire sa capacité à alterner l'ordre de visite des différentes branches du labyrinthe de manière à visiter successivement 3 branches successives différentes.

Dispositif : Le labyrinthe est composé de 3 branches (60 x 10 x 45 cm) pourvues de cloisons verticales, disposées en Y, l'angle étant le même entre chaque branche . Chaque branche est identifié par un chiffre (1, 2, 3), pour le relevé des variables. Procédure : Au début du test l'animal est placé au bout de la branche 1, la tête orientée vers la

paroi. Il est ensuite laissé libre d'explorer le labyrinthe pendant 5 minutes(voir photo 2.9).

Variables mesurées : La succession des branches visitées est relevée. Le pourcentage de triplets justes, ou pourcentage d'alternance, sera ensuite calculé. On considère qu'un triplet est juste lorsqu'il est composé de trois branches différentes (ex : 1-2-3, ou 2-1-3). Le pourcentage de triplets justes est calculé en divisant le nombre de triplets justes par le nombre total de triplets effectués par l'animal en 5 minutes.



FIGURE 2.9 – Test de Labyrinthe en y

4. Test de reconnaissance d'objet

Principe : Le test de reconnaissance d'objet est particulièrement utile pour étudier la mémoire déclarative chez les rongeurs car il fait appel à leur préférence naturelle pour un nouvel objet par rapport à un objet familier. Cette tâche évalue la capacité de la souris à reconnaître un nouvel objet par rapport à un objet familier dans un environnement connu. Les animaux contrôles passent classiquement plus de temps à explorer le nouvel objet, ce qui reflète ainsi l'utilisation de processus de mémoire et d'apprentissage. L'absence de différence dans l'exploration des objets peut être interprétée comme un déficit de mémoire (SAHAY et al., 2011) .

Dispositif : L'appareil pour ce test consiste en une enceinte carrée (4 x 4 cm) en plexiglas entourée entièrement de cloisons grises pour éliminer tout indice du champ visuel de la souris.

Procédure : Le test est divisé en 3 phases : une phase de familiarisation de 5 minutes dans laquelle on présente à l'animal deux objets identiques A et B, une phase de 3 minutes où l'animal est replacé dans sa cage d'origine et une phase de test ou de reconnaissance, de 5 minutes, au cours de laquelle l'objet B est remplacé par un objet

C différent dans la couleur et la forme. Le paramètre calculé dans ce test est l'indice de reconnaissance IR.

Avec $IR = C*100/(C+A)$

-C : le temps passé par l'animal avec l'objet C pendant la phase de reconnaissance.

-A : le temps passé par l'animal avec l'objet A pendant la phase de reconnaissance

5. Test de l'interaction sociale :

Le test à trois chambres connu sous le nom de protocole de Crawley, ce a été utilisé avec succès pour étudier l'affiliation sociale et la mémoire sociale chez la souris.

Dispositif : une boîte rectangulaire à trois chambres. Chaque chambre est de 19 x 45 cm et les murs de séparation sont en plexiglas clair, avec une section centrale ouverte, qui permet un accès libre à chaque chambre (voir photo 2.10). Le principe de base de ce test repose sur le libre choix, par la souris de passer du temps dans l'un des compartiments de la boîte pendant deux sessions expérimentales, y compris un contact indirect avec une ou deux souris avec lesquelles elle n'est pas familier.

La conception expérimentale de ce test permet d'évaluer deux aspects critiques mais distincts du comportement social, tels que l'affiliation / motivation sociale, ainsi que la mémoire et la nouveauté sociales. La "sociabilité" se définit dans ce cas comme la propension à passer du temps avec une autre souris, par rapport au temps passé seul dans une chambre identique mais vide. La "préférence pour la nouveauté sociale" est définie comme la propension à passer du temps avec une souris non rencontrée auparavant plutôt qu'avec une souris familière .

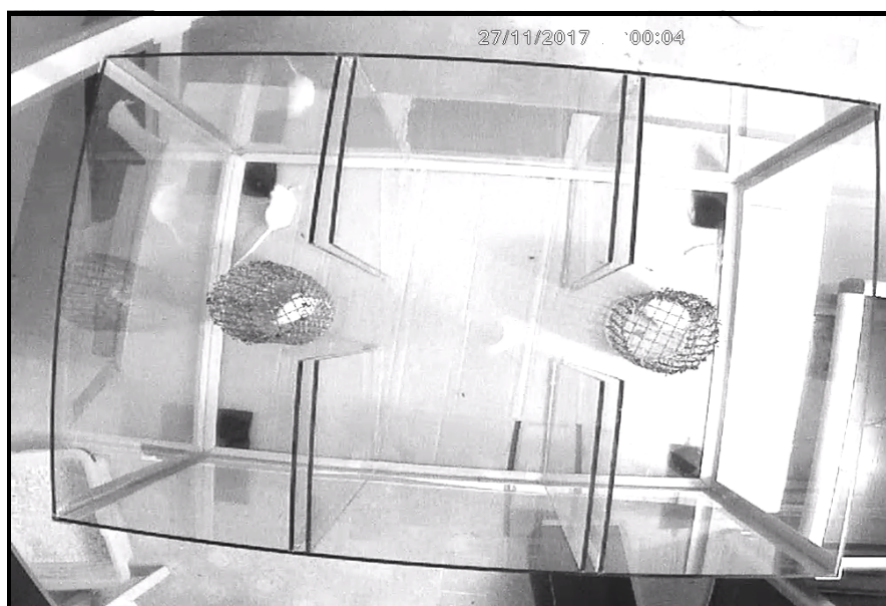


FIGURE 2.10 – Test de l'interaction sociale

2.2 Exploration du stress oxydant

2.2.1 Préparation de l'homogénat

Homogénat des organes

Le foie, le rein et le cerveau des différents groupes étudiés a été utilisé, Après broyage et homogénéisation des tissus dans la TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4), puis une centrifugation de la suspension cellulaire (9000 tours/min, 4°C, 15 min), le surnageant obtenu est aliquoté dans des tubes eppendorfs puis conservés à 4°C en attendant d'effectuer les dosages des paramètres du stress oxydant.

2.2.2 Détermination de la peroxydation lipidique (LPO) par le taux du malondialdéhyde (MDA)

— principe

Le principe de ce dosage est basé sur la condensation de MDA en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique. La réaction entraîne la formation d'un complexe de couleur rose entre deux molécules d'acide thiobarbiturique qui peut être donc mesuré par spectrophotométrie d'absorption à 530 nm

— Mode opératoire

Prélever 125 μ L de l'homogénat (surnageant)

Ajouter 50 μ L de la solution tampon TBS

Ajouter 125 μ L de la solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%)

Vortexer et Centrifuger à 1000 tours/min pendant 10 min à 4

Prélever 200 μ L du surnageant

Ajouter 40 μ L du HCl (0.6 M)

Ajouter 160 μ L de la solution Tris-TBA (Tris 26 mM, TBA 120mM)

Mélanger et incuber au bain marie à une température de 80C pendant 10 min

— Calcul de la concentration

On calcule la concentration de MDA exprimé en nanomoles par milligramme de protéines (nmol/mg prot) selon la formule suivante :

$$C = \frac{DO * 10^6}{E * X * Fd * l} \quad (2.1)$$

C : Concentration de MDA en nmole/mg

DO : Densité optique lue à 530 nm

E : Coefficient d'extinction molaire du MDA

$$E = \frac{1.56 * 10^5}{M * cm} \quad (2.2)$$

L : Longueur du trajet optique = 0.779 cm

X : Concentration du surnagent en protéines

Fd : Facteur de dilution, Fd = 0.2083

2.2.3 Détermination de l'activité de l'acétylcholinestérase

Dosage de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE)

— Principe

La méthode utilisée est celle décrite par Ellman et al., (1961). C'est une méthode colorimétrique.

Ainsi l'acétylcholinestérase contenue dans la fraction des tissus va réagir avec l'acétylthiocholine (ASCh) en libérant de l'acide acétique et la thiocholine (SCh). Cette dernière réagit à son tour avec le 5-5'-Dithio-bis (2-nitrobenzoate) (DTNB) en donnant du TNB produit de couleur jaune qui absorbe à 412 nm et dont la concentration est proportionnelle à la quantité d'enzymes présente dans le milieu. La réaction peut se schématiser ainsi :



— mode opératoire :

- Prélever 1000 μL de Tampon phosphate (PBS) (0.1 M, pH 7.4).
- Ajouter 50 μL de DTNB.
- Ajouter 50 μL de ASCh.
- Ajouter 50 μL de l'homogénat.

La lecture de l'absorbance se fait à 412 nm à un intervalle de temps de 25 min (lecture de la DO chaque 3min) contre la solution blanc.

— Calcul de l'activité de l'AChE

L'activité de l'AChE exprimée en nanomoles par minute par milligramme de protéines (nmol/min/mg prot) selon la formule suivante :

$$\frac{\Delta DO}{\Delta t} =$$

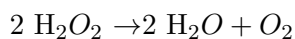
variation de la densité optique par minute (2.3)

P : Concentration de protéines en mg/ml.

2.2.4 Détermination de l'activité de quelques enzymes antioxydantes au niveau tissulaire

Dosage de l'activité de la catalase (CAT)

— Principe Les catalases sont présentes dans un grand nombre de tissus. Ce sont des enzymes tétramériques, chaque unité portant une molécule d'hème et une molécule de NADPH. Ces enzymes interviennent dans la défense de la cellule contre le stress oxydant en éliminant les espèces réactives et en accélérant la réaction spontanée de l'hydrolyse du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) toxique pour la cellule en eau et en oxygène (Aebi, 1984). La réaction se fait en deux étapes. La réaction bilan est :



L'activité de la CAT est mesurée à 240nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

— Mode opératoire

Réactifs	Essai μL
Tampon phosphate (PBS) (0.1 M, pH 7.4)	780
H_2O_2 (0.5M)	200
Homogénat	20

TABLEAU 2.1 – Protocole utilisé pour le dosage de l'activité du CAT

Régler le zéro de l'appareil par la solution PBS ; La lecture de l'absorbance se fait à 340 nm.

— Calcul de l'activité de la CAT

L'activité de la CAT exprimée en micromoles de H_2O_2 par minute par milligramme de protéines

$$CAT_{(umoldeH_2O_2/min/mgprot)} = \frac{\Delta DO}{E * X * L * 0.02} \quad (2.4)$$

DO =variation de la densité optique par minutes, c'est-à-dire pour

* AI (Absorbance initiale) : 15 s

* AF (Absorbance finale) : 1min

$$\Delta DO = (AI - AF) * 4/3$$

par min (2.5)

d : dilution de l'échantillon au début

E : Coefficient d'extinction moléculaire de l'eau oxygénée, $E_{H_2O_2} = 0.043 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} = 0,043 \text{ umol cm}^{-1} \text{ ml}^{-1}$

L : Trajet optique de la cuve = 1 cm

X : Concentration de protéines en mg/ml.

Dosage de l'activité de la Superoxyde Dismutase (SOD)

La procédure expérimentale du dosage de la superoxyde dismutase est la suivante :

Prélever 0.1 ml de mélange (méthionine et Na₂EDTA)

Ajouter 0.8922 ml de tampon phosphate (50mM, pH=7.8)

Ajouter 0.05 ml du surnageant

Ajouter 0.95 ml de tampon phosphate

Ajouter 0.0852 ml de NBT .

Ajouter 0.0226 ml de riboflavine .

La réduction du NBT est estimée après 20min à une longueur d'onde 580nm contre le blanc

Le pourcentage (Y) contre unité de SOD (quantité des protéines enzymatiques capable d'inhiber 50% de NBT) peut être calculé selon l'équation suivante :

$$Y = \frac{\Delta DO_{\text{étalon}} - \Delta DO_{\text{échant}} * 100}{\Delta DO_{\text{étalon}}} * 20/C \quad (2.6)$$

Dosage de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx)

L'activité de la glutathion peroxydase (GPx) a été mesurée selon la méthode de Flohe et Gunzler (1984). Cette activité a été calculée par la diminution de taux de GSH réduit par rapport à la réaction non enzymatique « blanc ».

— Mode opératoire :

Prélever 200 ul de l'homogénat

Ajouter 200 ul de GSH .

Ajouter 200 ul de la solution tampon PBS (pH 7.4)

Ajouter 500 ul de H₂O₂ pour initier la réaction

Incuber à 37°C, pendant 1 min

Ajouter 500 ul de TCA (5%) pour arrêter la réaction

Centrifuger à 15000 tours/min durant 5 min

Mélanger le surnageant, le tampon PBS(pH 7.4) et le DTNB

lire les densités optiques à 412 nm après 5 minutes.

$$GPX = \frac{Y}{X} \quad (2.7)$$

$$Y = DO_{blanc} - DO_{\text{échantillon}} \text{ et } X = \text{quantité de protéines}$$

Dosage de l'activité de la glutathion S-transférase (GST)

La technique que nous avons utilisée pour doser l'activité de GST est celle de Habig et al., 1974, elle mesure la cinétique de formation entre un substrat modèle, le Chlorodinitrobenzene (C-DNB) et le glutathion, qui absorbe la lumière à 340 nm.

— Mode opératoire

Réactifs	Essai μL
Tampon phosphate (PBS) (0.1 M, pH 7.4)	830
CDNB	50
GSH	100
Homogénat	20

TABLEAU 2.2 – Protocole utilisé pour le dosage de l'activité du glutathion S-transférase (GST)

— calcul de la concentration

L'activité de la GST exprimée en nanomoles de C-DNB par minute par milligramme de protéines (nmol C-DNB/min/mg prot) selon la formule suivante :

$$GST_{(nmol\ C-DNB/min/mg\ prot)} = \frac{\Delta DO_{\text{échantillon}} - \Delta DO_{\text{blanc}}}{E * L * mg\ prot} \quad (2.8)$$

— $\Delta DO_{\text{échantillon}} - \Delta DO_{\text{blanc}}$: moyenne des DO des échantillons par minute – moyenne des DO des Blancs par minute

— E : Coefficient d'extinction moléculaire du C-DNB, EC-DNB = $9.6\ mM^{-1}.cm^{-1}$

— L : Trajet optique de la cuve = 1cm

2.2.5 Dosage des protéines

Les concentrations des protéines des différents tissus ont été dosées par la méthode de Lowry (1951) à l'aide d'une gamme d'étalonnage avec l'albumine de sérum bovin (BSA) voir fig 2.11.

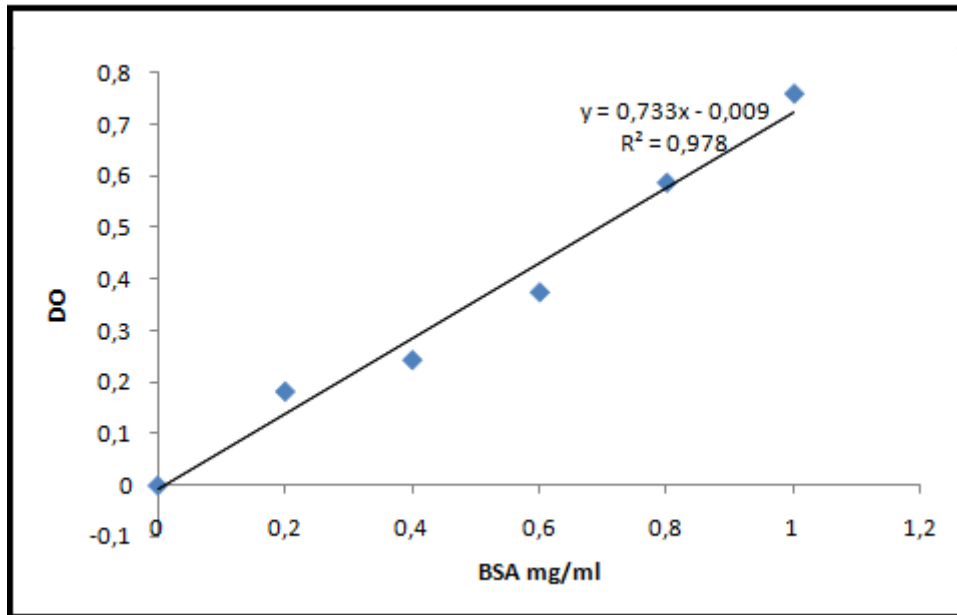


FIGURE 2.11 – Courbe d'étalonnage des protéines dosées par la méthode de Lowry

2.2.6 Technique histologique

La technique d'histologie nous permet d'obtenir des coupes minces de ces différents organes (foie, tissu adipeux, muscle, cerveau). Cette technique comprend plusieurs étapes principales successives : fixation, inclusion, coloration, et montage .

Prélèvement

Le prélèvement constitue la première étape de toute étude histologique .pour cela la dissection doit se faire le plus rapidement possible pour que l'organe ne subisse pas d'altération cellulaires et tissulaires et éviter le dessèchement des tissu. Immédiatement après le prélèvement, les organes sont rincés dans l'eau physiologique.

Fixation

Le but histologique de la fixation est d'immobiliser les cellules dans un état proche de l'état vivant, l'acte de la fixation consiste à précipiter avec le moins de déformation topographiques possibles. Cette fixation entraine un durcissement de l'organe ce qui permet de maintenir les diverses formations tissulaires en place, ainsi ces cellules seront protégées contre les attaques bactériennes, les distorsions et les rétractions. Elle s'effectue en plongeant les prélèvements dans un liquide fixateur le formol à 10% ou liquide de Bouin , le temps de fixation doit être au moins de 24 h à température ambiante et peu durer plusieurs jours même plusieurs semaines .

Déshydratation

Déshydrater les fragments par bains successifs de 10min chacun dans des bains d'éthanol à différent degrés à 50°C ,70°C ,95°C et 3 fois 100°C et suivit de 3 bains de toluène ou xylène de 10mn chacun.

Inclusion = Enrobage

L'inclusion a pour objectif d'imprégner totalement les cellules d'une substance durcissante qui permettra des coupes fines et régulières. Cette technique permet aussi la conservation de l'échantillon. Le milieu d'inclusion le plus utilisé est la paraffine qui est un mélange d'hydrocarbure saturés et quelque fois de cire. La paraffine n'est pas miscible à l'eau et l'alcool mais miscible dans le toluène et le xylène. On obtient à la fin de cette phase le bloc en paraffine réalisé dans des cassettes.

Confection des coupes

Les coupes sont réalisées à l'aide d'un microtome, on vérifie la solidité du bloc de paraffine puis on fixe le bloc sur le porte-bloc du microtome et on l'oriente convenablement. On réalise des rubans de coupes à une épaisseur à 5 mm (on commence par l'épaisseur de 30, 25, 20, 5). Les coupes obtenues sont déposées sur des lames en verre préalablement nettoyées.

Étalement

Identifier les lames à l'aide d'un crayon diamanté puis déposer une goutte de liquide d'étalement (un blanc d'oeuf ou de l'albumine +100 ml glycine+450 ml'eau distillé) sur lequel sera déposé le ruban de coupe. Puis ces lames sont placées sur une plaque chauffante (37°C) afin de faciliter l'étalement, ensuite elles sont placées dans une étuve à 56°C pendant deux heures.

Déparaffinage et Hydratation

Les lames doivent donc être déparaffinées avant leur coloration dans 2 bains de xylène pendant 10 min chacun, puis dans 2 bains d'éthanol pendant une minute pour chaque bain. L'hydratation se fait en plongeant les lames dans différents bains d'alcool d'ordre décroissant, alcool à 90°C puis à 50°C pendant 1 à 5 minutes, puis on rince avec l'eau courante pendant une minute.

Coloration

Elle a pour but de différencier les constituants tissulaires. La coloration utilisée est celle de la coloration tri chromique hématoxyline, éosine.

Où l'hématoxyline colore les structures nucléaires en bleu et l'éosine colore le cytoplasme en rouge et le collagène en rose.

Déshydratations

Après coloration, il est nécessaire de faire une déshydratation : les coupes sont trempées dans différents bains d'Alcool éthylique de titre croissant :

1-Alcool à 70°C pendant 5 à 10 minutes.

2- Alcool à 90°C pendant 5 à 10 minutes.

3-alcool éthylique absolus pendant 15 minutes.

4- Suivie de deux bains de xylène de 15 minutes chacun.

Cette étapes nous permet d'éliminée l'eau présente dans les coupes.

montage des lames

Les lames colorées doivent être protégées pour rendre possible leur examen microscopique et leur conservation sans risque d'altération : dans ce but : nous avons recouvert les lames par des lamelles couvre-objet a l'aide d'une colle EUKITT ou baume de canada. Les lames ainsi préparées peuvent se conserver pendant une période illimitée.

observation microscopique

Les lames ainsi préparées sont prêtes pour l'observation au microscope optique (x10puisx40).
Remarque.

Ces différentes coupes ont été réalisées au laboratoire d'anatomie et pathologie du Centre Hospitalier Régional De Beni Mellal, Toutes ces étapes sont réalisées à l'aide d'un automate.

2.2.7 Analyse Statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SPSS 20.0. Les tests paramétriques d'ANOVA à mesure répété et d'ANOVA à 1 facteur ont été utilisés pour comparer les series de donnés. Lorsque il y'avait une difference entre plus de deux lots, on procédait à une analyse complémentaire avec le test en post hoc de tukey .

La normalité de distribution a été testée par le test de Kolmogrov-Smirnov, et l'homogénéité par le test de Levens.

2.2.8 protocole expérimental

Notre travail se présente en trois parties principales , une qui étudie les effets du Malathion sur les souris gestante (voir schéma 2.12) et une deuxième partie qui traitera les impacts de malathion sur la descendance(voir schéma 2.13) ,et une troisième partie qui traitera les impacts de malathion sur les adultes (voir schéma 2.14).

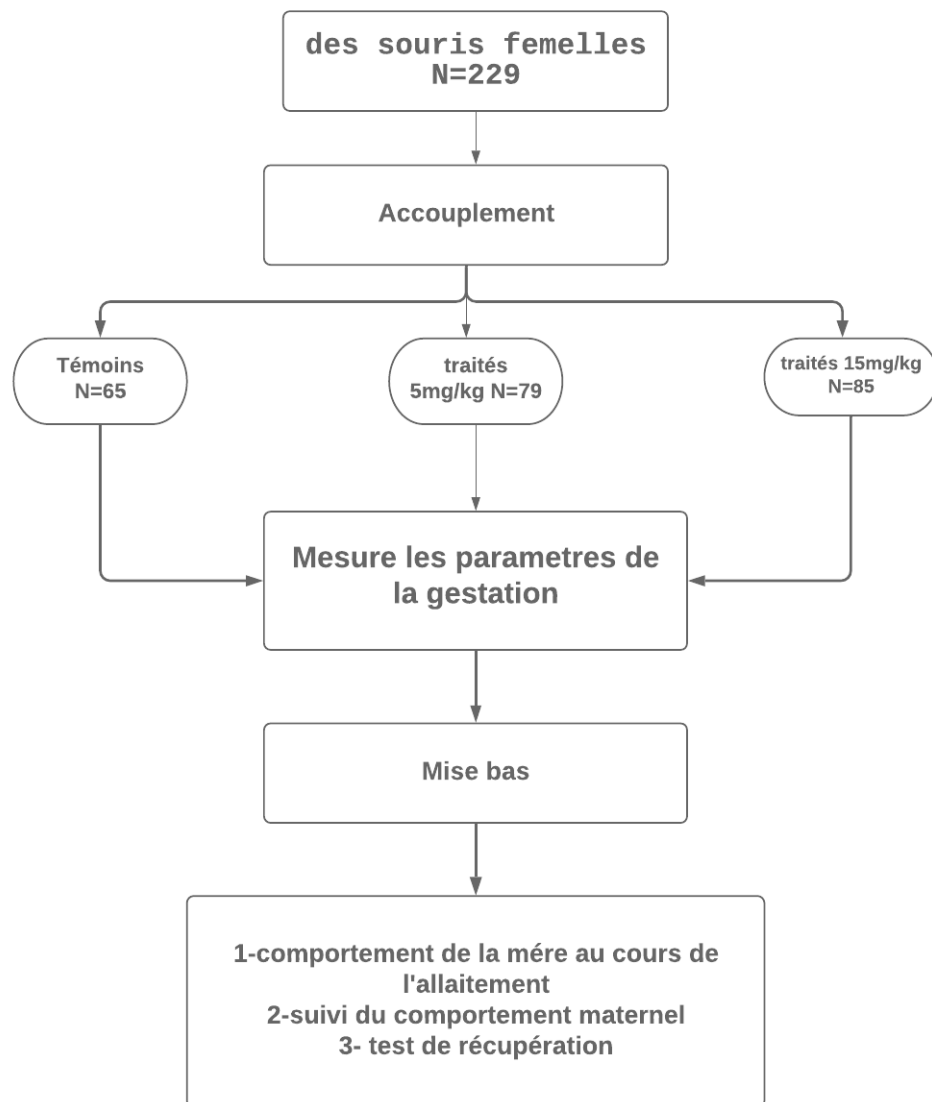


FIGURE 2.12 – protocole expérimental chez les souris mères

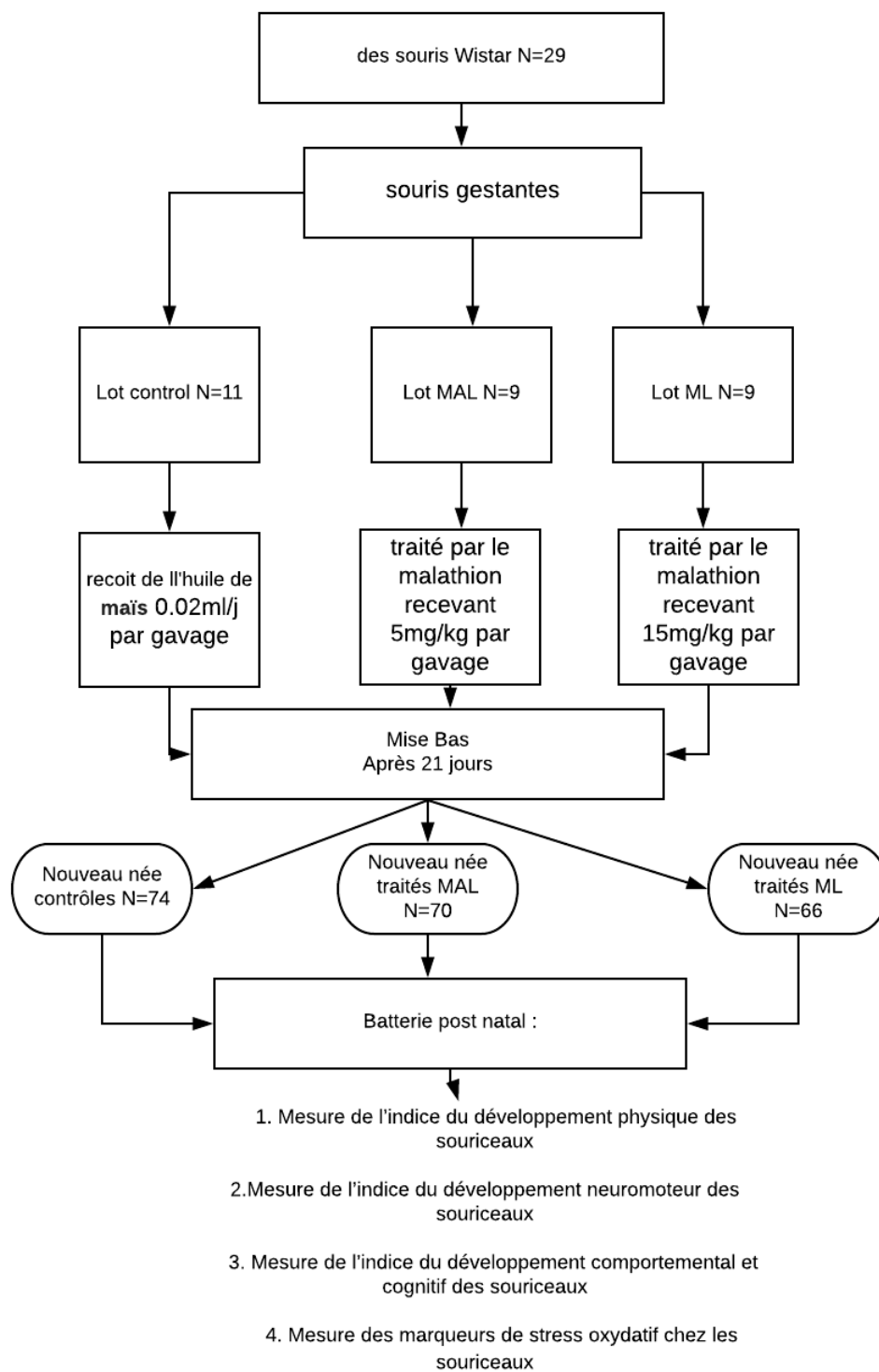


FIGURE 2.13 – protocole expérimental chez les nouveaux nés

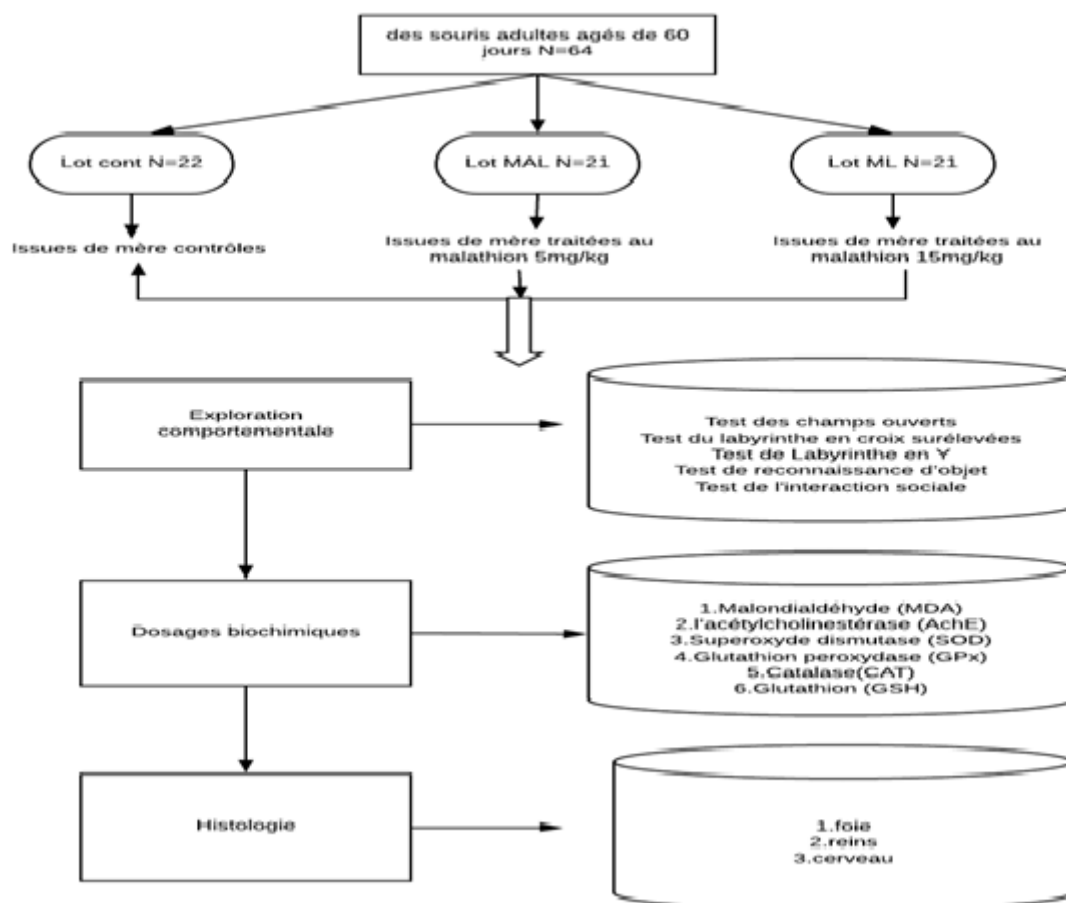


FIGURE 2.14 – protocole expérimental chez les adultes

3 Résultats

Etude des effets du Malathion chez la souris gestante : Aspect neuro-comportemental et physiologique

les conditions expérimentales se résument comme suit : les mères sont exposées par gavage dès le premier jour de gestation et réparties en trois lots, un lot témoin recevant seulement l'huile de maïs, et deux lots traités quotidiennement par le Malathion à la dose de 5 et 15 mg/kg .

3.0.1 Caractérisation des paramètres de la gestation

Les paramètres de la gestation sont estimés par le nombre des femelles gestantes, le nombre de femelles mortes pendant la gestation, la durée de gestation (j), l'indice de fécondité(%), la mortalité néonatale (%), le nombre moyen de souriceaux par portée, le poids moyen des souriceaux (g) et le pourcentage des souriceaux mâles (voir tableau 3.1).

Pour la durée de gestation, nous avons constaté qu'elle est plus longue chez les femelles gestantes traitées avec la forte dose (15 mg/kg) [F (2, 21) = 4.475, P =0.009] et aussi chez les femelles gestantes traitées avec la faible dose (5mg/kg) [F (2, 21) = 4.475, P =0,043] par rapport aux témoins.

Concernant le nombre de femelles mortes pendant la gestation, il est très élevé surtout chez les traitées avec la forte dose (28.7%).

l'indice de fécondité est très élevé chez les témoins par rapport au traités avec un pourcentage de 93.05%.

la mortalité néonatale est très élevée chez les femelles traités avec les deux doses [F (2, 21) = 4.472, P =0.01] et [F (2, 21) = 4.472, P =0.028] .

Le poids moyen de souriceaux par portée est plus élevé chez les témoins que chez les traités 15 mg/kg [F (2, 21) = 3.125, P >0.05] .

Le pourcentage des souriceaux mâles est relativement faible surtout chez les traités avec la forte dose 49.305% .

Concernant le poids des femelles au cours de la gestation (voire figure 3.1), nous avons constaté que le poids des femelles traitées avec la forte dose 15mg/kg est significativement faible par rapport aux témoins (j12 :[F (2, 60) = 0,118, P =0.001],j19 :[F (2, 60) = 0,118, P =0.036],j20 et j21 : [F (2, 60) = 0,118, P =0.01]).

TABLEAU 3.1 – Effet de l'exposition de Malathion sur les paramètres de gestation, Les valeurs sont des moyennes $\pm SEM$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)(One Way Anova)

	Témoins	5mg/kg	15mg/kg
Nombre des femelles accouplées	65	79	85
Nombre des femelles gestantes (%)	83	75.9	71
nombre de femelles mortes pendant le gestation (%)	16	24.5	28.7
Durée de gestation	20,5 \pm 0.463	22 \pm 0.327*	20,875 \pm 0.295 **
Indice de fécondité (%)	93.05	76.38*	68.055 **
le nombre moyen de souriceaux par portée	8,778 \pm 0, 222	8,111 \pm 0.423	7,818 \pm 0, 4
Nombre de souriceaux vivants	8.375 \pm 0.183	6.875 \pm 0.611*	6.125 \pm 0.398 **
Mortalité néonatale (%)	2,778	14, 137*	16, 166 **
Poids moyen des souriceaux (g)	3,4 \pm 0, 105	3,3 \pm 0, 0894	3,1 \pm 0.0860*
Nombre des nouveaux nés males (%)	63.93	53.389	49.305

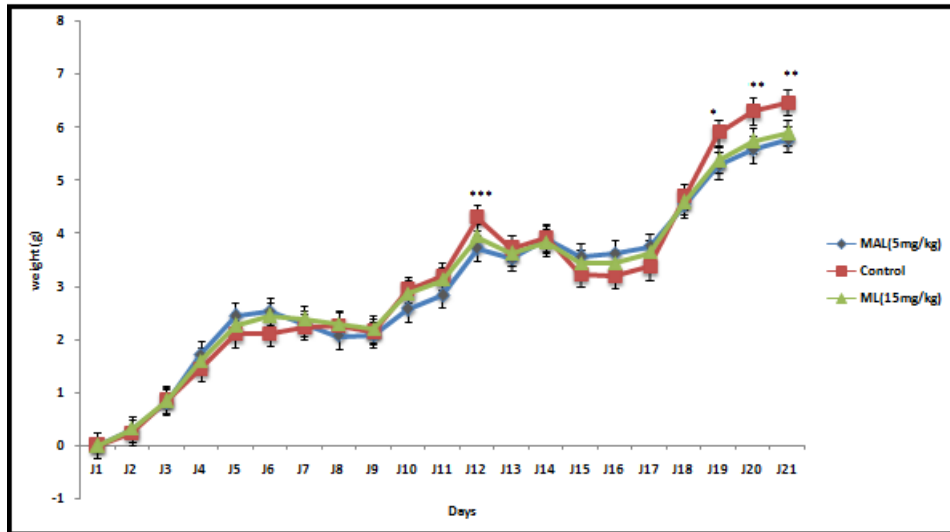


FIGURE 3.1 – .

Effet de l'exposition au Malathion sur le poids des femelle au cours de la gestation.

(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

3.0.2 Effet de Malathion sur le comportement maternel

Le comportement maternel a été observé après la mise-bas , c'est-à-dire au cours de la quatrième semaine de traitement. L'action du Malathion sur les activités qui définissent le comportement maternel est reporté dans le tableau(3.2)

TABLEAU 3.2 – Effet de l'exposition de Malathion pendant la période post-partum sur les activités maternel et non-maternel des femelles

test d'observation	Témoins	5mg/kg	15mg/kg
les activités maternelles			
dans le nid	4,33±0, 42	3,66±0, 34	2,61±0, 31 * **
l'entretien de nid	NA	NA	NA
caresse des souriceaux	NA	NA	NA
les activités non-maternelles			
la prise de nourriture (Eating)	3.143±0.19	2.81±0.30	2.952±0.20
la consommation de l'eau(Drinking)	2.905±0.26	1.875±0.30*	1.714±0.27 * *
le sommeil(Sleeping)	1.575±0.20	2.333±0.31	2.524±0.38*
auto toilettage(Self-grooming)	1.905±0.26	4.238±0.57	4.995±0.21 * **
redressement(Rearing)	1±0.19	2.238±0.29	2.571±0.26*
reniflement(Sniffing)	0.619±0.20	1.333±0.24*	2.095±0.26 * *

le Comportement « maternel » : l'observation de la position de la mère par rapport au nid (Resting out/in side of the nest) chez les mères traitées avec la dose de 15 mg/kg révèle que les femelles passent moins de temps à l'intérieur du nid [F (2, 60) = 2.61 P =0.001] par rapport aux témoins [F (2, 60) = 4.33 P =0.001] , donc elles sont loin de la portée et moins actives auprès de leurs souriceaux (voir tableau3.2). la faible dose ne montre pas de différence significative par rapport au témoins .

le Comportement « non maternel » : il se caractérise par une importante activité de la mère en lien avec le milieu extérieur et non pas avec sa progéniture (exploration des cages par exemple).

Dans notre étude, Les mères traitées avec la forte dose(15 mg/kg) ont consommé moins d'eau que les témoins [F (2, 60) = 1.714 P =0,01].

la prise de nourriture a été augmentée chez les Mères témoins par rapport aux traitées [F (2, 60) = 2.295 P =0.6]. De plus, le sommeil a augmenté chez les femelles traitées avec la forte dose 15 mg/kg par rapport aux mères témoins [F (2,60) = 2.524 P ;0,05].

Pour le reniflement [F (2, 60) = 2.095, P ;0,01] et l'auto toiletteage [F (2, 60) = 2.571, P ;0,05] ont diminué chez les mères témoins par rapport aux mères traitées avec la forte dose (15mg/kg) (voir tableau 3.2).

Position par rapport à l'allaitement : le comportement de la mère au cours de l'allaitement se définit selon trois types de positions : deux positions actives « arc-boutée » et « moyenne », et une position « passive ».

Chez les traitées (15 mg/kg) [F (2,60) = 2.143 P ;0,001] la position « active » lors de la première semaine qui suit la naissance est moins fréquente par rapport aux témoins [F (2,60) = 4.238 P ;0,001].

Chez les témoins la position « arc boutée » où les souriceaux sont abrités sous l'animal est légèrement plus adoptée que la position sur le flanc (position moyenne) , par contre chez les mères traitées (5 mg/kg)[F (2,60) = 1,494 P ;0,001] , nous avons constaté une augmentation de la position « passive » au détriment des deux autres positions(voir figure 3.2).

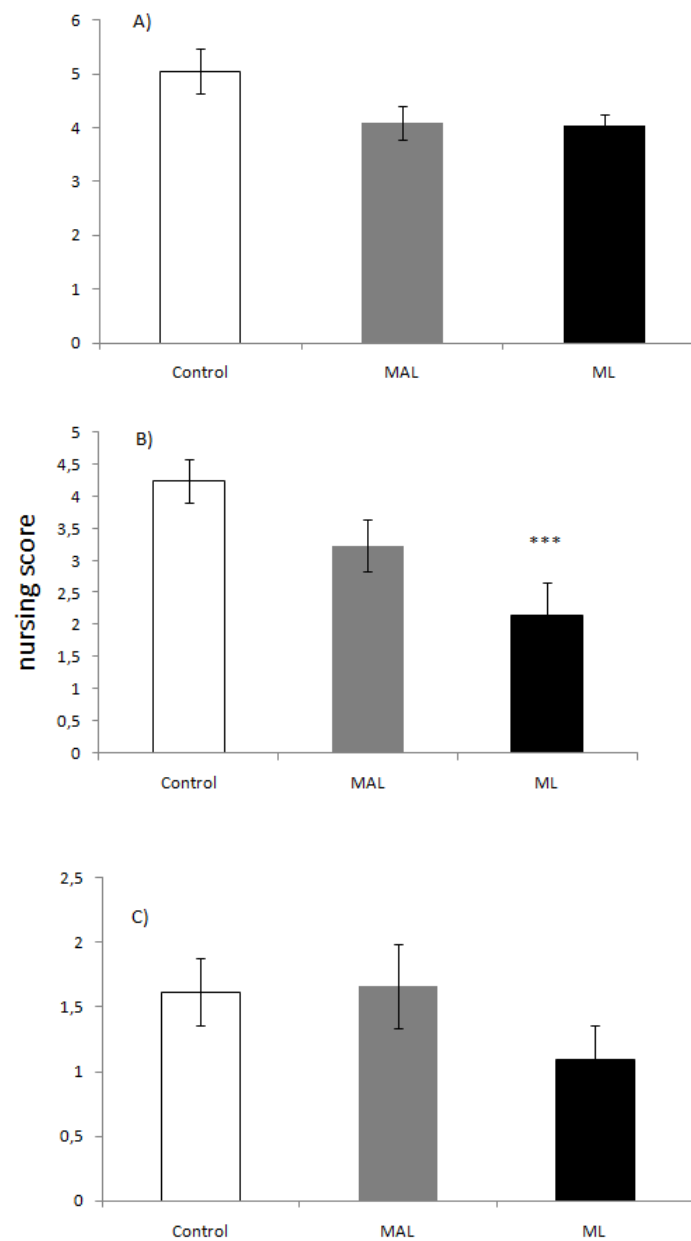


FIGURE 3.2 – Effets de Malathion sur le L'allaitement dans le test d'observation.
Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes (Moyens \pm S.E.M. $n = 8$)

A) nursing, (B) active nursing, (C) passive nursing

le test de récupération : Pour le test de récupération Nous n'avons trouvé aucune différence significative dans la latence de ramasser les souriceaux et ramener le premier souriceau au nid pendant les 12 jours de test.

Le temps pour retourner tous les souriceaux dans le nid était plus longue pour les femelles traitées (15 mg/kg) [$F(2,60) = 55,833$; $p = 0,033$] par rapport aux

témoins .

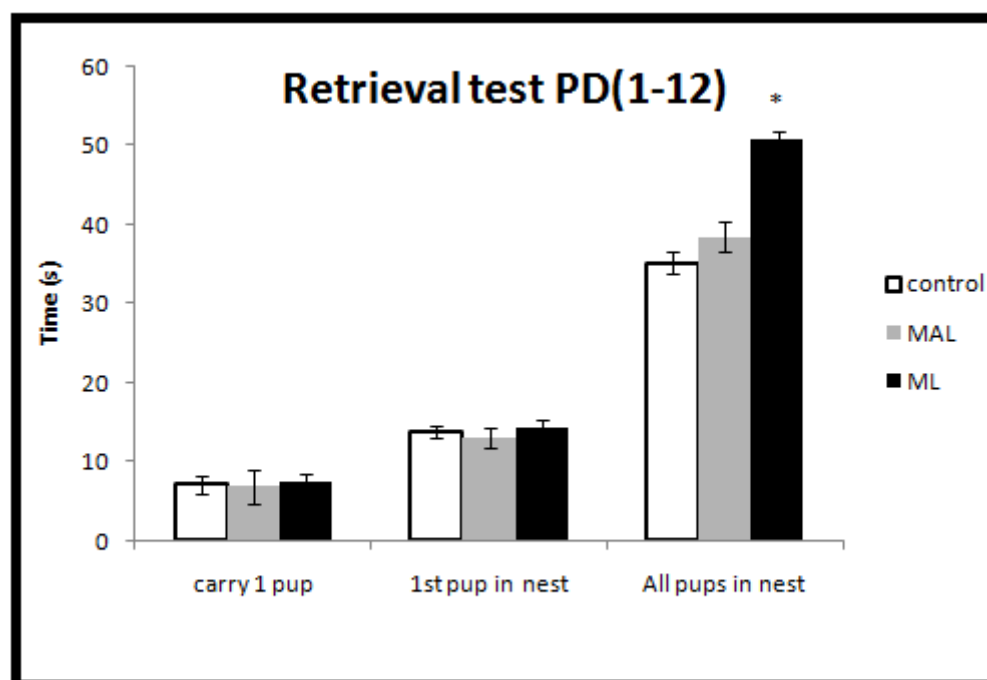


FIGURE 3.3 – Effet de l'exposition au Malathion sur le test de récupération pendant la période d'allaitement (PD 1–12). Les valeurs sont des moyennes $\pm SEM$ ($n = 8$), PD = jour postnatal. * $p < 0,05$), (One Way Anova)

3.1 Effets du traitement au Malathion sur le développement physique des Souriceaux

le poids :

Les résultats montrent que les souriceaux traités présentent une insuffisance pondérale marquée entre la naissance et le jour postnatal 21, la figure 3.4 montre l'évolution de poids des souriceaux issues des mères exposées au Malathion pendant la gestation.

Chez les traités (15 mg /kg), nous avons remarqué une diminution significative de poids à PN 5 ($F(2,207) = 29.938$, $p < 0,001$), à PN 9 ($F(2,197) = 50.557$; $p < 0,001$), à PN 13 ($F(2,189) = 54.032$; $p < 0,001$) et à PN 17 ($F(2,177) = 94.51$) et à PN 21 ($F(2,152) = 105.189$; $p < 0,001$) par rapport aux témoins .

Chez les traités avec la faible dose(5 mg / kg) le poids diminue à PN 5 ($F(2,207) = 29.938$, $p = 0.045$), à PN 9 ($F(2,197) = 50.557$; $p = 0.02$), à PN 13 ($F(2,189) = 54.032$; $p = 0.025$), à PN 17 ($F(2,177) = 94.51$) et à PN 21 ($F(2,152) = 105.189$; $p < 0,001$) par rapport aux témoins.

nous avons également observé une différence significative à PN9 entre les traités (15 mg / kg)]et les traités avec la faible dose (5 mg / kg) [F (2.197) =50.557;p = 0.049] .

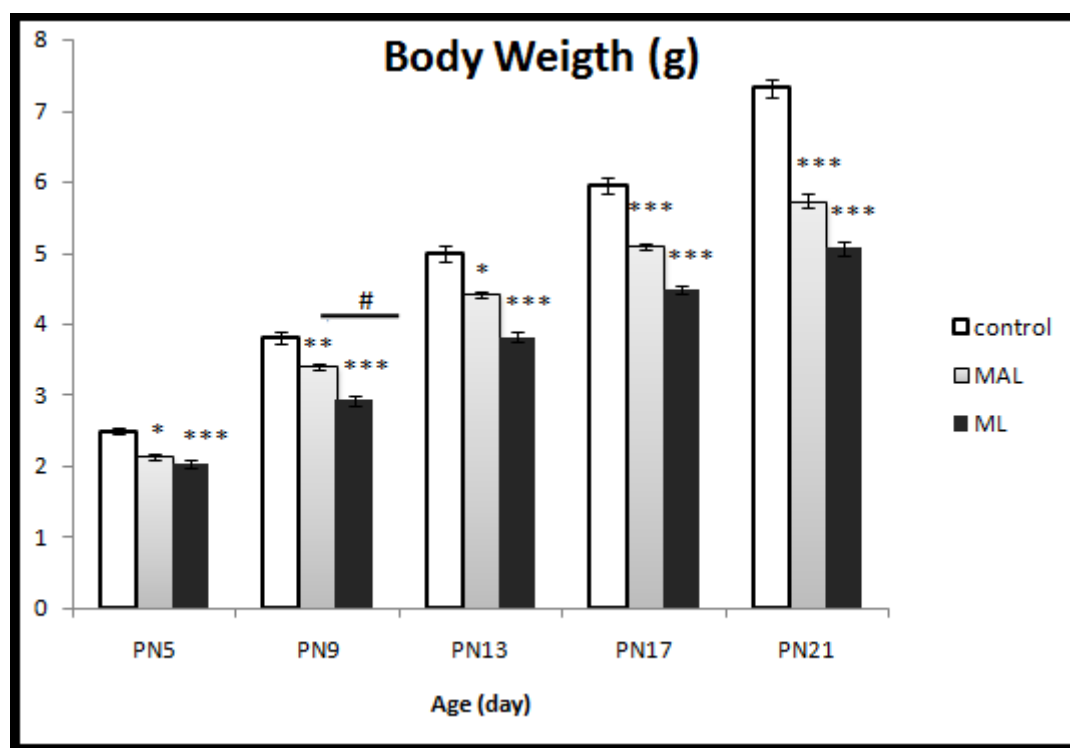


FIGURE 3.4 – Poids corporel des souriceaux pendant la période d’allaitement. Les valeurs sont des moyennes \pm SEM * $p < 0,05$ et *** $p < 0,001$ par rapport aux témoins ; # $p \leq 0,05$ comparaison entre les groupes traités MAL :5 mg/kg et ML : 15 mg/kg(One-Way ANOVA)

la longueur du corps :

La figure 3.5 montre que l’exposition au Malathion a entraîné une diminution de la longueur corporelle des souriceaux.

Chez les traités (15 mg/kg) nous avons trouvé une diminution significative de la longueur du corps des souriceaux pendant la période postnatale, à PN 5 [F (2.206) =40.069 ; p = 0,001] , à PN 9 [F (2.194) =57.739 ; P = 0,001], à PN 13 [F (2.187) =93.96 ; p<0,001] , à PN 17 [F (2.174) =86,417 ; P = 0,001]et à PN 21 [F (2.146) =107.534 ; p<0,001] par rapport aux témoins.

Chez les traités avec la faible dose(5 mg / kg) le poids diminue à PN 5 [F (2.206) =40.069 ; p = 0,001] , à PN 9 [F (2.194) =57.739 ; P = 0,043], à PN 13 [F (2.187) =93.96 ; p<0,001] , à PN 17 [F (2.174) =86,417 ; P = 0,001]et à PN 21 [F (2.146) =107.534 ; p<0,05] par rapport aux témoins.

alors qu'il n'y avait pas de différence significative entre les traités (15 mg/kg) et les traités avec la faible dose (5 mg/kg) (voir fig3.5).

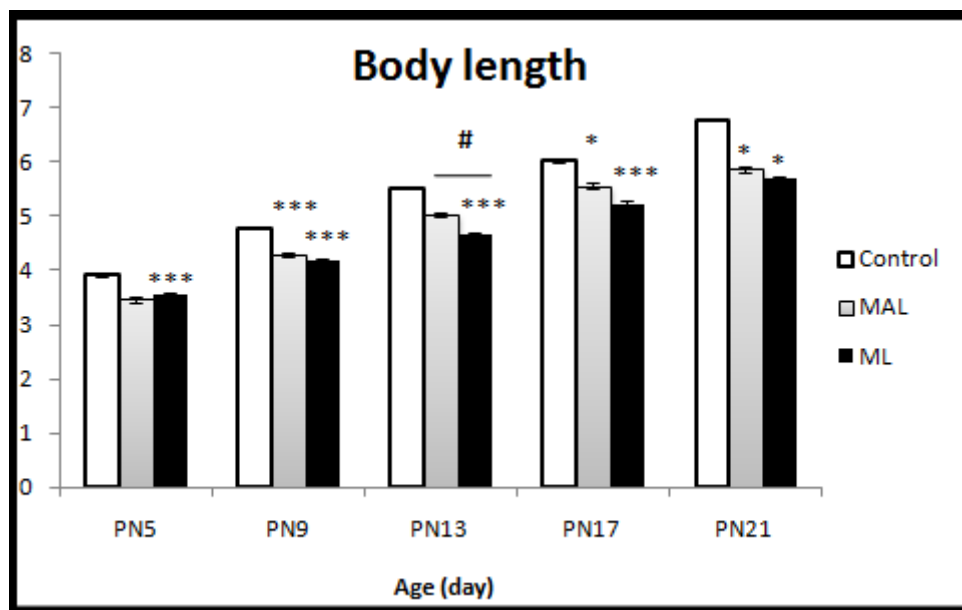


FIGURE 3.5 – longueur du corps des souriceaux pendant la période d'allaitement. Les valeurs sont des moyennes $\pm SEM$ * $p < 0,05$ et *** $p < 0,001$ par rapport aux témoins; # $p \leq 0,05$ comparaison entre les traités MAL : 5 mg/kg et ML : 15 mg/kg (One-Way ANOVA)

la longueur de la queue :

L'exposition au Malathion a diminué la longueur de la queue chez les souriceaux traités (15 mg / kg) à PN 5 [F (2.206) = 3.067; $p < 0,05$], à PN 9 [F (2.194) = 58.559; $p < 0,001$], à PN 13 [F (2.187) = 136.48; $p < 0,001$], à PN 17 [F (2.187) = 44.033; $p < 0,001$] et à PN 21 [F (2.174) = 41.642; $p < 0,001$] par rapport aux témoins.

Chez les traités avec la faible dose (5 mg / kg) la longueur de la queue a été diminuée à PN 9 [F (2.194) = 58.559; $p < 0,001$], à PN 13 [F (2.187) = 136.48; $p = 0,022$], à PN 17 [F (2.187) = 86.417; $p = 0,025$] et à PN 21 [F (2.174) = 107.534; $p = 0,043$] par rapport aux témoins.

Nous avons également observé une différence significative à PN9 entre les traités (15 mg / kg) et les traités (5 mg / kg) [F (2.194) = 58.559; $p = 0,05$] (voir fig3.6).

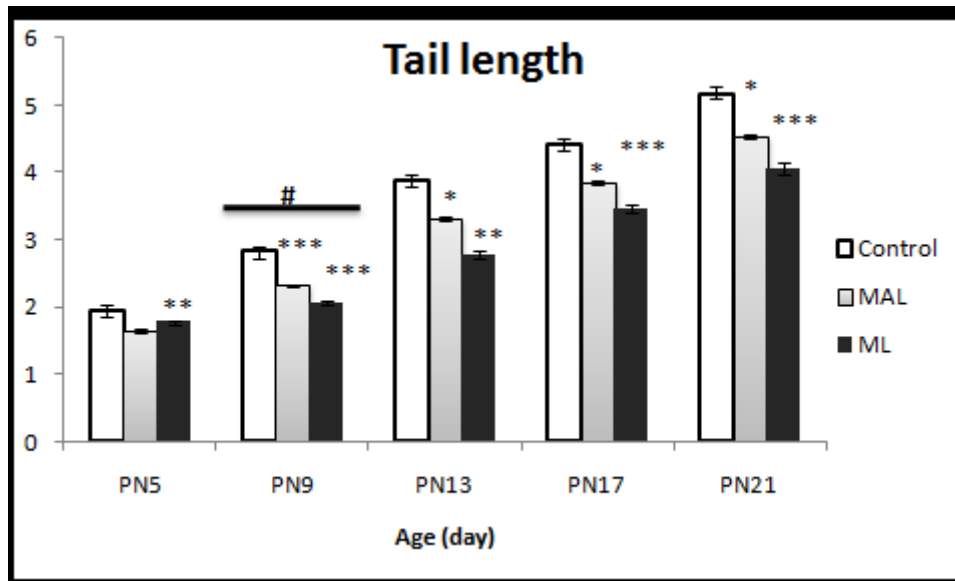


FIGURE 3.6 – Longueur de la queue des souriceaux pendant la période d’allaitement. Les valeurs sont des moyennes \pm SEM * $p < 0,05$ et *** $p < 0,001$ par rapport aux Témoins; # $p \leq 0,05$ comparaison entre les traités MAL : 5 mg/kg et ML : 15 mg/kg (One-Way ANOVA)

Age de détachement des oreilles :

concernant l’âge de détachement des oreilles nous n’avons pas trouvé une différence significative entre les trois groupes ($F(2,26) = 7.636$; $P = 0.01$) (voir tableau 3.3).

Age de l’apparition des poils :

le tableau 3.3 montre qu’il y’a un retard d’ un jour pour l’apparition des poils chez les traités (15 mg/kg) [$F(2,26) = 3.119$; $p = 0.061$] par rapport aux témoins.

Age de l’apparition du sexe :

concernant l’âge de l’apparition du sexe nous n’avons pas trouvé une différence significative entre les trois groupes [$F(2,26) = 3.044$; $p = 0.066$] (voir tableau 3.3).

Age de sortie d’incisive :

le tableau 3.3 montre qu’il y’a un retard d’ un jour pour l’âge de sortie d’incisive chez les traités (15 mg/kg) [$F(2,26) = 5.473$; $p = 0.011$] par rapport aux témoins.

Age d’ouverture des yeux :

l’exposition au Malathion au cours de la gestation a provoqué chez la progéniture un retard d’ouverture des yeux chez les souriceaux traités (15 mg/kg) [$F(2,26) = 17.277$; $p = 0.001$] et

aussi chez les traités avec la faible dose (5 mg/kg) ($F(2,26) = 17.277$; $P = 0.03$) par rapport aux témoins (voir tableau 3.3).

TABLEAU 3.3 – effet de Malathion sur les paramètres physique des souriceaux

	Témoins	5mg/kg	15mg/kg
Age de détachement des oreilles	5 ± 0	5,222 ± 0,147	5,455 ± 0,157
Age de l'apparition des poils	6,889 ± 0,111	7,375 ± 0,183	7,636 ± 0,244 * *
Age de l'apparition de sex	11,444 ± 0,475	12,625 ± 0,183	12,27 ± 0,273
Age de sortie d'incisives	11,125 ± 0,441	12,111 ± 0,309	12,667 ± 0,25 * *
Age d'ouvertures des yeux	14,653 ± 0,171	15,955 ± 0,29 * *	16,794 ± 0,284 * **

3.2 Effet du traitement au Malathion sur le développement neuro-moteur des Souriceaux

Test de retournement

La maturation neuromusculaire est mesurée par le temps de latence de Retournement. Ces mesures sont indiquées dans la figure 3.7, ces résultats montrent que l'exposition prénatale au Malathion provoque chez les souriceaux issues des mères traitées au Malathion un allongement du temps de latence de retournement chez les traités 15 mg/kg à PN 5 [$F(2,206) = 54.983$; $p < 0.001$], à PN 7 [$F(2,206) = 54.983$; $p < 0.001$] et à PN 13 [$F(2,206) = 54.983$; $p < 0.001$]. Chez les traités avec la faible dose 5mg/kg à PN 5 [$F(2,206) = 54.983$; $p < 0.001$], à PN 7 [$F(2,206) = 54.983$; $p = 0.025$] et à PN 13 [$F(2,206) = 54.983$; $p < 0.001$] par rapport aux témoins. Nous avons également observé une différence significative à PN 5 entre les traités (15 mg / kg) et les traités avec la faible dose (5 mg / kg) [$F(2,206) = 54.983$; $p = 0.05$] par rapport aux témoins.

Les tendances des variations nous laissent penser que les souriceaux provenant des mères traitées présentent un déficit marqué dans la maturation neuromusculaire.

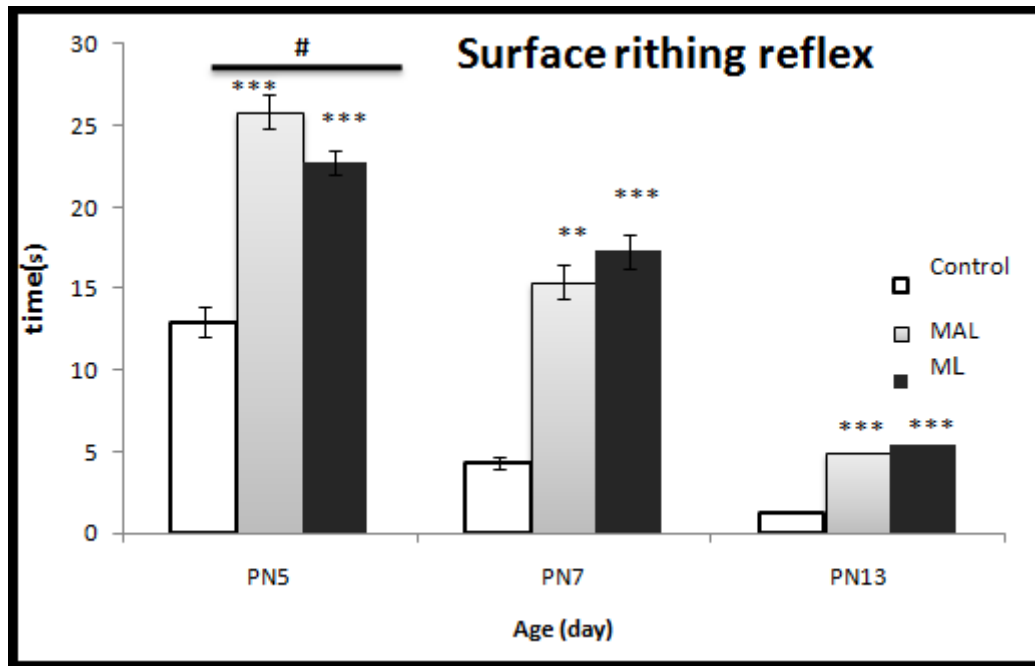


FIGURE 3.7 – le temps de latence de retournements des souriceaux pendant la période d'allaitement. Les valeurs sont des moyennes \pm SEM * $p < 0,05$ et *** $p < 0,001$ par rapport aux témoins; # $p < 0,05$ comparaison entre les traités MAL 5 mg/kg et ML 15 mg/kg (One-Way ANOVA)

Test d'évitement de Cliff

Ce test mesure la force musculaire et la coordination des membres antérieurs et postérieurs des souriceaux.

L'analyse des données montrent que le temps de latence pour éviter une falaise était plus élevé chez les souriceaux traités (15 mg / kg) ($F(2,64) = 17.123$; $p < 0,001$) et traités (5 mg / kg) ($F(2,64) = 16.601$; $p < 0,05$) par rapport aux témoins (voir figure 3.8).

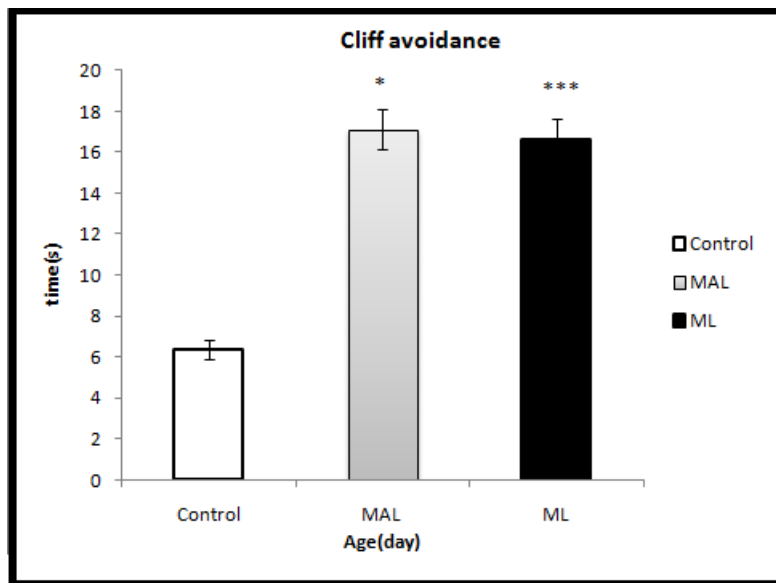


FIGURE 3.8 – L’effet du traitement du Malathion sur les réponses du test du Cliff avoidance pendant la période d’allaitement. Les valeurs sont des moyennes $\pm SEM$ * $p < 0,05$ et *** $p < 0,001$ par rapport aux témoins; # $p \leq 0,05$ comparaison entre les traités MAL (5 mg/kg) et ML (15 mg/kg) (One-Way ANOVA)

Test de réaction antigravitaire

Le test de réaction antigravitaire mesure la maturation du cervelet et des canaux semi-circulaire de l’oreille interne à travers la mesure du temps de réaction gravitaire (plus le temps est long plus la maturation est déficiente).

Les mesures des temps de réaction sont consignées dans la figure 3.9.

D’après ce test nous avons constaté que le temps de réaction est significativement allongé chez les traités (15 mg/kg) à PN9 ($F(2,194) = 9.166$; $p < 0,001$), à PN13 ($F(2,185) = 5.832$; $p = 0,001$) et à PN17 ($F(2,140) = 6.855$ $p = 0,001$) et aussi chez les traités (5 mg/kg) à PN 9 ($F(2,194) = 9.169$; $p = 0,006$) par rapport aux témoins.

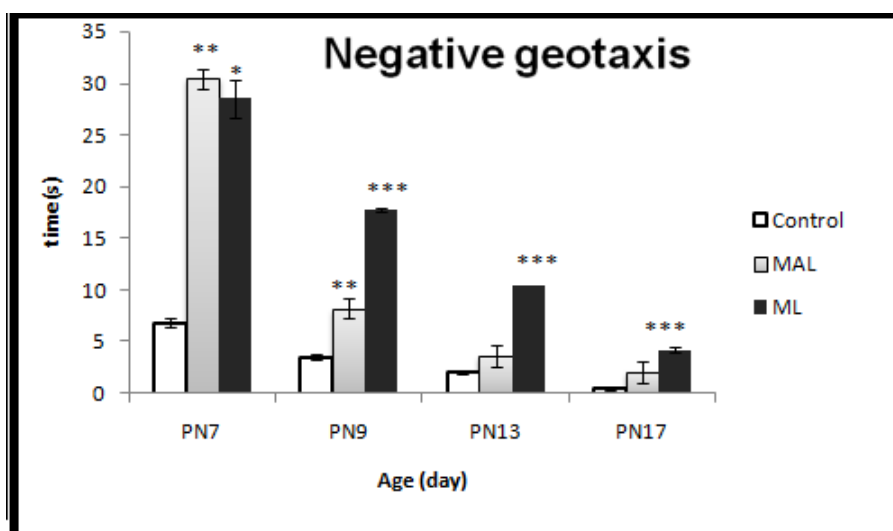


FIGURE 3.9 – L'effet du traitement du Malathion sur la réaction antigravitaire des souriceaux pendant la période d'allaitement. Les valeurs sont des moyennes \pm SEM
 * $p < 0,05$ et *** $p < 0,001$ par rapport aux témoins; # $p < 0,05$ comparaison entre les traités MAL 5 mg/kg et ML 15 mg/kg (One-Way ANOVA)

Test de saut avec le choix des cages (Jumping down choice cage)

Ce test mesure le développement de l'orientation et la coordination sensori-motrice.

Les résultats de ce test ont montré des réponses significatives à PN 15 chez les traités 15 mg / kg ($F(2,52) = 98.413$; $p = 0.002$) par rapport aux témoins, par contre il n'y avait pas de différence significative à PN 17 pour les groupes traités et les groupes témoins.

Pour le choix de la cage tous les animaux ont été sautés, 67% des témoins ont préféré la cage qui contient la fratrie par rapport au groupe traité (15 mg/kg) (26%) et également chez les traités (5 mg/kg) (36%) (voir Fig3.10).

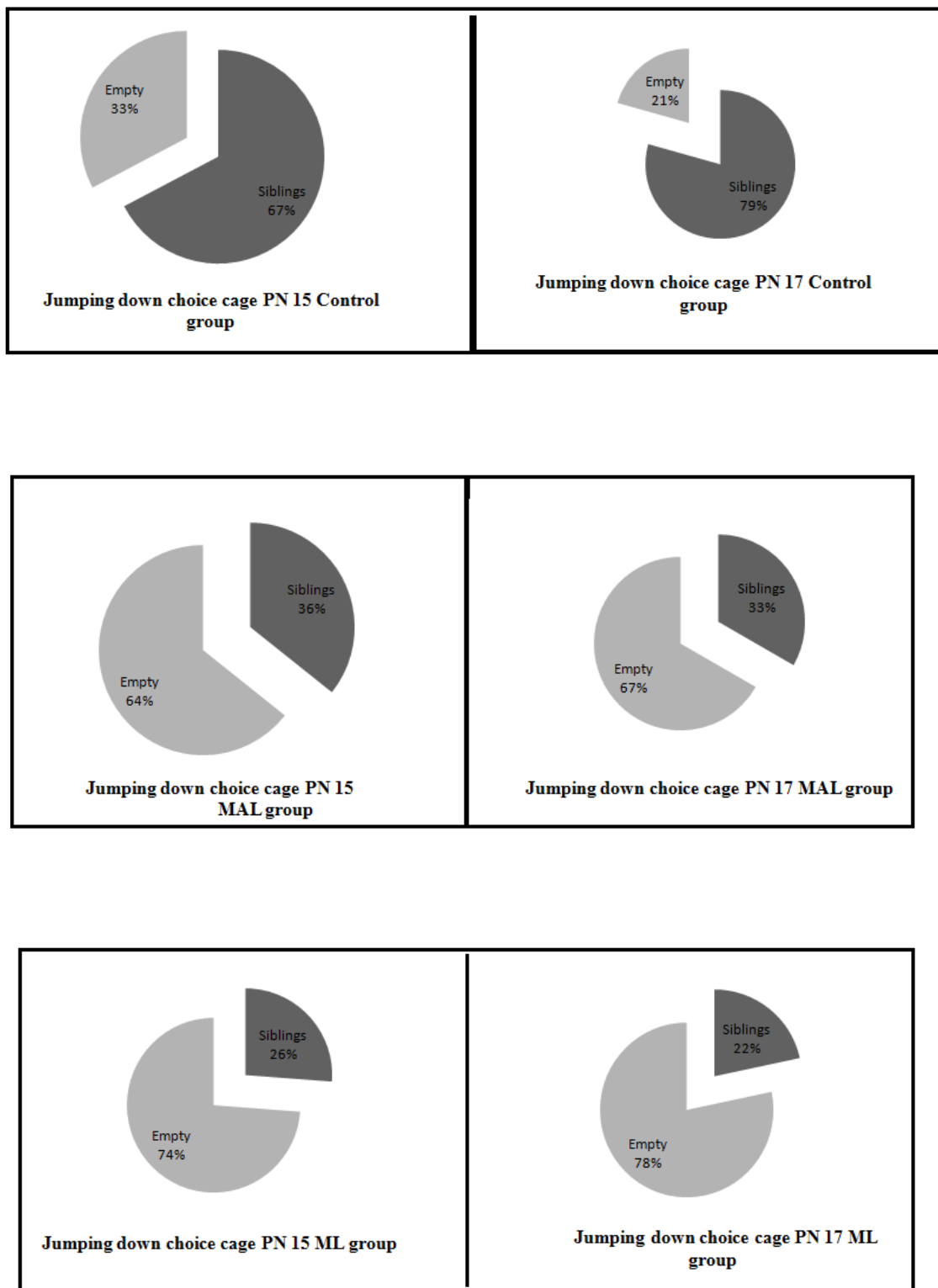


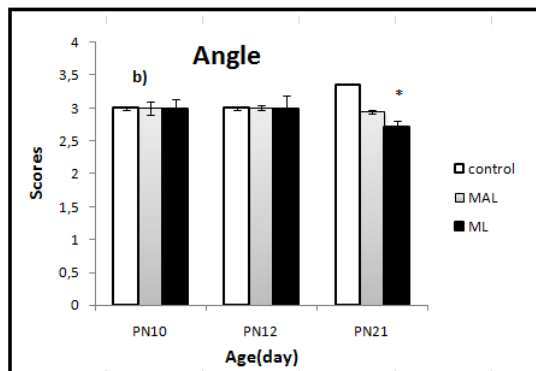
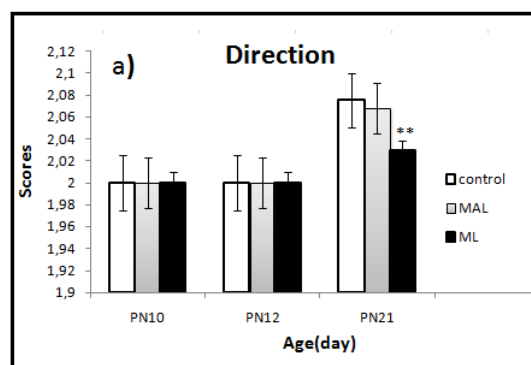
FIGURE 3.10 – Effet du traitement par le Malathion sur les réponses des souriceaux au test Jumping. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm S.E.M. (One-Way ANOVA)

Test de développement de natation(Swimming development))

Ce test mesure le développement de la coordination neuro-motrice et la capacité de nage.

En ce qui concerne la direction de la natation le groupe traité avec la dose(15 mg/kg)a montré un score inférieur à PN 21 ($F(2.64) = 2.944$; $p = 0.003$) par rapport aux témoins.

Pour l'angle de nage ,le groupe traité avec la forte dose 15 mg/kg présentait un seuil significativement inférieur à celui du groupe témoin à PN 21 ($F(2.64) = 2.714$; $p = 0.006$).Par contre, aucune différence significative n'a été observée lors de l'utilisation des membres chez les deux groupes traités. (Voir fig3.11). Cependant, aucun effet significatif sur le traitement n'a été observé à PN 10 et à PN 12 dans les trois paramètres étudiés.



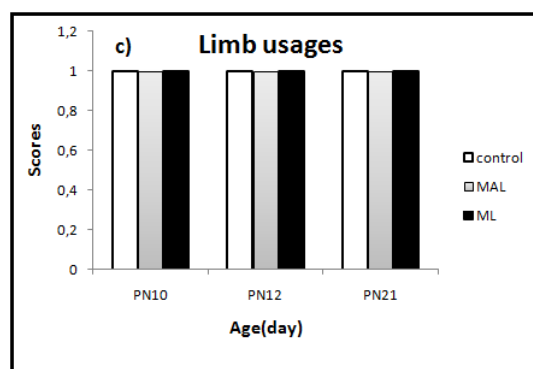


FIGURE 3.11 – Le développement de la natation chez les souriceaux traités par le Malathion . Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (One-Way ANOVA)

Variation du poids relatif des reins, rate et cerveau chez les souriceaux

Le tableau(3.6) montre une diminution du poids des reins chez les souriceaux traitées avec la forte dose 15 mg/kg à PN 21 par rapport aux témoins (F (2, 12) =0,483 ; p = 0.015).

Les résultats concernant le poids du cerveau (Tableau3.5) montre que le traitement au Malathion entraine une réduction du poids du cerveau chez les souriceaux traités avec la forte dose (15 mg/kg)(F (2, 12) =7,082 ; p = 0.017) et chez les traités avec la faible dose (5 mg/kg) (F (2, 12) =7,082 ; p = 0.025) à PN 15 par rapport aux témoins.

les tableaux (3.5) et (3.6) montrent une augmentation de poids du foie chez les souriceaux traités avec la forte dose (15 mg/kg) à PN 15(F (2, 12) =5,377 ; p = 0.008) et à PN 21(F (2, 12) =4,382 ; p = 0.021) par rapport aux témoins.

TABLEAU 3.4 – Variation du poids relatif des reins, cerveau et foie chez les souriceaux à PN5

PN5	Témoins	5mg/kg	15mg/kg
poids de cerveau (g/pc) \pm SEM	0,0703 0.0016	0,0699 \pm 0.0017	0,0691 \pm 0.0023
poids du foie(g/pc) \pm SEM	0,0299 \pm 0.0036	0,0296 \pm 0.0023	0,0308 \pm 0.0016
Poids des riens (g/pc) \pm SEM	0,00839 \pm 0.00017	0,00831 \pm 0.00018	0,00797 \pm 0.00279

TABLEAU 3.5 – Variation du poids relatif des reins, cerveau et foie chez les souris à PN15

PN15	Témoins	5mg/kg	15mg/kg
poids de cerveau (g/pc)±SEM	0,0671 ±0.000576	0,0670 ±0.0011*	0,0626 ±0.0010*
poids du foie(g/pc) ±SEM	0,0295 ±0.0024	0,0362 ±0.0020	0,0393 ±0.0019 * *
Poids des reins (g/pc) ±SEM	0,0174 ±0.00214	0,0185 ±0.0014	0,0164 ±0.000695

TABLEAU 3.6 – Variation du poids relatif des reins, cerveau et foie chez les souris à PN21

PN21	Témoins	5mg/kg	15mg/kg
poids de cerveau (g/pc)±SEM	0,0526 ±0.0016	0,0519 ±0.0017	0,0516 ±0.0023
poids du foie(g/pc) ±SEM	0,0361 ±0.00083	0,0419 ±0.00194	0,0423 ±0.00198*
Poids des reins(g/pc) ±SEM	0,0251 ±0.00148	0,0243 ±0.00111	0,0219±0.00101*

3.3 Effet sur le développement comportemental et cognitif des souris

Test des champs ouverts (Open Field)

L'analyse des données de ce test a montré la présence d'un effet du traitement sur le comportement des souris en ce qui concerne le temps et le nombre de carrés croisés. Ainsi, le temps passé dans la périphérie était significativement plus élevé chez les traités avec la forte dose (15 mg/kg) ($F(2,12) = 4,552$; $p = 0,05$) que chez les contrôles alors que le temps passé au centre était significativement plus faible chez les traités (15 mg/kg) ($F(2,12) = 5,553$; $p = 0,006$) (figure 3.12 a).

En outre, le nombre de carrés périphériques était plus élevé chez les souris traitées que chez les témoins, mais n'atteignait pas l'importance (Fig. 4b), alors que le nombre de carrés centraux croisés par les souris traitées était inférieur à celui des témoins, à la dose de 5 mg / kg ($F(2,12) = 7,115$; $p = 0,045$) et aussi à la dose de 15 mg / kg ($F(2,12) = 7,115$; $p = 0,003$) (figure 3.12 b).

Lorsque le pourcentage de carrés centraux croisés était pris en compte, les souris traitées 15 mg / kg présentaient un pourcentage très faible ($F(2,12) = 9,56$; $p = 0,001$) par rapport aux témoins. la même chose pour la dose de 5 mg / kg ($F(2,12) = 9,56$; $p = 0,044$) (figure 3.12 c).

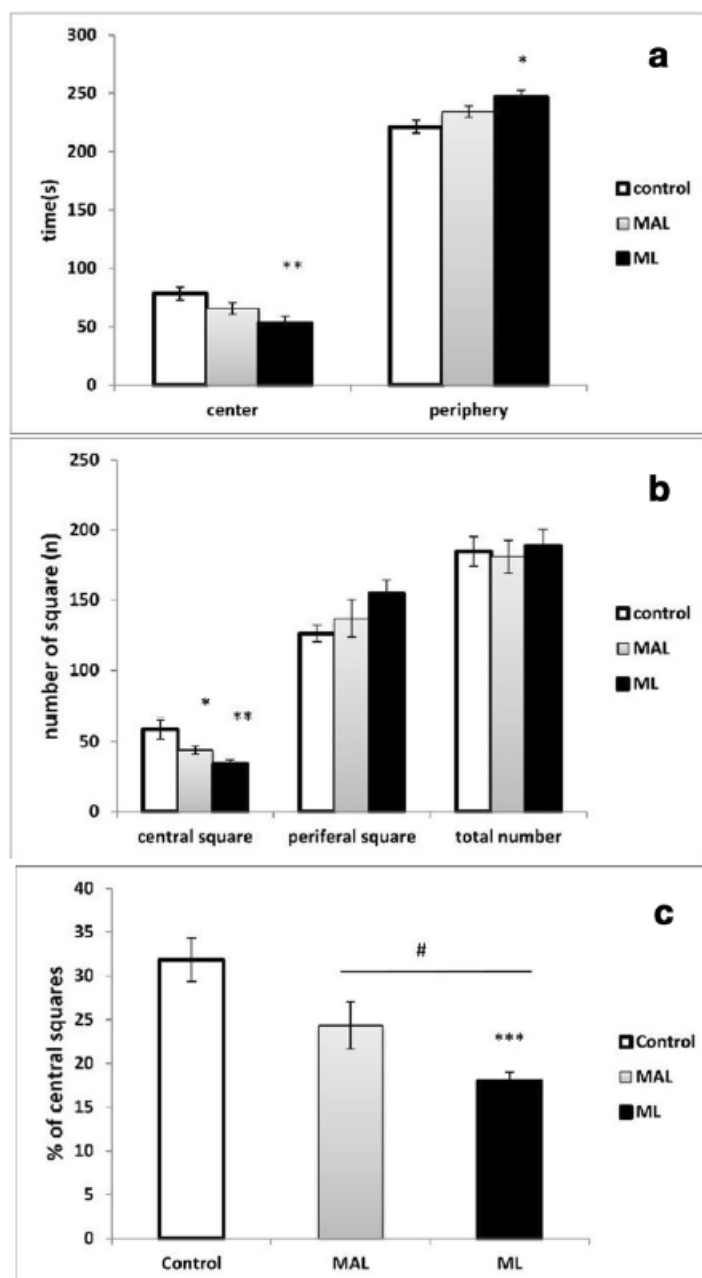


FIGURE 3.12 – Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle du Malathion (5 mg / kg : MAL ou 15 mg / kg : ML) sur le comportement des souriceaux dans le test d'Open Field. Chaque histogramme représente la moyenne \pm SEM
 a : Temps passé au centre et à la périphérie. b : Nombre de carrés croisés et c pourcentage des croisements des carrés centraux. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM ; *** $p < 0,001$,** $p < 0,01$ et * ou $p < 0,05$ par rapport au groupe témoin (one-way ANOVA)

Test de l'interaction sociale

La première session du test permet d'estimer l'affiliation et la motivation des souriceaux. Dans cette partie du test, le souriceau étranger était enfermée dans un gobelet circulaire qui

permettait contact avec le nez, mais a empêché les combats entre les souriceaux.

Ces conditions garantissent que les approches sociales sont initiées par la souris d'investigation seulement, sans contact physique direct.

le souriceau a le choix de passer plus de temps autour de la coupelle contenant le souriceau étranger pour éviter tout contact en se déplaçant vers le compartiment avec la tasse vide.

Dans la première session Les souriceaux témoins passeront plus de temps dans le compartiment avec le souriceau étranger 1 comparé au compartiment vide que les traités (15 mg / kg) [F (2, 18) = 27,382, $p < 0,001$] et les traités (5 mg / kg) [F (2, 18) = 27,382; $p = 0,001$] (Figure 3.13 A).

Dans la deuxième session Les souriceaux traités avec la forte dose (15 mg / kg) [F (2, 18) = 10,242; $p < 0,001$] et chez les traités avec la faible dose [F (2, 18) = 27,382; $p = 0,016$] ne montrent pas de préférence pour la chambre contenant le souriceau nouvellement introduit (Figure 3.13 B).

Le comportement indifférent des souriceaux traités dans ce test indique une diminution de la motivation sociale et de la nouveauté.

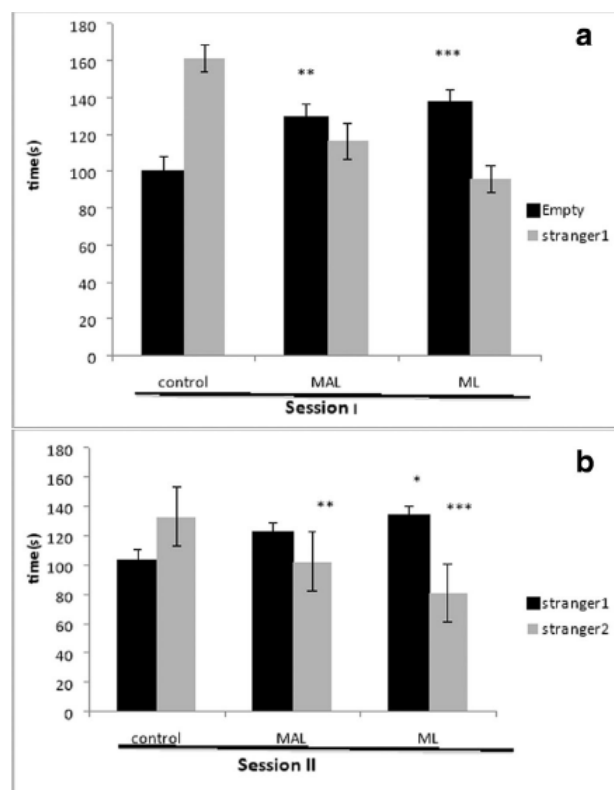


FIGURE 3.13 – Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle du Malathion (5 mg / kg : MAL ou 15 mg / kg : ML) sur le comportement des souriceaux dans le test d'interaction sociale . Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM ; *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ et * ou $p < 0,05$ par rapport au groupe témoin (one-way ANOVA)

3.4 Détermination de la peroxydation lipidique (LPO) par le taux du malondialdéhyde (MDA) chez les souriceaux

Pour l'estimation de la peroxydation lipidique, l'activité de la MDA a été mesurée dans le cerveau et le foie des souriceaux traités au malathion et à leur contrôles correspondants.

Pour les doses appliquées de 5 mg / kg et 15 mg / kg, l'activité était significativement augmentée chez les souriceaux traités comparés aux contrôles notamment aux PN5 et PN21.

Ce dernier âge postnatal a montré l'augmentation très significative en valeurs MDA chez les traités avec la forte dose (15mg/kg) ($F(2, 12) = 35,34$; $p < 0,05$) (voir fig 3.14A). La même chose pour le foie [$F(2, 12) = 31,98$; $p = 0,006$] (voir fig 3.14B).

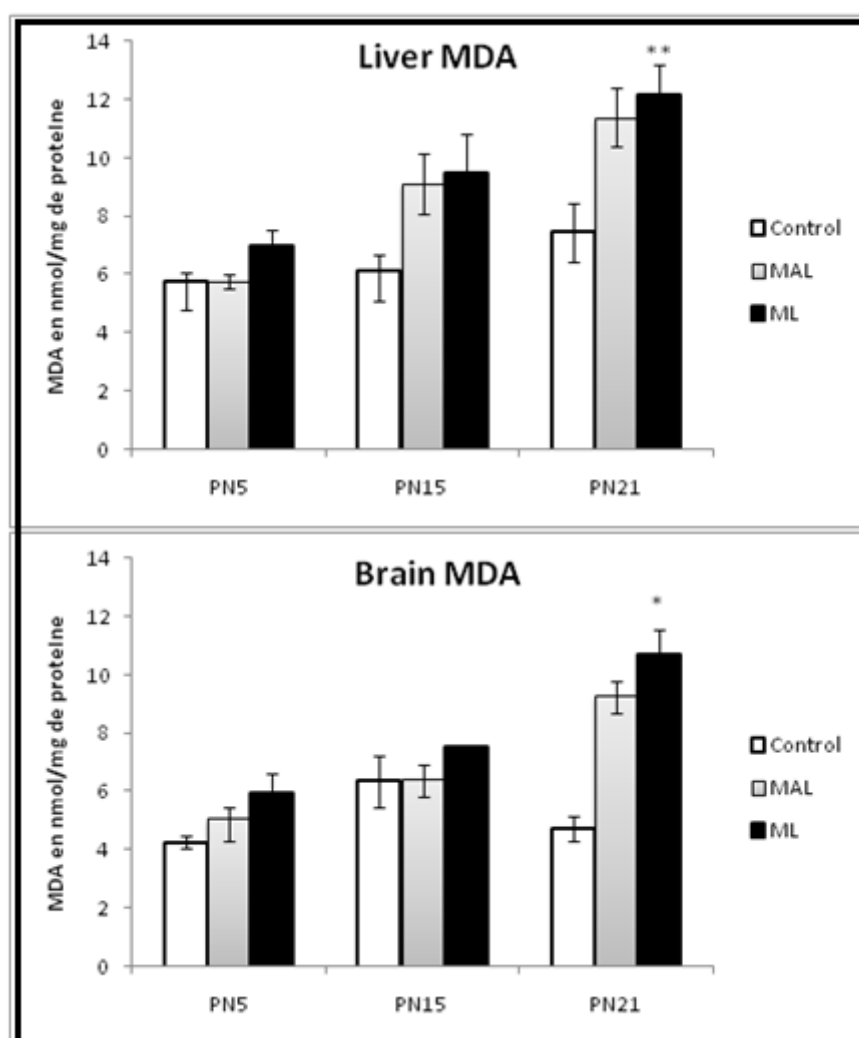


FIGURE 3.14 – Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle du Malathion (5 mg / kg : MAL ou 15 mg / kg : ML) Chez des souriceaux pendant la période postnatale (5, 15 et 21 jours postnatales) sur les taux de MDA, Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM ; *** $p < 0,001$,** $p < 0,01$ et * ou $p < 0,05$ par rapport au groupe témoin (one-way ANOVA)

3.5 Dosage de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) chez les souriceaux

nous avons constaté une réduction de l'activité enzymatique chez les souriceaux traités 15 mg/kg à PN 15 [$F(2, 12) = 3.593; =0, 03$] et à PN 21 [$F(2, 12) = 4.568; =0, 01$] par rapport aux témoins (voir figure 3.15).

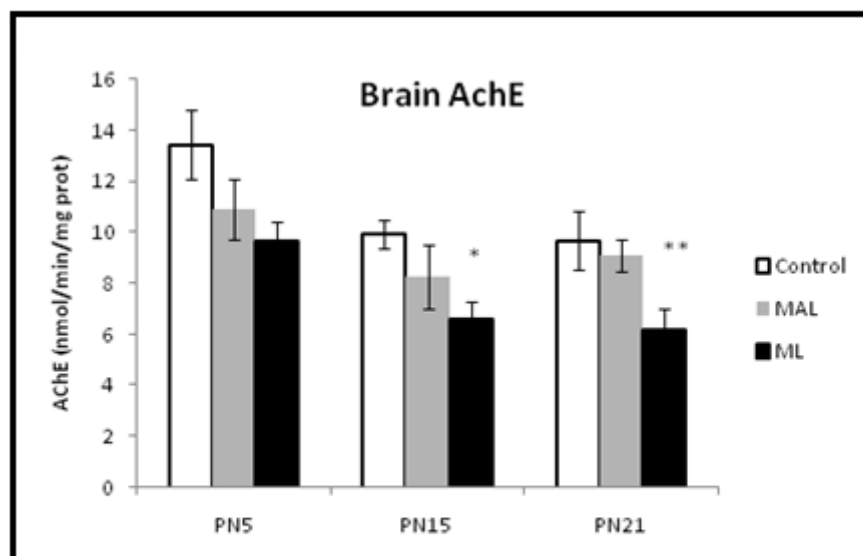


FIGURE 3.15 – Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle du Malathion (5 mg / kg : MAL ou 15 mg / kg : ML) Chez des souriceaux pendant la période postnatale (5, 15 et 21 jours postnatales) sur l'activité cérébrale de l'AChE, Chaque valeur représente la moyenne $\pm SEM$; *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ et * ou $p < 0,05$ par rapport au groupe témoin (one-way ANOVA)

3.6 Détermination de l'activité de quelques enzymes antioxydantes chez les souriceaux

Activité de la catalase (CAT)

L'activité de la catalase a montré une diminution significative dans le cerveau des souriceaux après le traitement au malathion pour les deux doses appliquées et aux trois âges postnatales étudiés (voir figure 3.16).

La diminution de l'activité la plus importante a été observée à PN 21 pour la dose expérimentale de 5 mg / kg ($F(2, 12) = 93,048; p < 0,001$) et pour la dose expérimentale élevée de 15 mg / kg ($F(2, 12) = 93,048; p = 0,001$) avec respectivement 50% et 63% (voir figure 3.16).

Pour le foie l'activité de la catalase diminue chez les traités (15 mg/kg)à PN 15 [F (2, 12) = 9.605 ; p < 0, 01] à PN 21 [F (2, 12) = 5.63 ; p = 0, 006] par rapport aux témoins .

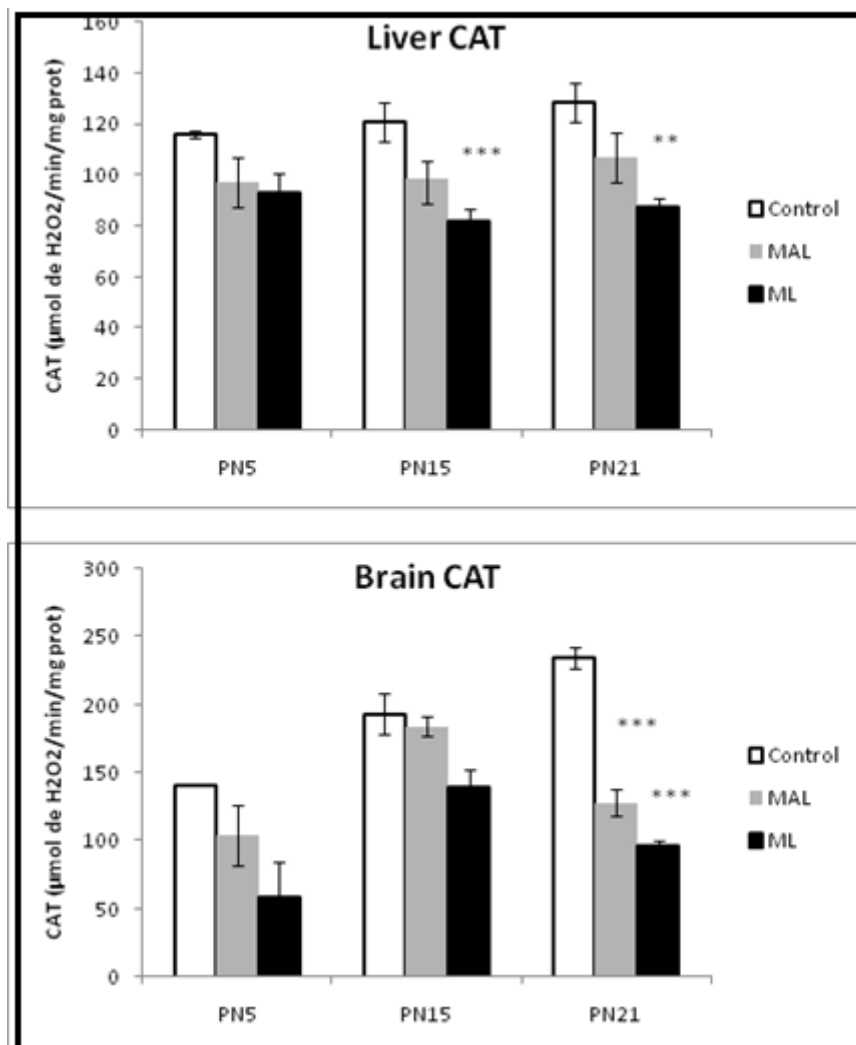


FIGURE 3.16 – Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle du Malathion (5 mg / kg : MAL ou 15 mg / kg : ML) Chez des souriceaux pendant la période postnatale (5, 15 et 21 jours postnatales) sur l'activité enzymatique de la CAT . Chaque valeur représente la moyenne $\pm SEM$; *** $p < 0,001$,** $p < 0,01$ et * ou $p < 0,05$ par rapport au groupe témoin (one-way ANOVA)

Activité de la superoxyde dismutase (SOD)

Une diminution significative de l'activité de SOD dans le cerveau de l'ordre de 15 à 65% a été observée dans la période postnatale étudiée pour la dose de 5 mg / kg et dans l'intervalle de 15 à 50% pour le dose élevée de 15 mg / kg (voir figure 3.17).

La signification statistique n'a été observé que pour le PN 21 pour les traités avec la forte dose (15mg/kg) (F (2, 12) = 4,957 ; p = 0,013) et à PN 15 pour la même dose de 15 mg / kg (F (2, 12) = 4,531 ; p = 0,024). Les diminutions observées dans les autres âges postnataux

n'a pas atteint la signification statistique.

Pour le foie nous avons trouvé une diminution significative de l'activité de SOD chez les traités avec la forte dose (15 mg/kg) [$F(2, 12) = 9.091$; $p = 0,002$] et chez les traités avec la faible dose 5 mg/kg [$F(2, 12) = 9.091$; $p = 0,05$] par rapport aux témoins .

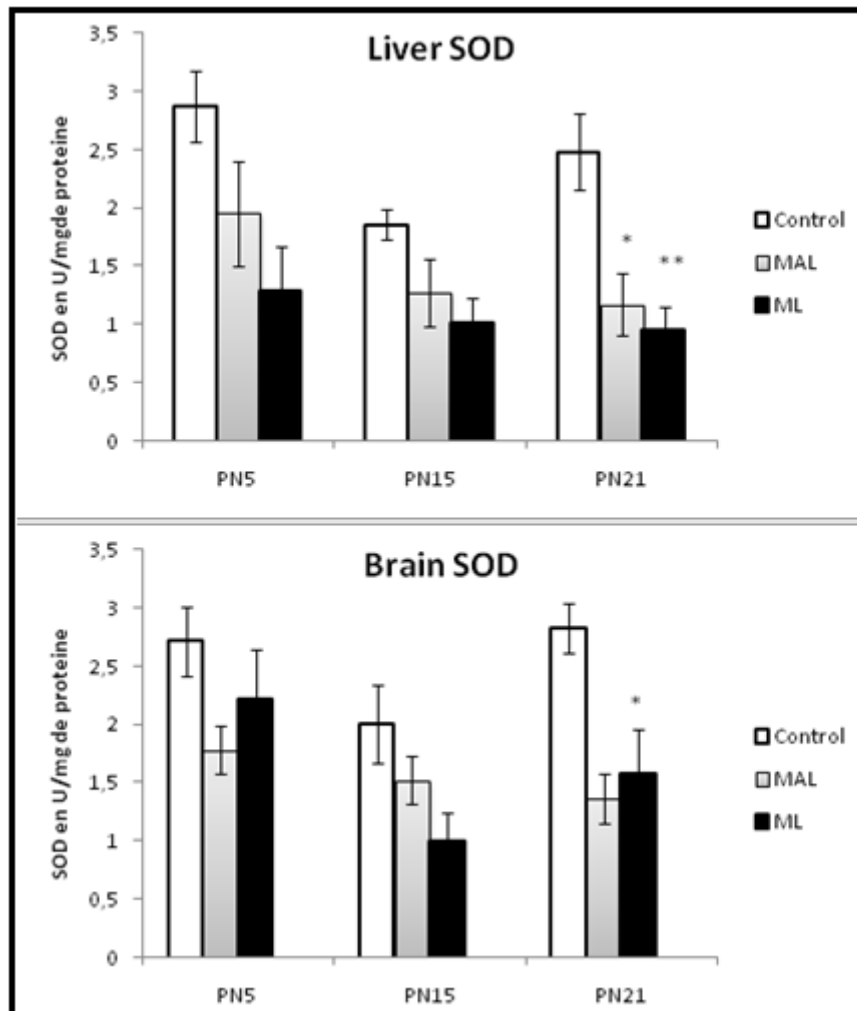


FIGURE 3.17 – Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle du Malathion (5 mg / kg : MAL ou 15 mg / kg : ML) Chez des souriceaux pendant la période postnatale (5, 15 et 21 jours postnatales) sur l'activité de SOD . Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM ; *** $p < 0,001$,** $p < 0,01$ et * ou $p < 0,05$ par rapport au groupe témoin (one-way ANOVA)

Activité de la glutathion peroxydase (GPx)

L'activité de la glutathion peroxydase (GPx) est caractérisée par une double évolution dans les différents âges postnatales analysés.

Ainsi, nous avons constaté une relative stabilité au premier âge postnatal analysé, c'est-à-dire PN 5, alors qu'une diminution importante et significative a été observé à PN 15 avec jusqu'à 50% ($F(2, 12) = 6,466$; $p = 0,007$) pour la dose de 5 mg / kg et plus de 50%, pour la dose de 15 mg / kg ($F(2, 12) = 6,466$; $p = 0,013$) (voir figure 3.18).

Nous avons aussi constaté une diminution significative de l'activité de la glutathion peroxydase au niveau de foie chez les traités avec la forte dose (15mg/kg) [$F(2, 12) = 12,148$; $p < 0,001$] et aussi chez les traités avec la faible dose 5mg/kg [$F(2, 12) = 31,98$; $p = 0,006$] par rapport aux témoins à PN 21.

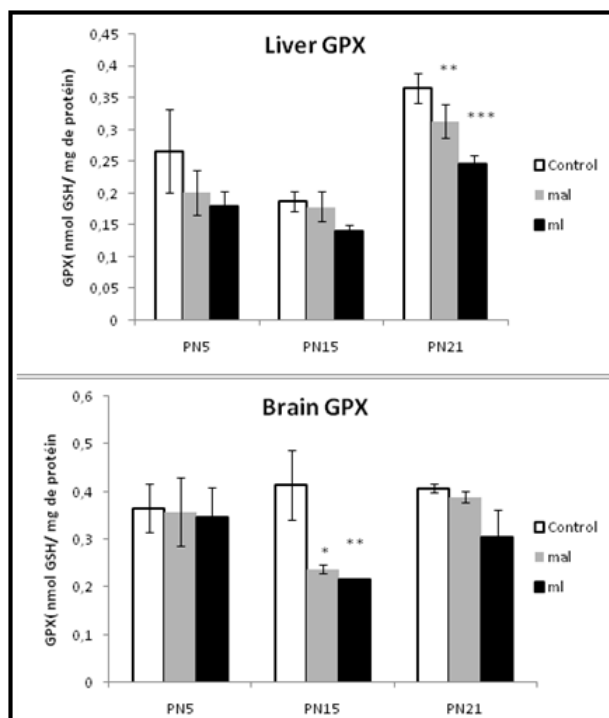


FIGURE 3.18 – Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle du Malathion (5 mg / kg : MAL ou 15 mg / kg : ML) Chez des souris pendant la période postnatale (5, 15 et 21 jours postnatales) sur l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (nmol GSH/protéine). Chaque valeur représente la moyenne $\pm SEM$; $***p < 0,001$, $**p < 0,01$ et $*$ ou $p < 0,05$ par rapport au groupe témoin (one-way ANOVA)

Activité de la glutathion S-transférase (GST)

L'activité de la GST a montré une diminution significative chez les deux traités et aux trois âges postnatales étudiés (voir figure 3.19).

Ainsi, une diminution nette et significative a été observée pour la forte dose 15 mg/kg à PN 5 [F (2, 12) = 10,031 ; p = 0,01] et à PN 15 (F (2, 12) = 10,131 ; p = 0,02) . La plus forte diminution a été observé à PN 21 chez les traités avec la faible dose 5 mg / kg (F (2, 12) = 10,031 ; p = 0,01) et aussi chez les traités avec la forte dose (15 mg/kg) (F (2, 12) = 10,031 ; p < 0,001) (voir figure 3.19).

au niveau de foie nous avons constaté une diminution de l'activité chez les traités 15 mg/kg à PN 15 [F (2, 12) = 8,087 ; p = 0,003] à PN 21 chez les deux traités [F (2, 12) = 18,233 ; p < 0,001] par rapport aux témoins.

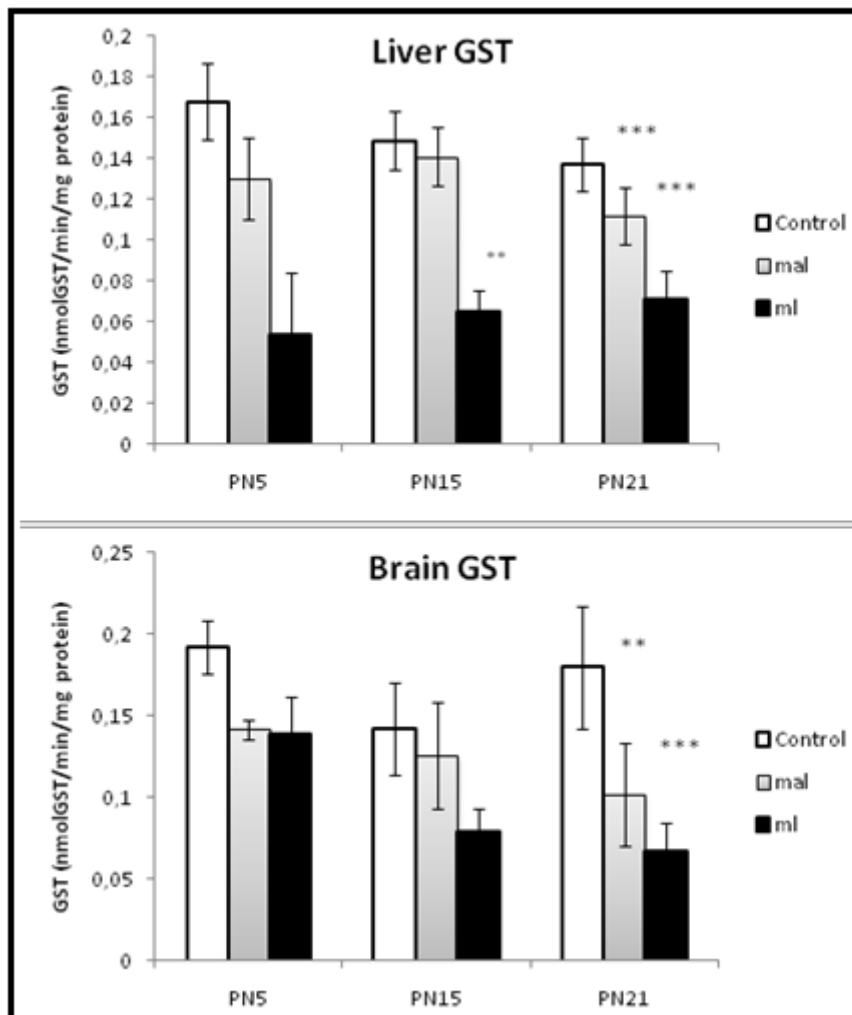


FIGURE 3.19 – Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle du Malathion (5 mg / kg : MAL ou 15 mg / kg : ML) Chez des souriceaux pendant la période postnatale (5, 15 et 21 jours postnatales) sur l'activité de la glutathion S-transférase .Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM ; *** $p < 0,001$,** $p < 0,01$ et * ou $p < 0,05$ par rapport au groupe témoin (one-way ANOVA)

3.7 Effet du traitement sur le développement cognitif et comportemental des souris à l'âge adulte

Test des champs ouverts(Open Field)

La figure (3.20A) montre que le temps passé en périphérie était significativement plus élevé chez les traités avec la forte dose (15 mg/kg) [$F(2, 12) = 11.225$; $p < 0.001$] et chez les traités avec la faible dose 5 mg/kg par rapport aux témoins.

Concernant le nombre de carrés centraux était plus élevé chez témoins que chez les traités (5 mg/kg) [$F(2, 12) = 5.754$; $p = 0.05$] et chez les traités avec la forte dose (15 mg/kg) [$F(2, 12) = 5.754$; $p = 0.006$] par rapport aux témoins (figure 3.20 B).

Le pourcentage de carrés centraux croisés est très faible mais n'est pas significative chez les deux traités par rapport aux témoins (figure 3.20 C).

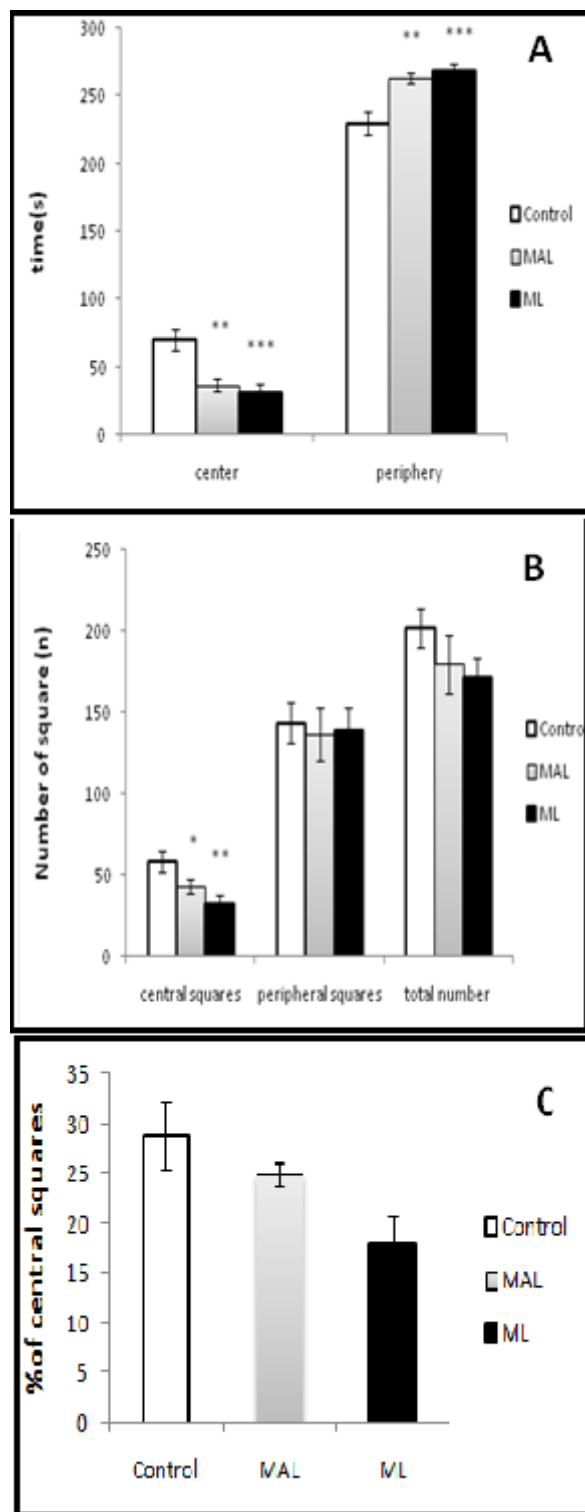


FIGURE 3.20 – Effet de l’administration gestationnelle et lactationnelle du Malathion (5 mg / kg : MAL ou 15 mg / kg : ML) sur le comportement des souris adultes lors d’un test d’Open Field . Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM ; *** $p < 0,001$,** $p < 0,01$ et * ou $p < 0,05$ par rapport au groupe témoin (one-way ANOVA)

Test de Labyrinthe en Y

L'analyse statistique des données a montré une signification dans le pourcentage d'alternance chez les groupes traités avec la faible dose 5 mg/kg [$F(2, 12) = 7.798$; $p = 0.018$] et aussi chez les traités avec la forte dose (15 mg/kg) [$F(2, 12) = 7.798$; $p = 0.001$] par rapport aux témoins (voir figure 3.21).

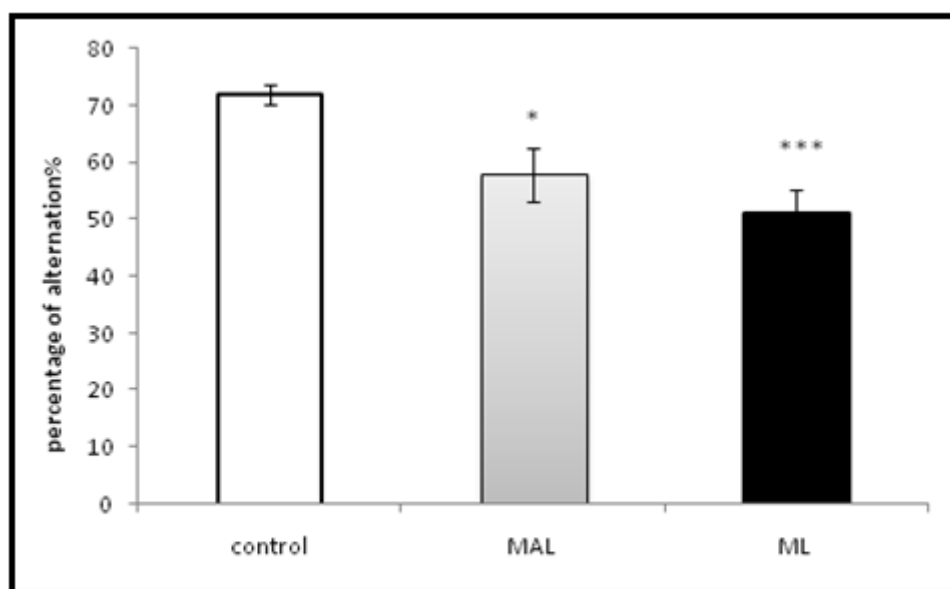


FIGURE 3.21 – Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle du Malathion (5 mg / kg : MAL ou 15 mg / kg : ML) sur le comportement des souris dans le test du labyrinthe en Y. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM; *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ et * ou $p < 0,05$ par rapport au groupe témoin (one-way ANOVA)

Test de reconnaissance d'objet

L'analyse statistique des données a montré un faible indice de reconnaissance chez les groupes traités avec la forte dose (15 mg/kg) [$F(2, 12) = 3.86$; $p = 0.01$] par rapport aux témoins (voir figure 3.22).

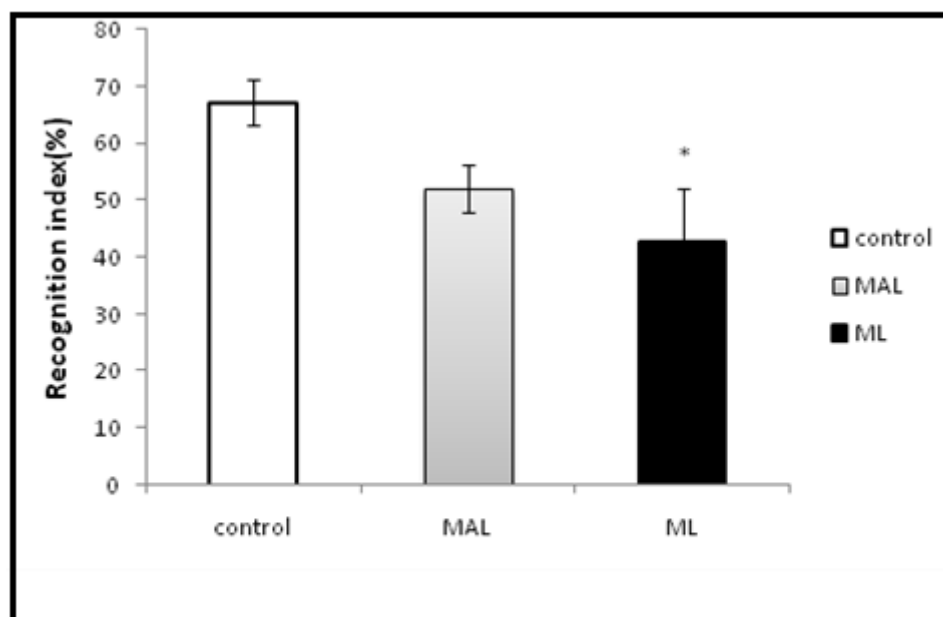


FIGURE 3.22 – Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle du Malathion (5 mg / kg : MAL ou 15 mg / kg : ML) sur le comportement des souris adultes dans le test de reconnaissance des objets. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM ; *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ et * ou $p < 0,05$ par rapport au groupe témoin (one-way ANOVA)

Test du labyrinthe en croix surélevé

L'analyse statistique du test a révélé que le temps passé dans les bras fermés est significativement élevé chez les souris intoxiquées au Malathion avec la faible dose 5 mg/kg [F (2, 12) = 7.275 ; $p = 0.005$] et chez les traités avec la forte dose (15 mg/kg) [F (2, 12) = 7.275 ; $p = 0.008$] par rapport à celui des témoins (voir figure 3.23)

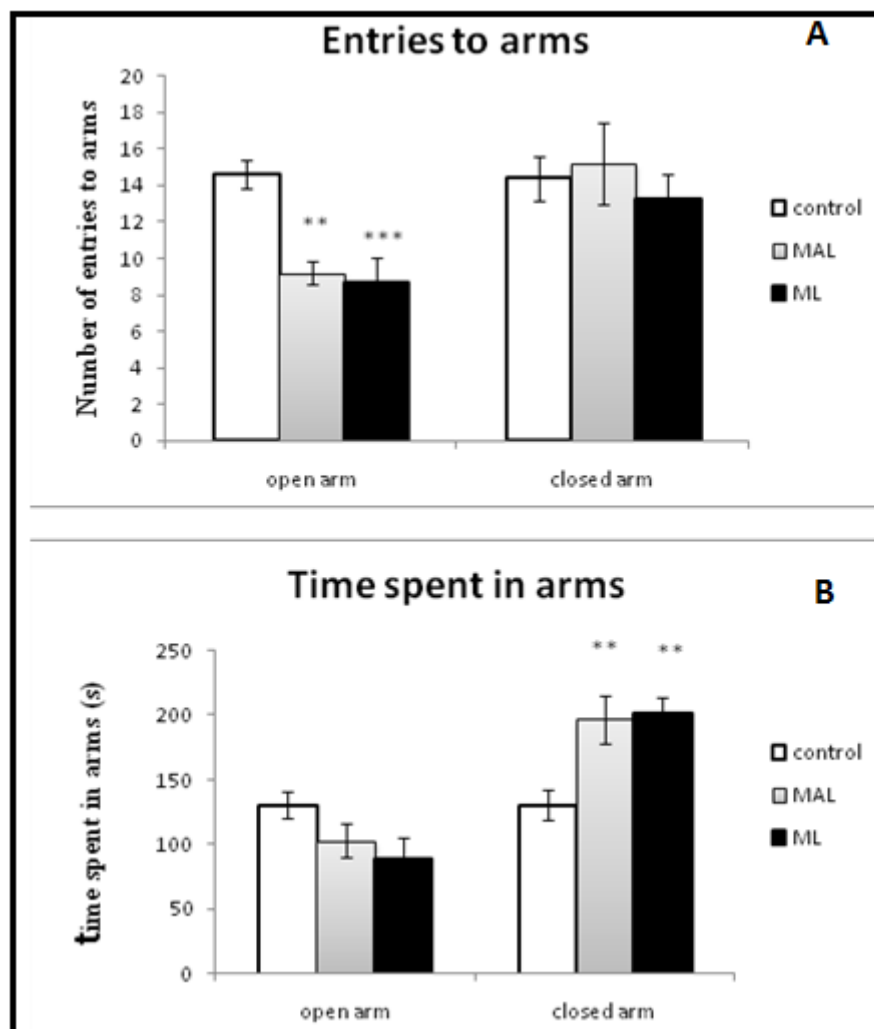


FIGURE 3.23 – Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle du Malathion (5 mg / kg : MAL ou 15 mg / kg : ML) sur le comportement des souris adultes lors d'un test de labyrinthe en croix surélevé. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM ; *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ et * ou $p < 0,05$ par rapport au groupe témoin (one-way ANOVA)

Test de l'interaction sociale

Dans la première session du test les souris témoins passeront plus de temps dans le compartiment avec Stranger 1 comparé au compartiment vide que les traités avec la forte dose (15 mg/kg) [$F(2, 12) = 26.27$; $p < 0.001$] et les traités avec la faible dose 5 mg / kg [$F(2, 12) = 26.27$; $p = 0.006$] (Figure A3.24).

dans la deuxième session les souris traités avec la forte dose (15 mg/kg) [$F(2, 12) = 26.27$; $p = 0.006$] et chez les traités avec la faible dose 5 mg/kg [$F(2, 12) = 15.5111$; $p = 0.007$] ne montrent pas de préférence dans la chambre contenant une souris nouvellement introduite (Stranger 2) par rapport la chambre contenant une souris désormais familière (Stranger 1) en session II (Figure B 3.24).

Le comportement indifférent des souriceaux traités dans ce test indique une diminution de la motivation sociale et de la nouveauté.

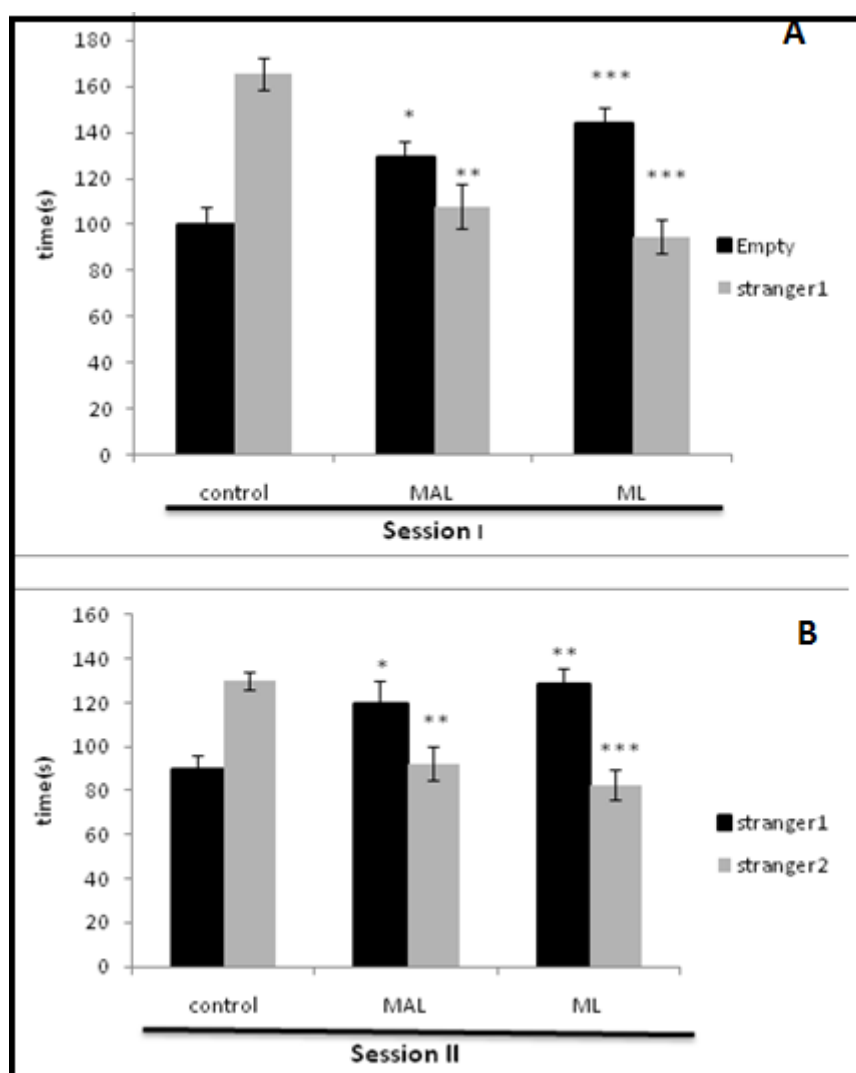


FIGURE 3.24 – Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle du Malathion (5 mg / kg : MAL ou 15 mg / kg : ML) sur le comportement des souris adultes dans le test d'interaction sociale . Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM ; *** p < 0,001,** p < 0,01 et * ou p < 0,05 par rapport au groupe témoin (one-way ANOVA)

3.8 Détermination de la peroxydation lipidique (LPO) par le taux du malondialdéhyde (MDA) chez les adultes

La figure (A 3.25) montre une augmentation du taux de MDA dans les deux structures de cerveau ,dans le Cortex Pré-Frontale chez les deux traités avec la faible dose 5 mg/kg [F (2, 12) =3.959 ; p = 0.033] et chez les traités avec la forte dose (15 mg/kg)[F (2, 12) =3.959 ; p = 0.029] et dans les Bulbes Olfactifs chez les traités de forte dose 15 mg/kg [F (2, 12) =4.24 ; p = 0.01].

Le Malathion a augmenté significativement le taux de MDA dans le foie chez les traités avec la faible dose [F (2, 12) =15.671 ; p = 0.01] et chez les traités avec la forte dose (15 mg/kg) [F (2, 12) =15.671 ; p<0,001] par rapport aux témoins (voir figure B3.25).

Le taux de MDA dans les reins montre aucune différence significative entre les trois groupes (figure C 3.25).

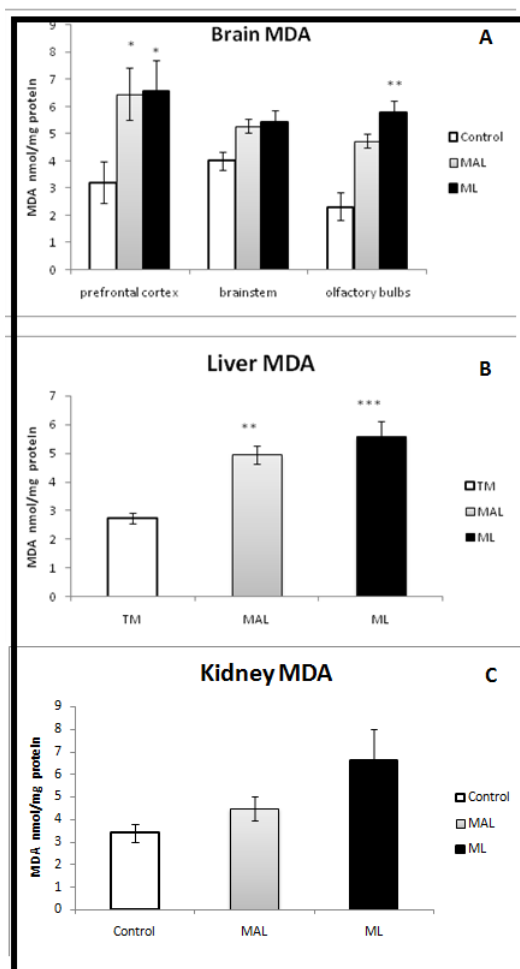


FIGURE 3.25 – Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle de Malathion (5 mg / kg : MAL ou 15 mg / kg : ML) chez des souris adultes au niveau de MDA dans le cerveau, le foie et les reins . Chaque valeur représente la moyenne $\pm SEM$; *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ et * ou $p < 0,05$ par rapport au groupe témoin (one-way ANOVA)

3.9 Dosage de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) chez les adultes

La figure 3.26 montre une réduction de l'activité enzymatique dans les deux structures de cerveau, dans le Cortex Pré-Frontale chez les deux traités avec la forte dose (15 mg/kg)[F (2, 12) = 11.429 ; $p = 0.001$] et chez les traités avec la faible dose 5 mg/kg[F (2, 12) = 11.429 ; $p = 0.002$]. Et dans les bulbes olfactifs pour les deux traités avec la forte dose (15 mg/kg)[F (2, 12) = 9.787 ; $p = 0.002$] et chez les traités avec la faible dose (5 mg/kg) [F (2, 12) = 9.787 ; $p = 0.004$] par rapport aux témoins.

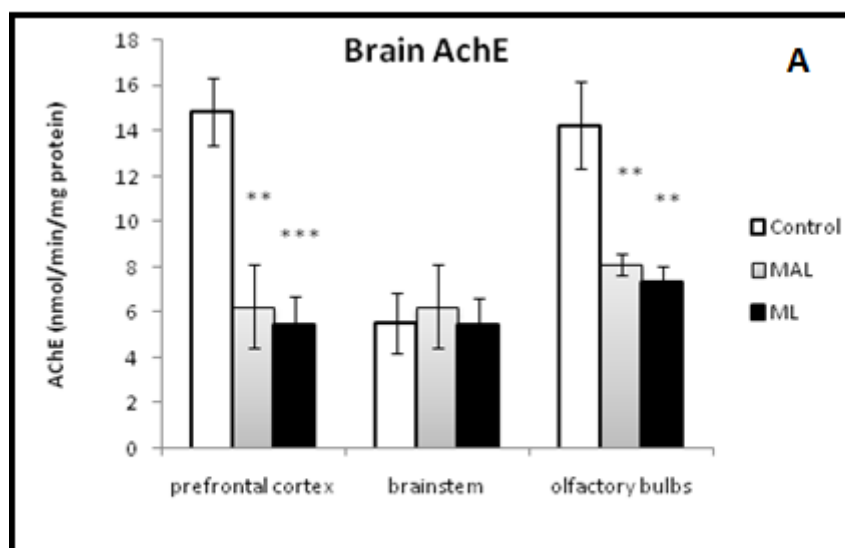


FIGURE 3.26 – Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle du Malathion (5 mg / kg : MAL ou 15 mg / kg : ML) Chez des souris adultes sur l'activité cérébrale de l'AChE . Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM ; ** * $p < 0,001$, * * $p < 0,01$ et * ou $p < 0,05$ par rapport au groupe témoin (one-way ANOVA)

3.10 Détermination de l'activité de quelques enzymes anti-oxydantes au niveau tissulaire chez les adultes

Activité de la catalase (CAT)

La figure A 3.27 montre une différence entre les traités et les témoins dans les deux structures de cerveau ,dans les bulbes olfactifs chez les traités de forte dose 15 mg/kg [F (2, 12) = 4.384 ; p = 0.015] et aussi dans le cortex pré-frontal pour les deux traités (15 mg/kg : [F (2, 12) = 4.716 ; p = 0.01] et 5mg/kg : [F (2, 12) = 4.716 ; p = 0.03] par rapport aux témoins.

concernant le foie la figure B 3.27 montre une diminution significative de l'activité de la catalase chez les traités avec la forte dose (15 mg/kg) [F (2, 12) =4.001 ; p = 0.022] ,et chez les traités avec la faible dose(5 mg/kg) [F (2, 12) =4.001 ; p = 0.048] par rapport aux témoins.

pour les reins la figure C 3.27 montre une une diminution significative de l'activité de la catalase chez les traités avec la forte dose (15 mg/kg)[F (2, 12) = 4.183 ; p = 0.01] par rapport aux témoins.

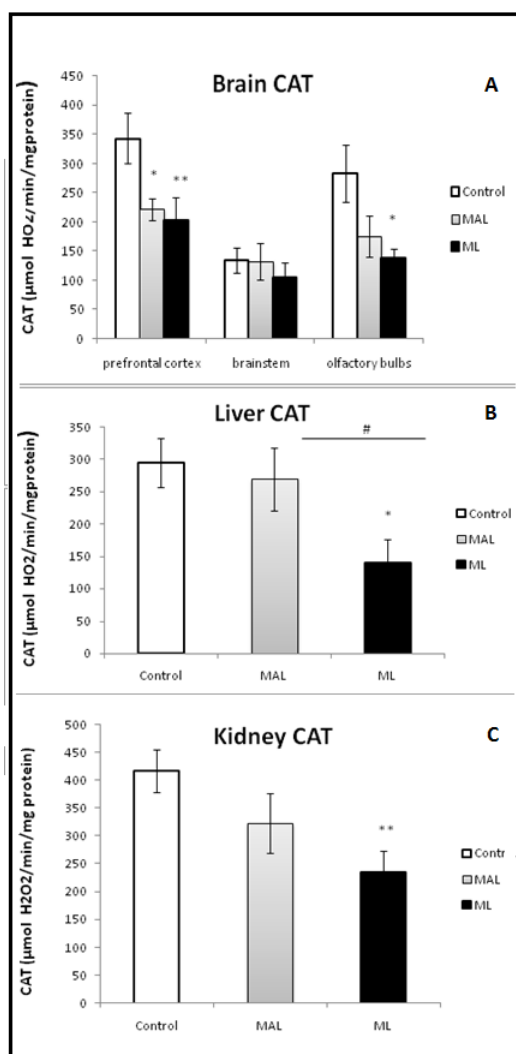


FIGURE 3.27 – Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle de Malathion (5 mg / kg : MAL ou 15 mg / kg : ML) de souris adultes au niveau de la CAT dans les tissus du cerveau, du foie et des reins . Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM ; *** $p < 0,001$,** $p < 0,01$ et * ou $p < 0,05$ par rapport au groupe témoin (one-way ANOVA)

Activité de la superoxyde dismutase (SOD)

la figure A3.28 montre une différence significative de l'activité de SOD entre les traités et les témoins dans les bulbes olfactifs chez les traités de forte dose 15 mg/kg [F (2, 12) = 3.972 ; $p = 0.016$].

la figure B3.28 montre une diminution significative de la concentration de SOD chez les traités avec la forte dose (15 mg/kg) [F (2, 12) = 7.079 ; $p = 0.004$] et aussi chez les traités (5mg/kg) [F (2, 12) =7.079 ; $p = 0.004$] par rapport aux témoins.

pour les reins la figure C3.28 montre une diminution significative de la concentration de SOD chez les traités avec la forte dose (15 mg/kg) [F (2, 12)= 6.479 ; $p = 0.004$] par rapport aux

témoins.

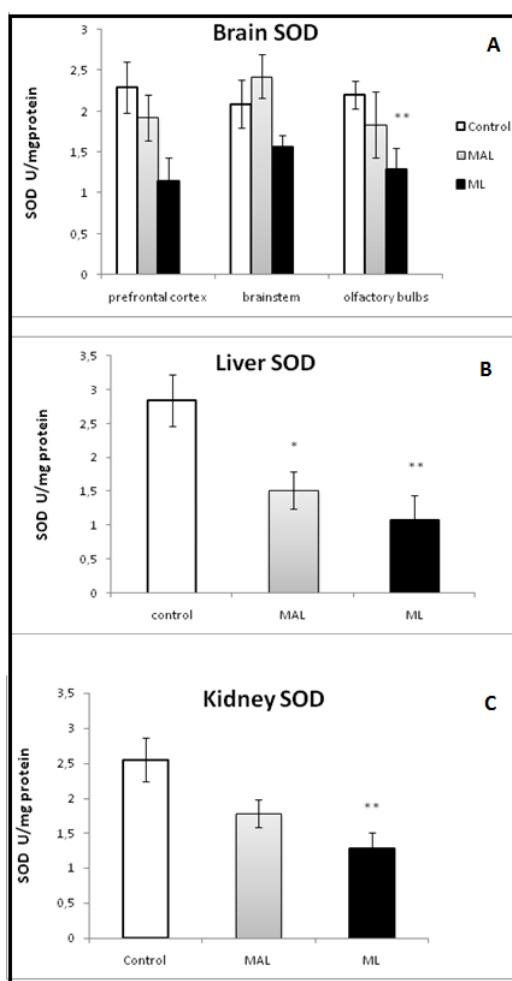


FIGURE 3.28 – Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle du Malathion (5 mg / kg : MAL ou 15 mg / kg : ML) chez des souris adultes au niveau de SOD dans le cerveau, le foie et les reins. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM ; *** $p < 0,001$,** $p < 0,01$ et * ou $p < 0,05$ par rapport au groupe témoin (one-way ANOVA)

Activité de la glutathion peroxydase (GPx)

la figure A3.29 montre une diminution de l'activité de la glutathion peroxydase chez les traités avec la forte dose (15 mg/kg) [F (2, 12)=6.479; $p = 0.004$] par rapport aux témoins dans les deux structures ,dans le Tronc Cérébrale chez les traités avec la forte dose 15 mg/kg [F(2.12)= 5.912; $p = 0.00$] et chez les traités avec la faible dose (5 mg/kg) 5 mg/kg[F(2.12) = 5.912; $p = 0.029$] et dans les Bulbes Olfactifs chez les traités avec la forte dose (15 mg/kg) [F(2.12) = 4.85; $p = 0.009$] par rapport aux témoins .

la figure B 3.29 montre une diminution significative de la concentration de GSH dans le foie chez les traités avec la forte dose (15 mg/kg) [F(2.12) = 15.485; $p = 0.001$] et aussi chez les traités (5 mg/kg) [F(2.12) = 15.485; $p = 0.004$] par rapport aux témoins.

la figure C3.29 montre aucune différence significative de la concentration de GSH dans les reins entre les trois groupes.

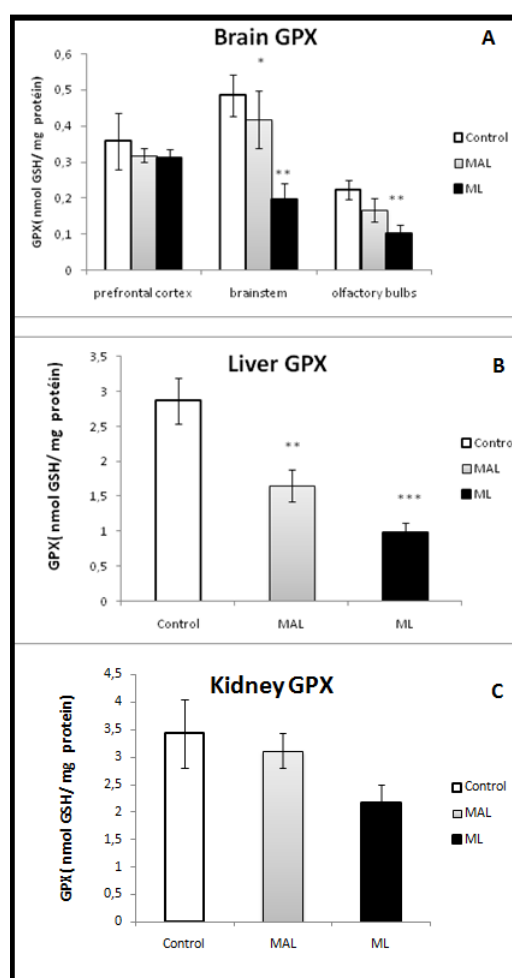


FIGURE 3.29 – Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle de Malathion (5 mg / kg : MAL ou 15 mg / kg : ML) de souris adultes au niveau GPX dans les tissus du cerveau, du foie et des reins . Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM ; *** p < 0,001,** p < 0,01 et * ou p < 0,05 par rapport au groupe témoin (one-way ANOVA)

Activité de la glutathion S-transférase (GST)

la figure A3.30 montre une différence significative de l'activité de la glutathion S-transférase entre les traités et les témoins dans les deux structures de cerveau ,dans le cortex pré-frontal chez les traités avec la forte dose (15 mg/kg)[$F(2,12) = 6.950$; $p = 0.004$ et chez les traités avec la faible dose (5mg/kg)[$F(2,12) = 6.950$; $p = 0.024$] et dans les Bulbes Olfactifs chez les traités avec la forte dose [$F(2,12) = 4.784$; $p = 0.01$ et chez les traités avec la faible dose (5mg/kg)n[$F(2,12) = 4.784$; $p = 0.042$]par rapport aux témoins.

la figure B3.30 montre une diminution significative de l'activité de la glutathion S-transférase dans le foie chez les traités avec la forte dose (15 mg/kg) [$F(2,12)=9.76$; $p = 0.001$] et aussi

chez les traités avec la faible dose 5 mg/kg [$F(2,12) = 9.76$; $p = 0.015$] par rapport aux témoins.

la figure C3.30 montre une diminution significative de l'activité de la glutathion S-transférase dans les reins chez les traités 15 mg/kg [$F(2,12) = 5.852$; $p = 0.006$] et aussi chez les traités 5 mg/kg [$F(2,12) = 5.852$; $p = 0.03$].

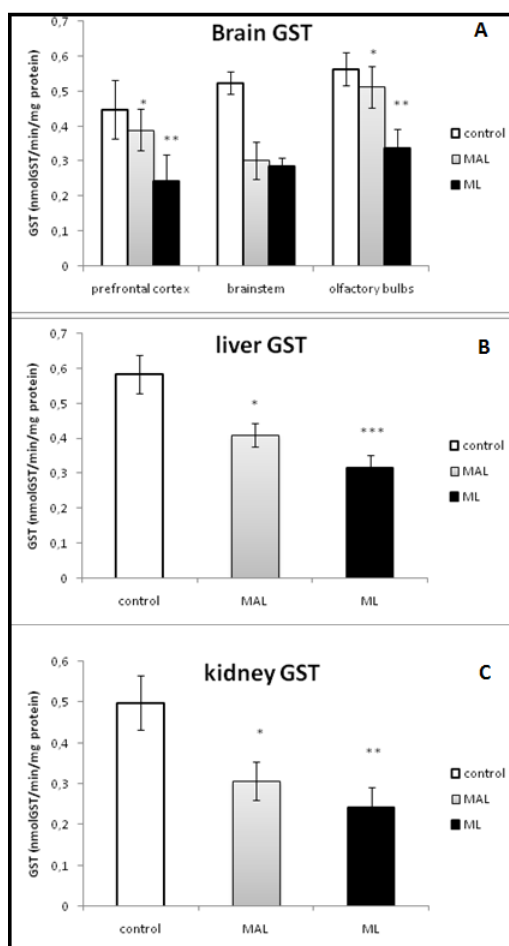


FIGURE 3.30 – Effet de l'administration gestationnelle et lactationnelle du Malathion (5 mg / kg : MAL ou 15 mg / kg : ML) chez des souris adultes au niveau de la GST dans le cerveau, le foie et les reins . Chaque valeur représente la moyenne $\pm SEM$; *** $p < 0,001$,** $p < 0,01$ et * ou $p < 0,05$ par rapport au groupe témoin (one-way ANOVA)

3.11 Histologie des organes étudiés

Le foie

Le foie des souris témoins a présenté une configuration régulière et compacte avec une cellule hépatique et une veine centrale bien organisées (Fig.A3.31).

Le foie des souris traitées au Malathion 5 mg/kg a montré une altération histopathologique

différente, y compris nécrose hépatique (Fig B 3.31) .

Chez les traités avec la forte dose(15 mg/kg) les coupes ont montré des dommages graves dans le tissu hépatique, y compris Nécrose en carte géographique(fig. C3.31), Nécrose en corps étranger (fig. D3.31), Nécrose du foie (Fig. E3.31).

Les reins

Chez les témoins les différentes coupes montrent qu'il y a une configuration régulière des reins avec des capillaires, des tubules, des glomérules et Bowman capsule (fig A 3.32).

Par contre chez traités avec la faible dose 5 mg/kg les coupes ont montré une dégénérescence de glomérules y compris une atrophie glomérulaire(fig B3.32), une fibrose glomérulaire(fig C3.32), une atrophie des tubes rénaux(fig D3.32), une glomérulonéphrite (fig E 3.32) .

Chez les traités avec la forte dose (15 mg/kg) les coupes ont montré des dommages graves dans les tissus rénales, y compris une inflammation du rein(fig F3.32), une inflammation : glomerulite et glomérulonéphrite (fig G 3.32) ,une atrophie glomérulaire (fig H 3.32).

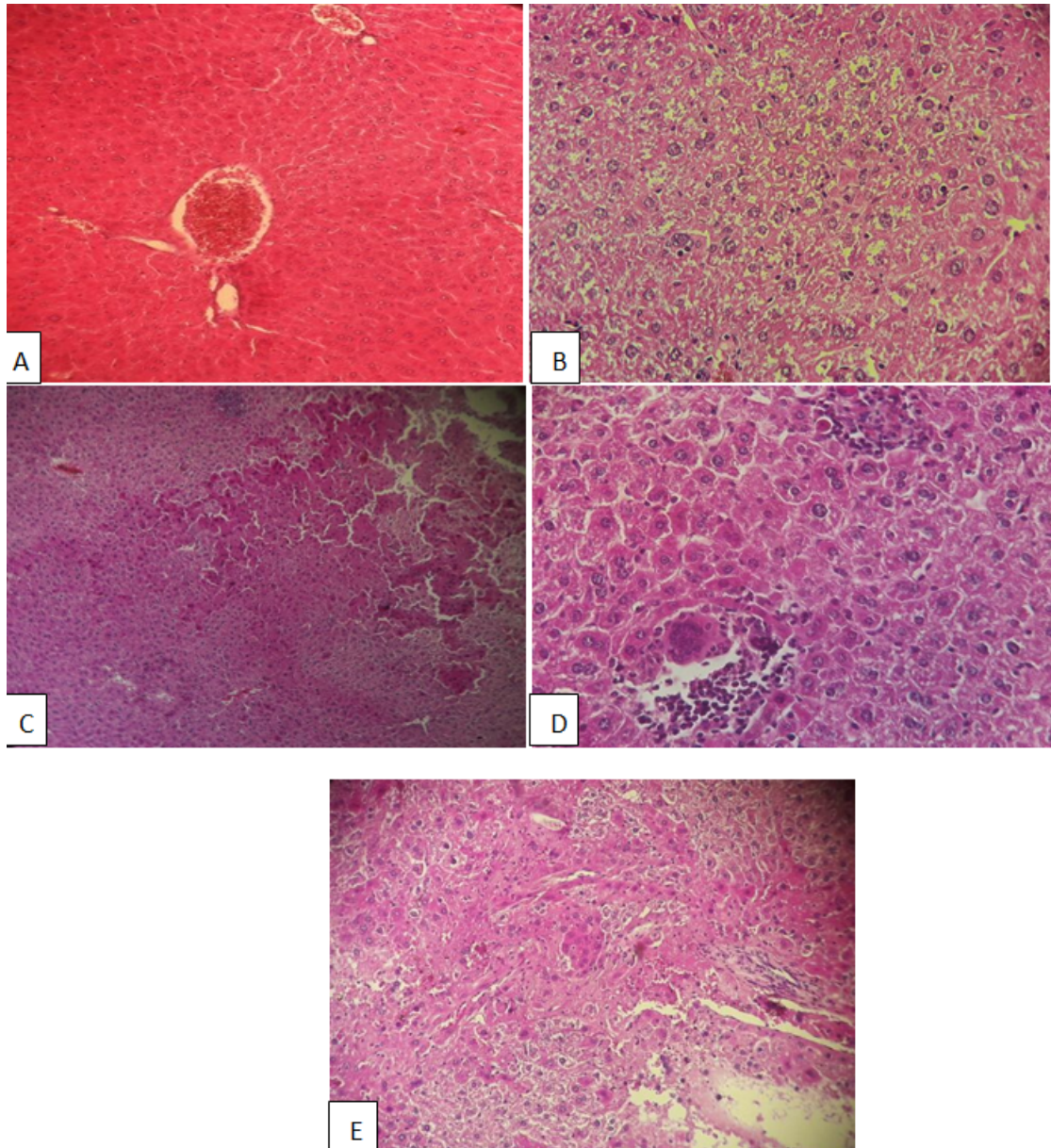


FIGURE 3.31 – Coupes histologiques du foie montrant l'effet de l'exposition au Malathion pendant 60 jours chez des souris mâles prépubères. Architecture normale dans le groupe de contrôle (A), Changements histologiques dans le groupe traité (5mg/kg) (B) et le groupe traité (15 mg/kg) (C,D et E).(HEX150)

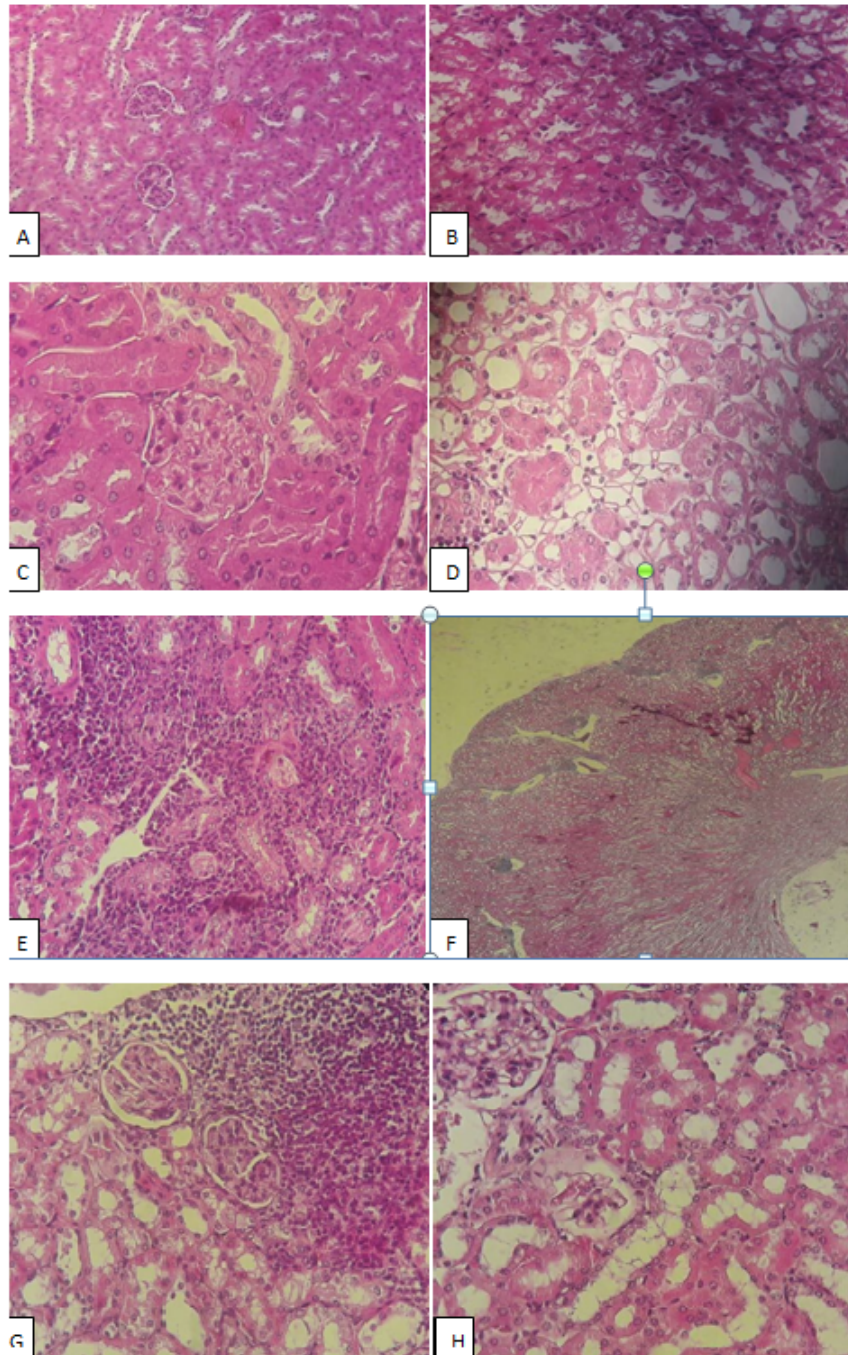


FIGURE 3.32 – Coupes histologiques des reins montrant l'effet de l'exposition au Malathion (15 et 5 mg/ kg) pendant 60 jours chez des souris mâles. Architecture normale dans le groupe de contrôle (A), Changements histologiques dans le groupe traité MAL 5 mg/kg(B,C,D et E) et le groupe traité 15 mg/kg (F.G,H). (HEX150)

4 Discussion

Dans cette étude nous avons réalisé une exposition indirecte des souris à de faibles doses de Malathion , via une intoxication durant la gestation et durant la période de lactation. En effet les souris sont exposés in utéro, durant la gestation ,sachant que le rôle de la barrière placentaire est insuffisant pour empêcher l'entrée des substances chimiques dans les corps et le cerveau (ANDERSEN, 2003). les xénobiotiques en général et le Malathion en particulier possèdent la capacité à traverser le placenta et le sang du cordon ombilical.

De ce fait ils peuvent avoir un effet neurotoxique surtout pendant les premiers stades du développement. Le SNC en développement est particulièrement sensible aux substances neurotoxiques que lorsqu'il atteint sa maturité (ENGEL, 2000).

La barrière hémato-encéphalique (B H E) n'achevie sa fonction que tardivement et la BHE fœtale se développe au cours de la période de gestation et atteint sa maturation complète a l'age postnatale (RODDIER, 1995).

Au cours des périodes pré et postnatale avec une BHE incomplète, certains agents toxique peuvent atteindre le cerveau en développement ,surtout que le SNC en développement est plus vulnérable à de nombreux agents chimiques que le SN adulte (TILSON et al., 1989).

les études sur les effets développementaux des insecticides OP sur le cerveau et le comportement ont été bien documentées et peu d'études ont été réalisées sur l'effet de malathion administré pendant la gestation et la lactation sur le neurodéveloppement et le comportement au stade adulte. Il nous est paru intéressant d'étudier les effets de l'exposition au Malathion au cours du développement du SNC et au stade adulte lorsque le cerveau aura atteint sa maturation.

4.1 Exposition au malathion et reprotoxicité

Nos résultats ont montré que le fertilité ainsi que la reproduction sont affectées chez les souris sous l'effet de l'exposition continue au malathion pendant la gestation. En outre ce produit administré par voie orale à de faibles dose de 15 mg/kg et de 5 mg/kg pendant toute la période de le gestation entraine une diminution de l'indice de fécondité.

En plus de son effet sur la réduction du nombre de nouveau-nés par portée ainsi qu'une augmentation de la mortalité néonatale de la progéniture a été causée par le malathion pour les deux groupes traités.

Nous avons également enregistré une diminution de l'indice d'allaitement chez les groupes traités. Cependant la durée de gestation et le nombre de portée n'ont été pas influencés par l'exposition des souris mères au malathion. Neanmoins l'exposition au malathion a exercé un effet significatif sur le comportement maternel.

Cette toxicité sur les différents indices de reproduction observée dans le présent travail est en accord avec les résultats publiés de la FAO 2003. En effet une augmentation du nombre d'œuf fécondés non implantées chez la mère a été noté et une réduction du nombre de fœtus viable ont été observés chez la lapine pour une exposition de 50 mg/kg/jour.

Une autre étude chez le rat a montré qu'une exposition à un mélange de pesticides de la famille des organophosphorés a engendré une diminution des taux de gestation et de naissances vivants (YU et al., 2013). Il est largement admis chez l'homme, comme chez l'animal que l'exposition aux xénobiotiques tel que les pesticides agissent de façon néfaste non seulement sur le déroulement normal de la gestation, mais aussi sur le nouveau né lui même. Des études épidémiologiques ont montré qu'une exposition précoce aux pesticides contenus dans l'atmosphère ou dans les aliments a des effets nocifs sur la grossesse, provoquant des accouchements prématurés et des malformations congénitales, ainsi qu'une diminution de poids corporel et de la taille des nouveau nés (MEULENBERG, 2002).

D'autre part, des études réalisées sur l'animal corroborent le fait qu'une exposition prénatale aux pesticides induit des effets négatifs sur la croissance et la survie fœtale. De nombreux pays s'inquiètent de plus en plus des effets néfastes des pesticides sur la reproduction humaine, allant de la stérilité féminine et masculine à l'avortement, la mortalité et les malformation congénitales (MEULENBERG, 2002).

Il est intéressant de noter que les effets toxiques induits par le malathion ont permis de le caractériser en tant que perturbateur endocrinien potentiel. En effet, des études réalisées sur le serum humain, ont montré que le malathion a une affinité pour le SHBP(Sex Humain Binding Protein) et pourrait avoir une activité œstrogénique (MEULENBERG, 2002).

4.2 Effet de malathion sur Le comportement maternel

Le comportement maternel est un comportement social. Il est défini comme l'ensemble des interactions (stimuli auditifs, olfactifs, . . . etc.) qui peuvent avoir lieu entre la mère et le nouveau né. Il est vital pour ce dernier car la mère est l'unique source de l'alimentation. Le comportement maternel se manifeste par plusieurs activités de la mère par rapport à l'allaitement, à sa façon de transporter, de nourrir et aux soins donnés à sa progéniture (FLEMING, O'DAY et KRAEMER, 1999).

Une perturbation des stimuli émis par le nouveau-né vers la mère peut entraîner une altération au niveau du système neuroendocrinien des nouveau-nés et par conséquent une modification dans le comportement exprimé à l'âge adulte (FRANCIS et al., 1999).

Ce chapitre rapporte plusieurs effets du malathion lors d'une exposition chronique à faibles doses chez la souris femelle. Les résultats obtenus montrent que les femelles traitées par la forte dose de 15 mg/kg/j montrent une diminution de l'allaitement actif et de récupération des souriceaux. Les comportements non maternels tels que la consommation d'eau, le sommeil, l'auto toilettage, le redressement et le reniflement ont été également affectés. Concernant la faible dose de 5 mg/kg nous n'avons constaté aucun changement concernant les activités maternelles. Pour les activités non maternelles seuls la consommation d'eau et le reniflement ont montré une différence par rapport au groupes témoins.

À notre connaissance, aucune étude n'a montré les effets du traitement sur le comportement maternel. Donc, nous pouvons comparer nos résultats uniquement aux effets d'un autre perturbateur telle que le BPA. Ainsi, il a été démontré que l'exposition précoce (in utero) ou continue au BPA à des faibles doses [2 mg-20 g/kg PC/j] provoque des effets sur le comportement maternel (SETA et al., 2005), (PALANZA et al., 2008).

Plus précisément, le BPA a diminué l'inter-contact mère-petit et le nombre de souriceaux récupérés et a augmenté la latence de récupération. Le temps de la construction du nid et l'indice de l'allaitement ont également été diminués dans leurs études, ces effets peuvent provenir d'une action des perturbateurs endocriniens au niveau central, en particulier sur l'hypothalamus, une aire cérébrale très importante dans la régulation du comportement maternel (SHEEHAN et NUMAN, 2002).

4.3 Effet de malathion sur les paramètres de la croissance globale

Les résultats de l'évaluation des paramètres pondéraux suggèrent que l'administration de malathion provoque une diminution significative de la croissance corporelle des différents groupes . Cette diminution peut être traduite par la perturbation du métabolisme cellulaire sous l'effet du stress oxydatif engendré par les ROS, ceci a été mise en évidence dans cette étude, ainsi que par d'autres médiateurs chimiques comme les cytokines pro-inflammatoires que l'organisme puisse libérer après les effets toxiques des pesticides (CAROLE et HARVÉ, 2011) (VIVIANA et al., 2015) .

Des résultats similaires ont été obtenus dans l'étude de la perméthrine chez des rats (9,8 et 19,6 mg / kg / jour pendant 4 semaines) , qui ont constaté une diminution significative de la taille et du poids des souriceaux traités par rapport aux témoins (Farang et al, 2007).

Cette diminution du poids et de la taille des souris traitées peut être due à l'effet du malathion sur le tissu mammaire des souris en lactation, ce qui peut affecter la capacité de la glande mammaire à sécréter les hormones inductrices susceptibles de réduire la quantité de lait ayant atteint sa progéniture. et peut affecter la composition du lait (protéines, glucides, lipides et unités énergétiques)(DULAWA SC, 2004.

Dans notre travail, le déficit pondéral des souriceaux issus des femelles traitées au malathion est souvent associé à un retard de la durée de l'éruption des incisives et de l'ouverture des yeux. Ceci a été rapporté dans divers travaux qui signalent tous un retard dans la durée d'ouverture des yeux, l'éruption des incisives et le détachement des oreilles . Les résultats observés en accord aussi avec les résultats trouvés par Lazarini et al (LAZARINI et al., 2001). Ces résultats peuvent également rentrer dans un cadre de toxicité générale, parce que nous avons montré que pour d'autres toxiques comme le mercure, une diminution du poids corporel liées à un retard de maturation ont été observés même a des doses faibles (MALQUI et al., 2018).

En outre, il a été démontré que le malathion est capable de traverser la barrière placentaire, ce qui pourrait vraisemblablement altérer le processus développemental du fœtus (MOSER, 2007).

4.4 Effet de malathion sur le développement sensori-moteur

les résultats de cette étude ont souligné la présence d'un retard global dans les réflexes innés comme conséquence de l'exposition pré ou néonatale au malathion . En effet nous avons enregistré un retard prononcé dans le réflexe de redressement ,la géotaxie négative, l'évitement de la chute chez la progéniture issue des femelles traitées pendant la période de la gestation et de l'allaitement.

Le retard dans l'accomplissement du réflexe de la géotaxie négative serait lié à la position anormale de la tête et du corps qui sont sous contrôle des systèmes vestibulaires et posturaux (ADAMS, 1985). Ce réflexe nécessite une séquence d'événements organisés qui ne se produit que si le système a atteint une certaine maturité (RICHENDRFER et CRETON, 2017).

De même un déficit dans le réflexe de redressement a été observé chez les souris traitées au dose 5mg et 15 mg/kg , le réflexe qui évalue les aspects liés aux fonctions vestibulaires et/ou proprioceptives (SCHER et al., 2008).

Ce type d'altération a été signalé comme l'un des déficits qui accompagnent un retard de développement de cervelet des souris.

De même, les animaux traités préalablement par le malathion laissent apparaître un retard très important dans l'analyse du danger au cours du test d'évitement. Ce type d'altération a été signalé comme l'un des déficits qui accompagnent un retard de développement du cervelet des souris (ARUGA et al., 1998).

De même, les animaux traités préalablement par le malathion laissent apparaître un retard très important dans l'analyse du danger au cour du test d'évitement. Ce type de retard pourrait être relatif à des perturbation des fonctions neuronales liées à la maturité des fonctions sensorimotrices associés au développement nerveux(santilleret et al ,2010).

Il faut noter que même si les souris issues des mères traitées avaient montré une amélioration de leurs performances motrices dans les derniers jours des tests par rapport aux souris témoins, elle continue à avoir une faible coordination motrice par rapport au témoins . l'amélioration relativement faible dans la performances des animaux entre le premier et le dernier jour de test est suggestive d'une déficience dans les capacités d'apprentissage.

Ces chercheurs ont affirmé que les réflexes néonataux peuvent être considérés comme un indice de maturation cérébrale, des changements dans leur développement et leur expression pourraient représenter un facteur prédictif de plusieurs modification du comportement à l'age adulte. Les résultats actuels sont conformes à d'autres études démontrant que les pesticides OP causent des modifications du comportement et des effets neurotoxiques chez les souris .

En outre Rosenthal et Cameron ont démontré que le malathion provoque des lésions nerveuses permanentes avec un dysfonctionnement musculaire, auditif et vestibulaire, une faiblesse et une fatigue généralisée (ROSENTHAL et CAMERON, 1991).

Dans l'étude de la toxicité du malathion chez les souris (N'GO et al., 2013), il a été montré qu'il existait une corrélation négative entre le test de retournement et l'activité AChE. Ainsi, les animaux qui présentaient la plus forte inhibition de l'activité de l'AChE présentaient la latence la plus élevée dans le test retournement.

Ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle l'activité de l'AChE cérébrale est impliquée dans les troubles du comportement causés par le malathion chez les souris (N'GO et al., 2013).

4.5 Effet du Malathion sur le développement cognitif et comportemental des souris

Plusieurs études ont rapporté que l'implication du système cholinérgique constitue un élément très important dans les connections neuronales impliquées dans les phénomènes d'apprentissage et de mémoire.

En effet, chez les patients atteints de maladies cérébro-vasculaires ou d'alzheimer (Coyle et al., 1983), une diminution de l'activité cérébrale cholinérgique a été enregistrée. Des déficits d'apprentissage et de la mémoire accompagnés d'une altération du système cholinérgique ont été rapportés (N'GO et al., 2013).

Dans la présente étude nous avons montré, une altération de la mémoire et des déficits d'apprentissage chez les souris traitées au malathion, ceci pourrait être expliqué par une altération de l'activité cholinérgique. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé le dosage de l'activité de l'enzyme AChE aux niveaux de différentes structures cérébrales à savoir le cortex pré-frontal, le tronc cérébral et le bulbe olfactif chez les souris adultes traitées (15 mg/kg, 5 mg/kg) et chez les témoins. Une diminution significative de l'activité de l'AChE a été observée au niveau du cortex pré-frontal et des bulbes olfactifs. Ces résultats sont en accord avec une étude menée chez le rat montrant une diminution au niveau du cervelet et de l'hippocampe (N'GO et al., 2013).

4.6 effet de malathion sur l'anxiété :

Dans la littérature il existe une rareté d'étude rapportant les effets développementaux du Malathion par voie orale, sur le niveau de l'anxiété comme l'a si bien démontré notre étude.

En revanche, une étude antérieure a mis en exergue l'effet anxiogène de Malathion chez des rats femelles exposés de façon aiguë (100mg/kg) et de façon répétée (25mg/kg)(ASSINI et TAKAHASHI, 2005). Tandis que l'exposition par voie intrapéritonéale à des doses sub-aigües de 25à150mg/kg chez les rats, n'induit aucune modification de leur niveau d'anxiété après évaluation dans le labyrinthe en crois surélevé (VALVASSORI et QUEVEDO, 2007). Comme évoqué dans la section précédente, l'exposition développementale au malathion par voie orale à des doses très faibles de 5mg/kg et de 15mg/kg augmente davantage le niveau d'anxiété chez les souris traités par rapport aux témoins. Ces études confrontés à la notre, renforcent quelque part l'hypothèse selon laquelle le malathion induirait une anxiété adulte lorsque l'exposition orale intervient à une période sensible de développement. D'autre part nos résultats concordent avec autre étude antérieure rapporte une augmentation du niveau d'anxiété chez des souris femelles adulte exposé oralement à une dose subtoxique de chlorpyrifos (1mg/kg) durant une grande période périnatale (GD15-PND14).(BARQUENIER, 2009) . Nos résultats ont révélé que l'exposition développementale diminue significativement l'activité de l'AchE au niveau de différentes régions cérébrales notamment dans le Cortex Préfrontal et dans les bulbes olfactifs pour les deux groupes traités (15mg/kg et 5mg/kg). Toutefois les auteurs évoquent l'inhibition de l'AchE induit par les OP incluant le malathion est de type irréversible, ce qui a pour conséquence l'altération des synapses cholinergiques (pendant une grande période périnatale (GD15-PND14).(COSTA L G et P., 2004), Or il a été démontré que le système cholinergique joue un rôle dans le contrôle du niveau d'anxiété (FILE et ANDREWS, 1998).

4.7 Effet de malathion sur l'activité locomotrice :

Nos résultats montrent que l'administration chronique du malathion aux doses très basses de 5 et 15 mg/kg provoque une hypoactivité chez les souris traités, cette diminution de l'activité prouvée par une diminution du nombre de carreaux totaux traversés dans l'OF par rapport a leur témoins. En effet, il a été démontré que la réduction du nombre des carreaux totaux qui est un paramètre neurocomportemental corrèle positivement avec l'augmentation de la réponse émotionnelle ou l'altération de l'activité motrice (PRUT et BELZUNG, 2003). Une autre étude a rapporté également que des rats exposés prénatalement au CPF (1 à 5 mg/kg)présentaient une réduction de l'activité locomotrices spontanée, alors qu'elle n'est pas perturbée chez les rats dans les cas d'une exposition en fin de gestation (Icenegole et al ;2004), Par ailleurs aucune altération de l'activité locomotrice n'a été détectée chez des rats jeunes

(PND12 PND14) exposés dès ce stade à de fortes doses de Malathion (100 et 200 mg/kg) durant 4 jours consécutives au cours de cette période post -naissance (ACKER et C.W, 2011). Ces différents résultats montrent que plusieurs facteurs seraient impliqués dans l'altération de l'activité motrice par le malathion, la période de traitement, la dose et le mode d'exposition. Notons que la plupart des effets développementaux des OP potentiellement toxique (CPF, Parathion...) sur l'activité locomotrice surviennent suite à des périodes d'exposition de type court 4 jours (Riccerie et al, 2006), De plus les voies d'exposition dans la plupart de ces études de types injection sous-cutanée, alors que nous avons utilisés dans notre expérience la voie orale et l'exposition de type long, ce qui a permis d'obtenir des résultats semblables aux autres OP très toxiques retrouvés dans la littératures . Nos résultats ont révélé que l'exposition développementale inhibe l'activité de l'AchE au niveau de différentes régions cérébrales notamment dans le Cortex Préfrontal et dans les bulbes olfactifs pour les deux groupes traités (15 mg/kg et 5 mg/kg). Plusieurs travaux antérieurs ont montré que l'exposition aux doses subtoxiques d'OP inhibant l'AchE pourrait altérer également le système dopaminergique qui est un régulateur de l'activité locomotrice (ALDRIDGE et SLOTKIN, 2005).

4.8 Effet de malathion sur la mémoire :

les tests comportementaux sont utilisés à fin d'évaluer la capacité de reconnaître un stimulus qu'a été présenté auparavant, ils forment des modèles d'amnésie chez l'homme et chez l'animal (Baxler, 2010). Parmi les tests utilisés dans cette étude, nous citons le test de reconnaissance du nouvel objet (NOR) chez les rongeurs (ENNACEUR, 2010).

Au cours de ce test, les animaux explorent le nouvel objet comme étant leur tendance naturelle à la nouveauté ce qui donne aussi la possibilité d'évaluer l'indice de reconnaissance du stimulus (Baxler, 2010). La préférence pour un nouvel objet signifie que la présentation de l'objet familier existe dans la mémoire des animaux (ENNACEUR, 2010).

L'analyse des résultats montre que l'exposition au malathion a engendré un comportement caractérisé par une réduction dans l'exploration du nouvel objet par rapport à l'objet familier .

Nos résultats pourraient être expliqués par un dysfonctionnement du traitement et du stockage de l'information perçue . D'un autre côté, nos résultats ont également montré que le malathion a affecté la mémoire du travail en affectant le comportement de l'alternance spontanée des souris évaluées par le test de "Y-Maze" . Ce dernier est largement utilisé pour évaluer

la mémoire du travail basé sur la tendance naturelle des rongeurs à exercer une alternance spontanée dans les trois bras de labyrinthe avec 60 à 70% de succès (BELZUNG, 1993).

Nos résultats montrent que le pourcentage d'alternance et le nombre d'entrées dans les trois bras sont réduits chez les traités. On peut déduire que le malathion a altéré l'activité locomotrice et la mémoire de travail, ce qui est en accord avec d'autres études qui ont affirmé également par administration intrapéritonéale à des organophosphorés, une diminution de l'alternance spontanée chez le rat (N'GO et al., 2013).

Ceci est autant plus intéressant car ceci corrobore bien que l'hypothèse cholinergique, en effet de l'activité de l'AChE est altérée chez les traités.

Il est donc logique de penser que l'inhibition de l'AChE doit participer aux mécanismes qui provoquent ces modifications persistantes de la mémoire spatiale chez les souris dans cette expérience. De plus, les résultats de McDonald ont indiqué que l'inhibition prolongée de l'acétylcholinestérase causée par l'exposition répétée aux organophosphorés altère les fonctions de la mémoire spatiale (MCDONALD, 1998).

4.9 Effets de malathion sur le statut redox

La peroxydation lipidique (LPO) est l'une des manifestations principales des dommages oxydatifs et s'est avérée jouer un rôle important dans la toxicité et la cancérogénicité de plusieurs xénobiotiques. La LPO est le processus de la dégradation oxydative des acides gras polyinsaturés et son occurrence dans les membranes biologiques causant des changements dans la structure et la fonction membranaires et mènent à la diminution de la fluidité de la membrane et l'inactivation de plusieurs enzymes membranaires (GUTTERIDGE et HALLIWELL, 2000).

Les taux du MDA (comme produit final de LPO) ont été mesurés pour indiquer la génération des ERO et des dommages induits par la LPO tissulaire dans la toxicité des pesticides (CEMEK et al., 2010). Divers pesticides sont capables de générer des ERO (le peroxyde d'hydrogène, le superoxyde et l'hydroxyle) (STEVENSON et al., 1995). Ces oxydants ont été impliqués dans la toxicité des pesticides en raison de leurs effets nocifs sur la santé humaine.

Dans la présente étude, l'exposition des souris au Malathion a eu comme conséquence une augmentation significative de la peroxydation lipidique, indiquée par l'augmentation significative du MDA dans plusieurs organes chez les souriceaux et chez l'adulte ce qui prouve que le malathion a activé la formation des radicaux libres dans les tissus hépatiques, rénaux et cérébraux, suggèrent par conséquent leurs effets délétères dans ces tissus. Ces observations

sont en accord avec l'effet du Diazinon (DZN) dans différents organes et tissus chez les animaux expérimentés (OSMAN et al., 2005).

La LPO a été suggérée en tant qu'un des mécanismes moléculaires impliqués dans la toxicité induite par les pesticide (OZDEN, 2009). En effet, le cerveau est fortement susceptibles aux radicaux libres dus à leur activité métabolique oxydante accrue et leur teneur élevée en acides gras polyinsaturés (AGPI) (EVANS, 1993).

ERAI et SHARMA, 2007 et RAI et al., 2009 ont signalé que le carbofuran (un carbamate insecticide) a causé la génération des ERO et l'augmentation des LPO dans le cerveau de rat. D'un autre côté Gupta, (2009) a proposé que LPO pourrait être l'un des mécanismes de neurotoxicité associée à l'exposition au propoxur (un insecticide) et que le taux élevé du MDA chez les souris indique que ce composé a augmenté la peroxydation lipidique (GUPTA et al., 2009).

Dans notre étude, nous avons noté une diminution du taux de GSH liée à une augmentation de MDA au niveau des organes observée dans cette étude. Qui sont probablement liées à une hémolyse intra vasculaire en raison de la peroxydation lipidique dans érythrocytes circulants, liée avec la diminution de l'activité de GSH dans ces organes (AHMAD et al., 2010). Il a été montré également que l'augmentation de la peroxydation lipidique est une conséquence de l'épuisement des réserves en GSH, qui sont capables de modérer la LPO (GARG et al., 2008). Par conséquent, la réduction du niveau du GSH augmente l'effet toxique, car le GSH joue un rôle important dans la détoxification des xénobiotiques en tant que co-facteur pour la famille des GST et en tant qu'antioxydant important pour l'élimination des ERO (EL-DEMERDASH, 2004).

Il est intéressant de noter qu'une diminution de l'activité de la GST a été observé dans le cerveau, le foie et les reins allant dans le sens d'une déplétion. En effet la famille enzymatique des GST est impliquée dans les processus de la détoxification. Une fonction importante de GST et sa capacité de conjuguer le GSH avec les produits de la peroxydation lipidique (KALI WAL, 2010).

Notre étude a montré une diminution de l'activité de GPx dans les organes, le foie, le rein et le cerveau après exposition au malathion chez les souris adultes. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Messaoudi (MESSAOUDI et al., 2010).

Cette diminution pourrait s'expliquer par l'induction de radicaux libres chez les souris traités par malathion. Par conséquent, la toxicité de nombreux xénobiotiques est associée à la production de radicaux libres qui sont également impliqués dans de nombreux processus physiopathologiques (ABDOLLAHI et al., 2004).

Ces observations suggèrent que La diminution observée de l'activité de la CAT et de la GPx pourrait probablement être due à l'utilisation de ces enzymes dans la conversion du H_2O_2 en H_2O (GARG *Etal.*, 2008).

En outre, la réduction des activités de la CAT, du GPx et de la GST ainsi que l'augmentation de la peroxydation lipidique pourrait s'expliquer par l'induction de radicaux libres chez les souris traités par malathion. Par conséquent, la toxicité de nombreux xénobiotiques est associée à la production de radicaux libres qui sont également impliqués dans de nombreux processus physiopathologiques (ABDOLLAHI et al., 2004).

Ces données peuvent être renforcées par les données histologiques qui ont mis en évidence la présence des lésions .

En effet nos résultats de l'étude histologique ont révélé au niveau du foie des animaux traités au malathion des dommages graves dans le tissu hépatique, y compris une nécrose dans certaines régions du foie.

Des résultats comparables ont été répertoriés par divers auteurs qui ont observé des nécroses focales, ainsi que des gonflements des hépatocytes chez les foies des rats ayant reçu par voie orale, un traitement subaigu et subchronique de 56 et 560 mg/kg pc de glyphosate (CAGLAR et KOLANKAYA, 2008).

Des études faites sur l'insecticide Chlorpyrifos ont montré des résultats similaires aux nôtres. En effet, l'étude effectuée par l'équipe de (HEIKAL et al., 2012) a révélé des Nécroses, des hépatocytes dégénérées chez des rats mâles gavés au Chlorpyrifos avec la dose de 1/10 de la DL50 (13.5 mg/kg pc) pendant 28 jours.

Les résultats obtenus pourraient être dus à l'effet de libération des radicaux libres lors du stress oxydatif.

Notre résultats ont montré une dégénérescence des glomérules chez les traités au malathion résultats en accord avec l'étude de Osman et al qui a montré que la toxicité chronique de Méthidathion a causé des glomérules (Glomerular sclerosis), des tubulaires focales, (Focal tubular necrosis) (Osman et al, 2015).

5 Conclusion

Les résultats issus de cette thèse relatifs à la toxicité du malathion, mettent le point tout d'abord sur le fait, que la majorité des agriculteurs ne mettent pas en œuvre les moyens qui sont à leur disposition pour limiter le risque lié à l'usage des produits phytosanitaires. En effet, la plupart des agriculteurs n'appliquent pas les bons gestes, les bonnes pratiques au cours de l'utilisation de ces produits. En plus ils ne sont pas attentifs au choix du produit et au respect de la dose à appliquer.

Malgré les solutions proposées aux agriculteurs pour limiter le risque lié à l'usage des pesticides, on peut remarquer que certains agriculteurs semblent encore méconnaître l'intérêt de ces mesures et continuent à prendre des risques en ne respectant pas les points clés de la réglementation. Malheureusement toutes ces précautions présentent des failles qui peuvent contaminer l'agriculteur peu à peu durant toute sa vie professionnelle. En effet, ni le local réservé aux pesticides, ni la combinaison à usage unique, ni le filtre des masques ou de la cabine de tracteurs, ni le nettoyage automatique de la cuve en plein champ, ne suffisent à écarter tous les risques (BONNEFOY, 2012).

Des efforts restent à faire pour la prise de conscience de la dangerosité de ces produits. L'une des limites pertinente de notre étude est l'absence d'évaluation toxicologique chez notre population étudiée (voir leur famille notamment leur enfants). Nous nous sommes attachés à décrire les effets neurotoxiques chez les souris, suite à une exposition chronique à de subtoxiques doses au pesticide organophosphoré Malathion durant la phase critique du développement du cerveau, c'est à dire pendant la gestation en opposition à la plupart des études précédents qui décrivent seulement une période limitée d'intoxication qui ne représente pas la réalité. Ce protocole que nous avons utilisé a été axé sur l'administration d'une faible dose de malathion par l'alimentation pendant la période gestationnelle et postnatale. Ce protocole reflète les conditions environnementales et humaines communes. Très peu d'études se sont intéressées par la période de gestation malgré sa grande sensibilité car il représente une période dynamique d'organogenèse et maturation neuronale.

Nos résultats montrent que l'exposition directe étudiée chez l'adulte diffère de l'exposition indirecte chez le jeune du fait du transfert de la contamination par l'organisme maternel.

Lorsque la mère est le vecteur de l'intoxication, le composé est métabolisé par l'organisme maternel avant d'atteindre le jeune par transfert placentaire ou lactationnel.

L'individu au cours de ses stades précoces de développement est considéré comme un organisme plus vulnérable qu'à l'âge adulte du fait de l'immaturité de ses systèmes de protection enzymatique et de ses capacités de métabolisation réduites. De plus, le développement implique une série de choix organisationnels irréversibles une fois ceux-ci déterminés. La plupart des études sur les effets de l'exposition périnatale à des composés chimiques ont montré des perturbations précoces, telles que des atteintes de la reproduction, de l'activité comportementale et du système immunitaire et aucune atteinte à l'âge adulte (CREWS, WILLINGHAM et SKIPPER, 2000, PALANZA et al., 1999).

A l'inverse, l'exposition périnatale au malathion a montré des perturbations transitoires aux cours des stades précoces de développement sur la maturation des systèmes moteurs et sensoriels et des troubles des fonctions cognitive et émotionnelle à l'âge adulte suggèrent d'une part l'existence de mécanismes compensatoires précoces, protégeant l'organisme en développement des expositions environnementales toxiques, et d'autre part une spécificité des effets liée aux transferts placentaire et lactationnel de la molécule (BARTON, 2005).

Sachant que durant la lactation, la quantité et le taux de transfert des composés du sang vers le lait maternel dépendent de nombreux facteurs comme leur solubilité dans les lipides, leur masse molaire et leur fixation (ou non) sur des protéines plasmatiques. Cependant, les mécanismes précis de ce transfert, aussi bien des composés toxiques que des éléments essentiels, sont encore peu connus (OSKARSSON et al., 1998).

Pris dans l'ensemble de nos résultats obtenus que les faibles doses bien que classées comme étant "sûres" ne le sont plus une fois administrées de manière continue (l'effet de bioaccumulation).

Perspectives :

Le présent travail a porté sur les effets chroniques de doses (15 mg/kg, 5 mg/kg) de malathion sur la santé en général et sur le fonctionnement cérébral en particulier. Les données obtenues corroborent certains aspects rapportés sur des études, notamment au stade adulte.

L'aspect novateur, des investigations résident dans la partie toxicologique développementale qui a montré pour la première fois, la présence d'effets délétères à de faibles doses sur le développement. Afin de mieux étudier les mécanismes mis en jour, ce travail devrait être prolongé par :

1-L'étude des facteurs d'inflammation sous tendant l'altération du statut rédox comme les interleukines et cytokines en les dosant au niveau périphérique et au niveau central, voir même étudier leur expression à ces 2 niveaux.

2-L'étude des expressions des marqueurs du stress oxydatif, comme un indice précoce (précédent même les niveaux critiques et tissulaires de ces marqueurs).

3-la mesure des doses résiduelle dans les différentes organes étudiées .

4-L'évaluation du niveau d'exposition à travers le dosage de métabolite des pesticides dans les milieux biologiques (sang, urine) au sein de la population étudiée en particulier celles d'enfants et des femmes enceintes, vivants dans les milieux agricoles à forte usage des pesticides.

5-Compléter les effets neurocomportementaux, cognitifs du Malathion mis en évidence dans notre étude, par des études immunohistochimiques du cerveau notamment dans les structures étudiées.

6-L'étude de l'effet protecteur des antioxydants naturels contre la toxicité induite par le malathion chez les souris ou d'autres modèles expérimentaux.

7- Le développement d'une dose spécifique et plus efficace de ce protecteur, capable d'être utilisé comme antidotes spécifiques contre les différents types d'intoxication par ces pesticides (hépat, neuro. -néphro).

undefined.ΩΩSee the LaTeX manual or LaTeX Companion for explanation.ΩType `-H-|return-|` for immediate

Références bibliographiques

- ABDOLLAHI et al. (2004). « Pesticides and oxidative stress : a review ». In : *CMed. Sci. Monit*, RA141-RA147.
- ACKER C.I., Souza A.C. Pinton-S. da Rocha-J.T. Friggi C.A. Zanella R. et Nogueira C.W (2011). « Repeated Malathion exposure induces behavioral impairment and AChE activity inhibition in brains of rat pups ». In : *Ecotoxicology and Environmental Safety*, p. 2310-2315.
- ADAMS (1985). « Physiological characterization of adaptive clones in evolving populations of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae* ». In : *Genetics*, p. 173-85.
- AHMAD et al. (2010). « Maneb and paraquat-induced modulation of toxicant responsive genes in the rat liver :comparison with polymorphonuclear leukocytes ». In : *Chem. Biol. Interact*, p. 566-579.
- AHOANGNINO, FAYOMI et MARTIN (2011). « Évaluation des risques sanitaires et environnementaux des pratiques phytosanitaires des producteurs maraîchers dans la commune de Tori-Bossito (Sud-Bénin) ». In : *Cahiers Agriculture*, p. 16-22.
- AKBARSHA, LATHA et MURUGAIAN (2000). « Retention of cytoplasmic droplet by rat cauda epididymal spermatozoa after treatment with cytotoxic and xenobiotic agents ». In : *Repro. Fert*, 385–390.
- ALDRIDGE J.E., Meyer A. Seidler-F.J. et T.A SLOTKIN (2005). « Alterations in central nervous system serotonergic and dopaminergic synaptic activity in adulthood after pre- natal or neonatal chlorpyrifos exposure ». In : *Environmental Health Perspectives*, p. 1027-1031.
- AMER et al. (2002). « Cytogenetic studies on the effect of feeding mice with stored wheat grains treated with malathion ». In : *Mut. Res*, p. 513.
- ANDERSEN, NIELSEN et GRANDJEAN (2000). « Toxicologic evidence of developmental neurotoxicity of environmental chemicals ». In : *Toxicology* 144(1-3, p. 121-127.
- ANDERSEN, S.L (2003). « Trajectories of brain development : Point of vulnerability or window of opportunity ». In : *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, p. 3-18.

- ANON (1986). « Studies on resistance of insect and mite pests of agricultural importance to pesticides. Final Technical Report 1978-1983 ». In : *Scand. J. Work Environ. Health*, p. 4-27.
- ANONYME (1989b). « Répertoire des pesticides à usage agricole autorisés au Maroc. Ministère de l'agriculture et de la réforme agraire ». In : *Direction de la protection des végétaux, des contrôles techniques et de la répression des fraudes, Rabat, Maroc*, p. 73.
- ANTONELLA et al. (2002). « Preventing health risks from the use of pesticides in agriculture. Protecting Workers' health series n0 1 ». In : *edited by International Centre for Pesticide Safety, WHO, Geneva*, p. 12-18.
- ARUGA et al. (1998). « Mikoshiba Mouse Zic1 is involved in cerebellar development ». In : *J. Neurosci*, p. 284-293.
- ASPELIN, P. (1998). « Hazards of health care—for patient and community ». In : *Lakartidningen* 95, p. 484-485.
- ASSINI F.L., Zanette K.D. Brocardo-P.S. Pandolfo P.-Rodrigues A.L. et R.N TAKAHASHI (2005). « Behavioral effects and ChE measures after acute and repeated administration of malathion in rats ». In : *Environmental Toxicology and Pharmacology*, p. 443-449.
- BAKOURI, El (2006). « Développement de nouvelles techniques de détermination des pesticides et contribution à la réduction de leur impact sur les oiseaux par utilisation des substances organiques Naturelles ». In : « *Thèse, Université AbdElmalek Saadi, 2006* », p.9,24, 52.
- BALALI-MOOD M., Balali-Mood-K (2008). « Neurotoxic disorders of organophosphorus compounds and their managements ». In : *Arch. Iran. Med* 11, 65–89.
- BARQUENIER, J.B (2009). « thèse de doctorat :Etude de la neurotoxicité développementale d'insecticides organophosphorés :Analyse comportementale de la souris CDI ». In :
- BARTON (2005). « Computational pharmacokinetics during developmental windows of susceptibility ». In : *Journal of Toxicology and Environmental Health*, p. 889-900.
- BEATTIE (1994). « A 13-week toxicity study of aerosolized malathion administered by whole body inhalation exposure to the albino rat ». In : *Unpublished study prepared by Product Safety Assessment, Bio-Research Labs, Ltd.*
- BELHAOUCHET, N (2014). « Evaluation de la toxicité du Spinosad « insecticide nouvellement introduit enAlgérie » sur un modèle expérimental bioindicateur de la

- pollution « *Helix aspersa* » ». In : *These Doctorat LMD. Université Badji Mokhtar-Annaba*, p. 17-82.
- BELL (2001). « A Case-Control Study of Pesticides and Fetal Death Due to Congenital Anomalies ». In : *Epidemiology*, p. 148-156.
- BELZUNG (1993). « Mesuring rodent exploratory behavior : handbool ok molecular genetic technique for brain ». In : *Elseiver*, p. 738-749.
- BETHESDA, MD (1988). « Hazardous Substances Databank. Toxicology Data Network ». In : *U.S. National Library of Medicine*.
- BIGNALL, K E (1974). « Ontogeny of levels of neural organization : the righting reflex as a model ». In : *Exp. Neurol*, 566–573.
- BLANCOU (1995). « Les méthodes de désinfection de l'antiquité à la fin du XVIIIe siècle ». In : *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz*, p. 21-30.
- BONNEFOY (2012). « Pesticides : vers le risque zéro. » In : *Edition Quae*.
- BONNEFOY (2012). « Rapport d'information fait au nom de la mission commune d'information sur les pesticides et leur impact sur la santé et l'environnement ». In :
- BOURBIA, S (2013). « Évaluation de la toxicité de mixtures de pesticides sur un bio-indicateur de la pollution des sols *Helix aspersa* ». In : *These Doctorat. Univ Annaba*, p. 177.
- BRENGUES et COOSEMANS (1997). « Sensibilité et résistance des insectes aux insecticides en Afrique tropicale ». In : *Organisation de Coordination et de Coopération pour la Lutte contre les Grandes Endémies*, p. 1-23.
- BROCARDO et al. (2005). « Antioxidant defenses and lipid peroxidation in the cerebral cortex and hippocampus following acute exposure to malathion and/or zinc chloride ». In : *Toxicology* 207, 283–291.
- BUSTOS-OBREGÓN1999 ; BUSTOS-OBREGÓN Gonzalez-Hormazabal, 2003 Contreras et. In : () .
- CABELLO et al. (2001). « A rat mammary tumor model induced by the organophosphorous pesticides parathion and malathion, possibly through acetylcholinesterase inhibition. Environ. » In : *Health Persp*, 471–479.
- CAGLAR et KOLANKAYA (2008). « The effect of sub-acute and sub-chronic exposure of rats to the Glyphosate-based herbicide Roundup ». In : *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 57–62.

- CAROLA et al. (2002). « Evaluation of the Elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice ». In : *Behav. Brain Res*, p. 49-57.
- CAROLE et HARVÉ (2011). « Désordres métaboliques et réanimation : de la physiopathologie au traitement ». In : *Berlin Heidelberg. New York. ISBN*, 522pp.
- CEMEK et al. (2010). « Protective roles of vitamin E (-tocopherol), selenium and vitamin E plus selenium in organophosphate toxicity in vivo : A comparative study ». In : *Pesticide Biochemistry and Physiology*, p. 113-1187.
- COMMISSION (2009). « Directive 2009/115/CE de la commission du 31 août 2009 modifiant la directive 91/414/CEE du Conseil en vue d'y inscrire la substance active méthomyl ». In : *Journal officiel de l'Union européenne*, p. 228.
- COSTA L G Aschner M, Vitalone A Syversen T et Soldin O P. (2004). « Developmental neuropathology of environmental agents ». In : *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, p. 287-110.
- COSTE (1998). « Conférence sur l'utilisation des intrants en cultures cotonnière et maraîchères, Dakar, Sénégal ». In : *Impact des pesticides sur l'environnement*.
- CREWS, WILLINGHAM et SKIPPER (2000). « Endocrine disruptors : present issues, future directions ». In : *Quarterly Review of Biology*, p. 243-260.
- DALLEGRAVE et al. (2007). « Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats ». In : *Arch. Toxicol* 81, 665-673.
- DALY, I (1996a). « A 24-month oral toxicity/oncogenicity study of malathion in the rat via dietary administration. Final Report, Lab Project Number : 90-3641 : J-11 90-3641 ». In : *Unpublished study prepared by Huntingdon Life Sciences*.
- DALY, I.W. (1993b). « subchronic (3-month) oral toxicity study of malathion in the rat via dietary administration. » In : *Unpublished report from Bio/dynamics Inc., East Millstone, New Jersey, USA. Submitted to WHO by Cheminova, Lemvig, Denmark*.
- DENT, D (2005). « Overview of agrobiologicals and alternatives to synthetic pesticides. In The Pesticide Detox : Towards a More Sustainable Agriculture ». In : *Pretty, J., Ed. ; Earthscan : London, UK*, 70-82.
- DOUMBIA et KWADJO (2009). « Pratiques d'utilisation et de gestion des pesticides par les maraîchers en Côte d'Ivoire : Cas de la ville d'Abidjan et deux de ses banlieues (Dabou et Anyama) ». In : *J. Appl. Biosci*, p. 992-1002,

- DULAWA SC Holick KA, Gundersen B Hen R (2004). « Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression ». In : *Neuro-psycho-pharmacology*, p. 21-30.
- ECOBICHON, D J (1996). « Toxic effects of pesticides. In : Casarett and Doull's Toxicology ». In : *The Basic Science of Poisons (Klaassen CD, Doull J, eds). 5th ed. New York :MacMillan, 643–689.*
- EKSTRÖM G, Ekbohm B (2011). « Pest control in agro-ecosystems : An ecological approach ». In : *Crit. Rev. Plant Sci*, 74–94.
- EL-DEMERDASH (2004). « Antioxidant effect of vitamin E and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rats exposed to aluminium ». In : *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, p. 113-121.
- ENGEL (2000). « Maternal occupation in agriculture and risk of limb defects in Washington State ». In : *Scand J Work Environ Health*, p. 193-19.
- ENNACEUR (2010). « One-trial object recognition in rats and mice : Methodological and theoretical issues ». In :
- EPA, US (2000a). « Malathion : The toxicology chapter for the RED ». In : *Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances.*
- (2000b). « US Environmental Protection Agency, 2000b. Malathion : Human health risk assessment for the reregistration eligibility decision (RED). Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Document ». In : *Chemical No. 057701, Case No. 0248, Barcode D 269070*, 89 pages.
- (2007). « Environmental Protection Agency (EPA), Pesticides ». In : *Health and Safety. National Assessment of the Worker Protection Workshop 3*, 643–689.
- ERAI et SHARMA (2007). « Carbofuran induced oxidative stress in mammalian brain ». In : *Mol. Biotechnol*, p. 66-71.
- ESKENAZI B., Bradman A. Castorina R (1999). « Exposures of children to organophosphate pesticides and their potential adverse health effects. Environ ». In : *Health Perspect* 107, 409–419.
- EVANS (1993). « Free radicals in brain metabolism and pathology ». In : *Br. Med. Bull*, p. 77-587.
- FILE S.E., Gonzalez L.E. et N ANDREWS (1998). « Endogenous acetylcholine in the dorsal hippocampus reduces anxiety through actions on nicotinic and muscarinic1 receptors ». In : *Behavioral Neuroscience*, p. 352-359.

- FLEMING, O'DAY et KRAEMER (1999). « Neurobiology of mother-infant interactions : experience and central nervous system plasticity across development and generations ». In : *Neuroscience and biobehavioral reviews*, p. 673-85.
- FLESSEL, QUINTANA et HOOPER (1993). « Genetic toxicity of malathion : a review. Environ ». In : *Mol. Mutagen*, 7-17.
- FRANCIS et al. (1999). « Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat ». In : *Science*, p. 1155-8.
- FREEMAN, BONNER et BLAIR (2005). « Cancer incidence among male pesticide applicators in the agricultural health study cohort exposed to diazinon ». In : *Am J Epidemiol*, p. 1070-1079.
- GARG et al. (2008). « Role of vitamin E in mitigating methomyl acute toxicity in blood of male Wistar rats ». In : *Toxicology*, p. 487-499.
- GHALIB M. Abdeljalil A., Benada M. Hormatallah A. Dahchour A. et chtaiha A. (1992). « Etude du Secteur des pesticides au Maroc et perspectives ». In : *office pour le développement industriel Rabat, Maroc*, pp60.
- GUPTA et al. (2009). « Reversal of propoxur-induced impairment of step-down passive avoidance, transfer latency and oxidative stress by piracetam and ascorbic acid in rats ». In : *Environmental Toxicology and Pharmacology*, p. 403-408.
- GUTTERIDGE et HALLIWELL (2000). « Free radicals and antioxidants in the year 2000 : a historical look to the future ». In : *Ann. NY Acad*, p. 136-147.
- HAYES et LAWS (1991). « Handbook of Pesticide Toxicology ». In : *Academic Press Inc., Toronto*.
- HAZARIKA et al. (2003). « Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilofos in male rats : a biochemical interaction study ». In : *Toxicology* 185, 1-8.
- HEIKAL et al. (2012). « Antioxidant effect of selenium on hepatotoxicity induced by Chlorpyrifos in male rats ». In : *International Journal of Pharmacy Pharmaceutical Sciences*, p. 603-609.
- HOOD., E (2005). « Are EDCs blurring issues of gender ? Environ Health Perspect ». In : *Developmental Psychobiology*, p. 670-677.
- HOOKER, D (1952). « The prenatal origin of behavior ». In : *Lawrence, Kansas : Kansas University press*.
- IARC (1991). « International Agency on Research on Cancer. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Occupational exposures in insecticide application, and some pesticides ». In : *Lyons, IARC*.

- JOHN et al. (2001). « Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes ». In : *J. Nutr. Biochem*, 500–504.
- JUREWICZ et HANKE (2008). « Prenatal and childhood exposure to pesticides and neurobehavioral development : review of epidemiological studies ». In : *International journal of occupational medicine and environmental health*, p. 121-132.
- KALIWAL, Manawadiand (2010). « Methomyl-induced alteration in mice hepatic-oxidative status ». In : *Inter. J. Biotech*, p. 11-19.
- KANDA (2010). « Agriculture maraîchère au Togo : analyse systémique et environnementale ». In : *Thèse Doct., Université de Lomé, Togo*, 150 p.
- KISHI M Hirschhorn N, Djajadisastra M Satterlee LN Strowman S Dilts R (1995). « Relationship of pesticide spraying to signs and symptoms in Indonesian farmers ». In : *Scand. J. Work Environ. Health*, p. 124-33.
- KOMORI et al. (1991). « A case of delayed myeloneuropathy due to malathion intoxication ». In : *No To Shinkei* 43, 969–974.
- LAZARINI et al. (2001). « Effects of prenatal exposure to deltamethrin on forced swimming behavior, motor activity, and striatal dopamine levels in male and female rats ». In : *Neurotoxicol Teratol*, 665–673.
- LIFE, Crop (2011). « Les statistiques des importations des produits phytosanitaires au Maroc ». In : [[http ://www.amiphy.org/fr/etudes.php](http://www.amiphy.org/fr/etudes.php)].
- LIGGETT et PARCELL (1985a). « Irritant effects on rabbit skin of malathion (Fyfanon) technical ». In : *Unpublished study prepared by Huntingdon Research Centre Ltd*.
- MALQUI et al. (2018). « Continuous Exposure to Inorganic Mercury Affects Neurobehavioral and Physiological Parameters in Mice ». In :
- MARONI et al. (2000). « Biological monitoring of pesticide exposure : a review, introduction ». In : *Toxicology* 7, 1–118.
- MATHUR et al. (2003). « Analysis of pesticide residues in bottled water (Delhi Region) ». In : *CSE Report*.
- MATHUR et al. (2005). « Analysis Of Pesticide Residues In Blood Samples From Villages Of Punjab ». In : *CSE Report*.
- MATTHEWS (2008). « Risk assessment of pesticide usage by smallholder farmers in the Cagayan valley (Philippines) ». In : *Crop. Prot*, p. 834-846.
- MCDONALD (1998). « Dorsoventral patterning in the drosophila central nervous system ». In : *Genes devel*, p. 3603-3612.

- MCEWEN et STEPHENSON (1979). « The use and significance of pesticides in the environment ». In : *John Wiley Sons*, p. 473-524.
- MESSAOUDI et al. (2010). « Reversal of cadmium-induced oxidative stress in rat erythrocytes by selenium, zinc or their combination ». In : *Experimental and Toxicologic Pathology*, p. 281-288.
- MEULENBERG (2002). « “A Note on Modeling Consumer Reactions to a Crisis : The Case of the Madcow Disease,” » in : *International Journal of Research in Marketing*, p. 91-100.
- MIQUEL (2003). « Rapport sur la qualité de l'eau et de l'assainissement en France. Brochure sur la recherche dans les produits phytosanitaires ». In : *Brochure sur la recherche dans les produits phytosanitaires*, p. 124-128.
- MORENO (1989). « 21-Day dermal toxicity study with AC 6,601 in rabbits : Laboratory Report ». In : *Unpublished study prepared by MB Research Laboratories, Inc.*
- MOSER, V. C (2007). « Animal models of chronic pesticide neurotoxicity ». In : *Hum Exp Toxicol*, p. 321-331.
- N'GO et al. (2013). « Developmental effect of Malathion exposure on locomotor activity and anxiety-like behavior in Wistar rat ». In : *Health*, 603–611.
- NIGG et KNAAK (2000). « Blood cholinesterase as human biomarkers of organophosphorus pesticide exposure ». In : *Rev. Environ. Contam. Toxicol*, 29–111.
- OMS (1996). « rganisation mondiale de la santé). Directives de l'organisation mondiale de la santé pour la classification des pesticides en fonction des risques ». In : *23*.
- ORP. « Observatoire des résidus des pesticides (ORP) ». In : <http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr> ()
- OSKARSSON et al. (1998). « Risk assessment in relation to neonatal metal exposure ». In : *Analyst*, p. 19-23.
- OSMAN et al. (2005). « Nephrotoxicity in rats induced by organophosphate insecticide methidathion and ameliorating effects of vitamins E and C ». In : *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 21–28.
- OZDEN S., Catalgol B. Gezginci-Oktayoglu S. Arda-Pirincci P. Bolkent S. Alpertunga B. (2009). « Methiocarb-induced oxidative damage following subacute exposure and the protective effects of vitamin E and taurine in rats ». In : *Food and Chemical Toxicology*, p. 1676-1684.

- PALANZA et al. (1999). « Prenatal exposure to endocrine disrupting chemicals : Effects on behavioral development ». In : *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, p. 1011-1027.
- PALANZA et al. (2008). « Effects of developmental exposure to bisphenol A on brain and behavior in mice ». In : *Environmental research*, p. 150-7.
- PLAN, Haut Commissariat au (2006). « Recensement général de la population et de l'habitat de 2004 ,Caractéristiques démographiques et socio-économiques : région de Tadla-Azilal ». In : *Lakartidningen* 12.
- PLUTH et al. (1996). « Increased frequency of specific genomic deletions resulting from in vitro malathion exposure ». In : *Cancer Res*, 2393–9.
- PRUT, L. et C BELZUNG (2003). « The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors : A review ». In : *A review. European Journal of Pharmacology*, p. 3-33.
- RAI et al. (2009). « Carbofuran-induced toxicity in rats : Protective role of vitamin C ». In : *Experimental and Toxicologic Pathology*, p. 531-535.
- RICHENDRER et CRETON (2017). « Cluster analysis profiling of behaviors in zebrafish larvae treated with antidepressants and pesticides ». In : *Neurotoxicol Teratol*, 30113–30117.
- RODDIER (1995). « Le diabète sucré à La Réunion : une pré-enquête auprès des acteurs de santé publique et des patients diabétiques, Saint-Denis ». In : *Université de La Réunion (mémoire de DEA de Lettres et sciences sociales, option anthropologie)*.
- ROSENTHAL et CAMERON (1991). « Exaggerated sensitivity to an organophosphate pesticide ». In : *American Journal of Psychiatry*, p. 148.
- SAHAY et al. (2011). « Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation ». In : *Nature*, p. 466-70.
- SALAMEH et al. (2004). « Pesticides in Lebanon : a knowledge, attitude and practise study ». In : *Environ. Res*, p. 1-6.
- SANBORN et al. (2007). « Non-cancer health effects of pesticides : systematic review and implications for family doctors ». In : *Canadian family physician Medecin de famille canadien*, p. 1712-1720.
- SANGHI et al. (2003). « Organochlorine and organophosphorus pesticide residues in breast milk from Bhopal, Madhya Pradesh, India ». In : *Hum. Exp.Toxicol* 22, 73–76.

- SATAKA M Y Mido MS, Sethi SA Iqbal HY Taguchi S (1997). « Relationship of pesticide spraying to signs and symptoms in Indonesian farmers ». In : *Discovery Publishing House, New Delhi, India*, p. 185-197.
- SCHER et al. (2008). « Design and end points of clinical trials for patients with progressive prostate cancer and castrate levels of testosterone : recommendations of the Prostate Cancer Clinical Trials Working Group ». In : *J Clin Oncol*, 1148–1159.
- SCHREINEMACHERS (2003). « Birth Malformations an Other Adverse Perinatal Oucomes in Four U.S ». In : *Wheat-Producing States, Environ Health Perspect.*
- SCHROEDER, R (1990). « A two-generation (two litters) reproduction study with AC 6,601 to rats ». In : *Unpublished Study prepared by Bio/Dynamics, Inc.*
- SCHWARTZ (1986). « Parental occupation and birth outcome in an agricultural community ». In : *Scand J Work Environ Health*, p. 51-54.
- SETA, Della et al. (2005). « Bisphenol-A exposure during pregnancy and lactation affects maternal behavior in rats ». In : *Brain Res Bull*, p. 255-60.
- SHARDEIN (1985). « Chemically induced birth defect ». In : *Dekker, New-York et Bâle*, p. 879.
- SHEEHAN et NUMAN (2002). « Estrogen, progesterone, and pregnancy termination alter neural activity in brain regions that control maternal behavior in rats ». In : *Neuroendocrinology*, p. 12-23.
- SIGLIN (1985a). « A resubmission of rabbit teratology study, FDRL Study No ». In : *with Appendix III included.*
- SLAUTER, R (1994). « 18-Month oral (dietary) oncogenicity study in mice : Malathion : Lab Project Number : 668-001 ». In : *Unpublished study prepared by International Research and Development Corp.*
- SNELDER, MASIPIQUENA et SNOO (2008). « Risk assessment of pesticide usage by smallholder farmers in the Cagayan valley (Philippines) ». In : *Crop. Prot*, p. 747-762.
- STEVENSON et al. (1995). « Effect of dietary antioxidants on dieldrin-induced hepatotoxicity in mice ». In : *Toxicol. Lett*, p. 177-183.
- « The UK Pesticide Guide » (2004). In : *BCPC/CABI.*
- THIEL R, Chahoud I. (1997). « Postnatal development and behavior of Wistar rats After ». In : *Behav. Brain Res.*
- TILSON et al. (1989). « Oral administration of aspartame is not proconvulsant in rats ». In : *Neurotoxicology*, p. 229-238.

- UTIP, B et al. (2013). « Effect of Deltamethrin and Ridomil on Sperm Parameters and Reproductive Hormones of Male Rats ». In : *Toxicol Environ Health*, p. 9-14.
- VALERY PC McWhirter W, Sleigh A Williams G Bain C (2002). « Farm exposures, parental occupation, and risk of Ewing's sarcoma in Australia ». In : *a national case-control study. Cancer*, p. 263-270.
- VALVASSORI S.S., Fortunato J.J. Gomes K.M. Réus G.Z. Martins M.R. Gavioli E.C. Schetinger M.R. Dal-Piz-zol F. et J QUEVEDO (2007). « Acute and subacute exposure to malathion impairs aversive but not non-associative memory in rats ». In : *Neurotoxicity Research*, p. 71-79.
- VIDAIR, C A (2004). « Age dependence of organophosphate and carbamate neurotoxicity in the postnatal rat : extrapolation to the human ». In : *Toxicol. Appl. Pharmacol* 196, 287-302.
- VIVIANA et al. (2015). « Acute restraint stress and corticosterone transiently disrupts novelty preference in an object recognition task ». In : *Behav Brain Res*, p. 60-66.
- WALSH et Cummins . (1976). « The Open-Field Test : a critical review ». In : *Psychol Bull*, 482-504.
- WANG et al. (2009). « Acute and chronic toxicity of organophosphate monocrotophos to *Daphnia magna* ». In : *J. Environ. Sci. Health B* 44, 38-43.
- WATTERSON, A (1988). « Pesticide Users' Health and Safety Handbook ». In :
- YEN et al. (2000). « Potential of the insecticides acephate and methamidophos to contaminate groundwater ». In : *Ecotoxicol. Environ. Saf* 45, 79-86.
- YU et al. (2013). « Clonal development and organization of the adult *Drosophila* central brain ». In :
- YURUMEZ et al. (2007). « Beneficial effect of N-acetylcysteine against organophosphate toxicity in mice ». In : *Biol. Pharm* 30, 490-494.
- ZHAO et HWANG (2009). « A study of the degradation of organophosphorus pesticides in river waters and the identification of their degradation products by chromatography coupled with mass spectrometry ». In : *Arch. Environ. Contom. Toxicol*, 646-653.