



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université de Larbi Tébessi –Tébessa-  
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie



Département : Biologie appliquée  
Domaine des Sciences de la Nature et de la Vie

# Thèse

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat LMD  
En : TOXICOLOGIE CELLULAIRE  
Option : TOXICOLOGIE

Par : M. Ben Aicha Brahim

Intitulée :

Impact cellulaire de Lambda-cyhalothrine chez les rats  
Wistar et le rôle cytoprotecteur de l'extrait de la plante  
*Melissa officinalis* L.

Devant le jury :

Mm. Guedri Kamilia	MCA	Université de Larbi Tébessi –Tébessa-	Présidente
M. Mihi Ali	MCA	Université de Larbi Tébessi –Tébessa-	Examineur
M. Derouiche Samir	MCA	Université de Hamma Lakhdar – El Oued-	Examineur
Mm. Bouchaha Hanene	MCA	Université de Chedli Bendjedid – El Tarf-	Examinatrice
M. Rouabhi Rachid	Prof	Université de Larbi Tébessi –Tébessa-	Rapporteur

Date de soutenance : /09/2021

Année universitaire : 2020/2021

## Résumé

L'explosion démographique de la population mondiale et ses besoins alimentaires et sanitaires sont les principales raisons ayant conduit à une augmentation spectaculaire de la production et l'utilisation des pesticides susceptibles d'engendrer l'apparition de plusieurs maladies. Actuellement, les recherches s'orientent vers les plantes médicinales considérées comme source potentielle de multiples substances phytothérapeutiques douées d'activités antioxydantes. Ces substances s'avèrent être l'arme la plus efficace permettant de faire face au stress oxydant et à ses dégâts nocifs au niveau des organes de l'être vivant. C'est dans ce cadre que rentre la présente étude, qui vise à étudier d'une part, les effets oxydatifs et neuropathologies induits par la lambda-cyhalothrine (LCT), un pyréthriinoïde de synthèse type II, chez les rats au niveau du cerveau régional (hippocampe, cortex, et striatum) et mettre en évidence les effets correcteurs de l'extrait méthanolique de la plante médicinale *Melissa officinalis* L. (EMMO) vis-à-vis de la toxicité de cet insecticide, d'autre part.

Sur le plan phytochimique, les analyses préliminaires de l'extrait ont montré sa richesse en métabolites secondaires, dont plusieurs parmi eux ont été identifiés et quantifiés par la LC-ESI-MS. Les phénols totaux, et les flavonoïdes, ont caractérisé l'extrait de *M. officinalis*. Les tests antioxydants réalisés à l'échelle *in vitro* ont montré que EMMO est doté d'activités antioxydantes, et anticholinestérasiques très importantes : le dosage de piégeage des radicaux DPPH, l'activité de piégeage ABTS, la capacité antioxydante réductrice cuivrique, le dosage du pouvoir réducteur ferrique, et les activités anticholinestérasiques AchE, et BchE. L'extrait méthanolique de *M. officinalis* s'est montré efficace, quoique à des degrés différents, dans la prévention contre les effets néfastes induits par la lambda-cyhalothrine sur les paramètres récents. L'effet préventif de *M. officinalis* contre la toxicité de la lambda-cyhalothrine est vraisemblablement attribué aux différents constituants de cette plante qui sont dotés d'une forte aptitude à neutraliser les radicaux libres et protéger le cerveau contre le stress oxydant.

Sur le plan *In vivo*, nos résultats ont prouvé que l'insecticide administré induit une neurotoxicité par (LCT), à travers l'augmentation de stress, la perturbation de neurotransmetteur (AchE) et la dégénérescence des cellules cérébrales. Nous avons également mis en évidence des changements du comportement psychique des rats qui se sont manifestés par des cas d'anxiété, de perturbation de la mémoire et de l'apprentissage par des cas d'anxiété, de perturbation de la mémoire et de l'apprentissage. Le suivi des biomarqueurs de stress oxydatif montré une perturbation du statut oxydant au niveau du des trois régions du cerveau (augmentation du contenu en TBARS, en PC, en NO, et inhibition de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, CAT, GPx) ainsi que le taux de GSH). A partir de l'analyse des résultats d'apoptose, on a observé que le traitement par LCT a différentes doses augmente l'activité des caspase-3 et cytochrome-c, cette augmentation provoque un état de mort cellulaire organisé dans le cerveau. Aussi, l'évaluation de l'activité d'AchE montre une diminution très claire chez les rats exposés au LCT. L'étude histologique régionale (hippocampe, cortex, et striatum) montre une destruction des cellules cérébrales chez les lots traités par LCT comparé avec les témoins.

**Mots clés :** Lambda-cyhalothrine, *M. officinalis*, Cerveau, Stress oxydant, Apoptose.

**Abstract**

## Abstract

The demographic explosion of the world population and its food and health needs are the main reasons that have led to a dramatic increase in the production and use of pesticides that can lead to the emergence of several diseases. Currently, research is focused on medicinal plants considered as a potential source of multiple phytotherapeutic substances endowed with antioxidant activities. These substances prove to be the most effective weapon for dealing with oxidative stress and its harmful damage to the organs of living beings. This is the context of the present study, which aims to study, on the one hand, the oxidative and neuropathological effects induced by lambda-cyhalothrin (LCT), a type II synthetic pyrethroid, in rats in the brain. regional (hippocampus, cortex, and striatum) and highlight the corrective effects of the methanolic extract of the medicinal plant *Melissa officinalis* L. (EMMO) vis-à-vis the toxicity of this insecticide, on the other hand.

Phytochemically, preliminary analyzes of the extract have shown its richness in secondary metabolites, several of which have been identified and quantified by LC-ESI-MS. Total phenols, and flavonoids, characterized the *M. officinalis* extract. Antioxidant tests carried out at the in vitro scale have shown that EMMO is endowed with very important antioxidant and anticholinesterase activities: the DPPH radical scavenging assay, the ABTS scavenging activity, the copper reducing antioxidant capacity, the dosage of ferric reducing power, and anticholinesterase activities AchE, and BchE. The methanolic extract of *M. officinalis* has been shown to be effective, although to varying degrees, in preventing the adverse effects induced by lambda-cyhalothrin on recent parameters. The preventive effect of *M. officinalis* against the toxicity of lambda-cyhalothrin is probably attributed to the various constituents of this plant which are endowed with a strong ability to neutralize free radicals and protect the brain against oxidative stress.

In vivo, our results showed that the administered insecticide induces neurotoxicity by (CTL), through increased stress, neurotransmitter disruption (AchE) and degeneration of brain cells. We also demonstrated changes in the psychic behavior of rats which manifested as cases of anxiety, disturbance of memory and learning through cases of anxiety, disturbance of memory and learning. The monitoring of oxidative stress biomarkers showed a disturbance of the oxidative status in the three regions of the brain (increase in the content of TBARS, PC, NO, and inhibition of the activity of antioxidant enzymes (SOD, CAT, GPx) as well as the level of GSH). From the analysis of the results of apoptosis, it is observed that the treatment with LCT at different doses increases the activity of caspase-3 and cytochrome-c, this increase causes a state of organized cell death in the brain. Also, evaluation of AchE activity shows a very clear decrease in rats exposed to LCT. The regional histological study (hippocampus, cortex, and striatum) shows destruction of brain cells in the batches treated with LCT compared with the controls.

**Keywords:** Lambda-cyhalothrin, *M. officinalis*, Brain, Oxidative stress, Apoptosis.

## ملخص

إن الانفجار الديموغرافي لسكان العالم واحتياجاته الغذائية والصحية هي الأسباب الرئيسية التي أدت إلى زيادة كبيرة في إنتاج واستخدام المبيدات الحشرية التي يمكن أن تؤدي إلى ظهور العديد من الأمراض. يركز البحث حاليًا على النباتات الطبية التي تعتبر مصدرًا محتملاً للعديد من مواد العلاج بالنباتات التي تتمتع بأنشطة مضادة للأكسدة. ثبت أن هذه المواد هي أكثر الأسلحة فعالية للتعامل مع الإجهاد التأكسدي وأضراره الضارة بأعضاء الكائنات الحية. هذا هو سياق الدراسة الحالية، التي تهدف إلى دراسة التأثيرات التأكسدية والمرضية العصبية التي يسببها لامدا-سيهالوثرين (LCT)، وهو نوع من البيروثرويدات الاصطناعية من النوع الثاني، في الفئران في الدماغ، والمخطط) وإبراز التأثيرات التصحيحية للمستخلص الميثانولي للنبات الطبي (*Melissa officinalis* L. (EMMO) مقابل سمية هذا المبيد الحشري، من ناحية أخرى.

من الناحية الكيميائية النباتية، أظهرت التحليلات الأولية للمستخلص ثرائه في المستقلبات الثانوية، والتي تم تحديد العديد منها بواسطة LC-ESI-MS. مجموع الفينولات، والفلافونويد، تميزت خلاصة *M. officinalis*. أظهرت اختبارات مضادات الأكسدة التي تم إجراؤها على مقياس المختبر أن EMMO يتمتع بأنشطة مهمة جدًا في مضادات الأكسدة ومضادات الكولين ستراز: مقايسة الكسح الجذري DPPH، ونشاط الكسح ABTS، والقدرة المضادة للأكسدة التي تقلل النحاس، وجرعة قوة تقليل الحديدك، وأنشطة مضادات الكولين ستراز. AchE و BchE. وقد ثبت أن المستخلص الميثانولي من *M. officinalis* فعال، على الرغم من بدرجات متفاوتة، في منع الآثار الضارة التي يسببها lambda-cyhalothrin على المعايير الحديثة. ربما يعزى التأثير الوقائي لـ *M. officinalis* ضد سمية lambda-cyhalothrin إلى المكونات المختلفة لهذا النبات والتي تتمتع بقدرة قوية على تحييد الجذور الحرة وحماية الدماغ من الإجهاد التأكسدي.

في الجسم الحي، أظهرت نتائجنا أن المبيدات الحشرية تسبب السمية العصبية عن طريق (LCT)، من خلال زيادة الإجهاد، واضطراب الناقل العصبي (AchE) وتنكس خلايا الدماغ. كما أظهرت تغيرات في السلوك النفسي للفئران من خلال حالات القلق واضطراب في الذاكرة والتعلم. أظهرت مراقبة المؤشرات الحيوية للإجهاد التأكسدي اضطرابًا في حالة الأكسدة في مناطق الدماغ الثلاثة (زيادة في محتوى TBARS، PC، NO، وتنشيط نشاط إنزيمات مضادات الأكسدة (SOD، CAT، GPx) وكذلك مستوى GSH). من تحليل نتائج الاستماتة، لوحظ أن العلاج بـ LCT بجرعات مختلفة يزيد من نشاط cytochrome-c و caspase-3، وتسبب هذه الزيادة حالة من موت الخلايا المنظم في الدماغ. أيضًا، يُظهر تقييم نشاط AchE انخفاضًا واضحًا جدًا في الفئران المعرضة لـ LCT. أظهرت الدراسة النسيجية الإقليمية تدمير خلايا الدماغ على دفعات عولجت بـ LCT مقارنةً بالشواهد.

**الكلمات المفتاحية:** *M. officinalis*، Lambda-cyhalothrin، الدماغ، الإجهاد التأكسدي، موت الخلايا المبرمج.

# Remerciements

*Je remercie en premier lieu mon dieu **ALLAH** le tout puissant pour toute la volonté et le courage qu'il m'a donné pour l'achèvement de cette thèse, il a été et sera toujours à côté de moi pour réussir à terminer n'importe quel travail.*

*Je tiens tout particulièrement à exprimer mes plus vifs remerciements et ma profonde Gratitude à mon encadreur **M. Rouabhi R**, professeur à l'université de Tébessa, et le doyen de l'institut des sciences. Qui m'a fait l'honneur d'assurer la direction de ce travail, et qui a su faire preuve de patience, d'indulgence et de compréhension tout au long de ces années, me permettant ainsi de mener à bien cette étude. Merci monsieur pour sa présence, pour sa patience, ses précieux conseils, le suivi, l'orientation et pour sa confiance.*

*Je vous prie de croire en ma profonde reconnaissance et l'expression de mon profond respect Je tiens à remercier vivement **M. Derouiche S**, maitre de conférences à l'université de El Oued, Qui, malgré ses nombreuses obligations a bien voulu faire partie de ce jury. Qu'il reçoive toute ma gratitude et mon respect.*

*J'exprime aussi toute ma gratitude à **Mm. Guedri K**, maitre de conférences à l'université de Tébessa, pour l'intérêt et l'attention qu'il a accordé à ce travail de thèse, et pour avoir accepté de faire partie de ce jury.*

*Mes remerciements s'adressent aussi à **M. Bouchaha H** maitre de conférences à l'université de Boumerdes de m'avoir accordé le privilège de participer à ce jury et d'examiner avec soin ce mémoire.*

*Ma plus grande gratitude va à **M. Mihi A** maitre de conférences à l'université de Tébessa, pour ces encouragements et ces nombreux conseils, et pour avoir accepté de faire partie de ce jury.*

*Je profite de l'occasion qui m'est offerte pour adresser mes remerciements aussi au mon frère **M. Gasmi S**, docteur à l'université de Tébessa, pour sa disponibilité et son souci constant afin que cette thèse se passe dans les meilleures conditions possibles. Avec enthousiasme, disponibilité, efficacité et sympathie, vous avez encadré ces années de recherche. Vous avez pris une part prépondérante dans ma formation de jeune chercheur et m'avez donné l'envie d'aller plus loin. L'excellence est assez rare pour que l'on puisse la souligner. Vous resterez à jamais un exemple pour moi. Aussi toutes mes gratitudes à mon frère **M. Menaceur F**, pour s'être pleinement investi à la réalisation de ce travail et sacrifié de son temps pour répondre à nombreuses questions, pour ses encouragements et ses nombreux conseils.*

## إهداء

أحمد الله عز وجل على منه وعونه لإتمام هذا البحث.  
إلى الذي وهبني كل ما يملك حتى أحقق له آماله، إلى من كان يدفعني قدما نحو الأمام لنيل  
المبتغى، إلى الإنسان الذي امتلك الإنسانية بكل قوة، إلى الذي سهر على تعليمي بتضحيات جسام  
مترجمة في تقديسه للعلم، إلى مدرستي الأولى في الحياة،

**أبي الغالي** على قلبي رحمة الله عليه.

إلى التي وهبت فلذة كبدها كل العطاء والحنان، إلى التي صبرت على كل شيء، التي رعتني  
حق رعاية وكانت سندي في الشدائد، وكانت دعواها لي بالتوفيق، تتبعني خطوة خطوة  
في عملي، إلى من ارتحت كلما تذكرت ابتسامتها في وجهي نبع الحنان **أمي** أعز ملاك على  
القلوب والعين جزاها الله عندي خير الجزاء في الدارين.

إليكم أهدي هذا العمل المتواضع لكي أدخل على قلوبكم شيئا من السعادة إلى **إخوتي**  
**أخواتي وزوجتي المستقبلية إن شاء الله** الذين تقاسموا معي عبء الحياة.

كما أهدي ثمرة جهدي لأني الكريم الدكتور **فاسمي سليم** الذي كلما تظلمت الطريق  
أمامي لجأت إليه فأنارها لي كلما دب اليأس في نفسي زرع فيا الأمل لأسير قدما  
وكلما طلبت كمية من وقته الثمين وفره لي بالرغم من  
مسؤولياته المتعددة.

إلى كل أساتذة قسم علوم الطبيعة والحياة؛ جزأهم الله عندي خير جزاء.

إلى من أحبهم وقضيت معهم أجمل اللحظات؛ إلى الأهل والأقارب والأصدقاء.

وإلى كل الذين أحبهم أهدي لهم هذا العمل المتواضع...

## Liste des abréviations

<b>3-PBA</b>	Acide 3-phénoxybenzoïque
<b>ACh</b>	Acétylcholine
<b>AChE</b>	Acétylcholinestérase
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AG</b>	Acide gras
<b>ANOVA</b>	Analyse de variance
<b>ARLA</b>	L'Agence canadienne pour la régulation de la lutte antiparasitaire
<b>ARN</b>	Acide Ribonucléique
<b>ATP</b>	Adenosine triphosphate
<b>bcl-2</b>	Protéines anti-apoptotiques
<b>BHE</b>	Barrière hémato-encéphalique
<b>BHT</b>	Butyl hydroxy toluène
<b>BSA</b>	Bovine Sérum Albumine
<b>BSA</b>	Sérum albumine bovine
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Ion de calcium
<b>Cap</b>	Caspase
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CDNB</b>	1-chloro, 2,4-dinitrobenzène
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentration inhibitrice de 50 % de l'activité enzymatique
<b>CL50</b>	Concentration létal 50
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dioxyde de carbone
<b>COX</b>	Cyclo-oxygénase
<b>CPF</b>	Chlorpyrifos
<b>CP-SM</b>	Chromatographie à phase liquide couplée à spectrométrie de masse
<b>Cu</b>	Cuivre
<b>Cyt</b>	Cytochrome
<b>DJA</b>	Dose journalière admissible
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dose mortel 50
<b>DMSO</b>	Diméthyl sulfoxyde
<b>DTNB</b>	Acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque) ou réactif d'Ellman.
<b>EDTA</b>	Acide Ethylène-Diamine-Tétraacétique
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
<b>EMMO</b>	Extrait méthanolique de <i>Mélissa officinalis</i>
<b>EOA</b>	Espèces Oxygénées Activées
<b>EPA</b>	Agence de Protection de l'Environnement
<b>ERN</b>	Espèces Réactives de l'azote
<b>ERO</b>	Espèces Réactives de l'Oxygène
<b>ESM</b>	Erreur standard sur la moyenne
<b>GPx</b>	Glutathion peroxydase
<b>GSH</b>	Glutathion réduit
<b>GSSG</b>	Glutathion oxydé
<b>GST</b>	Glutathion-S-transférase
<b>H</b>	Hydrogène
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène
<b>HAPs</b>	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
<b>Hip</b>	Hippocampe
<b>HPLC</b>	Chromatographie liquide à haute performance
<b>Kg</b>	Kilogramme

<b>LCT</b>	Lambda-cyhalothrine
<b>MAO</b>	Monoamines oxydases
<b>MDA</b>	Acide Malon-dialdéhyde
<b>mg</b>	Milligramme
<b>mmol</b>	Milimole
<b>NO</b>	Monoxyde d'azote
<b>NO</b>	Nitrie Oxydé
<b>NOAEL</b>	No observed adverse effect level
<b>OH•</b>	Radical hydroxyle
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>PCO</b>	Protéine carbonylée
<b>TNF</b>	Facteur Transformant de nécrose
<b>UI</b>	Unité international
<b>μmol</b>	Micromoles

## Liste des figures

Figure N°	Titre de figure	Page N°
01	Voies du métabolisme secondaire des plantes qui produisent les trois types généraux de composés secondaires	17
02	Le phénol, le plus simple des composés phénoliques	18
03	Classification et structure chimique des composés phénoliques	18
04	Structure générale des flavonoïdes	19
05	Structure des anthocyanosides	20
06	Structure des tannins hydrolysables et les acides associés	21
07	Structure du tanin condensé	21
08	<i>Melissa officinalis</i> L	25
09	Feuilles et fleurs de Mélissa	26
10	Quantité des pesticides vendus en 2018 dans le monde	30
11	Différents modes de contamination de l'environnement par les pesticides	32
12	Les principales voies d'exposition aux pesticides	33
13	Evolution structurale des pyréthrinoïdes de synthèse	37
14	Structure chimique de lambda-cyhalothrine	38
15	Métabolisme des xénobiotiques MRP : Multidrug Resistance associated Proteins ; PGP : P glycoprotéine	41
16	Métabolisme de la Lambda-cyhalothrine chez les mammifères	41
17	Le stress oxydant induit par un déséquilibre entre pro-oxydant et système antioxydant	47
18	Les cibles biologiques du stress oxydant	50
19	Dispositif expérimental de l'open-field (OF).	66
20	Dispositif expérimental du CM.	68
21	Dispositif expérimental de la Nage Forcée (Forced Swim Test - FST).	69

<b>22</b>	Structure de complexe 2,4-dinitrophénylhydrazine-dérivé carbonylé	<b>70</b>
<b>23</b>	Principe de détermination des nitrites par la réaction de Griess	<b>73</b>
<b>24</b>	Les structures chimiques des composés identifiés dans l'extrait de <i>M. officinalis</i> L	<b>85</b>
<b>25</b>	Les spectres de masse en mode d'ionisation négative et schéma de fragmentation simplifié des phénols identifiés dans l'extrait de <i>M. officinalis</i>	<b>87</b>
<b>26</b>	Activité locomotrice et exploratoire des rats dans le test d'open-field	<b>98</b>
<b>27</b>	Niveau d'anxiété des animaux dans le labyrinthe classique	<b>99</b>
<b>28</b>	Exploration et état d'anxiété dans le test de nage forcé	<b>100</b>
<b>29</b>	Taux de PCO dans l'hippocampe, cortex, et striatum chez les rats	<b>102</b>
<b>30</b>	Taux de MDA dans l'hippocampe, cortex, et striatum chez les rats	<b>103</b>
<b>31</b>	Taux de NO dans l'hippocampe, cortex, et striatum chez les rats	<b>104</b>
<b>32</b>	Taux de GSH dans l'hippocampe, cortex, et striatum chez les rats	<b>105</b>
<b>33</b>	Activité de CAT dans l'hippocampe, cortex, et striatum chez les rats	<b>106</b>
<b>34</b>	Activité de GPx dans l'hippocampe, cortex, et striatum chez les rats	<b>107</b>
<b>35</b>	Activité de SOD dans l'hippocampe, cortex, et striatum chez les rats	<b>108</b>
<b>36</b>	Activité de AchEase dans l'hippocampe, cortex, et striatum chez les rats	<b>109</b>
<b>37</b>	Concentration de Cytochrome-c (Cyt-c) dans l'hippocampe, cortex, et striatum chez les rats	<b>110</b>
<b>38</b>	Activité de Caspase-3 (Casp-3) dans l'hippocampe, cortex, et striatum chez les rats	<b>111</b>
<b>39</b>	Les coupes histologiques (G-40)	<b>112</b>
<b>40</b>	Les coupes histologiques (G-100)	<b>113</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau N°</b>	<b>Titre de tableau</b>	<b>Page N°</b>
<b>01</b>	Quelques familles chimiques de pesticides et leurs cibles principales	<b>29</b>
<b>02</b>	Fréquences par type de pesticides utilisés durant les campagnes 2008,2009 et 2010 en Algérie	<b>31</b>
<b>03</b>	Propriétés physico-chimiques de lambda-cyhalothrine	<b>38</b>
<b>04</b>	Les principales espèces réactives	<b>48</b>
<b>05</b>	Composition de l'alimentation/Kg.	<b>63</b>
<b>06</b>	Étapes de déshydratation des échantillons	<b>79</b>
<b>07</b>	Teneurs en phénols totaux, flavonoïdes l'extrait de <i>M. officinalis</i> L	<b>85</b>
<b>08</b>	L'analyse ESI-LC-MS de certains constituants phénoliques de l'extrait hydro-méthanolique de <i>M. officinalis</i> L.	<b>87</b>
<b>09</b>	Analyse comparative de l'activité antioxydante de l'extrait de <i>M. officinalis</i>	<b>89</b>
<b>10</b>	Coefficients de corrélation (r) pour les relations entre les dosages	<b>89</b>
<b>11</b>	Inhibition de l'activité anticholinestérase par l'extrait méthanolique de <i>M. officinalis</i> L.	<b>89</b>

## Sommaire

Introduction.....	11
-------------------	----

### Partie bibliographique

I. Les Plantes Médicinales : Les Plantes à usages thérapeutiques .....	16
I.1. Définition et utilisation.....	16
I.2. Métabolites secondaires (principes actifs) des plantes médicinales .....	16
I.3. Les composés phénoliques : un exemple de métabolites secondaires d'importance pharmacothérapeutique .....	17
I.3.1. Définition.....	17
I.3.2. Structure chimique.....	18
I.3.3. Classification des composés phénoliques .....	18
I.3.4 Les principaux composés phénoliques à meilleures activités biologiques.....	19
I.3.5. Propriétés biologiques des polyphénols .....	22
I.4. Les plantes médicinales en Algérie .....	24
I.5. La <i>Melissa Officinalis</i> L : une espèce à pouvoir thérapeutique promoteur .....	24
I.5.1. Classification .....	24
I.5.2 Description botanique.....	25
I.5.3. Composition chimique et usages thérapeutiques.....	26
II. Pesticides : Epidémie silencieuse .....	28
II.1. Historique des pesticides .....	28
II.2. Classification des pesticides.....	28
II.3. Répartition quantitative des pesticides dans le monde .....	30
II.4. Destinés des pesticides dans l'environnement .....	31
II.5. Voies d'exposition aux pesticides.....	32
II.6. Qui est plus particulièrement exposé aux pesticides ? .....	33
II. Pyréthrinoïdes de synthèse : nouvelle génération de pesticides.....	36
II. 1. Définition .....	36
II.2. Structure chimique .....	36
II.3. Lambda-cyhalothrine (pyréthrinoïdes de synthèse) : un exemple d'étude .....	37
II.3.1. Définition et utilisation.....	37
II.3.2. Propriété physico-chimique.....	38
II.3.3. Toxicocinétique de la lambda-cyhalothrine .....	39
II.4. Toxicité de la lambda-cyhalothrine .....	42
II.4.1. Neurotoxicité.....	42
II.4.2. Effets sur la consommation d'aliments et de l'eau .....	43

II.4.3. Stress oxydant .....	43
II.4.4. Les effets sanguins .....	43
II.4.5. Effets rénaux .....	44
II.4.6. Toxicité hépatique .....	44
II.4.7. Immunotoxicité .....	44
II.4.8. Effets endocriniens .....	45
III. Stress oxydatif et antioxydant .....	47
III.1. Définition du stress oxydant .....	47
III.2. Différentes formes des radicaux libres .....	48
III.2. Sources cellulaires des radicaux libres .....	48
III.2.1. La mitochondrie .....	48
III.2.2. Les NADPH oxydases .....	49
III.2.3. Peroxysomes .....	49
III.2.4. La xanthine oxydase .....	49
III.3. Les cibles des dérivés actifs de l'oxygène .....	50
III.3.1. Les protéines .....	50
III.3.2. Les lipides .....	51
III.3.3. L'ADN .....	51
III.4. Anti-oxydants endogènes enzymatiques .....	52
III.4.1. La catalase .....	52
III.4.2. Les superoxyde dismutase (SOD) .....	52
III.4.3. La Glutathion Peroxydase .....	53
III.5. Les antioxydants non enzymatiques .....	54
III.5.1. Les vitamines C et E .....	54
III.5.2. Les polyphénols .....	54

### **Partie pratique**

Etude phytochimique .....	58
I. Préparation de l'extrait méthanolique ( <i>Melissa officinalis</i> L) .....	58
Dosages des composés phénoliques .....	58
II.1. Dosage des polyphénols totaux .....	58
II.2. Dosage des flavonoïdes totaux .....	58
III. Analyse ESI-LC-MS de l'extrait méthanolique de <i>Mélissa officinalis</i> L. ....	59
V. Evaluation de l'activité antioxydante dans l'extrait de <i>M. officinalis</i> L. ....	59
IV.1. Activité antiradicalaire au DPPH .....	59

IV.2. Activité du piégeage de l'ABTS.....	60
IV.3. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC).....	60
IV.4. Test de Pouvoir réducteur.....	61
V. Activité anticholinestérasés.....	61
Analyses statistiques.....	62
Étude <i>in vivo</i> .....	63
II. Animaux et Traitement.....	63
II.1. Animaux et élevage.....	63
II.2. Traitement des Animaux.....	64
II.3. Sacrifice des animaux.....	65
II.4. Prélèvement des échantillons.....	65
III. Tests comportementaux.....	65
Le test champ ouvert (open-.....	III.1
<b>Erreur ! Signet non défini.</b> .....	field OF)
III.2.....	Test de labyrinthe
classique (LC).....	67
III.3.....	Test Nage Forcée (Forced swim
test FST).....	68
III.....	Technique du dosage de biomarqueurs du stress
oxydatif.....	70
III.3. Dosage de la quantité de glutathion réduit (GSHt).....	71
III.4. Dosage du taux de peroxydation lipidique (TBARS) tissulaire.....	71
III.5. Mesure de la production d'oxyde nitrique (NO).....	73
III.6. Détermination de l'activité de quelques enzymes antioxydantes.....	74
III.6.1. Activité de la catalase (CAT).....	74
III.7. Activité du superoxyde dismutase (SOD).....	74
III.8. Activité de la glutathion peroxydase (GPx).....	75
IV. Dosage de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE).....	76
V. Technique du dosage de biomarqueurs d'apoptose.....	77
V.1. Evaluation de Cytochrome c.....	77
V.2. Evaluation l'activité de la Caspase 3.....	77
VI.6. Analyse histologique.....	78
VI.7. Dosage des protéines.....	80
VI.9. Analyses statistiques.....	80
Résultats et Discussion.....	81

Chapitre II : étude phytochimique et évaluation <i>in vitro</i> de l'activité antioxydant et antiradicalaire de l'extrait méthanolique de <i>Mélissa officinalis</i> L.....	82
I. Introduction .....	83
II. Analyse quantitative de l'extrait de <i>Mélissa officinalis</i> L.....	84
II.1. Taux des polyphénols totaux.....	84
II.2. Taux des flavonoïdes totaux.....	84
III. Analyse CLHP-MS de l'extrait méthanolique de <i>M. officinalis</i> .....	85
IV. Investigation du pouvoir antioxydant de <i>M. officinalis</i> L. étude <i>in vitro</i> .....	87
IV.1. Activité antiradicalaire au DPPH.....	88
IV.2. Activité du piégeage de l'ABTS.....	88
IV.3. Test de la capacité inhibitrice du CUPRAC .....	88
IV.4. Test du pouvoir réducteur ferrique .....	88
IV.5. Coefficients de corrélation (r) pour les relations entre les dosages .....	89
V. Activité anticholinestérase .....	89
VI. Discussion.....	90
Chapitre I : Etude <i>in vivo</i> des mécanismes de toxicité de Lambda-cyhalothrine au niveau du cerveau (Hippocampe, Cortex, et Striatum) et le rôle cytoprotecteur de l'extrait méthanolique de <i>Mélissa officinalis</i> L : Implication du processus oxydatifs et apoptotiques .....	94
I. Introduction .....	95
II. Mesures comportementales chez les animaux exposés à deux doses de LCT seuls ou mélangées avec EMMO .....	97
II.1. Activité locomotrice et exploratoire des animaux dans le test d'open-field .....	97
II.2. Niveau d'anxiété des animaux dans labyrinthe classique .....	99
II.3. L'état de dépression des animaux dans le test de nage forcé .....	100
III. Effet du LCT et EMMO sur biomarqueurs de stress oxydant au niveau du cerveau (hippocampe, cortex, et striatum) .....	101
III.1. Effet sur le taux des groupements carbonyles (PCO) .....	101
III.2. Effet sur le taux de peroxydation lipidique (TABARS) tissulaire.....	102
III.3. Effet sur le taux de production d'oxyde nitrique (NO).....	103
III.4. Effet sur le taux de glutathion réduit (GSHt).....	104
IV. Effet du LCT et EMMO sur le statut enzymatique antioxydant au niveau du cerveau (hippocampe, cortex, et striatum) .....	105
IV.1. L'activité de la catalase (CAT).....	105
IV.2. Activité de glutathion peroxydase (GPx) .....	106
IV.3. L'activité de superoxyde dismutase (SOD).....	107

V. Effet du LCT et EMMO sur l'activité de l'acétylcholinestérase (AchE) au niveau du cerveau (hippocampe, cortex, et striatum) .....	109
VI. Effet du LCT et EMMO sur les biomarqueurs pro-apoptotiques au niveau du cerveau (hippocampe, cortex, et striatum) .....	110
VI.1. Effet sur la concentration du Cytochrome-c .....	110
VI.1. Effet sur l'activité de Caspase-3 .....	111
VII. Analyses histologiques .....	112
VIII. Discussion .....	114

Discussion générale .....	119
Conclusion et Perspectives .....	125
References .....	128
Annexes .....	143

# *Introduction*

Les facteurs sanitaires liés à l'environnement constituent des déterminants fondamentaux de la santé humaine. Parmi ces facteurs, les produits phytosanitaires jouent un rôle important dans l'agriculture. En protégeant les cultures contre les maladies, les mauvaises herbes, les ravageurs, etc., elles peuvent augmenter et stabiliser les rendements et assurer la qualité de la production. Ils sont aujourd'hui les seuls outils d'optimisation efficaces. Ils sont également devenus un enjeu économique et sanitaire important. Cependant, leur utilisation intensive aura un impact négatif sur l'environnement, les organismes non ciblés, et surtout la santé humaine. En raison des effets potentiellement nocifs des produits phytopharmaceutiques, l'agriculture doit aller dans le sens d'une meilleure prise en compte des exigences environnementales. Elle doit donc aller dans le sens d'une utilisation raisonnée des produits phytosanitaires, qui ne doivent pas devenir des facteurs de risque pour la santé publique.

Les origines du stress oxydant sont multiples. Des facteurs externes (exposition prolongée aux UV, inflammation, infection) et le mode de vie (tabac, alcool, alimentation déséquilibrée, sport intense, stress, fatigue), créent un déséquilibre de la balance pro-oxydant /antioxydant. Toutefois, en raison de la concomitance entre la survenue des maladies liées au stress oxydatif, l'aggravation de la pollution, et l'utilisation accrue des pesticides à différentes fins, il était légitime de suspecter l'implication de ces polluants chimiques dans l'induction du stress oxydant. Plusieurs études cliniques et expérimentaux ont montré que l'administration des pesticides peut induire un état de stress oxydant menant à différentes pathologies (Fortin et al., 2009 ; Fetoui et al., 2010). Actuellement, les pyréthrinoïdes de synthèse sont soupçonnés être un risque sur la santé humaine à cause de leur utilisation fréquente. La lambda-cyhalothrine est l'un des pyréthrinoïdes de synthèse les plus couramment utilisés, vu le potentiel insecticide et la faible toxicité qu'il présente pour les mammifères (Moretto, 1991). Toutefois, on y trouve des résidus de ce pesticide partout : dans l'environnement (eau, air, l'eau de pluie et de brouillard) et dans les produits alimentaires et de consommation (Tayade, 2013). Par conséquent, une exposition à cet insecticide peut conduire à des effets aigus sur la santé. Des études récentes ont montré que la lambda-cyhalothrine est un facteur de risque pour plusieurs pathologies telles que les cancers, l'infertilité, les troubles neurologiques et les maladies cardiovasculaires (Moser et al., 2016 ; Bossou et al., 2020).

De nos jours, la tendance à utiliser des produits naturels dérivés de plantes se développe pour répondre aux préoccupations concernant les effets secondaires des composés synthétiques qui sont nocifs non seulement pour la santé humaine mais aussi pour l'environnement. (Pan et al., 2009). Ainsi, d'après les estimations de l'organisation mondiale de la santé (OMS, 2013),

80% de la population mondiale eu recours principalement à la médecine traditionnelle. Les plantes médicinales sont considérées comme la source la plus potentielle de matières premières importantes pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires au développement futur de médicaments. (Celik et al., 2004). En effet, environ 170 000 molécules bioactives ont été identifiées à partir des plantes et les estimations indiquent que sur les 300 000 espèces végétales recensées, seules 15% d'entre elles sont utilisées à l'échelle mondiale comme remèdes traditionnels (Verpoorte, 2002). Ces plantes possèdent diverses molécules bioactives peu explorées. Par ailleurs, une grande part des recherches actuelles se focalisent sur les biomolécules antioxydantes naturelles qui agissent comme des capteurs de radicaux libres, produits quotidiennement par l'organisme. Les oxydants sont des composés très réactifs générant des espèces réactives de l'oxygène (ERO) touchant et perturbant des mécanismes vitaux. La surproduction de ces radicaux libres peut être néfaste pour l'organisme, vu qu'ils endommagent de nombreux composants cellulaires aussi divers telles que les protéines, les lipides et l'ADN, et par conséquent, induisant un état de stress oxydatif. Ce type de stress est le facteur potentialisant l'apparition des maladies plurifactorielles tels que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (Sergeant et al., 1998). Ces dernières années, de nombreux travaux de recherche s'orientent vers l'exploitation des métabolites secondaires à partir des plantes médicinales et plus particulièrement les polyphénols et ceci en vue de lutter contre le stress oxydant induit par les pesticides et à ses dégâts au niveau des organes de l'être vivant. Ces multiples composés phénoliques sont doués d'activités anti-oxydantes importantes, car ils peuvent arrêter les réactions radicalaires en piégeant les espèces réactives de l'oxygène (Halliwell, 1994). Du point de vue végétation, la Algérie est considérée parmi les pays connus pour sa grande diversité taxonomique vu sa position biogéographique privilégiée et son étendue entre la Méditerranée et l'Afrique subsaharienne. La flore algérienne est par conséquent potentiellement riche en plantes médicinales présentant une source des produits naturels. *Mélicca officinalis*, est une plante médicinale largement répandue dans l'Algérie et bien reconnue en médecine traditionnelle par ses propriétés pharmacologiques (Hussein et al., 2007).

Pour atteindre l'objectif de cette présente étude, nous allons examiner les données bibliographiques permettant une analyse plus poussée des travaux réalisés récemment afin de révéler l'état de l'art de la problématique posée dans cette étude. Ensuite, des méthodes expérimentales et les résultats sont présentés selon le plan suivant :

- Le premier chapitre consiste à des études phytochimiques et pharmacologiques d'un extrait méthanolique issu de *Mélissa officinalis* L. visant à déterminer sa composition et d'évaluer ses activités biologiques *in vitro*.
- Le second chapitre a pour objectif d'explorer les mécanismes *in vivo* de toxicité de Lambda-cyhalothrine au niveau du cerveau régional (Hippocampe, Cortex, et Striatum) et le rôle cytoprotecteur de l'extrait méthanolique de *Mélissa officinalis* L : Implication du processus oxydatifs et apoptotiques.

Enfin, le travail s'achève par une conclusion générale suivie par les perspectives envisagées. Les références bibliographiques sont présentées à la fin de ce document.

*Partie*  
*Bibliographique*

# *Chapitre I : Les Plantes Médicinales : Les Plantes à usages thérapeutiques*

## **I. Les Plantes Médicinales : Les Plantes à usages thérapeutiques**

### **I.1. Définition et utilisation**

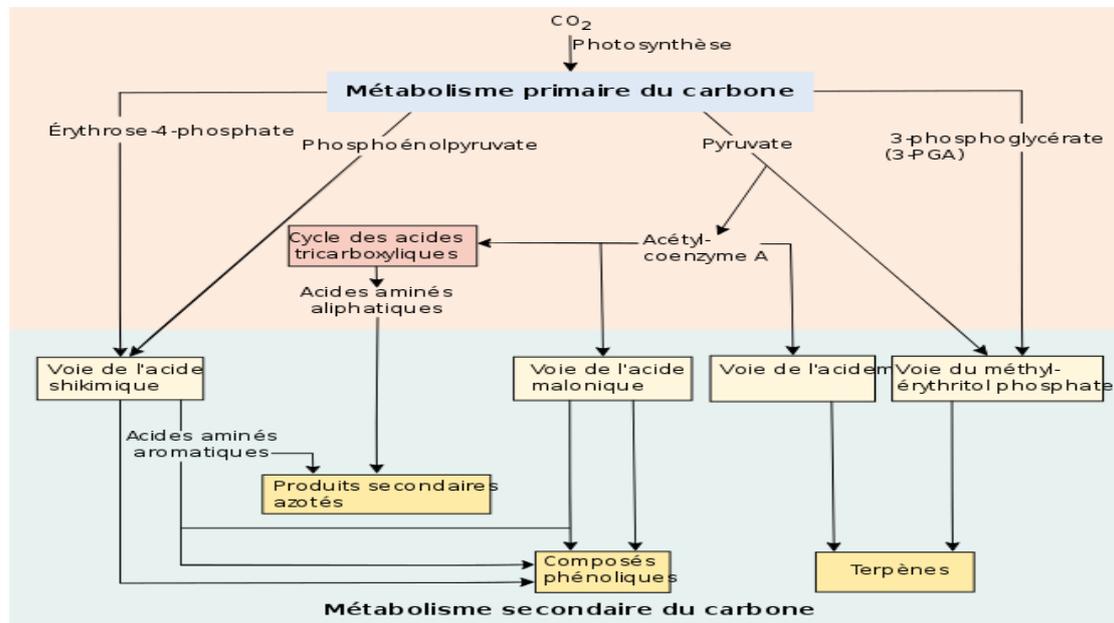
Les plantes médicinales réputées par leur action physiologique sont utilisées comme curatives sous forme de poudre, d'extraits, de teintures, d'infusion et/ou de décoctions. Elles constituent une source inépuisable de substances ayant des activités biologiques certaines tels que les polyphénols, les vitamines A, C et E, et contiennent une infinité de principes actifs dont la nature et les propriétés sont généralement peu connues et investies. Elles sont parfois récoltées à l'état sauvage et beaucoup d'entre elles sont cultivées à grande échelle (Digitale, Pavot, Chanvre, etc.). Les méthodes de sélection ou de manipulation génétiques sont également utilisées pour augmenter leur teneur en principes actifs. Certaines familles sont particulièrement riches en principes actifs (Papavéracées, Apocynacées, Liliacées, Rubiacées, Solanacées, Lamiacées), et d'autres sont inoffensives telles que le Tilleul, la Camomille, la Menthe, ... etc. (Tshisikhawe, 2002).

### **I.2. Métabolites secondaires (principes actifs) des plantes médicinales**

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protéides, lipides, acides nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires. Ces composés ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse, mais résultent de réactions chimiques ultérieures. Les métabolites secondaires sont présents dans toutes les plantes supérieures, et ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Plus de 200.000 structures ont été définies (Hartmann, 2007) et sont d'une variété structurale extraordinaire mais sont produits en faibles quantités. Ces molécules marquent de manière originale, une espèce, une famille ou un genre de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique.

Ces métabolites secondaires ont des fonctions très importantes pour la survie et la propagation des plantes qui les produisent, comme signaux chimiques, pour défendre leur producteur contre les herbivores et les pathogènes, comme ils participent à des réponses allélopathiques (compétition entre les plantes pour la germination et croissance). Certains assurent une protection contre les radiations solaires et d'autres facilitent la dispersion du pollen et des graines (Chimie, 2017). Les métabolites secondaires sont aussi très exploités par l'Homme dans les différents domaines : dans le domaine culinaires comme colorants et arômes, dans le domaine agricole comme herbicides et dans le domaine médical comme antibiotiques,

antioxydants, drogues ...etc. (France, 2012) (Krief & M, 2004). On peut classer les métabolites secondaires en trois grands groupes : les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine (Krief & M, 2004) (Gurib-Fakim, 2006).



**Figure 01 :** Voies du métabolisme secondaire des plantes qui produisent les trois types généraux de composés secondaires : produits azotés, composés phénoliques et terpénoïdes. La relation avec le métabolisme primaire est également indiquée (Taiz & Eduardo, 2006).

### I.3. Les composés phénoliques : un exemple de métabolites secondaires d'importance pharmacothérapeutique

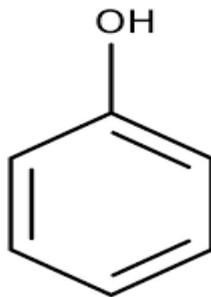
#### IV.3.1. Définition

Les composés phénoliques ou les polyphénols constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. Ce sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance, ou la reproduction (Yusuf, 2006). Les polyphénols sont des produits de la condensation de molécules d'acétylcoenzyme A et de phénylalanine. Cette biosynthèse a permis la formation d'une grande diversité de molécules qui sont spécifiques d'une espèce de plante, d'un organe ou d'un tissu particulier (Nkhili, 2009). Elles sont largement distribuées et comportent au moins 9000 structures différentes (Hall, 1998). Ces corps jouent un rôle fondamental car ce sont des éléments importants de qualités sensorielles (couleur et caractères organoleptiques) et nutritionnelles des végétaux, tels que les légumes, les fruits, les céréales ou les fruits secs, ainsi

que dans les boissons, le café, le cacao ou le thé. Une alimentation équilibrée fournit quotidiennement à l'Homme environ un gramme de polyphénols, quantité 10 fois supérieur à celle de la vitamine C et 100 fois supérieur à celles des caroténoïdes ou de la vitamine E (Scalbert et al., 2005).

### I.3.2. Structure chimique

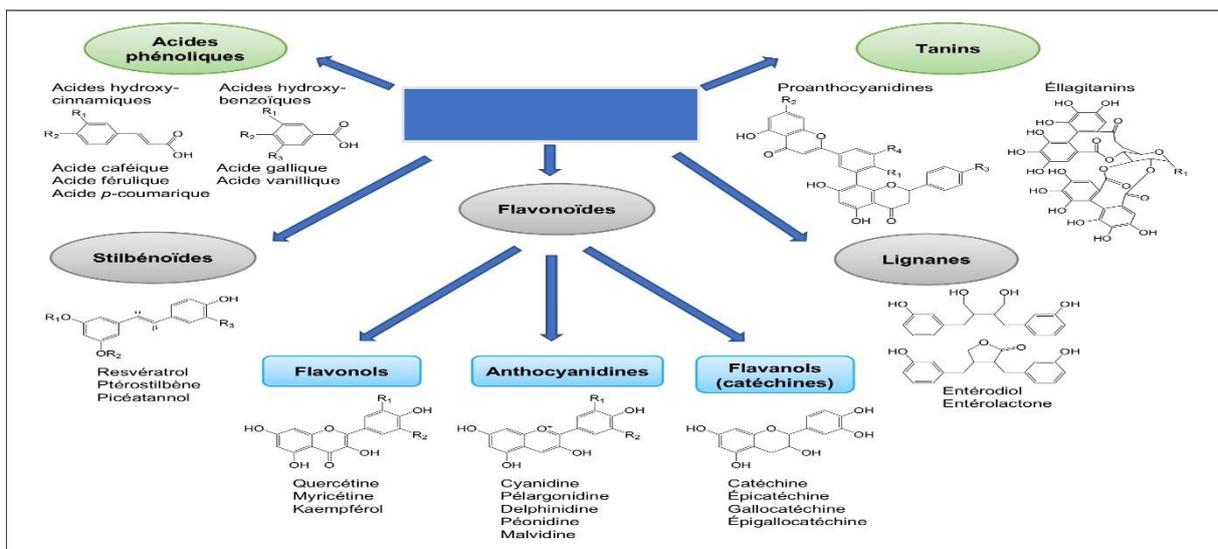
Tous les polyphénols présentent la même structure chimique, et sont caractérisés par un ou plusieurs noyaux aromatiques hydroxylés. Ils sont classés sous différents groupes en fonction du nombre de noyaux aromatiques qui les composent et des substitutions qui les relient (Ahlem, 2012).



**Figure 02 :** Le phénol, le plus simple des composés phénoliques (Ahlem, 2012).

### I.3.3. Classification des composés phénoliques

On distingue les acides phénoliques (phénols simples), les flavonoïdes, les lignanes, les stilbènes, les coumarines et les tannins (Boros et al., 2010).

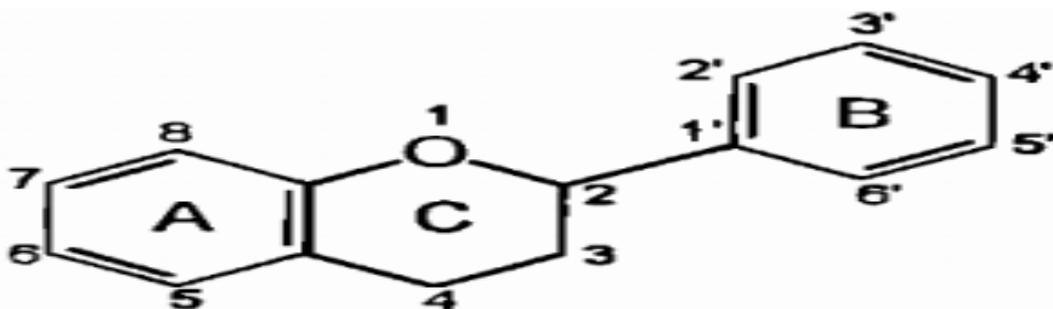


**Figure 03 :** Classification et structure chimique des composés phénoliques (Nile & Park, 2014).

### I.3.4 Les principaux composés phénoliques à meilleures activités biologiques

#### ❖ Les flavonoïdes

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres. Elles sont omniprésentes dans les fruits, les légumes, les graines, les boissons tels que le thé et le vin rouge et d'autres parties de la plante (Tsimogiannis & Oreopoulou, 2006). Elles sont considérées comme des pigments quasi universels des végétaux qui peuvent participer dans les processus photosynthétiques, dans la régulation des gènes, dans le métabolisme et dans la croissance (Havsteen, 2002). Actuellement, environ de 4000 composés flavoniques sont connus (Edenharder & Grünhage, 2003) et ont tous le même squelette de base à quinze atomes de carbones qui sont arrangés selon la configuration C6-C3-C6 de type phényl-2-benzopyrane ce qui est synonyme avec la structure 2-phényle chromane (Yao et al., 2004).



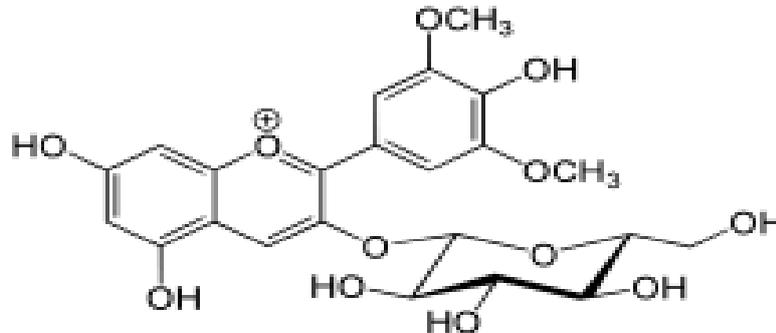
**Figure 04 :** Structure générale des flavonoïdes (Balasundram et al., 2006).

La nature chimique des flavonoïdes dépend de leur classe structurale, du degré d'hydroxylation et de méthylation, du degré de polymérisation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle C c'est-à-dire la présence : de double liaison C2-C3, du groupe 3-O et de la fonction 4-oxo (Yao et al., 2004)(Tsimogiannis & Oreopoulou, 2006). En se basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes : anthocyanidines ; flavonoles ; isoflavonoles ; flavones ; isoflavones ; flavanes ; isoflavanes ; flavanols ; isoflavanols ; flavanones ; isoflavanones ; aures (Havsteen, 2002).

#### ❖ Les anthocyanosides

Ce sont des pigments vacuolaires rouges, roses, mauves, pourpres, bleus ou violets de la plupart des fleurs et des fruits (Tzima et al., 2018). Ils sont caractérisés par l'engagement de

l'hydroxyle en position 3 dans une liaison hétérosidique (les anthocyanosides) (Figure 20). Leurs génines (les anthocyanidols) sont des dérivés du cation 2-phényl-benzopyrylium plus communément appelé cation flavylum. Ces pigments représentent des signaux visuels qui attirent les animaux pollinisateurs (insectes, oiseaux) (Brouillard et al., 1997).

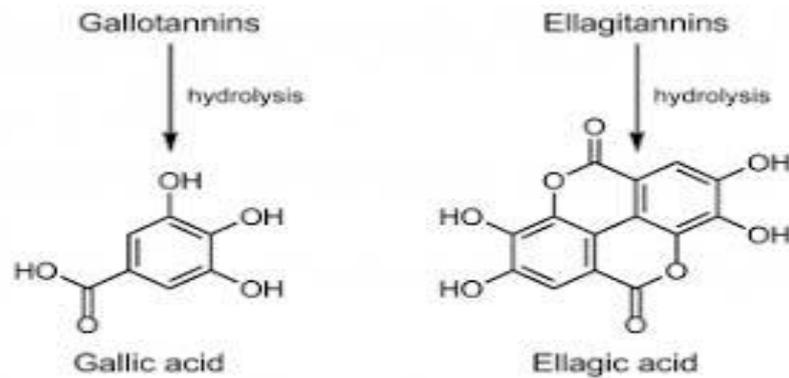


**Figure 05** : Structure des anthocyanosides (Balasundram et al., 2006).

#### ❖ Les Tanins

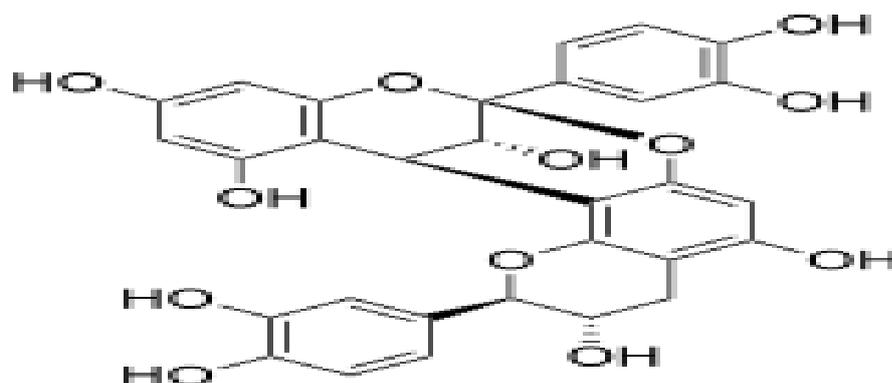
Cette classe désigne le nom général descriptif du groupe des substances phénoliques polymériques, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 kDa qui présente, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (Cowan, 1999). Les tanins sont caractérisés par une saveur astringente et sont trouvés dans toutes les parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines (Scalbert et al., 2005). On distingue deux groupes de tanins différents par leur structure et par leur origine biogénétique :

- **Tanins hydrolysables** : qui sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol. Le sucre est très généralement le D-glucose et l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des gallotannins soit l'acide ellagique dans le cas des tanins classiquement dénommés ellagitannins (Balasundram et al., 2006) (Cowan, 1999)



**Figure 06 :** Structure des tannins hydrolysables et les acides associés (Balasundram et al., 2006).

- **Tannins condensés ou tanins catechiques ou proanthocyanidols** : qui se diffèrent fondamentalement des tanins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Il s'agit des polymères flavoniques constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone. Les proanthocyanidols ont été isolés ou identifiés dans tous les groupes végétaux, Gymnospermes et Fougères (Jean BRUNETON 2015). En s'hydrolysant, les tanins condensés ne donnent pas de composés simples comme le glucose ou les acides phénols comme c'est le cas pour les tanins hydrolysables, mais plutôt des anthocyanidines (Balasundram et al., 2006).



**Figure 07 :** Structure du tanin condensé (Balasundram et al., 2006).

#### IV.3.5. Propriétés biologiques des polyphénols

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en général et les flavonoïdes en particulier sont très poussées, en raison de leurs diverses propriétés physiologiques, comme les activités antiallergique, anti-atherogénique, anti-inflammatoire, hépato-protective, antimicrobienne, antivirale, antibactérienne, anticarcinogénique, anti-thrombotique, cardioprotective et vasodilatatoire (Ksouri et al., 2008).

- **Activité antioxydante :** L'activité antioxydante des polyphénols assure une meilleure conservation des denrées alimentaires en empêchant la peroxydation lipidique. Dans l'industrie cosmétique, les composés phénoliques trouvent leur application pratique en luttant contre la production des radicaux libres néfastes pour la santé et la beauté de la peau (Hennebelle et al., 2004). La capacité antioxydante de plusieurs fruits est due à la présence de flavonoïdes, en fait, la plupart des constituants polyphénoliques montre un pouvoir antioxydant élevé en comparant avec d'autres antioxydants tels que la vitamine C, la vitamine E, et le  $\beta$ -carotène (Vinson et al., 1995). La consommation des composés phénoliques provoque une augmentation transitoire de la capacité antioxydante du plasma dans les heures qui suivent le repas. Parvenus au niveau des artères, ils préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (Low Density Lipoproteins ou LDL). En limitant leur incrustation dans les parois des artères (Ahlem, 2012).
- **Effets antithrombotique et vasodilatatoires :** Les polyphénols agissant en inhibant l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose qui peut conduire à l'occlusion des artères (Scalbert et al., 2005). Ils sont regroupés dans la catégorie de veinotoniques et des vasculo-protecteurs (Ghosh & Scheepens, 2009). Un certain nombre de molécules polyphénoliques sont utilisés en clinique, en tant qu'hypotenseurs (Martin & Andriantsitohaina, 2002). De nombreux travaux suggèrent que les polyphénols participent à la prévention des maladies cardiovasculaires (Scalbert et al., 2005).
- **Effet antiallergique :** Ces effets sont attribués à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que la phosphodiesterase et l'ATPase  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles. Par exemple, l'ATPase  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante dégrade l'ATP produisant ainsi de l'énergie afin de faciliter l'absorption du calcium par les membranes cellulaires, ce qui favorise la libération de l'histamine

stockée dans les vésicules. En inactivant cette enzyme, la quercétine a montré un potentiel d'action supérieur à celui du cromoglycate de sodium utilisé comme médicament en empêchant la libération de l'histamine et d'autres substances endogènes qui causent l'asthme (Nkhili, 2009).

- **Effet anti-inflammatoire** : Sous l'action de la cyclooxygénase et la lipoxygénase, l'acide arachidonique est métabolisé respectivement en prostaglandines et leucotriènes induisant ainsi des phénomènes inflammatoires. Des études récentes ont montré que certains polyphénols sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique dans les plaquettes. Les effets de la quercétine et de la myricétine sont dose-dépendants. A de fortes concentrations, ils inhibent la cyclooxygénase et la lipoxygénase. Cependant, à de faibles concentrations, seule la lipoxygénase est affectée. En revanche, d'autres flavonoïdes tels que l'apigénine et la chrysin agissent principalement sur l'activité de la cyclooxygénase (Nkhili, 2009).
- **Effet anti-ulcère** : Dans des expériences réalisées sur des rats, il a été démontré que la quercétine et la naringénine jouent un rôle important dans la réduction de l'ulcère et la protection des cellules gastriques. Il a été suggéré que la quercétine exerce son activité via un mécanisme complexe impliquant la production du mucus, le piégeage des radicaux libres et également l'inhibition de la production des leucotriènes. D'autres études ont permis d'établir une relation étroite entre les propriétés anti-ulcère de la quercétine, la naringénine, la rutine et le kaempférol, et la production de PAF (facteur d'activation des plaquettes) qui est un agent ulcérogène potentiel. En effet, il s'est avéré que la réduction des dommages gastro-intestinaux est due probablement à l'inhibition du PAF par ces flavonoïdes (Nkhili, 2009).
- **Effet anticancéreux** : La catéchine qui est présentée dans tous les types de thé et en particulier dans le thé vert, a montré une activité anti-tumorale. Une telle activité est attribuée à la capacité de ce flavonoïde à inactiver l'action de la P-glycoprotéine qui est impliquée dans la résistance phénotypique des cellules cancéreuses. Les flavonoïdes ont montré des effets protecteurs contre les cancers de la prostate, du côlon et du poumon (Nkhili, 2009).

## I.4. Les plantes médicinales en Algérie

Les plantes médicinales constituent des ressources précieuses pour la majorité des populations rurale et urbaine en Afrique et représentent le principal moyen par lequel les individus se soignent (BADIAGA, 2012). Malgré les progrès de la pharmacologie, l'usage thérapeutique des plantes médicinales est très présent dans certains pays du monde et surtout les pays en voie de développement (Tabuti et al., 2003). L'Algérie, par la richesse et la diversité de sa flore, constitue un véritable réservoir phylogénétique, avec environ 4000 espèces et sous-espèces de plantes vasculaires (Hamel et al., 2013). Cependant, la flore médicinale algérienne reste méconnue jusqu'à nos jours, car sur les quelques milliers d'espèces végétales, seules 146 sont dénombrées comme médicinales (Hamel et al., 2018).

## I.5. La *Melissa Officinalis* L : une espèce à pouvoir thérapeutique promoteur

### I.5.1. Classification

<b>Règne</b>	Végétal
<b>Ordre</b>	<i>Lamiales</i>
<b>Embranchement</b>	<i>Spermaphytes</i>
<b>Sous-embranchement</b>	<i>Angiospermes</i>
<b>Famille</b>	<i>Lamiacées</i>
<b>Classe</b>	<i>Eudicotylédones</i>
<b>Sous-classe</b>	<i>Astéridées,</i>
<b>Genre</b>	<i>Melissa</i>
<b>Espèce</b>	<i>Melissa officinalis</i>

(Sabah Chermat & Rachid Gharzouli, 2015).

On note trois espèces : *officinalis*, *inodora* et *altissima*. L'espèce *officinalis* est la plus utilisée en thérapeutique (Carnat et al., 1998).

Nom botanique : *Melissa officinalis* L (Figure 22).

Nom français : Mélisse officinale

Nom anglais : Lemon balm



**Figure 08 :** *Melissa officinalis* L.

### I.5.2 Description botanique

Très recherchée par les abeilles, le nom de la Mélisse officinale (*Melissa officinalis*) vient du grec *melissophullon* qui signifie « feuille à abeilles ». C'est une plante médicinale et aromatique (Kothe, 2007).

La Mélisse possède une tige carrée mesurant le plus souvent entre 30 et 80 centimètres de haut, ramifiée, dressée et poussant en touffes (Figure 13) (Thoby, 2009).

C'est une plante également herbacée vivace de la famille des *Lamiacées* avec des feuilles à l'odeur et la saveur citronnées (Kothe, 2007).

Le fruit est un tétrakène contenant de petites graines brunes, foncées et luisantes.

La *Mélisse officinale* peut parfois, notamment si elle est cueillie à l'état sauvage, être confondue avec d'autres plantes (Wichl et Anton, 2003 ; Babulka, 2005).



**Figure 09** : Feuilles et fleurs de Mélissa

### I.5.3. Composition chimique et usages thérapeutiques

Les études phytochimiques préliminaires rapportées à cette espèce ont montré la richesse de ces plantes en substances chimiques biologiquement actives incluant la Mélissa, d'acides phénoliques et de flavonoïdes. L'acide caféique, l'acide catrarique, l'acide rosmarinique sont les principaux composés antioxydants qu'ils contiennent (Ziaková & Brandšteterová, 2003 ; Capecka et al., 2005). Les préparations dérivées de la partie aérienne de *Melissa officinalis* L sont souvent utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement de la fièvre et du rhume, l'indigestion associée à la tension nerveuse, l'hyperthyroïdie, la dépression, l'insomnie légère, l'épilepsie, les maux de tête, les maux de dents, les flatulences, les coliques, les nausées, la nervosité, anémie, vertiges, syncope, malaise, asthme, bronchite, aménorrhée, insuffisance cardiaque, arythmies, dépression, psychose, hystérie, ulcères, plaies, entre autres (BOUNIHI, 2016). Les extraits de *Melissa officinalis* L ont été utilisés pour ses propriétés sédatives, carminatives, antispasmodiques et anticancéreuses (Guginski et al., 2009 ; Sepand et al., 2013). L'extrait de *Melissa officinalis* L a montré des effets anti-prolifératifs sur diverses lignées de cellules tumorales, Aussi anti-inflammatoire et anti-apoptotique (Soodi et al., 2016).

La pollution par les pesticides pose à l'échelle mondiale un problème de santé publique non seulement pour les utilisateurs qui sont les plus exposés, mais également pour la population générale. Divers médicaments sont utilisés pour lutter contre les effets toxiques des pesticides, mais l'utilisation accrue de ces médicaments présente des effets néfastes. A cet égard, nous avons signalé ces dernières décennies un recours en hausse à la phytothérapie pour gérer les complications de la pollution par les pesticides.

# *Chapitre II : Pesticides*

## II. Les pesticides : l'épidémie silencieuse

### II.1. Historique des pesticides

Les pesticides appelés aussi produits phytosanitaires ou produits phytopharmaceutiques sont des produits chimiques organiques ou minéraux constitués d'un ou de plusieurs substances actives et de composés supplémentaires comme les diluants ou adjuvants (Tayade, 2013). L'étymologie du mot pesticide provient de l'anglais « pest » qui signifie animal, insecte ou plante nuisible et du suffixe « -cide » que l'on trouve dans le verbe latin « caedo, cadere » et qui signifie « tuer ». Ce terme de pesticide regroupe donc toutes les substances destinées à lutter contre les organismes jugés indésirables.

Avant la seconde Guerre Mondiale, les pesticides employés en agriculture étaient des dérivés de composés minéraux ou de plantes : arsenic, cuivre, zinc, manganèse, plomb, pyrèthre, roténone ou sulfate de nicotine ... (Štajn et al., 1997). Dès le XIXe siècle, l'essor de l'industrie chimique a conduit à l'apparition de très nombreuses molécules dites pesticides de synthèse (plus d'un millier ont été à ce jour homologuées) et à un accroissement notable de leurs usages industriels. De manière globale, au niveau mondial, la consommation de pesticides a doublé tous les dix ans entre 1945 et 1985. A cause de la croissance démographique, la nécessité d'accroître les rendements des cultures pour répondre aux besoins alimentaires accrus, ce qui incite à accroître l'utilisation des pesticides de toutes les catégories.

### II.2. Classification des pesticides

Les pesticides disponibles aujourd'hui sur le marché sont caractérisés par une telle variété de structure chimique, de groupes fonctionnels et d'activité que leur classification est assez complexe. D'une manière générale, il existe de nombreuses façons de classer les pesticides (Kojima et al., 2004). La plus simple et la plus globale d'entre elles consiste à les distinguer en fonction de leur cible en grandes catégories : les herbicides, les fongicides et les insecticides. À celles-ci s'ajoutent des produits divers tels que les acaricides (contre les acariens), les nématicides (contre les nématodes), les rodenticides (contre les rongeurs), les taupicides (contre les taupes), les molluscicides (contre les limaces et les escargots essentiellement), les corvicides et les corvifuges (contre les oiseaux ravageurs de culture et surtout les corbeaux) et enfin les répulsifs. Sur le plan chimique, certains pesticides se caractérisent par la présence de molécules halogénées comme le chlore ou le brome, d'autres comportent des groupes fonctionnels oxygénés, azotés, phosphorés, autant de caractéristiques qui définissent leurs capacités de réaction, de métabolisation et d'élimination. Les modes d'action tout comme les caractéristiques chimiques, sont nombreux et divers, et fréquemment

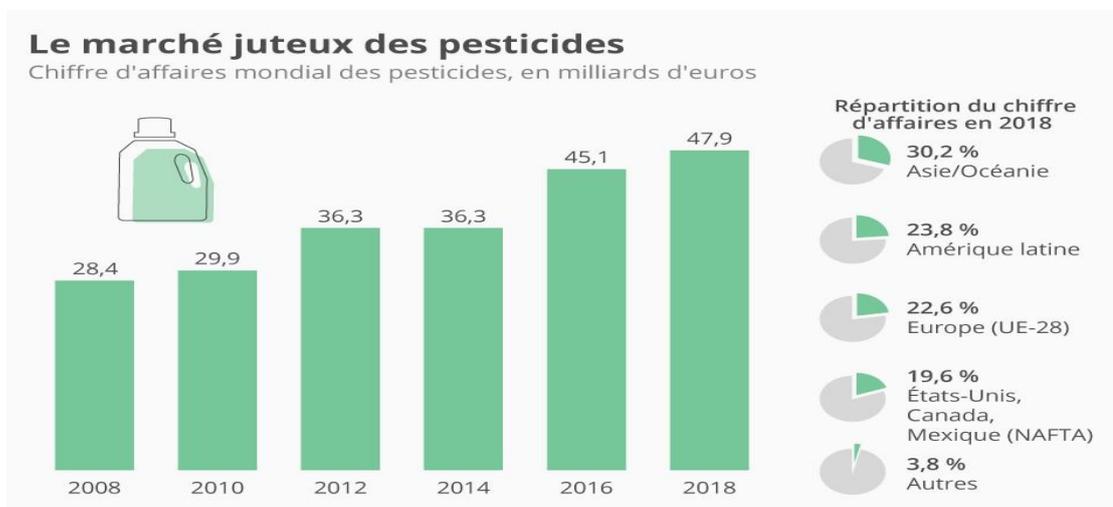
multiples pour une même substance. C'est pourquoi il n'existe pas de classification universelle et consensuelle des pesticides. Le tableau 1 présente néanmoins les grands groupes de pesticides couramment utilisés et les principales familles chimiques au sein de ces groupes.

**Tableau 01** : Quelques familles chimiques de pesticides et leurs cibles principales (INSERM. 2013)

<b>Familles chimiques</b>	<b>Exemples de substances actives</b>	<b>Classement selon cible</b>
Organochlorés	DDT, Chlordane, Lindane, Dieldrine, Heptachlore	Insecticides
Organophosphorés	Malathion, Parathion, Chlorpyrifos, Diazinon	Insecticides
Pyréthroïdes	Perméthrine, Deltaméthrine, Lambda-cyhalothrine	Insecticides
Carbamates	Aldicarbe, Carbaryl, Carbofuran, Méthomyl	Insecticides
	Asulame, Diallate, Terbucarbe, Triallate	Herbicides
	Benthiavalicarbe	Fongicides
Dithiocarbamates	Mancozèbe, Manèbe, Thirame, Zinèbe	Fongicides
Phtalimides	Folpel, Captane, Captafol	Fongicides
Triazines	Atrazine, Simazine, Terbutylazine	Herbicides
Phénoxyherbicides	MCPA, 2,4-D, 2,4,5-T	Herbicides
Chloroacétamides	Alachlore, Métolachlore	Herbicides
Pyridines-bipyridiliums	Paraquat, Diquat	Herbicides
Aminophosphonates	Glycine Glyphosate	Herbicides

### II.3. Répartition quantitative des pesticides dans le monde

Les quantités de pesticides utilisées dans le monde augmentent régulièrement depuis plus de soixante ans. Elles semblent diminuer dans certains pays d'Europe, mais à dose ou poids égal, les matières actives d'aujourd'hui sont généralement beaucoup plus efficaces que celles des décennies précédentes. Les molécules commercialisées évoluent, pour contourner les résistances (des insectes, champignons ou végétaux), et pour remplacer des produits interdits en raison de leur toxicité, ou quand des molécules à priori intéressantes viennent en remplacer d'autres. Le marché mondial des pesticides s'élève à 26.1 milliards euros annuels, dont près d'un tiers pour l'Europe et environ 25 % pour l'Amérique du Nord ainsi que pour l'Asie.



**Figure 10 :** Quantité des pesticides vendus en 2018 dans le monde  
(<https://fr.statista.com/infographie/11599/chiffre-affaires-pesticides-produits-phytosanitaires-dans-le-monde-et-par-region/>)

En Algérie, nous avons réparti les pesticides utilisés par type de ravageurs ou de maladies ayant fait l'objet des divers traitements. Même si une diminution drastique est constatée dans le recours aux insecticides sur les 3 campagnes prospectées à travers le territoire national, ils restent néanmoins les plus utilisés, les fongicides viennent en seconde, les herbicides en troisième position et les divers en dernier (Tableau 2).

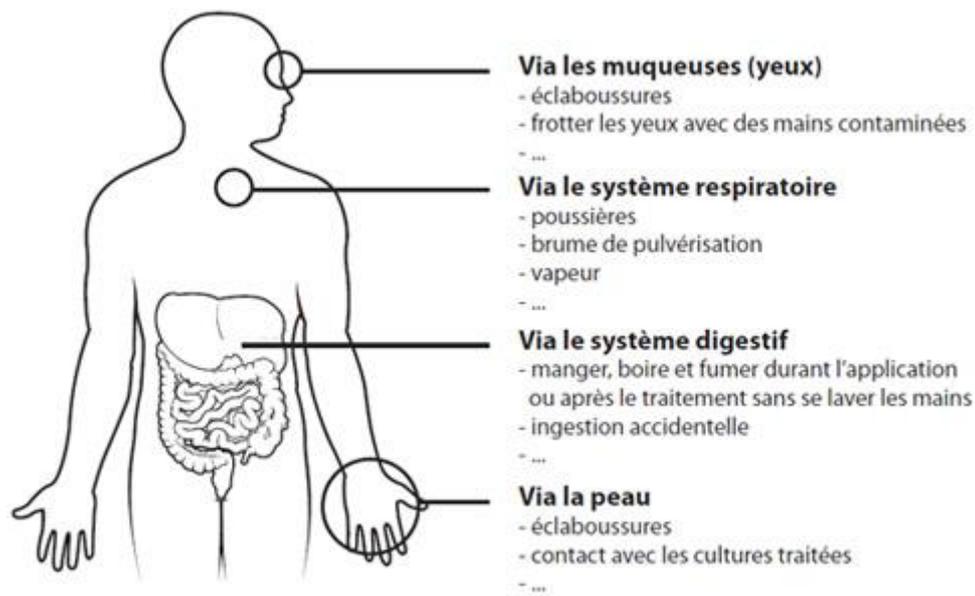
**Tableau 2** : fréquences par type de pesticides utilisés durant les campagnes 2008,2009 et 2010 en Algérie KHEDDAM-BENADJAL, N. (2012).

<b>Pesticides</b>	<b>Campagne 2008</b>	<b>Campagne 2009</b>	<b>Campagne 2010</b>
Insecticides	23	28	39
Insecticides biologiques	02	08	11
Fongicides	09	07	48
Herbicides	0	10	07
Nématicides	0	03	03
Divers	0	05	1
<b>Total</b>	<b>34</b>	<b>81</b>	<b>109</b>

#### II.4. Destinés des pesticides dans l'environnement

Les pesticides sont essentiellement libérés dans l'environnement sous l'effet d'activités anthropiques agricoles. Une fois dans l'environnement, certains groupes de pesticides se dégradent relativement rapidement, alors que d'autres qui persistent plus longtemps, peuvent s'y accumuler ou se transformer en contaminants. En plus de se disperser au niveau du sol par ruissellement ou percolation, les pesticides sont transportés par les précipitations et/ou par le vent. De ce fait, les pesticides ont été depuis près d'une cinquantaine d'années mis en évidence dans tous les compartiments environnementaux qui n'ont subi aucun traitement. Les pesticides et leurs dérivés pourraient être retrouvés dans les eaux de rivières, les nappes phréatiques, l'air, les eaux de pluie, mais aussi dans les fruits, les légumes, les céréales et les produits d'origine animale. Plus de 2, 5 millions de tonnes de pesticides sont appliquées chaque année sur les cultures dans le monde, dont 0,3%-0.5% seulement sont réellement efficaces sur les organismes cibles, et 99,5% de ces substances polluent directement l'environnement (Yekeen et al., 2016) Il existe plusieurs causes de contaminations par les pesticides à savoir le lessivage par des pluies entraînant les produits phytosanitaires vers les eaux superficielles et souterraines, l'usage incorrect des substances et des techniques (mauvais réglage des pulvérisateurs, doses excessives), les déversements "accidentels" (rinçage ou abandon d'emballages ayant contenu des produits phytosanitaires).





**Figure 12 :** Les principales voies d'exposition aux pesticides  
 (<https://www.crphyto.be/agriculteurs/bonnes-pratiques/3-bonnes-pratiques-pendant-la-preparation-du-traitement>)

## II.6. Qui est plus particulièrement exposé aux pesticides ?

- **Les enfants**

Plusieurs études concluent que les enfants sont plus vulnérables aux pesticides que les adultes, en effet les enfants sont susceptibles d'être exposés de façon plus importante aux pesticides que les adultes en raison des caractéristiques propres de leur physiologie, et absorbent davantage de pesticides par kilogramme de poids corporel, de plus leur comportement exploratoire les porte à voir, toucher sentir et parfois même goûter tout ce qui leur tombe des mains.

- **Les agriculteurs**

Les agriculteurs utilisent parfois des doses largement supérieures à ce qui était autrefois nécessaire. Certains produits sont normalement interdits, mais utilisés par dérogation. Les produits en cause sont par ordre d'importance, les fongicides (32 % des cas), les insecticides (30 %) et les herbicides (19 % des cas). 13% des agriculteurs recensés dans une banque de données spécialisée indiquent avoir été hospitalisés après une utilisation de pesticides et 27% d'entre eux ont dû avoir un arrêt de travail. L'OMS estime à 1 000 000 le nombre d'empoisonnements dans le monde et à 20 000 les décès qui s'en suivent. En septembre

2001, environ 500 paysans qui travaillaient dans des champs de coton, en Inde, sont morts suite à une forte exposition aux pesticides et à une mauvaise protection (Ahmad et al., 2008).

- **Les citoyens**

Multiplés études rétrospectives ont montré que les personnes qui habitent à proximité de vergers, traités ont un taux élevé de pesticides dans leurs urines, alors qu'ils ne sont pas allés sur les zones agricoles et n'ont pas été en contact avec les fruits traités (Nathalie, 2010). On peut donc en conclure que la contamination s'est effectuée par l'air, via les poumons, et/ou la peau. Sachant que les pesticides circulent dans l'atmosphère, quelle que soit la zone de résidence, il est impossible de s'y soustraire. Ainsi, par la respiration les pesticides en suspension dans l'air pénètrent dans les poumons. Même si on ne sait pas encore évaluer la part des pesticides inhalés par chacun, la présence chronique de faibles doses dans l'atmosphère concerne tout le monde (Baldi et Lebailly, 2007).

- **Les femmes enceintes et leur fœtus**

Certaines études soulèvent la possibilité qu'il y est un lien entre l'exposition des femmes enceintes, et parfois de leurs conjoints à certains pesticides d'usage courant et la survenue d'anomalies congénitales ou l'augmentation du nombre de mort-nés. Des récentes études ont montré qu'on peut trouver des résidus de certains pesticides organochlorés dans le sperme d'utilisateur professionnel, ce qui pourrait augmenter de façon significative l'indice d'avortement spontané chez leur conjointe.

***Chapitre III : Les  
pyréthrinoïdes de synthèse :  
nouvelle génération de  
pesticides***

### III. Les pyréthriinoïdes de synthèse : nouvelle génération de pesticides

#### III. 1. Définition

Les pyréthriinoïdes, sont des insecticides de synthèse ayant un noyau structural similaire à celui des pyréthrines, des dérivées de la plante *Chrysanthemum cinerariaefolium* qui est abondamment cultivée en Afrique mais qui, en général, se dégradent moins rapidement dans l'environnement et maintiennent donc leur efficacité pendant une période de temps accrue. Le premier pyréthriinoïde à avoir été commercialisé à titre d'insecticide a été l'alléthrine (Casida, 1980). L'alléthrine a été synthétisée en 1949 (Schechter et al., 1949) alors que les pyréthrines étaient plus difficilement accessibles à cause de la guerre. Au cours des années 1960-1970, d'autres pyréthriinoïdes ont été développés dont la perméthrine, la cyperméthrine, la dècaméthrine et le fenvalérate (Casida, 1980) Ces quatre pyréthriinoïdes étaient les premiers à pouvoir être utilisés en agriculture et en santé publique parce qu'ils étaient plus résistants à la photodégradation. Depuis, de nombreuses autres molécules ont été synthétisées et l'utilisation des pyréthriinoïdes n'a fait que s'accroître, ainsi que le potentiel d'exposition humaine.

#### III.2. Structure chimique

Les pyréthriinoïdes ont des centres chiraux et des liens doubles qui entraînent la présence de plusieurs conformères. La spécificité isomérique des pyréthriinoïdes utilisés diffère d'une substance active à l'autre et différentes combinaisons d'isomères (formulations) sont possibles pour une même substance active. Par exemple, il est possible de trouver sur le marché de la d-cis,trans-alléthrine, de la d-trans-alléthrine et de l'alléthrine (un mélange de 8 stéréoisomères). La perméthrine et la cyperméthrine, pour ne nommer que les plus importants, se retrouvent habituellement dans un ratio cis/trans d'environ 40/60, mais ce ratio peut différer selon la formulation (Figure 5). La forme isomérique (cis vs trans), tout comme la présence d'un nitrile en position C $\alpha$ , influencent l'efficacité, le type d'effets produits et la biotransformation de ces molécules. La présence ou l'absence de groupement nitrile en C $\alpha$  est d'ailleurs un des critères utilisés par (Complex, 1983) pour diviser les pyréthriinoïdes en deux types distincts. Le type I est attribué à un pyréthriinoïde qui n'a pas de groupement nitrile en C $\alpha$ , alors que si le pyréthriinoïde porte un nitrile en C $\alpha$ , il sera de type II. Bien qu'utile conceptuellement, la classification en type I ou II est loin d'être parfaite, surtout pour les nouvelles molécules qui sont plus complexes et dont les effets in vivo ne sont pas toujours reliés à la structure chimique.

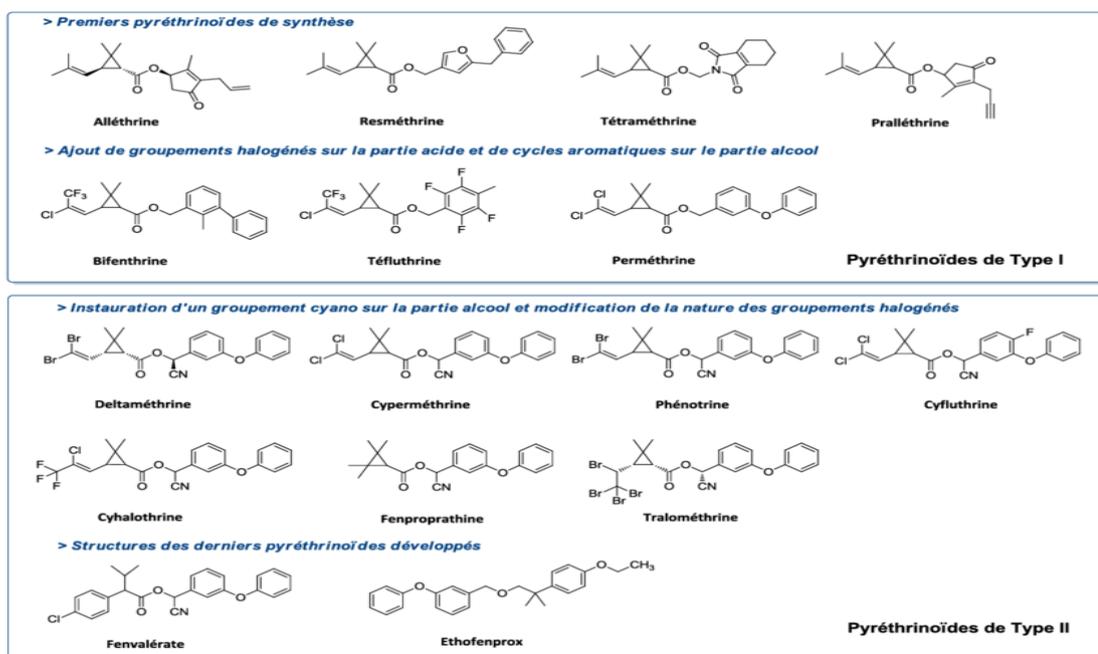


Figure 13 : Evolution structurale des pyréthrinoïdes de synthèse (Song, 2013)

### III.3. La lambda-cyhalothrine (pyréthrinoïdes de synthèse) : un exemple d'étude

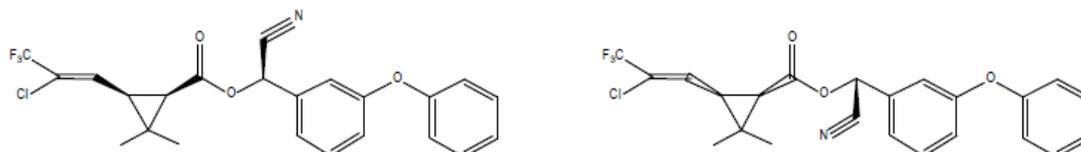
#### III.3.1. Définition et utilisation

La lambda-cyhalothrine (LCT) est un pyréthrinoïde de deuxième génération. La lambda-cyhalothrine est un produit chimique destiné à lutter contre les parasites animaux et végétaux nuisibles aux cultures : ce sont des substances capables soit de tuer, soit de repousser les ravageurs. C'est donc un produit **toxique et dangereux** pour les hommes et pour l'environnement. **Il faut respecter les dosages et l'usage** (l'action de se servir de quelque chose) pour lequel le produit est homologué. Ces insecticides lipophiles sont appliqués en remplaçant des organophosphorés, en raison de leur plus faible volatilité et leur inactivation métabolique rapide.

Un pesticide est composé de plusieurs substances :

- Une (ou plusieurs) **matière active**. C'est la matière active qui donne au pesticide un effet toxique. Les propriétés d'un pesticide découlent pour l'essentiel de sa matière active. Cette fiche présente la matière active appelée **LAMBDA-CYHALOTHRINE**.
- Un diluant qui est une matière liquide (solvant) incorporé à une préparation et destiné à abaisser la concentration en matière active. Ce sont le plus souvent des huiles végétales.

- Des adjuvants qui sont des substances dépourvues d'activité biologique, mais susceptibles de faciliter l'utilisation de la matière active (Réseau National des Chambres d'Agriculture du Niger, 2013).



**Figure 14 :** Structure chimique de lambda-cyhalothrine (composée de deux paires d'énantiomères diastéréoisomériques) ((S)-  $\alpha$ -cyano-3-phénoxybenzyl (Z)-(1R,3R)-3-(2-chloro-3,3,3-trifluoroprop-1-ényl)-2,2-diméthylcyclopropanecarboxylate ; (R)-  $\alpha$ -cyano-3-phénoxybenzyl(Z)-(1S,3S)-3-(2-chloro-3,3,3-trifluoroprop-1-ényl)-2,2-diméthylcyclopropanecarboxylate ; numéro CAS 91465-08-6).

### III.3.2. Propriété physico-chimique

Les principales caractéristiques physiques et chimiques de lambda-cyhalothrine sont rapportées dans le tableau 3

**Tableau 03 :** Propriétés physico-chimiques de lambda-cyhalothrine (INERIS, 2011)

	Valeurs
<b>Formule moléculaire</b>	$C_{23}H_{19}ClF_3NO_3$
<b>Famille chimique</b>	Pyréthriinoïdes de synthèse de type II
<b>Poids moléculaire [g/mol]</b>	$449,85 \pm 0,023$
<b>Hydrosolubilité [mg/L]</b>	$4.10^{-3}$ à 20°C et pH 5 $5.10^{-3}$ à 20°C et pH 6.5 $4.10^{-3}$ à 20°C et pH 9.2
<b>Pression de vapeur [Pa]</b>	$2.10^{-7}$ à 20°C
<b>Constante de Henry [Pa.m<sup>3</sup>/mol]</b>	0.02 à 20°C
<b>Log du coefficient de partage Octanol-eau (log K<sub>ow</sub>)</b>	7
<b>Coefficient d'adsorption carbone organique (K<sub>oc</sub>) [L/kg]</b>	157 000 (valeur moyenne) 38 000-345 000
<b>Constante de dissociation (pK<sub>a</sub>)</b>	-

### III.3.3. Toxicocinétique de la lambda-cyhalothrine

La toxicocinétique s'attache à décrire et comprendre le devenir de la molécule au sein de l'organisme. La molécule va être absorbée, atteindre la circulation sanguine, être distribuée au sein des organes et transformée en métabolites par des enzymes. La molécule parente et les métabolites sont ensuite excrétés via les fèces ou les urines. L'ensemble de ces étapes correspondent au processus d'absorption, distribution, métabolisme et excrétion (ADME) de la molécule.

#### III.3.3.1. Absorption

Les pyréthrinoïdes de synthèse (PS) sont absorbées en milieu professionnel principalement rapidement par voie respiratoire (sous forme de poussières ou d'aérosols) mais aussi, pour une faible part, par voie cutanée (< 1 % de la dose appliquée) ; par voie digestive, entre 40 et 60 % de la dose sont absorbés.

Après administration par voie orale de lambda-cyhalothrine, le pic plasmatique est observé environ 3-6 heures après ingestion pour les deux métabolites (acide cis-3-(2-chloro-3,3,3-trifluoroprop-1-en-1-yl) -2,2-diméthylcyclopropanecarboxylique ou CFMP et 3-PBA), et leurs demi-vies plasmatiques sont de 6 et 8 heures respectivement. Après contact cutané, le pic plasmatique est atteint environ 4 à 10 heures après arrêt de l'exposition et leurs demi-vies plasmatiques sont de 7-8 heures pour le 3-PBA et 11 heures pour le CFMP (*Index des fiches par régions*, 2010). (Bossou et al., 2020) ont également estimés la biodisponibilité par voie orale de la lambda-cyhalothrine à  $67 \pm 9\%$  chez le rat. Bien que peu étudiée, l'absorption par inhalation serait aussi rapide et importante.

#### III.3.3.2. Distribution

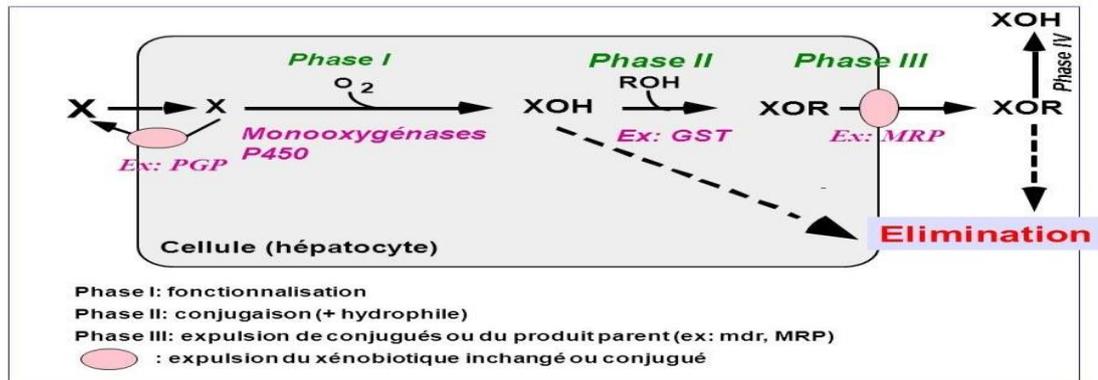
Une fois les xénobiotiques présents dans la circulation sanguine, ceux-ci sont distribués dans les divers tissus et organes, où ils vont exercer un effet (bénéfique ou délétère), être stockés ou être éliminés. Trois facteurs ont un impact important sur la distribution des xénobiotiques dans l'organisme : le débit sanguin de l'organe ou du tissu concerné, la capacité du xénobiotique à diffuser hors du sang vers les cellules de l'organe concerné et l'affinité des xénobiotiques pour les tissus ou organes. La forte vascularisation favorise l'arrivée rapide des xénobiotiques par voie sanguine dans certains organes (cerveau, viscères). L'affinité des xénobiotiques pour un tissu est influencée principalement par les caractéristiques physico-chimiques et la composition de ce tissu. Mais le transfert du xénobiotique du sang vers les tissus dépend également de l'efficacité des membranes biologiques à agir comme barrière. Ainsi certaines

barrières très efficaces comme la barrière hémato-encéphalique ou hémato-placentaire ne laissent passer que les composés très liposolubles. Le xénobiotique parvenu dans la circulation sanguine peut se lier plus ou moins fortement et de façon réversible aux protéines plasmatiques. Les molécules d'albumine, présentes en grande quantité dans le plasma, représentent un site de stockage qui peut être important pour certains xénobiotiques, et surtout pour les médicaments. La liaison aux protéines plasmatiques, bien que réversible, limite la distribution des substances en dehors du compartiment vasculaire vers d'autres tissus. D'autres facteurs plus dépendants de l'individu font varier la distribution du xénobiotique : l'âge, le taux d'hydratation, le rapport masse maigre/tissu adipeux, ou certains états physiopathologiques (état de choc, insuffisance cardiaque chronique, grands brûlés, état infectieux) (Bossou et al., 2020) (Zoumenou et al., 2015).

### III.3.3.3. Métabolisme

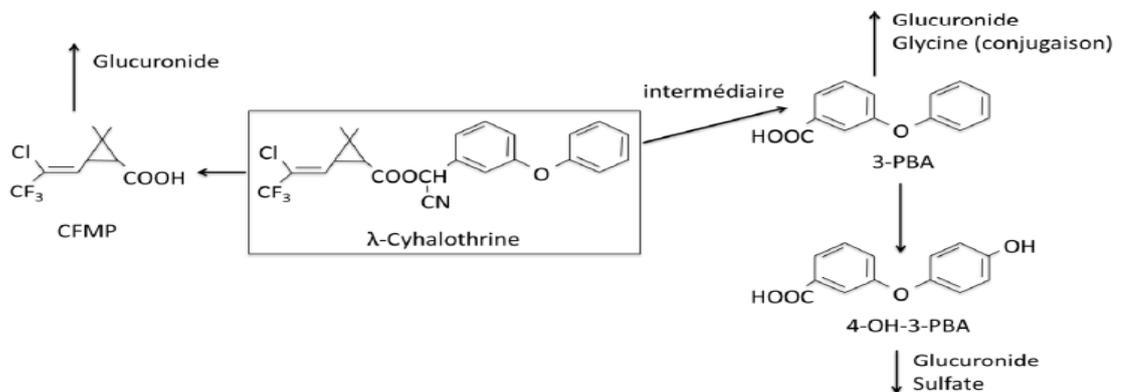
Le métabolisme correspond à la transformation de la molécule parente en un ou plusieurs autre(s) composé(s), appelé métabolite(s). La molécule parente peut être transformée en métabolites actifs (thérapeutique ou toxique) ou bien être détoxifiée lorsqu'elle est déjà active. La réaction métabolique est catalysée par des enzymes, tels que les cytochromes P450 (CYP) pour le métabolisme de phase I ou les sulfotransférases ou glutathion transférases pour le métabolisme de phase II (Version et al., 2020). Le métabolisme de phase II permet généralement d'aboutir à la formation de composés conjugués hydrosolubles facilement éliminés *via* les urines ou la bile, Cette excrétion des xénobiotiques à l'extérieur de la cellule, implique des protéines de transport ou d'efflux de phase III (P glycoprotéine et les Multidrug Resistance associated Proteins MRP) (**Figure 06**). En raison de la quantité d'enzymes présente dans les organes, le métabolisme a lieu de manière très importante dans le foie et plus faiblement dans les intestins, les poumons ou les reins (Bhardwaj et al., 2020). Le métabolisme aura un impact dès l'ingestion d'une molécule sur sa biodisponibilité, c'est-à-dire la fraction qui atteint

la circulation systémique, en raison du métabolisme intestinal et du premier passage hépatique, où sont présents transports actifs et enzymes.



**Figure 15 : Métabolisme des xénobiotiques MRP : Multidrug Resistance-associated Proteins ; PGP : P-glycoprotéine**

Dans le cas de lambda-cyhalothrine, cette molécule se scinde pour produire trois principaux métabolites, l'acide 3-phénoxybenzoïque (3-PBA), acide 3-(4 hydroxy) - phénoxybenzoïque (4OH-3PBA) et l'acide 3-(2-chloro-3,3,3-trifluoropropenyl) -2,2-diméthylcyclopropane carboxylique acid (CFMP) (**Figure 7**). Les métabolites générés ainsi sont alors conjugués et excrétés principalement dans l'urine au bout de quelques heures (Chakroborty et al., 2019).



**Figure 16 : Métabolisme de la Lambda-cyhalothrine chez les mammifères (Khemiri, n.d.)**

### III.3.3.4. Élimination

Ce phénomène correspond à l'élimination du composé (molécule parente et/ou métabolites) de l'organisme. Les voies d'élimination peuvent être la voie rénale, fécale, pulmonaire, ou s'effectuer par le biais de la sueur ou du lait maternel. Le rein reste cependant l'organe principal d'élimination. Comme pour le métabolisme, une clairance rénale du composé est déterminée, permettant de lier les concentrations sanguines et urinaires du composé. Près de

50 % de la dose administrée est éliminé sous forme de métabolites urinaires tandis que l'élimination fécale se situe entre 10 à 26 % de la dose absorbée (Aouey et al., 2017). Une étude chez le rat a montré que la lambda-cyhalothrine dans le plasma avait une demi-vie de 7 h suite à une injection intraveineuse et de 10 h après une administration orale (Martínez et al., 2018)(Khemiri et al., 2017).

### **III.4. Toxicité de la lambda-cyhalothrine**

#### **III.4.1. Neurotoxicité**

L'effet neurologique de la lambda-cyhalothrine a été étudié chez des rats mâles Long Evans à partir de tests de l'activité motrice. (Wolansky et al., 2006) ont étudié l'effet d'un mélange d'insecticide de type I et II afin de caractériser une relation dose- réponse de l'apparition des effets reliés à l'activité motrice. Il a aussi été documenté, qu'une dose de 3-10 mg/kg de lambda-cyhalothrine diminuait l'activité motrice de rats exposés de 50 – 60 % (Wolansky et al., 2006). La lambda-cyhalothrine ayant le groupe  $\alpha$ -cyano, présente les mêmes effets comportementaux que ceux des pyréthrinoïdes de type II, y compris de la salivation, des tremblements, ainsi que la diminution de l'activité motrice (D. Abbud Righi & Palermo-Neto, 2003) (Weiner et al., 2009) (Wolansky et al., 2006). Plusieurs études ont été menées chez différentes espèces animales. En particulier, (Weiner et al., 2009) ont documenté la toxicité aiguë d'un mélange de douze produits commerciaux de la famille des pyréthrinoïdes dont la lambda-cyhalothrine, suite à une exposition orale aiguë chez des rats Sprague-Dawley. Les rats ayant été exposés à une dose de 10-20 mg/kg de lambda-cyhalothrine présentaient des signes de salivation, d'altération de la fonction motrice, de la coordination et des tremblements (Weiner et al., 2009). De plus, l'étude de (Moser et al., 2016) a confirmé aussi l'observation de tremblements chez 7 les rats exposés par voie orale à des doses élevées de chaque isomère de la cyhalothrine, soit 6 mg/kg pc pour la lambda-cyhalothrine et 3 mg/kg pc pour la gamma-cyhalothrine. La salivation a été observée chez les groupes de rats exposés à des doses inférieures à 3mg/kg pc. Par ailleurs, cette étude a montré une corrélation entre les concentrations de la lambda-cyhalothrine dans le plasma et les tissus et la diminution de l'activité motrice (Moser et al., 2016). Cependant, des études récentes ont montré un effet inverse des pyréthrinoïdes sur le neurodéveloppement. En plus des effets neurotrophiques, il a été rapporté que les pyréthrinoïdes augmentaient la densité et la longueur de la colonne vertébrale.

### **III.4.2. Les effets sur la consommation d'aliments et de l'eau**

Il a été observé que l'exposition par ingestion à la lambda-cyhalothrine chez des rats induisait une nette diminution de la consommation alimentaire, de la consommation d'eau et du poids corporel. Des résultats similaires ont été obtenus chez les animaux exposés à différents composés pyréthrinoïdes comme la deltaméthrine et le fenvalérate (Kilian et al., 2007).

### **III.4.3. Stress oxydant**

La lambda-cyhalothrine, comme la majorité des pyréthrinoïdes, est une molécule hydrophobe. Cela suggère que son action sur les membranes biologiques pourrait être liée avec des altérations des protéines et des phospholipides (Michelangeli et al., 1990). Des études récentes indiquent l'implication du stress oxydatif comme mécanisme de toxicité des pyréthrinoïdes de synthèse de type II dans divers tissus de rats (Fetoui et al., 2008) (Sankar et al., 2012). En effet, la lambda-cyhalothrine semble s'accumuler dans les membranes biologiques et cause des dommages oxydatifs (Michelangeli et al., 1990). De plus, des indicateurs spécifiques de ce type de dommage ont été rapportés, tels que l'augmentation des concentrations des espèces réactives oxygénées au niveau du foie ainsi que la peroxydation des lipides. Ces effets ont été observés 60 jours après une exposition quotidienne répétée chez des rats (Aouey et al., 2017). Cette étude suggère que la lambda-cyhalothrine ou ses métabolites induisent des dommages cytotoxiques au niveau des hépatocytes. De plus, ces résultats ont montré une corrélation significative entre les niveaux de métabolites de la lambda-cyhalothrine et d'espèces réactives oxygénées ainsi que de la peroxydation des lipides chez les rats exposés.

### **III.4.4. Les effets sanguins**

Par ailleurs, les recherches de (Fetoui et al., 2008) ont montré des modifications des paramètres hématologiques chez rats exposés à la lambda-cyhalothrine (une diminution des hématies, avec un développement d'une anémie). Ces résultats confirment ceux d'études antérieures sur des rats exposés à d'autres pyréthrinoïdes, tels que l'alpha-cyperméthrine (Manna et al., 2005). Dans une étude menée chez des lapins, il a également été rapporté que la lambda-cyhalothrine peut induire une diminution du compte de globules rouges et blancs et de la concentration d'hémoglobine et de lymphocytes dans le sang (Basir et al., 2011).

### III.4.5. Effets rénaux

Les dommages oxydatifs aux reins qui se manifestent par la formation d'espèces radicalaires superoxyde azotées, telles que le peroxydinitrite, le monoxyde d'azote et le radical hydroxyle (OH), et sont générés par les produits de dégradation de la lambda-cyhalothrine (Kale et al., 1999). Ces radicaux attaquent la membrane cellulaire et la déstabilisent à la suite de la peroxydation lipidique (Štajn et al., 1997). L'étude de (Fetoui et al., 2010) a d'ailleurs montré une diminution significative de l'activité enzymatique (catalase, superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, glutathion réductase et glutathion S-transférase) au niveau des tissus rénaux, ce qui indique une atteinte rénale. Des études histopathologiques ont aussi montré que la lambda-cyhalothrine induisait de multiples foyers d'hémorragie, une dilatation tubulaire au niveau du tubule proximal, une desquamation des cellules tubulaires, une infiltration de cellules inflammatoires et un gonflement des tubules dans le rein (Fortin et al., 2009).

### III.4.6. Toxicité hépatique

En plus des effets rénaux, plusieurs études ont montré la relation entre l'exposition à des insecticides pyréthrinoïdes et les dommages au niveau du foie, étant donné que ce dernier est le site de métabolisme de tous les pesticides (Martínez et al., 2018) et al., 2013; Giray et al., 2001). On enregistre au niveau de ce tissu une concentration importante de métabolites des pesticides (Fetoui et al., 2010). Plusieurs enzymes sont impliquées dans le processus de défense des cellules contre les radicaux libres, telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx) et la peroxydase (A Abbassy, 2014)(Fetoui et al., 2010). L'étude de (Aouey et al., 2017) a montré que l'accumulation, dans les tissus hépatiques, des métabolites de la lambda-cyhalothrine (CFMP et 3 -PBA) était fortement corrélée aux dommages au niveau des hépatocytes (Aouey et al., 2019) (Takasaki et al., 2013) (Matsuya et al., 2012).

### III.4.7. Immunotoxicité

Des études animales ont rapporté des effets immunologiques de la lambda-cyhalothrine chez des rats albinos Wistar exposés à une dose de 10 mg/kg pc. Plusieurs tests ont été effectués pour documenter l'immunotoxicité, tels que les tests d'hémagglutination et l'estimation de la globuline. Des corrélations significatives ( $p < 0.05$ ) ont été obtenues entre l'exposition à la lambda-cyhalothrine et l'inhibition des concentrations de protéines sériques, telles que l'hémolysine et la gamma-globuline (Ibrahim, 2016). L'expérience in vitro de (Muranli, 2013)

a également montré que la lambda-cyhalothrine et l'alpha cyperméthrine causaient des effets cytotoxiques sur des cultures humaines de lymphocytes. Les résultats montrent des changements des taux sériques de lymphocytes ainsi qu'une apoptose significative à des concentrations de 15 et 30  $\mu$ M. Une diminution de la phagocytose par les macrophages a aussi été observée chez des rats 10 exposés à trois doses de cyhalothrine (0,6, 1 et 3 mg/kg/jour) durant 7 jours (Q. Zhang et al., 2010).

#### **III.4.8. Effets endocriniens**

Des résultats ont montré des effets toxiques sur le système immunitaire, y compris les maladies auto-immunes, des allergies et des défauts de régulations immunitaires (Chalubinski & Kowalski, 2006). Certains pyréthrinoïdes de synthèse peuvent induire un dysfonctionnement de l'hormone thyroïdienne, de la testostérone, et de la régulation des androgènes (Akhtar et al., 1996). En ce qui concerne la lambda-cyhalothrine spécifiquement, il a été démontré qu'elle pourrait agir sur le système endocrinien (Riederer et al., 2008) (D. A. Righi et al., 2009) (D. Abbud Righi & Palermo-Neto, 2003).

Des chercheurs ont testé 200 pesticides, dont plusieurs pyréthrinoïdes de synthèses comme la cyhalothrine, pour étudier l'effet antagonisme de deux sous-types d'œstrogènes humains par dosage du gène rapporteur, en utilisant des cellules ovariennes (Kojima et al., 2004). Par ailleurs, (Akhtar et al., 1996) ont indiqué que la lambda-cyhalothrine perturbait le système endocrinien des mammifères et diminuait les taux de la triiodothyronine sériques (T3) et de la thyroxine (T4), ainsi que le rapport de T4 à T3 chez le rat. Cependant, les connaissances actuelles sur les activités oestrogéniques de la lambda-cyhalothrine, et en particulier sur les mécanismes d'action, sont peu nombreuses.

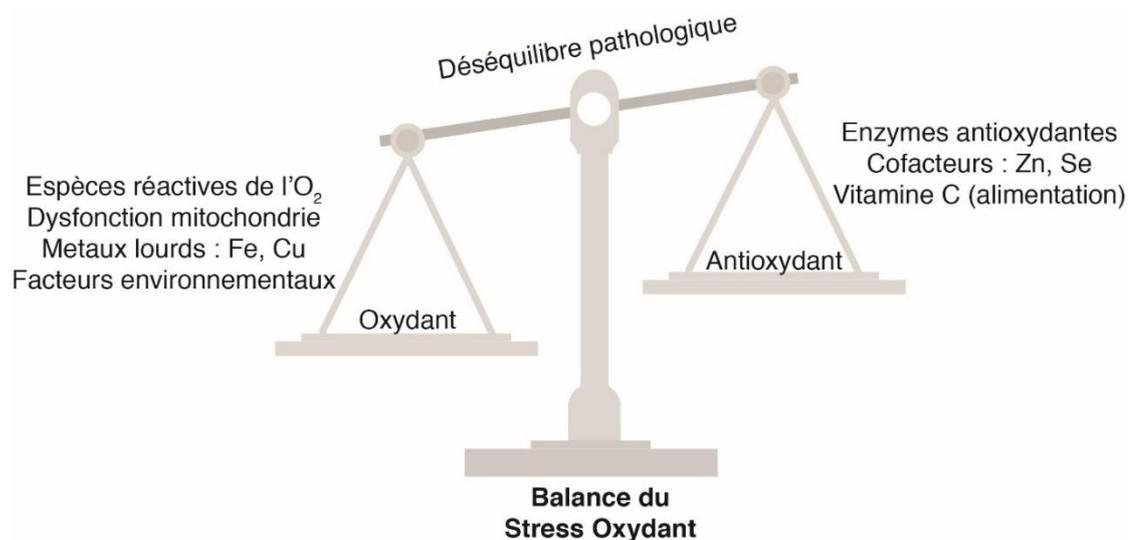
# *Chapitre IV : Stress oxydatif et antioxydant*

## IV. Stress oxydatif et antioxydant

### IV.1. Définition du stress oxydant

Des composés à fort potentiel oxydant, sont produits constamment en situation physiologique au sein d'un organisme. Il se met alors en place un système antioxydant qui contient notamment des enzymes, des vitamines, des oligoéléments, le glutathion. Ce système est un moyen de défense en cas de production excessive d'ER. Le stress oxydant se définit donc comme un déséquilibre entre la production d'ER et les systèmes de défense (Haleng et al., 2007).

Cette régulation, appelée équilibre redox, se fait en permanence. En situation normale, la balance antioxydant/prooxydant est équilibrée. Mais l'organisme peut être confronté à une surexposition à des composés oxydants lorsque la production endogène d'ERO devient excessive ou suite à l'exposition à un phénomène toxique exogène. Lorsqu'un déséquilibre intervient (par surproduction de composés prooxydants ou par déficit en substances antioxydantes), on parle de stress oxydatif ou stress oxydant (Boyer, 2016).



**Figure 17 :** Le stress oxydant induit par un déséquilibre entre pro-oxydant et système antioxydant (Antioxydants, n.d.).

## IV.2. Différentes formes des radicaux libres

Les ER se divisent en deux familles : les espèces réactives de l'oxygène (EROs) et les espèces réactives de l'azote (ERNs).

**Tableau 04** : Les principales espèces réactives

Espèces Radicalaires	Espèces Non Radicalaires
Anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$	Peroxyde d'hydrogène $H_2O_2$
Radical hydroxyl $HO^{\cdot}$	Acide hypochloreux $HOCl$
Monoxide d'azote $\cdot NO$	Peroxynitrite $ONOO^{\cdot}$
Grande instabilité : stabilisation par réaction avec les constituants cellulaire	Eléments de décomposition pour la détoxification par les systèmes de défense enzymatique

Comme indiqué dans le **Tableau 4** elles peuvent être de nature radicalaire ou non. Un radical se définit comme une espèce chimique possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur sa couche périphérique lui conférant ainsi une grande réactivité. La production d'ER peut être soit d'origine endogène soit due à des facteurs exogènes tels que les métaux lourds, les rayonnements ionisants et les rayons ultra-violets, les polluants atmosphériques tels que la fumée de cigarette mais également des médicaments (paracétamol, anthracyclines...).

### IV.2. Sources cellulaires des radicaux libres

Dans l'organisme il y a de nombreuses sources d'ERO dont l'importance varie selon les tissus. La réaction de Fenton produit des ERO dans la cellule. Les autres sources cellulaires de ERO sont enzymatiques et non enzymatiques (Droge, 2002).

#### IV.2.1. La mitochondrie

La mitochondrie est le principal organite producteur d'énergie sous forme d'ATP. Elle est aussi considérée comme la plus grande source de production de ROS. La production physiologique de ROS par la mitochondrie est de l'ordre de 0,2 à 0,4 % de l'oxygène consommé (Barja, 2014) (Hansford et al., 1997 ; Sanz et Stefanatos, 2008). Il a été démontré que les complexes I et III de la chaîne respiratoire sont responsables de la production d'anion superoxyde (Barja, 2014) (Y. Liu et al., 2002)(Chen et al., 2003). L'anion superoxyde est ensuite rapidement converti en  $H_2O_2$  par le superoxyde dismutase (SOD).

Si la mitochondrie est la source principale de la production des ROS, elle est aussi une des cibles des ROS. Ainsi, l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) peut réagir avec de l'oxyde d'azote et

former du peroxy-nitrite. Le peroxy-nitrite peut endommager les composants de la chaîne respiratoire mais aussi l'ADN mitochondrial, ce qui va augmenter la production de ROS (Shiva et al., 2004). On va ainsi avoir une modification de la morphologie et de la fonction des mitochondries entraînant une génération de ROS plus importante. Dans le cadre de la pathologie diabétique, une exacerbation de l'activité mitochondriale peut participer à l'installation d'un stress oxydant accru à l'origine d'une inhibition de la sécrétion d'insuline ou de la transduction de son signal contribuant ainsi à l'installation de l'insulino-résistance (Manucha et al., 2014) (Stump et al., 2006). En effet, l'excès de ROS produit par la mitochondrie peut inhiber la phosphorylation du récepteur de l'insuline pouvant conduire à une plus faible translocation du transporteur de glucose GLUT4 (Hansen et al., 1999).

#### **IV.2.2. Les NADPH oxydases**

La NADPH oxydase est un complexe enzymatique membranaire. Les NADPH oxydases (Nox) ont d'abord été considérées comme des enzymes uniquement exprimées dans les cellules immunitaires (macrophages et monocytes). Il a ensuite été découvert qu'il existait 7 isoformes de NADPH oxydase exprimées dans divers tissus et impliquées dans divers processus biologiques (Paravicini & Touyz, 2008). Les NADPH oxydases catalysent la réaction d'oxydation du NADPH par le dioxygène ( $O_2$ ), ce qui produit du  $NADP^+$ , du  $H^+$  et de  $O_2^{\cdot-}$ . Ces deux derniers composés réagissent entre eux pour former du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Ce complexe enzymatique entraîne ainsi la synthèse de ROS. L'activité de la NADPH est sensible à des facteurs métaboliques tels que l'hyperglycémie ou la présence d'AGE (Shao & Bayraktutan, 2014) (Thallas-Bonke et al., 2015) (When, 2015) (Teshima et al., 2014). Au niveau cardiaque, il s'agit de la première source de production de ROS (Privratsky et al., 2003) (M. Zhang et al., 2006). Plus particulièrement, ce sont les isoformes Nox2 et Nox4 qui sont le plus impliquées dans la production de ROS au niveau des cardiomyocytes.

#### **IV.2.3. Peroxysomes**

Le peroxy-some est une source importante de  $H_2O_2$ . Il a d'abord été établi que la fonction du peroxy-some était la dégradation de  $H_2O_2$  via la catalase peroxy-somale (Schrader & Fahimi, 2006). Cependant, il semblerait que les peroxy-somes soient impliqués dans plusieurs processus biologiques. Ils participent par exemple à la  $\beta$ -oxydation des acides gras. La présence d'un stress oxydant va entraîner une augmentation du nombre de peroxy-some.

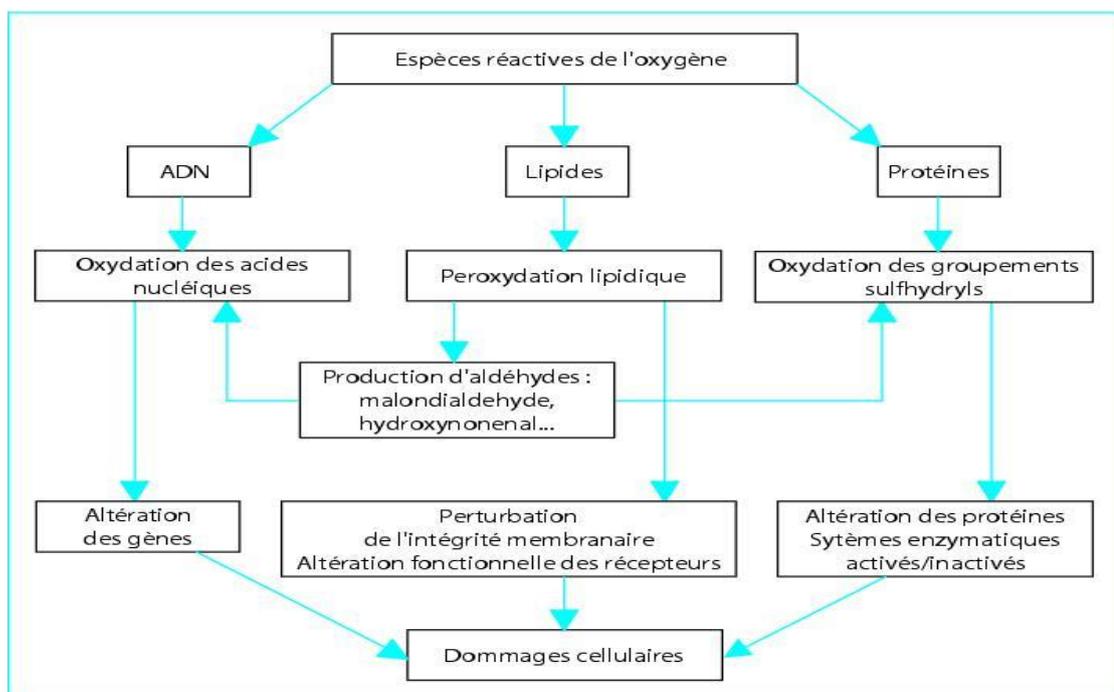
#### **IV.2.4. La xanthine oxydase**

La xanthine oxydase est une enzyme cytosolique qui génère des ROS en réduisant l'hypoxanthine en xanthine ainsi que la xanthine en acide urique (Harrison, 2002). Cette enzyme

est surtout présente dans le foie mais peut se retrouver dans la circulation en cas d'atteinte hépatique. La production de ROS par la xanthine oxydase est faible en condition physiologique mais jouerait un rôle important lors de l'ischémie-reperfusion. Dans le cas de l'ischémie, la grande consommation de l'ATP conduit à une accumulation d'hypoxanthine et de xanthine et donc une production de ROS plus importante. Au cours de la pathologie diabétique l'accumulation d'acide urique participe à la progression de la néphropathie diabétique. Il a été démontré que lorsque l'on bloque la xanthine oxydase grâce à des inhibiteurs, on observe une diminution de la concentration en acide urique et également une réduction des dommages liés au diabète (Lytvyn et al., 2015).

### IV.3. Les cibles des dérivés actifs de l'oxygène

Le stress oxydatif, dû aux radicaux libres, entraîne des dégâts tissulaires essentiellement par l'oxydation des protéines, de l'ADN ou des lipides (**Figure 18**).



**Figure 18** : Les cibles biologiques du stress oxydant (BOUNIHI, 2016)

#### IV.3.1. Les protéines

Tous les acides aminés peuvent être oxydés par les ROS et former des groupements carbonylés. Les acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) et aromatiques (tyrosine et tryptophane) sont les plus sensibles à l'oxydation. Par exemple, l'oxydation des groupements thiols (-SH) peut donner lieu à la formation de pont disulfure entre deux résidus (Davies, 2000). Ces dommages peuvent entraîner des altérations structurales et fonctionnelles importantes : perte d'activité enzymatique, non reconnaissance

de la protéine par son récepteur. Normalement, ces protéines non fonctionnelles sont prises en charge par des systèmes protéolytiques tel que le protéasome et dégradées. Cependant, lorsque ces systèmes protéolytiques sont défaillants, les protéines oxydées peuvent former des agrégats, dû au fait qu'elles deviennent hydrophobes et s'accumuler dans les cellules (Grune et al., 1997) (Erkekoglu et al., 2012).

La diminution de groupements thiols ou la présence de protéines carbonylées, sont des marqueurs de l'oxydation de protéines, mesurables par différents tests biochimiques.

### **IV.3.2. Les lipides**

Les lipides, et plus particulièrement les acides gras polyinsaturés, sont la cible privilégiée du radical hydroxyle et vont former un radical peroxyde. Le radical peroxyde, après évolution peut libérer différents aldéhydes toxiques dont le malondialdéhyde ou l'hydroxynonanal (Davies, 2000). Cette attaque des lipides peut concerner les lipides membranaires ou les lipides circulants. En fonction du type de lipide concerné, les conséquences seront différentes. L'oxydation des lipides circulants va aboutir à la formation de LDL oxydées qui seront captées par des macrophages. Les macrophages vont se transformer en cellules spumeuses, qui jouent un rôle important dans le développement de l'athérosclérose (Haleng et al., 2007). De plus la présence de LDL oxydées va entraîner une production de cytokines pro-inflammatoire (Saad et al., 2006). L'oxydation des lipides membranaire va entraîner une altération de la fluidité membranaire, de sa perméabilité mais aussi une perte d'activité des récepteurs (Cillard & Cillard, 2006).

La glutathion peroxydase mais aussi la vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol) sont connus pour participer à la détoxification des peroxydes lipidiques (Anderson et al., 2012). La présence de malondialdéhyde (MDA) ou de 4-hydroxynonanal (4-HNE) représente des marqueurs de l'oxydation lipidique détectable par des tests biochimiques ou immunologiques.

### **IV.3.3. L'ADN**

L'oxydation de l'ADN constitue une caractéristique majeure retrouvée dans des conditions de stress oxydant accru. La base guanine est principalement touchée par les phénomènes d'oxydation de l'ADN. La guanine va réagir avec le radical hydroxyle pour former du 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OH-dG). Le 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine va alors s'apparier avec l'adénine au lieu de la cytosine ce qui va induire des mutations au sein de l'ADN (Haleng et al., 2007). Le radical hydroxyle peut aussi réagir avec les groupements aromatiques des bases d'ADN (Nikitaki et al., 2015).

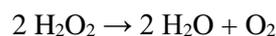
Ces altérations de l'ADN peuvent entraîner des coupures de l'ADN simple brin et double brin. Il existe plusieurs systèmes de réparation de l'ADN. Certaines enzymes permettent la réparation directe de l'ADN. La réparation de l'ADN peut se faire également par excision des bases endommagées, celles-ci sont remplacées en utilisant le brin intact comme matrice. Cependant, l'efficacité de ces systèmes dépend de plusieurs facteurs comme l'âge de la cellule ou le type de cellule. De plus, si les dommages sont trop importants, la cellule va entrer en apoptose ou dans un cycle de division cellulaire non contrôlé aboutissant à la formation de tumeurs cancéreuses.

Mesurer les dommages de l'ADN peut s'avérer être délicat du fait du faible taux de dommage. Il existe plusieurs méthodes permettant d'effectuer ces mesures. Certains anticorps sont utilisés permettant de détecter les modifications au niveau de l'ADN (Nikitaki et al., 2015). Il est possible aussi d'utiliser des enzymes de réparation de l'ADN qui vont convertir les lésions de l'ADN en cassure. Les brins d'ADN sont ensuite séparés par électrophorèse ou par élution (Ravanat, 2005). Enfin, certaines techniques de chimie analytique (HPLC) peuvent être utilisées pour mesurer les dommages de l'ADN (Chtourou et al., 2016).

#### **IV.4. Anti-oxydants endogènes enzymatiques**

##### **IV.4.1. La catalase**

Cette enzyme, localisée dans les peroxysomes, catalyse la dismutation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau et en oxygène moléculaire :

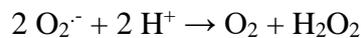


La catalase (CAT) est une enzyme héminique, c'est-à-dire qu'elle possède un atome de fer qui participe à la fabrication de l'hème. Sa masse molaire moléculaire est de 220 000 Da. La CAT possède 4 sous unités comprenant chacune un atome de fer sous forme Fe<sup>3+</sup>. Elle est majoritairement retrouvée dans les hépatocytes, les érythrocytes et les cellules rénales. C'est une enzyme qui possède un turnover important : une molécule de CAT peut convertir en une minute environ 6 millions de molécules de peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène (M. Valko et al., 2006).

##### **IV.4.2. Les superoxyde dismutase (SOD)**

Les superoxyde dismutases sont des métalloprotéines découvertes en 1969 par Fridovich pour la Cu/Zn SOD (SOD cytosolique) puis en 1973 pour la MnSOD (SOD mitochondriale). Elles constituent la première ligne de défense contre le stress oxydant (Haleng et al., 2007).

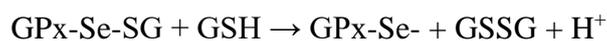
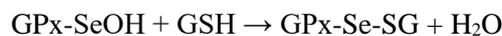
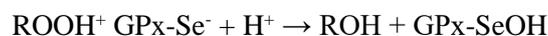
On peut distinguer 3 isoformes distinctes : la forme cytosolique (Cu/Zn SOD), la forme mitochondriale (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (Cu/Zn SOD). Les différentes SOD catalysent la même réaction :



La réaction catalysée par les SOD génère du peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène est un composé oxydant qui pourra être éliminé par la catalase ou la glutathion peroxydase. Il semblerait que la MnSOD soit très importante pour la survie. Il a été démontré que des souris dont le gène codant la MnSOD, a été invalidé (Knock Out), ne survivent que 10 à 18 jours en moyenne et présentent de nombreuses pathologies telles que des cardiomyopathies ou une dégénérescence des neurones (Li et al., 1995) (Lu et al., 1996).

#### IV.4.3. La Glutathion Peroxydase

Il existe différentes isoformes de glutathion peroxydase (GPx). Leur rôle principal est d'assurer la réduction du peroxyde d'hydrogène ou des peroxydes lipidiques formés suite à l'effet du stress oxydant, sur les acides gras polyinsaturés en les couplant avec l'oxydation du glutathion selon les réactions suivantes :



Alors que la GPx catalyse la dismutation d' $\text{H}_2\text{O}_2$  en eau et en oxygène moléculaire, le glutathion sous forme réduite, GSH, est oxydé en GSSG. La GPx est en compétition avec la CAT car elles utilisent toutes les deux le même substrat :  $\text{H}_2\text{O}_2$ , la GPx étant active pour des faibles concentrations d'EROs (M. Valko et al., 2006). D'un point de vue structural, les GPx présentent une ou quatre SU, selon l'isoforme. Chaque SU possède un atome de sélénium sous forme de sélénocystéine. Chez les eucaryotes, il existe 5 isoenzymes. La GPx 1 l'isoforme la plus fréquente, est exprimée dans de nombreuses cellules telles que les érythrocytes, les cellules hépatiques et rénales et est présente dans le cytoplasme et la mitochondrie. Les autres isoformes sont la GPx 2 dite gastro-intestinale car localisée préférentiellement dans les cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal, la GPx 3 présente au niveau plasmatique, la GPx 4

présente dans les cellules épithéliales du rein et dans les testicules est située à l'interface de la membrane interne et du cytoplasme, et enfin la GPx 5 localisée dans l'épididyme.

## **IV.5. Les antioxydants non enzymatiques**

### **IV 5.1. Les vitamines C et E**

Les vitamines ne sont pas synthétisées par l'organisme et doivent être apportées via l'alimentation. Les vitamines C et E jouent un rôle important dans l'inhibition de la peroxydation lipidique.

La vitamine C va piéger certains radicaux libres comme le HO $\cdot$  ou le O $_2^{\cdot-}$  mais va aussi permettre de régénérer la vitamine E oxydée (Haleng et al., 2007). Cependant, il semblerait que la vitamine C joue un rôle différent en fonction de sa concentration. Ainsi, à faible concentration elle agirait comme un pro-oxydant et participerait à la formation de ROS, alors qu'à forte concentration, elle se comporterait comme un antioxydant (Mandl et al., 2009)(Tabatabaei-Malazy et al., 2014) (Duarte & Lunec, 2005). De plus, la vitamine C serait nécessaire pour optimiser la sécrétion d'insuline chez les personnes diabétiques (Tabatabaei-Malazy et al., 2014) (Steffner et al., 2004). Chez les sujets diabétiques, on retrouve un taux de vitamine C plus faible que chez les sujets sains (Maxwell et al., 1997) (Odum et al., 2012)(Chambial et al., 2013). A ce jour, l'origine de ces taux faibles reste objet de recherche. Il existe cinq isomères de la vitamine E, appelés tocophérol. La forme la plus abondante de la vitamine E est l' $\alpha$ -tocophérol mais la forme la plus efficace serait la  $\gamma$ -tocophérol (Haleng et al., 2007).

### **IV.5.2. Les polyphénols**

Les polyphénols sont des antioxydants présents dans les végétaux. Ils vont piéger les radicaux libres. Les polyphénols peuvent protéger contre la glycoxydation des protéines et ils sont également connus pour avoir des propriétés anti-inflammatoires (Sears & Ricordi, 2012) (Sadowska-Bartosz et al., 2014). Les polyphénols contenus dans le thé vert ou autres végétaux peuvent favoriser l'absorption du glucose dans les cellules par le biais d'un mécanisme dépendant de la PI3-kinase et qui va mimer l'action de l'insuline (Jung et al., 2008) (Munir et al., 2013). Les propriétés antidiabétiques du thé vert ont aussi été démontrées in vivo dans un modèle animal (Sabu et al., 2002)(Tsuneki et al., 2004).

# *Partie Pratique*

## A. Etude phytochimique

### I. Préparation de l'extrait méthanolique (*Melissa officinalis* L)

La récolte a été réalisée à Betita (période de récolte Octobre 2018), Wilaya de Tébessa (750 km au nord-est de l'Algérie). L'extrait de *M. officinalis* L. a été obtenu à partir de sa poudre en utilisant un mélange méthanol-eau (7 : 3, v : v) sous agitation pendant 24 h à une vitesse de rotation de 200 tr / min. Le rapport utilisé dans cette étude était de 1 :10 (m : v) (échantillon de 100 g avec 1000 ml de solvant). La fraction soluble dans le méthanol obtenue a été filtrée et concentrée sous pression réduite à 60°C en utilisant un évaporateur rotatif. L'extrait a été conservé à l'obscurité à 4°C.

### II. Dosages des composés phénoliques

#### II.1. Dosage des polyphénols totaux

L'estimation des polyphénols totaux est déterminée par l'utilisation du réactif de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965) selon une méthode de dosage sur microplaque décrite par Müller et al., 2010. Brièvement, après avoir additionné à 20 µl d'extrait dilué 100 µl de réactif de Folin-Ciocalteu (10%), 75 µl de carbonate de sodium (7,5%) après mettre le mélange à l'obscurité pendant 2h à température ambiante. L'absorbance a été enregistrée à 765 nm. En remplaçant l'extrait par le solvant utilisé (méthanol), le blanc a été préparé de la même manière. Les phénols totaux ont été exprimés en microgramme d'équivalent acide gallique / mg (µg GAE / mg).

#### II.2. Dosage des flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes totaux est déterminée par un dosage colorimétrique selon Topçu et al., 2007 est utilisée avec quelques modifications pour une détermination sur microplaque 96 puits. 50 µl de l'extrait est mélangé avec 130 µl (méthanol). 10 µl de nitrate d'aluminium (10%) et 10 µl d'acétate de potassium (1 M) a été ajouté. Après incubation pendant 40 min à température ambiante, l'absorbance du mélange réactionnel est mesurée à 340 nm. Un échantillon à blanc a été préparé en remplaçant les réactifs par du méthanol (180 µl de méthanol). Les flavonoïdes totaux ont été calculés à l'aide du composé de quercétine standard (12,5, 25, 50, 75 et 100 µg / ml). Toutes les valeurs ont été exprimées en microgramme d'équivalent quercétine / mg (µg QE / mg).

### III. Analyse ESI-LC-MS de l'extrait méthanolique de *Mélissa officinalis* L.

L'analyse de l'extrait méthanolique de *M. officinalis* L. est effectuée à l'aide d'une chromatographie liquide à haute performance couplée en aval à une spectrométrie de masse (LC-MS) réalisée à l'aide d'un système Agilent triple quadripôle 6401 LC-MS équipé d'une pompe binaire et d'un système de détecteur à barrette de diodes (DAD) contrôlé par le logiciel de station de travail Mass Hunter. Les spectres de masse ont été enregistrés en utilisant le mode d'ionisation négative ESI en appliquant une tension capillaire de 3500 V et une tension de 135 V. Les paramètres MS les plus importants étaient les suivants : nébulisation d'azote à une pression de 25 psig à un débit de gaz 7 L / min, température de la source d'ions à 300 ° C. La séparation a été réalisée sur une colonne SB-C18 Zorbax, 2,1 × 50 mm × 18 µm (Phenomenex) en utilisant une phase mobile d'acétonitrile : eau (acide formique 0,1%) 50 :50 (v : v) avec un débit de 0,5 mL / min. La confirmation des valeurs de point de fusion par rapport à la substance pure récupérée a été effectuée en utilisant un calorimètre à balayage différentiel compensé en puissance (DSC) SDT Q600 (T.A. Instruments, USA).

### IV. Evaluation de l'activité antioxydante dans l'extrait de *M. officinalis* L.

L'étude de l'activité antioxydante de l'extrait hydrométhanolique de *Mélissa officinalis* L est testée selon quatre méthodes : piégeage du radical libre DPPH, Piégeage de l'ABTS, méthode CUPRAC, Test de pouvoir réducteur.

#### IV.1. Activité antiradicalaire au DPPH

L'activité du DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par (Blois, 1958), le principe de cette méthode est la réduction du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette en 2,2 diphényl-1-picrylhydrazine de couleur jaune. Le DPPH absorbe à 517 nm, mais lors de la réduction par un antioxydant, son absorption diminue. Brièvement, une solution de 0,4 mM de DPPH préparée dans le méthanol et 160 µl de cette solution ont été ajoutés à 40 µl d'échantillon dilué dans des solutions de méthanol à des concentrations différentes. Trente minutes plus tard, l'absorbance a été mesurée à 517 nm. Le BHA, BHT et l'α-tocophérol ont été utilisés comme normes anti-oxydantes, pour la comparaison de l'activité avec les extraits utilisés. La faible valeur d'absorbance de la réaction du mélange indique une activité de piégeage des radicaux libres supérieure. La capacité à piéger le radical DPPH a été calculée selon l'équation suivante

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A_{\text{Blanc}} - A_{\text{Extrait}}) / A_{\text{Blanc}}] \times 100$$

$A_{\text{Blanc}}$  est l'absorbance de la réaction ne contenant que les réactifs.

$A_{\text{Extrait}}$  est l'absorbance de la réaction contenant les réactifs et l'extrait.

#### IV.2. Activité du piégeage de l'ABTS

L'analyse spectrophotométrique de l'activité de piégeage de l'ABTS<sup>•+</sup> a été déterminée selon le procédé de (Havsteen, 2002), avec de légères modifications. L'ABTS<sup>•+</sup> a été produit par la réaction entre 7 mM de l'ABTS dans l'eau et 2,45 mM de persulfate de potassium est stockée dans l'obscurité à température ambiante pendant 12 h. L'oxydation de l'ABTS commence immédiatement mais l'absorption n'est pas maximale et se stabilise après 6 heures de temps. Le radical cation est stable sous cette forme depuis plus de 2 jours dans le stockage dans l'obscurité à la température ambiante. Avant utilisation, l'ABTS a été dilué pour obtenir une absorbance de  $0,708 \pm 0,025$  à 734 nm avec de l'éthanol. Ensuite, 160  $\mu\text{l}$  de la solution de L'ABTS<sup>•+</sup> ont été ajoutés à 40  $\mu\text{l}$  de la solution d'extrait dissout dans l'éthanol à différentes concentrations. Après 10 min, l'absorbance a été mesurée à 734 nm en utilisant un lecteur de microplaques à 96 puits.

Les pourcentages d'inhibition ont été calculés pour chaque concentration par rapport à une absorbance à blanc de l'éthanol. La capacité de piégeage de L'ABTS<sup>•+</sup> a été calculée en utilisant l'équation suivante :

$$\text{ABTS inhibition (\%)} = [(A_{\text{Blanc}} - A_{\text{Extrait}}) / A_{\text{Blanc}}] \times 100$$

#### IV.3. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

La réduction du cuivre a été déterminée par la méthode CUPRAC décrite par (Apak et al., 2004). Une solution est préparée avec le mélange des volumes de : 50  $\mu\text{l}$  Cu (II) (10 mM), 50  $\mu\text{l}$  neocuprine (7,5 mM), et 60  $\mu\text{l}$  de solution tampon NH<sub>4</sub>Ac (1 M, pH = 7,0). Différentes concentrations d'extrait ont été ajoutées au mélange initial afin de rendre le volume final de 200  $\mu\text{l}$ . Les microplaques de 96 puits ont été mises à l'abri de la lumière, et après 1 h, l'absorbance est mesurée à 450 nm. La capacité de réduction des extraits a été comparée à celles de le BHA et BHT. Les résultats ont été calculés à titre de A0.5 ( $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

#### IV.4. Test de Pouvoir réducteur

L'activité réductrice d'un extrait est évaluée par la réaction d'oxydo-réduction entre l'extrait et les ions métalliques de transition, notamment le fer. Le pouvoir réducteur est déterminé selon la méthode décrite par (Oyaizu, 1986). Cette méthode consiste à mélanger 10 µl de l'extrait à différentes concentrations avec 40 µl de tampon phosphate 0.2 M à pH 6.6 et 50 µl d'une solution de  $K_3Fe(CN)_6$  à 1% (m/v). Le mélange obtenu est incubé pendant 20 minutes à 50°C, puis 50 µl d'acide trichloracétique ( $CCl_3COOH$ ) à 10% sont ajoutés pour arrêter la réaction. On additionne 40 µl d'eau distillée et 10 µl de chlorure de fer ( $FeCl_3$ ) à 0.1%. La lecture de l'absorbance se fait à 700 nm contre un blanc ou l'extrait est remplacé par le méthanol. Les résultats permettent de calculer la concentration efficace (CE50), concentration de l'extrait correspondant à une absorbance égale à 0.5, obtenu par la courbe de régression linéaire ou logarithmique. L'activité de l'extrait est enfin comparée à  $\alpha$ -Tocopherol et l'acide ascorbique.

#### V. Activité anticholinestérases

Les activités acétylcholinestérase (AChE) et butyrylcholinestérase (BChE) ont été mesurées avec une modification légère de la méthode spectrophotométrique décrite par (Ellman et al., 1961). AChE de l'anguille électrique et BChE du sérum de cheval ont été utilisés, tandis que l'iodure d'acétylthiocholine et le chlorure de butyrylthiocholine ont été employés comme substrats. Le DTNB [5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoïque)] a été utilisé pour la mesure de l'activité du cholinestérase. L'éthanol a été utilisé comme solvant pour dissoudre les composés d'essai 0 et les contrôles. Brièvement, 150 µl de tampon phosphate de sodium (100Mm, pH 8,0), 10 µl d'une solution d'échantillon dissoute dans de l'éthanol à différentes concentrations et un volume de 20 µl l'AChE ( $5,32 \times 10^{-3}$  U) ou BChE ( $6,85 \times 10^{-3}$  U) ont été mélangés et incubés pendant 15 min à 250 C puis 10 µl de DTNB (0,5 mM) ont été ajoutés. Ensuite, la réaction a été initiée par l'addition de 20 µl l'iodure d'acétylthiocholine (0,71 mM) ou le chlorure de butyrylthiocholine (0,2 mM). Les hydrolyses de ces substrats ont été suivies par spectrophotométrie par la formation d'une couleur jaune d'anion 5-thio-2-nitrobenzoate de méthyle, selon le résultat de la réaction de DTNB avec thiocholine, libéré par l'hydrolyse enzymatique de l'iodure d'acétylthiocholine ou le chlorure de butyrylthiocholine, respectivement, à une longueur d'onde de 412 nm, en utilisant un lecteur de microplaques à 96 puits (SpectraMax PC340, Molecular Devices, États-

Unis). Les mesures et les calculs ont été évalués en utilisant le logiciel PRO Softmax v5.2. Le pourcentage d'inhibition de l'AChE ou BChE a été déterminé par comparaison des vitesses de réaction d'échantillons par rapport à l'échantillon témoin (éthanol dans du tampon phosphate, pH 8) en utilisant la formule  $(E - S) / E \times 100$ , où E est l'activité de l'enzyme sans échantillon d'essai, et S, est l'activité de l'enzyme avec l'échantillon de test. Les expériences ont été réalisées en triple. La galantamine a été utilisé comme composé de référence.

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A_{\text{Blanc}} - A_{\text{Extrait}}) / A_{\text{Blanc}}] \times 100$$

## VI. Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD d'analyses en trois essais. Les valeurs de  $CI_{50}$  (Concentration d'inhibition à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentrations)]. Les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification sont faites par " Student's t-test " et le test ANOVA univarié. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05.

## Étude *in vivo*

### I. Animaux et Traitement

#### I.1. Animaux et élevage

L'étude est réalisée sur des rats mâles de souche Wistar pesant environ  $250 \pm 50$  g, provenant d'un élevage de l'institut pasteur d'Alger. Ils sont soumis dans une animalerie dont la température est de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  avec une alternance de 12 heures d'éclairage et de 12 heures d'obscurité, l'humidité relative étant voisine de 40%. Les rats reçoivent un régime équilibré en protéines, lipides, glucides, vitamines et oligoéléments provenant de la société industrielle de concentrés et l'eau étaient disponibles durant toute la durée de l'étude.

**Tableau 05** : Composition de l'alimentation/Kg.

Composition d'alimentation/kg d'aliments	Valeur
<b>Protéines brutes (%)</b>	20
<b>Matières grasse (%)</b>	8
<b>Celluloses brutes (%)</b>	9
<b>Cendre total</b>	8
<b>Apport énergétiques (Kcal)</b>	2600
<b>Vitamines</b>	
<b>Vitamines A (UI)</b>	13400
<b>Vitamines D<sub>3</sub> (UI)</b>	1300
<b>Vitamines E (mg)</b>	40
<b>Vitamines B<sub>3</sub> (mg)</b>	33
<b>Vitamine B<sub>1</sub> (mg)</b>	2.6
<b>Vitamines C (mg)</b>	1000
<b>Oligoéléments et minéraux</b>	
<b>Iode (ppm)</b>	407
<b>Calcium (ppm)</b>	1.04
<b>Phosphore (%)</b>	0.7
<b>Magnésium (ppm)</b>	340
<b>Sélénium (ppm)</b>	130
<b>Cuivre (ppm)</b>	14.4
<b>Zinc (ppm)</b>	111
<b>Fer (ppm)</b>	140

## 2. Traitement des Animaux

Les effets protecteurs de l'extrait méthanolique de *M. officinalis* sur les paramètres oxydatifs ont été explorés chez des rats. En se basant d'une part sur les données de la littérature (Ozarowski et al., 2016), et d'autre part en effectuant un test effet-dose, nous avons choisi pour notre expérience, deux doses quotidiennes de l'ordre de 0.18 et 0.36 mg/kg/ de poids corporel pour la lambda-cyhalothrine sous forme des traces détectée dans les légumes et les fruits selon la littérature (Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2013). Concernant l'extrait méthanolique de *Melissa officinalis*, nous avons réalisé un test effet-dose (50, 100 et 200 mg/kg de PC). Ainsi, parmi les trois doses testées, nous avons choisi 200 mg/kg de PC à cause de sa meilleure efficacité. En plus, la toxicité de nos extraits a été testée et n'a pas montré d'effet toxique jusqu'à 1 g/kg de PC.

Après une phase d'acclimatation aux conditions de l'animalerie, des rats adultes mâles ont été répartis en six groupes de 6 rats chacun. La durée de traitement est de 90 jours.

- ✚ Le 1er groupe de rats a reçu par gavage de l'huile d'olive (1.5 ml/jour). Il s'agit de **groupes témoins (Te)**.
- ✚ Le 2-ème groupe de rats a reçu par gavage une solution de l'extrait méthanolique des feuilles de *Melissa officinalis* L dissout dans l'huile d'olive à raison de 200 mg/Kg de poids corporel. Il s'agit de **groupes EMMO**.
- ✚ Le 3-ème groupe de rats a reçu par gavage une solution de la lambda-cyhalothrine dissout dans l'huile d'olive à raison de 0.18 mg/kg/jour de poids corporel. Il s'agit des **groupes LCT1**.
- ✚ Le 4-ème groupe de rats a reçu par gavage une solution de la lambda-cyhalothrine dissout dans l'huile d'olive à raison de 0.36 mg/kg/jour de poids corporel. Il s'agit des **groupes LCT2**.
- ✚ Le 5-ème groupe de rats a reçu quotidiennement et simultanément par gavage l'extrait de *Melissa officinalis* L (200 mg/kg/PC) et la lambda-cyhalothrine (0.18 mg/kg/PC), dissout dans l'huile d'olive. Il s'agit de groupes **LCT1+EMMO**.

- ✚ Le 6-ème groupe de rats a reçu quotidiennement et simultanément par gavage l'extrait de *Melissa officinalis* L (200 mg/kg/PC) et la lambda-cyhalothrine (0.36 mg/kg/PC), dissout dans l'huile d'olive. Il s'agit de groupes **LCT2+EMMO**.

Les rats sont pesés tous les 5 jours, des relevés quotidiens de consommations en aliment et en boisson sont effectués pour chaque groupe et ceci durant la période d'expérimentation.

### 3. Sacrifice des animaux

Le sacrifice des animaux des différents groupes étudiés est effectué à la même heure (9h du matin) pour éviter toutes variations dues au rythme circadien. Les rats ont été sacrifiés par décapitation sans anesthésie pour éviter tout état de stress.

### 4. Prélèvement des échantillons

La dissection a été fait sur une plaque émergée dans de la glace pour bien conserver la fraîcheur des organes. Enfin, chaque cerveau est disséqué pour faire extraire l'hippocampe, le striatum et le cortex. Des échantillons d'hippocampe, striatum et cortex ont été prélevés, broyés à 4°C dans du tampon Tris-HCl (0.1 M, pH=7,4). Après centrifugation à 12000 g pendant 15 min à 4°C, le surnageant a été récupéré conserver à (- 80°C) pour des dosages biochimiques.

## II. Tests comportementaux

Les tests comportementaux visant à évaluer les capacités motrices, cognitives et émotionnelles des animaux soumis aux différentes doses de lambda-cyhalothrine (LCT), et l'extrait de *Melissa officinalis* L. (EMMO) ont été effectués après 90 jours de traitement pour ces études. Dans l'étude réalisée chez le rat adulte, la batterie de tests open-field (OF), labyrinthe classique (LC), et test de la Nage Forcée (Forced swim test FST) a été effectuée après 90 jours de l'administration des traitements.

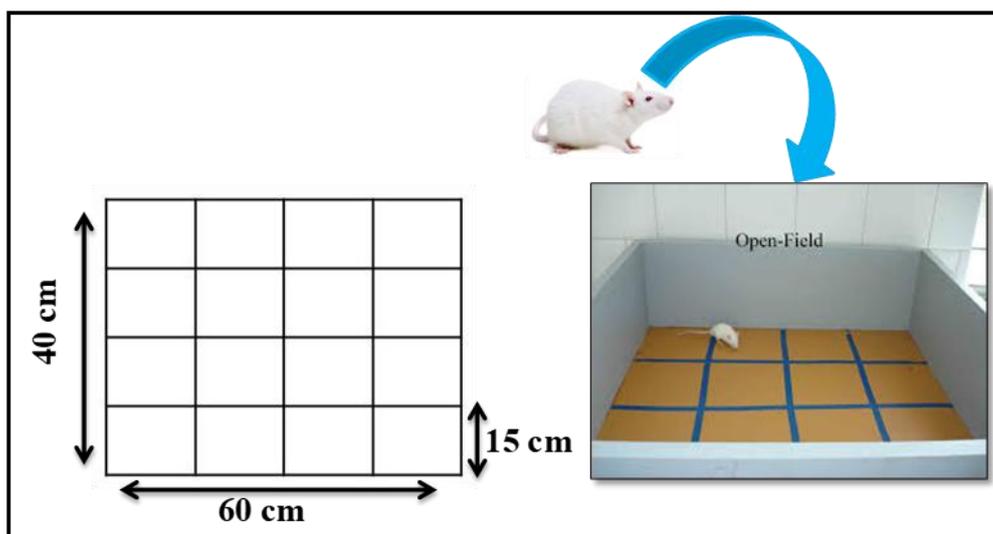
## II.1 Le test champ ouvert (open-field OF)

### II.1.1 Principe

A l'origine, l'open-field était un test classique permettant d'observer l'anxiété non pathologique des animaux et d'étudier les réponses émotionnelles, le test consistant à confronter l'animal à un environnement qu'il ne connaît pas, et dont la fuite est rendue impossible par la présence de parois sur la périphérie. Dans un tel environnement, les rongeurs privilégient spontanément l'environnement sécurisé, à savoir la périphérie de l'appareil, protégée par les parois, à la zone centrale éclairée et ouverte. Cependant l'openfield n'a été utilisé que pour tester l'activité exploratoire. Le nombre total de cases traversées, leur localisation dans les différentes zones et le temps passé dans celles-ci sont des indicateurs du comportement exploratoire dans un nouvel environnement, de l'activité générale et d'une aversion ou non pour les zones découvertes.

### II.1.2 Dispositif expérimental

Le dispositif est constitué d'un cube en contreplaqués de 60 cm de largeur et de 40 cm de hauteur, divisée en 16 Carreaux de surfaces égales : chaque Carreaux et de 15 cm (Figure 19).



**Figure 19 :** Dispositif expérimental de l'open-field (OF).

### **II.1.3 Procédure**

L'essai commence après la mise en place de l'animal au centre du dispositif et ses déplacements sont filmés pendant 5 minutes. Le dispositif est nettoyé avec une solution hydroalcoolique à 10 % et séché après le passage de chaque animal.

### **II.1.4 Variables mesurées**

Les variables mesurées sont le nombre de cases traversées, le nombre de redressements effectués, le nombre de passages en case centrale, le temps passé en case centrale.

Les tests qui suivent permettent d'accéder aux degrés d'anxiété ou de résignation des animaux. Le test du labyrinthe en croix surélevé met en évidence des types d'anxiétés spécifiques révélées par le caractère exploratoire des animaux. Le test de la nagé forcée rend compte du degré de résignation des animaux face à une situation à laquelle ils ne peuvent pas échapper, lui-même étant considéré comme relié à l'état de « dépression » de l'individu.

## **II.2 Test de labyrinthe classique (LC)**

### **II.2.1 Principe**

Labyrinthe classique est déposé sur une table de hauteur 90 cm. Les rats témoins montrent habituellement un passage de courte durée dans le labyrinthe entre le point de départ et celui d'arrivée. Ceci suggère que le comportement d'exploration va se traduire par un temps supérieur passé dans les centres de voies de passages, qui seront considérés comme aversifs ou anxiogènes pour l'animal stressé ; alors que le comportement de fuite va être observé lorsque l'animal passera plus de temps dans le point de départ ou les coins, qui seront associées à un refuge.

### **II.2.2 Dispositif expérimental**

Le dispositif, en plastique, ce test est réalisé dans une enceinte de forme carré (120x120x35 cm) en pastique comportant plusieurs passages en labyrinthe de taille identique (25x35 cm) de longueur variable selon le croisement, comportant aussi une zone de départ et une autre d'arrivée. (Figure 20).

### II.2.3 Procédure



**Figure 20 :** Dispositif expérimental du CM.

L'essai commence après la mise en place de l'animal dans la zone de départ. Les animaux sont filmés pendant 20 minutes sous lumière blanche atténuée. Les parois du labyrinthe sont nettoyées avec une solution hydroalcoolique à 10 % et séchées après le passage de chaque animal.

### II.2.4 Variables mesurées

Pour évaluer le degré d'anxiété des animaux, on mesure le temps passé dans les différentes parties du dispositif. Ainsi, le principe du test repose sur le fait qu'un animal qui explore plus de temps les coins ou les places de dépôt initial, est considéré comme anxieux.

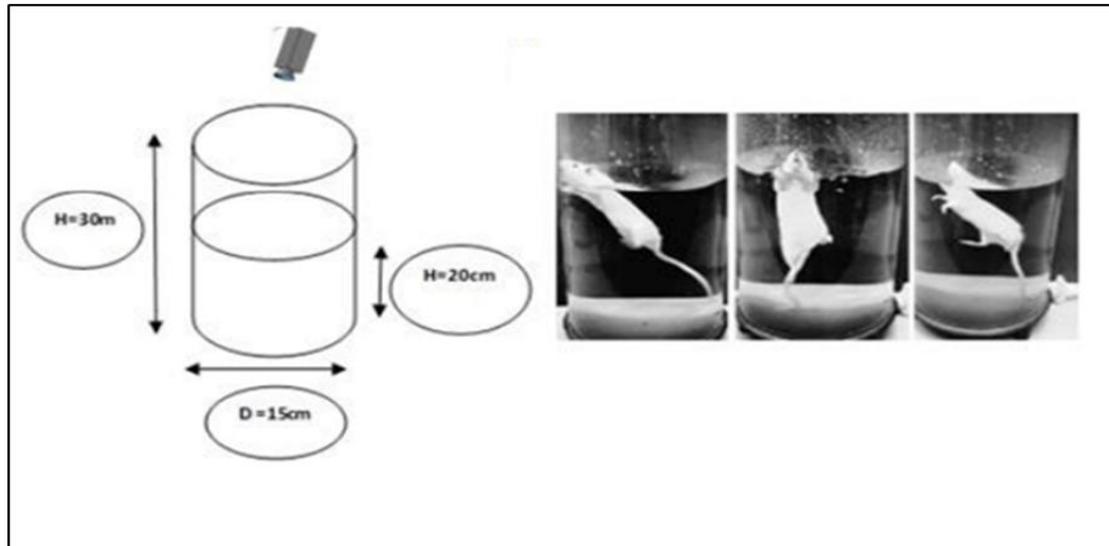
## II.3 Test de la Nage Forcé (Forced swim test FST)

### II.3.1 Principe

Ce test permet de mesurer le degré d'état de « dépression » ou plus précisément de l'état de résignation ou de motivation de l'animal via la durée d'immobilité mesurée. En effet, la diminution de cette dernière peut rendre compte d'un effet similaire à celui observé après l'administration d'antidépresseurs : moins l'animal est résigné, plus il aura tendance à lutter, diminuant d'autant plus sa durée d'immobilité.

### II.3.2 Dispositif expérimental

Le dispositif consiste en un cylindre en plexiglas transparent de 30 cm de hauteur et 15 cm de diamètre. Le cylindre est rempli d'eau, de telle manière à ce qu'une souris plongée à l'intérieur ne puisse pas toucher le fond du dispositif (Figure 21).



**Figure 21** : Dispositif expérimental de la Nage Forcée (Forced Swim Test - FST).

### II.3.3 Procédure

Le test de la nage forcée a été décrit pour la première fois par Porsolt en 1977 qui lui a ainsi laissé son nom. Il s'agit du test le plus largement utilisé chez les rongeurs, dans le but d'étudier le phénomène de « dépression ». L'animal est placé dans le cylindre et ses réactions sont enregistrées durant 5 minutes. Après un certain temps de nage, il abandonne et se laisse flotter. Lors du dépouillement du test, sont notés la latence de la première immobilité, la durée totale d'immobilité et de mobilité ainsi que les pourcentages respectifs correspondants à ces deux derniers paramètres.

### II.3.4 Variables mesurées

Les variables mesurées sont la durée de mobilité, la durée d'immobilité.

### III. Technique du dosage de biomarqueurs du stress oxydatif

#### III.1. Mesure des taux de groupements carbonyles

##### III.1.1. Principe

La mesure du taux de groupement carbonyles est réalisée selon la méthode (Halliwell et al., 1999). Les groupements carbonyles sont des produits de l'oxydation des protéines, ils réagissent avec le 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH) pour former un composé jaune-orange (hydrazones) qui absorbe à une longueur d'onde de 370 nm (Figure 22).

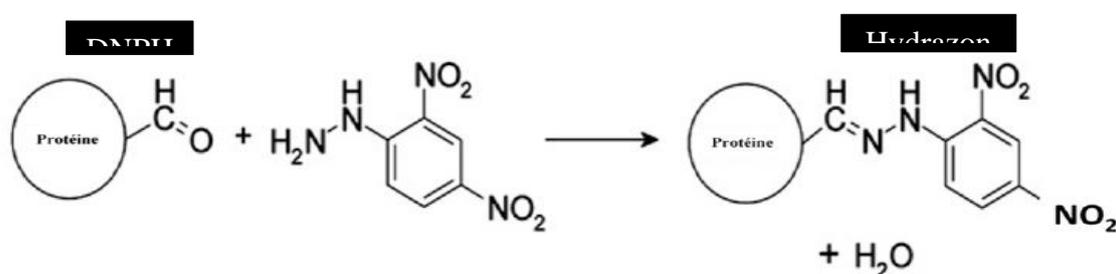


Figure 22 : Structure de complexe 2,4-dinitrophénylhydrazine-dérivé carbonylé

##### III.1.2. Protocole

Dans un premier temps, une solution de TCA à 50% est ajoutée aux échantillons de l'homogénat cellulaire de façon à précipiter les protéines. Ensuite, le culot est récupéré et incubé avec une solution de DNPH (10 mM) solubilisé sous agitation dans du HCl (2M) à température ambiante pendant 1 heure. Le mélange est centrifugé à 4°C pendant 15 minutes à 4000 g. Le culot est ensuite incubé avec un mélange éthanol-acétate d'éthyle (v/v). Cette opération de lavage du DNPH non fixé est répétée 3 fois. Après le dernier lavage, les tubes sont placés sous hotte aspirante afin de sécher le culot qui est ensuite solubilisé dans une solution de guanidine-HCl 6 M à 37°C pendant 15 min sous agitation. Le contenu en groupement carbonyles est mesuré à 370 nm contre un blanc de guanidine en utilisant un coefficient d'absorption molaire de 22 000 M<sup>-1</sup>.cm<sup>1</sup>. Les résultats sont exprimés en nmoles de groupements carbonyles par mg de protéines.

### III.3. Dosage de la quantité de glutathion réduit (GSHt)

#### III.3.1. Principe

Cette technique est basée sur la réaction entre le groupement thiol (–SH) du glutathion et le DTNB [dithiobisnitrobenzoate ou acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque)]. En effet, le groupement SH réduit le DTNB en TNB (thionitrobenzoate ou acide 5-thio (2- nitrobenzoïque)). Le TNB, coloré en jaune, possède un coefficient d'extinction molaire élevé dans le visible (412-415 nm) qui permet un dosage du glutathion présent initialement dans le milieu réactionnel.

#### III.3.2. Protocole

Le dosage des différentes formes de glutathion suit le protocole décrit par Fairbanks et al., (1999). Après traitement, les cellules sont grattées dans 1 ml de tampon phosphate (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 150 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4). L'ajout d'un volume égal de TCA (5%) permet de précipiter les protéines. L'ensemble est centrifugé à 2600×g pendant 5 min. Un aliquot de 130 µl de surnageant est neutralisé par 55 µl d'un tampon HEPES (20 mM) contenant 0,3 M de KOH. Ensuite, 50 µl de cet extrait neutralisé sont additionnés de 100 µl de tampon phosphate comprenant 225 µM de DTNB (acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque, Sigma), 300 µM de NADPH (Sigma) et 23 unités de glutathion réductase (Sigma). La glutathion réductase va permettre de réduire le GSSG en GSH. L'analyse spectrophotométrique à 412 nm de ce mélange permet de déterminer le taux de glutathion total (GSHt) de l'échantillon. Afin de mesurer le taux de glutathion réduit, 50 µl de l'extrait neutralisé initialement sont additionnés de 100 µl de tampon phosphate comprenant 225 µM de DTNB et 300 µM NADPH mais sans glutathion réductase. Les taux de glutathion oxydé sont calculés comme suit :  $2\text{GSSG} = \text{GSHt} - \text{GSH}$ . Les taux de glutathion sont évalués par l'intermédiaire d'une gamme d'étalonnage de GSH (Sigma) de 0 à 20 nmoles.

### III.4. Dosage du taux de peroxydation lipidique (TBARS) tissulaire

La mesure du niveau de la peroxydation lipidique (LPO) a été évaluée par la mesure des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS) comprenant des aldéhydes (dont le MDA) et les lipides hydroperoxydés (Buege et Aust, 1978). Le Malondialdéhyde ou MDA est le marqueur le plus utilisé en peroxydation lipidique.

### III.4.1. Principe

Après traitement acide à chaud, les aldéhydes réagissent avec le TBA (Acide thiobarbiturique) pour former un produit de condensation chromogénique consistant en deux molécules de TBA et une molécule de MDA.

### III.4.2. Mode opératoire

Dans des tubes en plastique et à froid, ont été introduits, dans l'ordre :

- 125 µl d'homogénat (S9) ou 125 µl de TBS (Tube blanc),
- 50 µl de tampon TBS pH 7,4,
- 125 µl de TCA–BHT, pour déprotéiniser le cytosol.

Le contenu des tubes a été vortexé puis centrifugé à 1000 tours/min pendant 10 minutes. 200 µl de surnageant (S) ont été prélevés de chaque tube et 40 µl de HCl (0,6 M) et 160 µl Tris-TBA (solution 2) ont été additionnés. Les mélanges ont été vortexés de nouveau puis incubés à 80°C pendant 10 min. La lecture des densités optiques s'est faite à 530 nm. Cette densité optique, correspondant à la formation du complexe (TBA–MDA), est directement proportionnelle à la concentration de MDA.

### III.4.3. Calcule

La concentration des TBARS a été calculée selon la loi de Beer-Lambert :

$$C = DO \cdot 106 / \epsilon \cdot L \cdot X \cdot Fd$$

Avec :

- C : Concentration de TBARS en n mole par milligramme de protéines
- DO : densité optique lue à 530 nm
- $\epsilon$  : coefficient d'extinction molaire du MDA

$$\epsilon \text{ MDA} = 1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} = 1,56 \cdot 10^5 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$$

- L : longueur du trajet optique = 0,779 cm
- X : concentration de l'homogénat en protéines (mg/ml)
- Fd : facteur de dilution :  $Fd = (VS9 \cdot VS) / (VFi \cdot VF)$  avec :

VS9 est le volume de l'échantillon (125 µl)

VFi est le volume final intermédiaire à la centrifugation (300 µl)

VS est le volume prélevé du surnageant (200 µl)

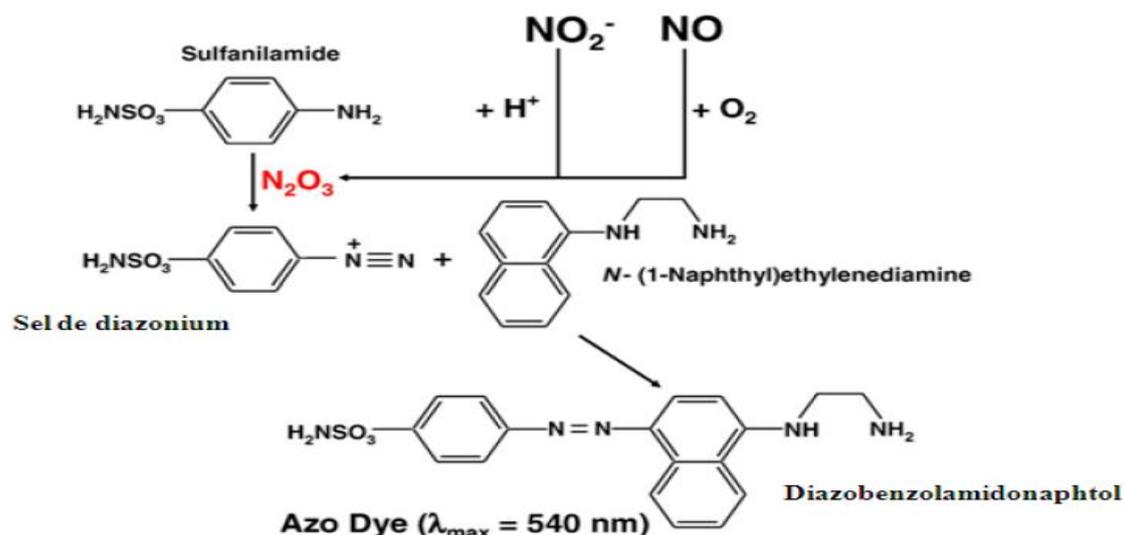
VF est le volume final à l'incubation à 80°C (400 µl), ici  $Fd = 0,2083$

### III.5. Mesure de la production d'oxyde nitrique (NO)

Dès sa production, NO est oxydé en nitrites et nitrates. Nous avons donc effectué une mesure indirecte de cette production via la quantification des nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ).

#### III.5.1. Principe

Les concentrations en nitrites sont déterminées selon la méthode de Griess (Archer, 1993). En présence de réactif de Griess (préparé en combinant une solution de sulfanilamide 1% dans HCl 10N et de N-(1-naphtyl) éthylène diamide 0.1% dans  $\text{H}_3\text{PO}_4$  5% selon une proportion 1 :1) et de  $\text{NO}_2^-$ , l'acide sulfanilique est converti en un sel de diazonium qui s'associe à la N-(1-naphtyl) éthylènediamine pour former le Diazobenzolamidonaphtol, un composé coloré détectable à 540 nm (**Figure 23**).



**Figure 23** : Principe de détermination des nitrites par la réaction de Griess (Bryan et Grisham, 2007)

#### III.5.2. Protocole

Après traitement, Les échantillons du milieu de culture, dilués dans un volume égal et déprotéinisés par le sulfate de zinc, sont incubés 20 minutes en présence d'un volume égal de réactif de Greiss dans une plaque de 96 puits. L'absorbance est lue à 570 nm. La concentration des échantillons est déterminée par l'intermédiaire d'une gamme d'étalonnage de nitrites de 0 à 50  $\mu\text{M}$ . Les résultats sont exprimés en micromolaires ( $\mu\text{M}$ ) ou en nanomoles par mg de protéines (nmole /mg P).

### III.6. Détermination de l'activité de quelques enzymes antioxydantes

#### III.6.1. Activité de la catalase (CAT)

##### III.6.1.1. Principe

Ce dosage a été effectué selon la technique décrite par Aebi (1984). Les catalases sont présentes dans un grand nombre de tissus. Ce sont des enzymes tétramériques. Chaque unité porte une molécule d'hème et une molécule de NADPH. L'activité catalase (CAT) a été mesurée à 240 nm à l'aide d'un spectrophotomètre par les variations de la densité optique consécutives à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Les résultats sont exprimés en µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par minute et par mg de protéines.

##### III.6.1.2. Protocole

Pour un volume final de 1 ml, le mélange réactionnel est constitué de tampon phosphate (0,1M, pH 7) et de 100 µl d'extrait enzymatique. La réaction est initiée par addition de 100 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 0,5 mM. La vitesse de décomposition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est déterminée en mesurant la diminution de l'absorbance à 240 nm pendant 1 min. L'activité du CAT est exprimée en unités internationales (U.I.) c'est-à-dire en µmoles d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> détruites/min/mg de protéines.

$$\text{L'activité de la catalase} = \Delta \text{DO} / (\epsilon \cdot L \cdot X \cdot Fd)$$

Avec :

- ΔDO : variation de la densité optique par minute (A1-A2)
- ε : coefficient d'extinction 0.043 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>
- L : largeur de la cuve en cm
- X : quantité des protéines en mg/ml
- Fd : facteur de dilution par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le tampon phosphate.

### III.7. Activité du superoxyde dismutase (SOD)

#### III.7.1. Principe

Le superoxyde dismutase est l'enzyme antioxydante chargée d'éliminer les ions superoxydes. Les molécules les plus souvent utilisées comme cibles des ions superoxydes sont le NBT et le pyrogallol. Nous avons utilisé la technique au pyrogallol. Elle repose sur la compétition entre la réaction d'oxydation du pyrogallol (10 mM) par

les radicaux superoxydes et la dismutation de ces radicaux par la SOD (Marklund and Marklund 1974), quantifié par spectrophotométrie à 420 nm.

### III.7.2. Protocole

Le protocole commence par une préparation du tampon à partir du Tris pH 8,2 (50 mM). Puis le pyrogallol est dissous dans du HCl (1N) afin d'obtenir une solution à 10 mM. Pour évaluer l'autooxydation du pyrogallol : on prépare le mélange réactionnel qui est constitué de : 960 µl de tampon tris, 40 µl de pyrogallol, après 45 secondes, la cinétique est lancée à 420 nm pendant 1 min. Chaque dosage est réalisé en double : pour chaque essai, on dépose 880 µl de Tampon Tris/EDTA, 80 µl d'échantillon, 40 µl de pyrogallol. Une unité d'activité enzymatique étant définie comme la quantité capable d'inhiber 50% de l'oxydation du pyrogallol. Le pourcentage du pyrogallol est estimé par le % inhibition qui est égal à  $100 - [(\Delta\text{DO}/\text{min}) \text{ test} / (\Delta\text{DO}/\text{min}) \text{ B}] * 100$  ; avec  $(\Delta\text{DO}/\text{min}) \text{ test}$  est le changement de l'absorbance de l'échantillon pendant une minute et  $(\Delta\text{DO}/\text{min}) \text{ B}$  : est le changement de l'absorbance du blanc pendant une minute.

## III.8. Activité de la glutathion peroxydase (GPx)

### III.8.1. Principe

Cette enzyme catalyse l'oxydation de GSH par le cumène hydroperoxyde. En présence de GSH réductase et de NADPH, le glutathion oxydé (GSSG) est immédiatement converti à sa forme réduite avec une oxydation concomitante de  $\text{NADPH} \rightarrow \text{NADP}^+$ . La réduction de cette absorbance a été déterminée à 340 nm. (Randox, 1996). Le recyclage du GSSG, produit de la GPx, permet d'éviter une sous-estimation de l'activité de la peroxydase due à un rétrocontrôle négatif de l'activité par une accumulation des produits de la réaction.

### III.8.2. Protocole

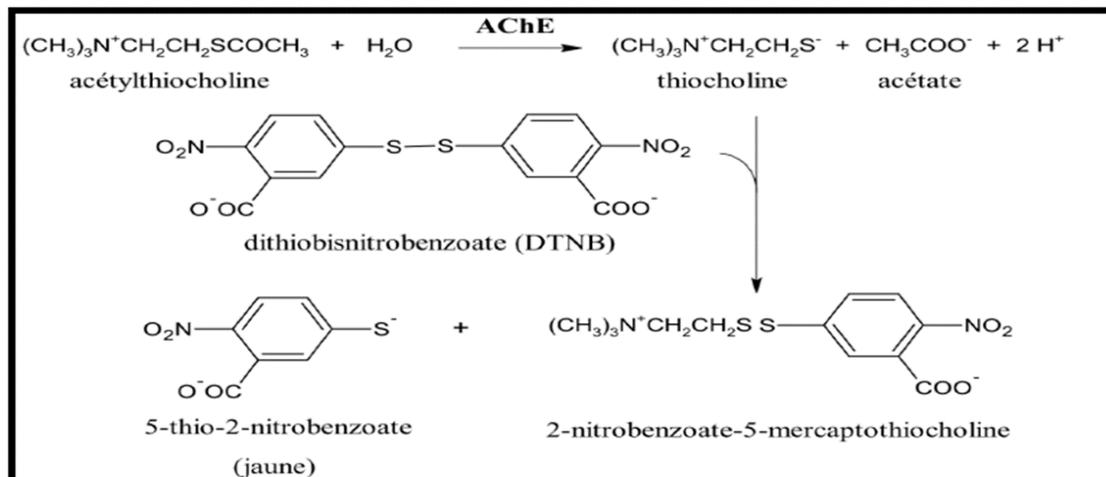
L'activité de la GPx est mesurée par la méthode de Flohe and Gunzler (1984). La détermination de l'activité de la GPx repose ainsi sur la mesure de la disparition du NADPH,  $\text{H}^+$  suivie par spectrométrie à 340 nm, avec comme réactif le t-butyl hydroperoxyde. Le milieu réactionnel a tout d'abord été préparé [1 mM d'EDTA  $\text{Na}_2$  ; 50 mM de Tris base (pH 7,6) ; 4 mM d'azide de sodium]. On dépose ensuite 50 µl d'échantillon, 20 µl de Glutathion réductase (GRase) (208 U/ml), 20 µl de glutathion (0,15), 20 µl de NADPH (8,4 mM), 900 µl de milieu réactionnel. Après une minute

d'attente, 20  $\mu\text{L}$  d'une solution de t-butyl hydroperoxyde (tBOOH 30 mM) sont rajoutés au mélange réactionnel. La décroissance de densité optique du  $\text{NADPH}_2$  est mesurée à 340 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Une courbe standard a été établie au préalable grâce à une gamme de NADPH.

#### IV. Dosage de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE)

##### IV.1. Principe

L'acétylcholinestérase catalyse la réaction de l'hydrolyse de l'acétylcholine en choline et en acide acétique. Elle est spécifique des esters de l'acide acétique. Le principe de ce dosage se fait selon la technique d'Ellman (Ellman et al., 1961). En effet, le thiolcholine, produit de la réaction d'hydrolyse d'acétylcholine, réagit avec le DTNB. Ce dernier réagit avec le groupement thiol de la thiolcholine réduisant l'acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque (DTNB) en acide 5-thio-2-nitrobenzoïque (TNB). Ce produit formé, qui absorbe à 412nm, et donne une coloration jaune qui est directement proportionnelle à l'activité d'acétylcholinestérase.



##### IV.2. Protocole

Le dosage de l'activité de l'acétylcholinestérase (ACHE) a été effectué selon la méthode de (Tsakiris et al., 2000). Brièvement, dans une microplaque à 96 puits, on dépose dans chacun des puits 10  $\mu\text{L}$  de blanc ou d'échantillon dilué ou non, ajouter deux cent quatre-vingt microlitres de MIX (contenant 1 ml d'une solution stock de DTNB (10 mM dans tampon phosphate 0.1 M à pH 7.4), 27 mL de tampon phosphate 0.1 M à pH 7.4) avant de procéder à une agitation de quelques secondes de la microplaque ainsi préparée puis à une incubation de 10 minutes à température ambiante. A l'issue de cette incubation, 10  $\mu\text{L}$  d'une solution d'acétylthiocholine (30 mM dans

du tampon phosphate 0.1 M à pH 7.4) sont ensuite déposés dans chacun des puits. Ces dépôts sont à réaliser en triplicate. La microplaque est ensuite brièvement agitée puis introduite dans le lecteur. L'absorbance de chacun des puits est alors lue à 405 nm durant 4 min (ou 10 min avec 2 min d'intervalle). Cette activité est ensuite exprimée par la différence d'absorbance  $\Delta DO/mg$  de protéines totales.

## V. Technique du dosage de biomarqueurs d'apoptose

### V.1. Evaluation de Cytochrome c

La détermination de taux de cytochrome c dans les tissus de cerveau a été effectué à l'aide de kit commercial (colorimetric test Kit, Cyto-cox1 (Sigma® Germany)), par un dosage colorimétrique optimisé basé sur l'observation des changements d'absorbance du ferrocyclochrome c. Mélanger 200 $\mu$ l d'échantillon dans 100 $\mu$ l de tampon #1 (10mM tris, 250mM sucrose, pH 7,2 et 1,02mg n-Dodecyl-b-D-maltoside (#D4641)). Centrifuger à 10000t/min durée de 10min. récupérer le surnageant, re-ajouté 100 $\mu$ l de tampon #1 et répéter la centrifugation à 10000t/min pendant 10min. incubé le surnageant dans un bain à 28°C. Ajouter 0,95 ml de tampon #2 et 200 $\mu$ l de tampon #3 (tampon de dilution) à une cuve de quartz, ajuster le spectrophotomètre à zéro ajouté 100 $\mu$ l de surnageant et démarrez la réaction par l'ajoute de 50  $\mu$ l de ferrocyclochrome c (Substrat). Dans ce dosage, la lecture à 550nm et le taux de réaction initial est mesuré chaque 15sec pendant la première 45 secondes de la réaction.

### V.2. Evaluation l'activité de la Caspase 3

La Caspase 3 est une protéase de cystéine exprimée de façon ubiquitaire impliqué dans la mort cellulaire programmée (apoptose). Le dosage colorimétrique de caspase 3 est basé sur l'hydrolyse du substrat peptidique [ace-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilide (Ac-DEVD-pNA)] par la caspase 3, entraînant la libération de la [p-nitroaniline (pNA)]. La p-nitroaniline a une forte absorbance au 405 nm ( $\epsilon = 10,5$ ). La réaction comme suivante :

Dans cette étude, l'activité de caspases-3 a été effectuée à l'aide de kit commerciale « Caspase-3 Activity, Colorimetric tests Kits, Réf. 90079, Sigma®, Germany ». Induire un apoptose dans une suspension cellulaire par addition de 10 $\mu$ l de solution (Stauro-Sporine de concentration 1 $\mu$ g/ml) avec 100 $\mu$ l de surnageant (5mg tissu avec 200 $\mu$ l tampon #A centrifuger à 5000t/min) mélanger et incubé le mélange pendant

3 heures à 37°C. Centrifugation à 1000 t/min pendant 5 min à 4°C. Retirer le surnageant par aspiration douce. Ajouté 150µl de tampon de lyse (1x). Incuber l'ensemble dans bain de glace pendant 15 à 20 minutes et centrifuger à 14 000 t/m pendant 10 à 15 minutes à 4°C. Mélanger 100µl de surnageant avec 350µl de tampon #B (tampon de dilution) dans une cuve de quartz et lancer la lecture après l'addition de 25µl de solution (Ac-DEVD-pNA). Suivre l'activité de caspase 3 chaque 30sec pendant 1,5 à 3min selon l'échantillon. Préparer le blanc par le remplacement d'échantillon par l'eau distillé. La lecture spectrophotomètre à 405 nm. Utilisez une cuve en quartz uniquement, car la cuve en plastique Atténuer l'absorption à 405 nm.

## 6. Analyse histologique

### 6.1. Préparation et déshydratation des échantillons

Immédiatement après le sacrifice des animaux, des fractions de tissu de cerveau ont été prélevés. Ils sont immédiatement fixés pendant un mois dans une solution de formol à 10%, dont le but de **la fixation** est d'immobiliser les structures cellulaires dans un état aussi proche que possible de leur état vivant. L'étape suivante est **la déshydratation** et imprégnation par la paraffine, qui se fait à l'aide d'un appareil appelé automate d'inclusion. Cette étape consiste à faire passer les fragments prélevés dans des différents bains successifs. Les différentes étapes réalisées sont les suivantes : étape de déshydratation qui consiste à remplacer l'eau contenue dans les cellules par de l'alcool 100°, étape de substitution qui permet d'échanger l'alcool 100° par le toluène et étape de substitution du toluène par la paraffine. Les séquences de bains nécessaires sont indiquées dans le **tableau 6**.

**Tableau 06 : Étapes de déshydratation des échantillons**

<b>Solution</b>	<b>Temps (minute)</b>
<b>Alcool 50%</b>	30
<b>Alcool 70%</b>	60
<b>Alcool 100%</b>	60
<b>Toluène</b>	90
<b>Toluène</b>	120
<b>Paraffine liquide (56°C)</b>	120
<b>Paraffine liquide (56°C)</b>	120

Les bains successifs d'alcool servent pour la déshydratation, les bains de toluène et de paraffine sont des étapes d'imprégnation qui précèdent l'étape d'inclusion des fragments dans la paraffine froide.

## **6.2. Inclusion en paraffine des tissus et coupe histologique**

Suite à la déshydratation, les échantillons étaient enrobés dans des blocs solides de paraffine, en les plaçant dans des moules en plastique, préalablement remplis de paraffine liquéfiée à 56°C ; celle-ci se solidifie progressivement à température ambiante et forme un bloc incluant le fragment de foie fixé et déshydraté. A partir des blocs obtenus, des coupes histologiques sont confectionnées à l'aide d'un microtome. Puis des coupes de 4 à 5 µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un microtome (Leica). Elles étaient ensuite prélevées et placées sur une lame de verre partiellement couverte d'un mélange d'albumine glycinée et eau distillée (1V/1V/2V), puis gardées à l'étuve à 37°C pendant 24h.

### 6.3. Déparaffinage et coloration Hématoxyline-Eosine

Le déparaffinage a consisté de placer les coupes sur une plaque chauffante pour faire fondre la paraffine puis déparaffinées dans deux bains de toluène pendant une heure pour chacun d'eux, puis Trois bains d'alcool absolu (15 minutes pour chacun). Cette étape a été suivie d'une élimination de toluène par un rinçage avec l'eau courante pendant 10 minutes (réhydratation). Le colorant utilisé est l'hématoxyline-éosine. Les lames sont trempées pendant 5 minutes dans un bain d'hématoxyline. L'hématoxyline est un colorant basique qui colore en bleu violacé les structures basophiles (noyaux). Après un lavage à l'eau de robinet, les lames sont plongées deux fois dans un bain de HCl 1% pour différencier les coupes et obtenir une coloration rose. Ce bain est suivi par deux lavages successifs à l'eau de robinet (2 à 3 minutes chacun). Ensuite, les lames sont trempées pendant 3 minutes dans un bain de carbonate de lithium (solution saturée) jusqu'à obtenir une coloration bleue des coupes. Après un dernier lavage à l'eau de robinet, les lames sont trempées pendant 5 minutes dans un bain d'éosine, ce dernier est un colorant acide qui colore en rose les structures acidophiles (cytoplasme). Un lavage à l'eau de robinet a été effectué après chaque bain de colorant. Après déshydratation des coupes colorées (étapes identiques à celles décrites ci-dessus), le toluène dernier bain dans lequel baignent les coupes est un solvant du baume de Canada (GimbH), ce dernier permet le collage des lamelles sur les lames renfermant les coupes à étudier. Elles sont ensuite observées au microscope optique (Leica) à un grossissement variant de 200 fois, 250 et 400 fois puis photographiées à l'aide d'un appareil photo (Olympus) monté au microscope.

### 7. Dosage des protéines

La concentration des protéines est déterminée par la méthode de (Bradford, 1976) en utilisant l'albumine de sérum de bœuf (BSA) comme standard. Les protéines sont diluées au 1/20 -ème dans de l'eau distillée stérile. Au niveau d'une plaque Elisa 200 µl de réactif de Bradford sont ajoutés ensuite à 20 µl de la dilution et la densité optique est déterminée à 595 nm.

### 9. Analyses statistiques

L'analyse statistique effectuée est soit une analyse de la variance (ANOVA) suivie d'une analyse post-hoc, soit une analyse par des méthodes non paramétriques grâce au logiciel GraphPad prism 8.1 (San Diego, CA, USA). Les différences significatives entre les effets de traitement étaient déterminées par one way ANOVA,

le test Tukey post hoc's est réalisé pour les comparaisons multiple. Les différences sont considérées comme significatives lorsque  $p < 0,05$ . La corrélation est réalisée par le test Spearman. Les données sont exprimées sous forme de moyenne suivie de déviation standard (SEM).

# *Résultats et Discussion*

*Chapitre I : étude phytochimique et évaluation in vitro de l'activité antioxydant et antiradicalaire de l'extrait méthanolique de *Mélissa officinalis* L.*

## I. Introduction

Au cours de la dernière décennie, il y a eu un intérêt significatif pour la phytothérapie dans le traitement de diverses maladies (Bolkent et al., 2005). Les propriétés pharmacologiques et thérapeutiques des plantes médicinales ont été attribuées à des composés chimiques isolés de leurs extraits bruts, qui ont des rôles physiologiques différents à de faibles concentrations, allant de la transduction du signal cellulaire à la défense contre les agents pathogènes (Dastmalchi et al., 2008 ; Pereira et al., 2009). La production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) entraîne un stress oxydatif, qui peut endommager la structure cellulaire, y compris les lipides et les membranes, les protéines et l'acide désoxyribonucléique (ADN) (Marian Valko et al., 2007). Par conséquent, de nombreuses études se concentrent sur l'utilisation potentielle d'antioxydants naturels et synthétiques dans divers modèles *in vitro* et *in vivo* de pathologies humaines qui pourraient être considérés comme de nouveaux agents thérapeutiques dans le traitement des maladies (Dastmalchi et al., 2008). Historiquement, les herbes de la famille des *Lamiaceae* ont été largement utilisées à de nombreuses fins communes, en particulier dans la cuisine et la médecine (Carović-Stanko et al., 2016). Ils sont connus comme des sources naturelles d'antioxydants en raison de leur teneur élevée en polyphénols (Marian Valko et al., 2007 ; Dastmalchi et al., 2008). *Melissa officinalis* (*Lamiaceae*) sont connues sous le nom de mélisse qui pousse largement dans la région méditerranéenne, l'Afrique du Nord, l'Asie occidentale et le sud-ouest de la Sibérie (Herodež et al., 2003 ; Marongiu et al., 2004). *M. officinalis* utilisé en médecine traditionnelle, a également fait l'objet de plusieurs types de recherche qui ont prouvé ses effets bénéfiques tels qu'antitumoral, antimicrobien, antibactérien, anti-inflammatoire et antioxydant (Birdane et al., 2007 ; Spiridon et al., 2011). De nombreux rapports ont démontré que les extraits éthanoliques de *M. officinalis* cultivés en Iran présentent une bonne activité antioxydante (Dastmalchi et al., 2008), de même, l'extrait hydroalcoolique de *M. officinalis* originaire de Roumanie avait une capacité importante de piégeage des radicaux (Spiridon et al., 2011). De plus, les extraits éthanoliques de *M. officinalis* peuvent avoir un potentiel de chimio-prévention contre le cancer (European Medicines Agency, 2013). Selon Barros et al., (2013) L'acide rosmarinique, un composé souvent identifié dans les extraits de plantes *Lamiaceae*, pourrait être utilisé comme agent anti-inflammatoire non stéroïdien. Les études précédentes ont montré que les feuilles de *M. officinalis* contiennent plusieurs classes de constituants dont des composés polyphénoliques (acide rosmarinique, acide caféique et acide), aldéhydes monoterpéniques, sesquiterpènes, flavonoïdes (lutéoline) et tanins (Carnat et al., 1998 ; Jafarpour & Fard, 2016 ; Shakeri et al., 2016). Le glucoside d'acide caftarique est un antioxydant naturel qui inhibe la dégradation des protéines et la carbonylation induites par les

radicaux hydroxyles, et limite l'oxydation de l'ADN (Kontogianni et al., 2013). Lors de l'administration, l'acide caféique agit comme un antioxydant, prévient le stress oxydatif, prévenant ainsi les dommages à l'ADN induits par les radicaux libres (Sentkowska et al., 2015). Des études ont montré que l'acide cinnamique, comme l'acide caftarique, un composé phénolique naturel possède diverses activités biologiques, y compris (Apak et al., 2004)(Q. Liu et al., 2017). Le but principal du présent travail était de quantifier les teneurs totales en phénoliques et flavonoïdes dans l'extrait hydro-alcoolique de *M. officinalis* et également d'identifier les principaux composés de l'extrait en utilisant l'analyse ESI-LC-MS. L'objectif secondaire était d'évaluer l'activité antioxydante de l'extrait de partie aérienne de *M. officinalis* en utilisant quatre méthodes différentes : le dosage de piégeage des radicaux DPPH, l'activité de piégeage ABTS, la capacité antioxydante réductrice cuivrique et le dosage du pouvoir réducteur ferrique. Au final, une estimation de l'importance de la corrélation a été établie entre les composants polyphénols et les activités antioxydantes.

## II. Analyse quantitative de l'extrait de *Mélissa officinalis* L.

### II.1. Taux des polyphénols totaux

Le contenu en phénols totaux de l'extrait méthanolique des feuilles de *M. officinalis* a été déterminé par la méthode de Folin-Ciocalteu et les teneurs obtenues sont exprimées en milligrammes équivalent d'acide gallique par gramme de matière végétale sèche (mg EAG/g MS), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée à l'aide de l'acide gallique. Les résultats obtenus ont montré que la plante étudiée présente une teneur importante en polyphénols estimée à  $118.62 \pm 6.57$  mg EAG /g MS (**Tableau 7**).

### II.2. Taux des flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes totaux a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium. La teneur en flavonoïdes de notre extrait a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage préparée à l'aide de la catéchine et exprimé en milligramme équivalent de catéchine par gramme de matière végétale sèche (mg EC/g MS). D'après les résultats obtenus (**Tableau 7**), la plante étudiée présente une teneur en flavonoïdes égale à  $4.91 \pm 0.05$  mg EC/ g MS.

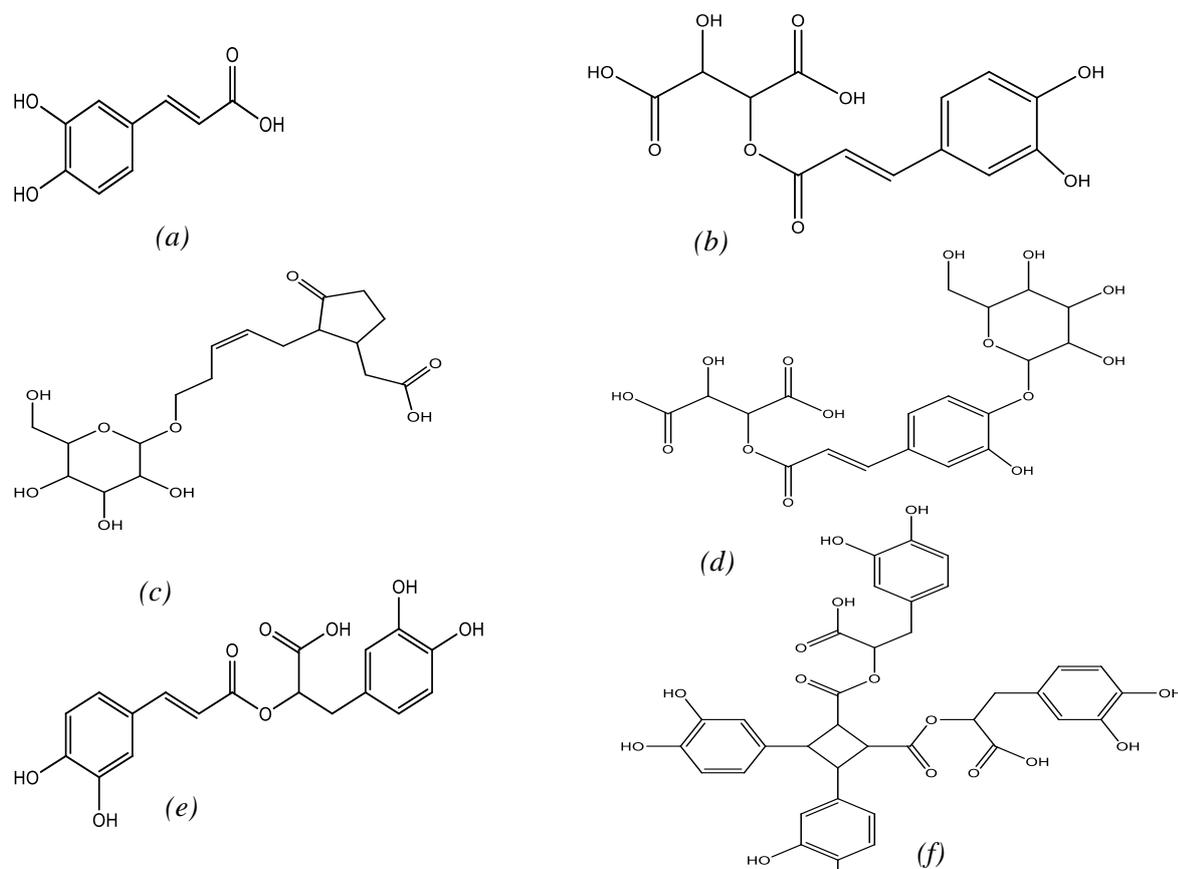
**Tableau 07** : Teneurs en phénols totaux, flavonoïdes l'extrait de *M. officinalis*(1mg/mL)

<i>Contenu des composés</i>	
Taux des polyphénols totaux, (mg EAG/g)	118.62±6.57
Taux des flavonoïdes totaux, (mg QE/g)	52.77±2.50

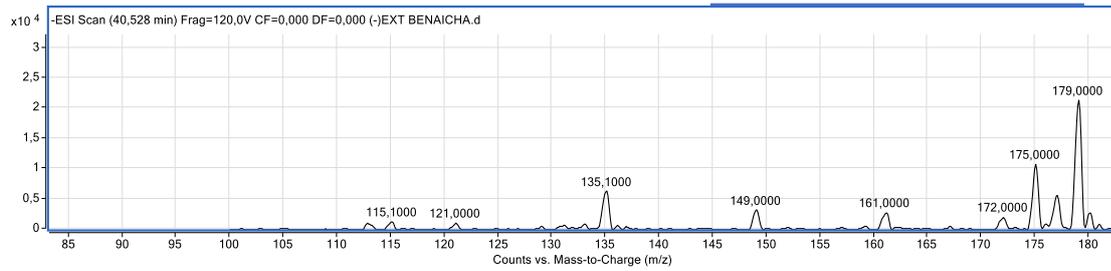
Les valeurs ont été exprimées sous forme de moyennes  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ).

### III. Analyse CLHP-MS de l'extrait méthanolique de *M. officinalis*

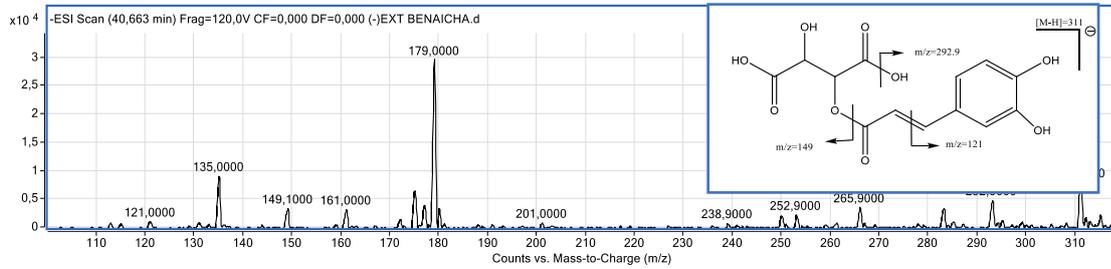
L'analyse de l'extrait méthanolique de *M. officinalis* est effectuée à l'aide d'une chromatographie liquide à haute performance couplée en aval à un spectromètre de masse de type quadripôle et à temps de vol à ionisation par électro-nébulisation (HPLC-ESI-MS), opérant en mode d'ionisation négatif. Six constituants phénoliques ont été identifiés dans l'extrait de *M. officinalis* L. (**Figure 24**). L'identification de chaque composé était principalement basée sur leur temps de rétention, leur spectre de masse et leurs profils de fragmentation MS2 avec des normes analysées dans les mêmes conditions expérimentales et / ou avec des données publiées sur la **figure 25**. Les composés identifiés, leurs temps de rétention et les données spectrales de masse sont résumés dans le **tableau 8**.



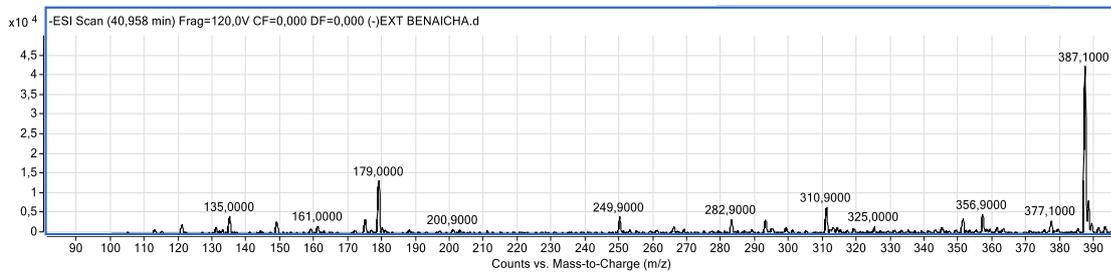
**Figure 24** : Les structures chimiques des composés identifiés dans l'extrait de *M. officinalis* L. : (a) acide caféique, (b) acide tartarique, (c) glucoside d'acide hydroxyjasmonique, (d) glucoside d'acide tartarique, (e) acide rosmarinique et (f) acide sagerinique.



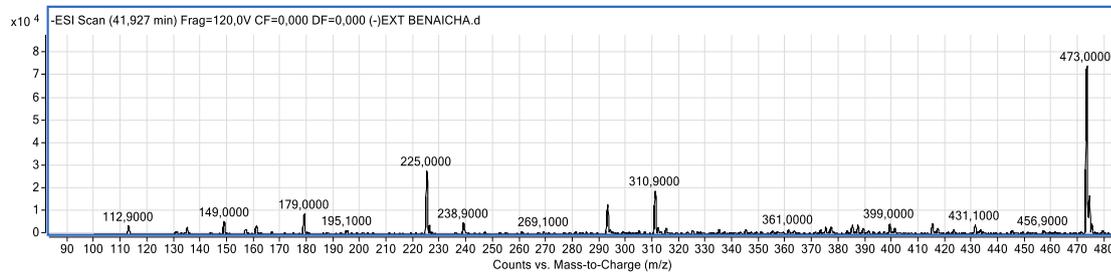
(a)



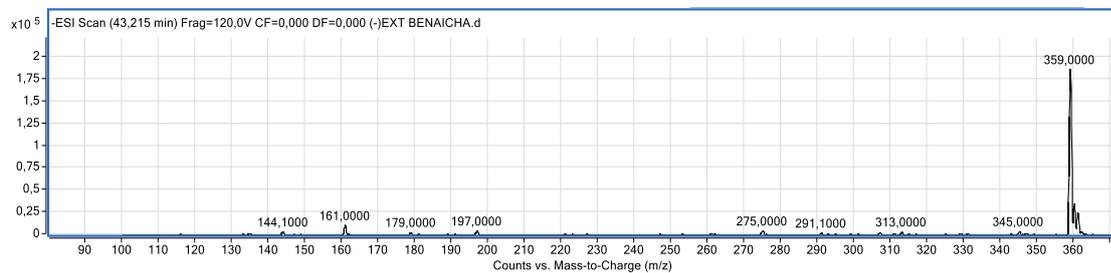
(b)



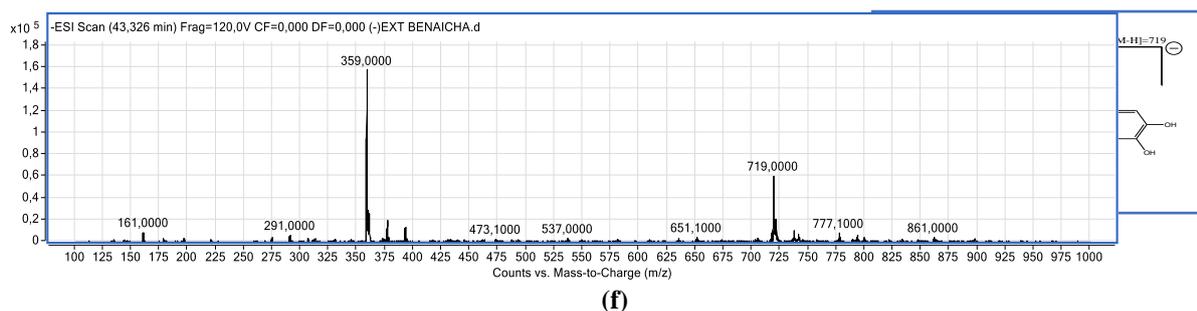
(c)



(d)



(e)



**Figure 25 :** Les spectres de masse en mode d'ionisation négative et schéma de fragmentation simplifié des phénols identifiés dans l'extrait de *M. officinalis* : (a) acide caféique, (b) acide caftarique, (c) glucoside d'acide hydroxyjasmonique, (d) glucoside d'acide caftarique, (e) rosmarinique acide et (f) acide sagerinique.

**Tableau 08 :** L'analyse ESI-LC-MS de certains constituants phénoliques de l'extrait hydro-méthanolique de *M. officinalis* L.

<i>Composés</i>	<i>Tr*</i> (min)	<i>Formule moléculaire</i>	<i>Ion moléculaire [M-H]<sup>-</sup></i> (m/z)	<i>MS<sup>2</sup></i> (m/z)	<i>Mode d'ionisation</i>	<i>Reference</i>
1 <i>Acide caféique</i>	40.528	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	179	135, 175	N	(Ozarowski et al., 2016)
2 <i>Acide caftarique</i>	40.663	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> O <sub>9</sub>	311	135	N	(Ozarowski et al., 2016)
3 <i>Glucoside d'acide hydroxyjasmonique</i>	40.958	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> O <sub>9</sub>	387	179	N	(Ozarowski et al., 2016)
4 <i>Glucoside d'acide caftarique</i>	41.927	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> O <sub>9</sub>	473	225, 310.9	N	(Barros et al., 2013)
5 <i>Acide rosmarinique</i>	43.215	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	359	161	N	(Barros et al., 2013)
6 <i>Acide Sagerinique</i>	43.326	C <sub>36</sub> H <sub>31</sub> O <sub>16</sub>	719	359	N	(Barros et al., 2013)

*Tr* - Temps de rétention.

## VI. Investigation du pouvoir antioxydant de *M. officinalis* L. étude *in vitro*

La mise en évidence des pouvoirs antioxydants neutralisant de l'extrait méthanolique de *M. officinalis* a été réalisée en se référant à différentes techniques chimiques : le dosage de piégeage des radicaux DPPH, l'activité de piégeage ABTS, la capacité antioxydante réductrice cuivrique et le dosage du pouvoir réducteur ferrique.

#### IV.1. Activité antiradicalaire au DPPH

La capacité de l'extrait méthanolique du *M. officinalis*, BHA, BHT, et  $\alpha$ -Tocopherol à céder un électron ou un atome d'hydrogène aux radicaux libres ont été évaluées selon la méthode de 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH). Le test de neutralisation du radical DPPH a été réalisé en présence de différentes concentrations de l'extrait du *M. officinalis* (**Tableau 9**). La concentration inhibitrice à 50 % (CI<sub>50</sub>) est le paramètre la plus utilisé pour l'évaluation du pouvoir antioxydant. Ainsi, nos résultats ont montré que l'extrait méthanolique de *M. officinalis* (CI<sub>50</sub> = 20.53  $\mu$ g/ml) possède une activité anti-radicalaire remarquable, et ceci en se référant aux antioxydants synthétiques, le BHA (CI<sub>50</sub>= 6.14  $\mu$ g/ml), le BHT (CI<sub>50</sub>= 12.99  $\mu$ g/ml), et  $\alpha$ -Tocopherol (CI<sub>50</sub>= 13.02 $\mu$ g/ml).

#### IV.2. Activité du piégeage de l'ABTS

Le **tableau 9** présente le résultat du test ABTS des parties aériennes d'extrait méthanolique de *M. officinalis*, a montré que l'extrait méthanolique de *M. officinalis* (CI<sub>50</sub> = 22.50  $\mu$ g/ml) possède une activité anti-radicalaire remarquable, et ceci en se référant aux antioxydants synthétiques, le BHA (CI<sub>50</sub>= 1.29  $\mu$ g/ml), et le BHT (CI<sub>50</sub>= 1.81  $\mu$ g/ml).

#### IV.3. Test de la capacité inhibitrice du CUPRAC

Nos résultats montrent que l'extrait de *M. officinalis* présente une activité antiradicalaire importante de manière dose dépendante pour toutes les concentrations considérées (0.0156-1  $\mu$ g/ml). La valeur CE<sub>50</sub> (la concentration efficace à 50 %) calculée pour l'extrait méthanolique était 29.18  $\mu$ g/ml remarquablement élevée, et ceci en se référant aux antioxydants synthétiques, le BHA (CE<sub>50</sub>= 5.35  $\mu$ g/ml), et le BHT (CE<sub>50</sub>= 8.97  $\mu$ g/ml).

#### IV.4. Test du pouvoir réducteur ferrique

Nos résultats ont montré que l'extrait méthanolique de *M. officinalis* (CE<sub>50</sub> = 24.09  $\mu$ g/ml) possède une activité anti-radicalaire remarquable, et ceci en se référant aux antioxydants synthétiques, l' $\alpha$ -Tocopherol (CE<sub>50</sub>= 34.93  $\mu$ g/ml), l'acide ascorbique (CE<sub>50</sub>= 6.77  $\mu$ g/ml), et (**Tableau 9**), ce résultat peut refléter de manière significative son activité antioxydante potentielle. La méthode du pouvoir réducteur ferrique représente la capacité des antioxydants contenus dans l'extrait de *M. officinalis* à transformer Fe<sup>3+</sup> en Fe<sup>2+</sup>.

**Tableau 9** : Analyse comparative de l'activité antioxydante de l'extrait de *M. officinalis*.

Extrait et standards	Activité antioxydante			
	DPPH <sup>a</sup>	ATBS <sup>a</sup>	CUPRAC <sup>b</sup>	Pouvoir réducteur ferrique <sup>b</sup>
<i>M. officinalis</i> L	20.53±2.64	22.50±0.67	29.18±2.61	24.09±0.50
BHA	6.14±0.41	1.29±0.30	5.35±0.71	nt
BHT	12.99±0.41	1.81±0.10	8.97±0.94	nt
$\alpha$ -Tocopherol	13.02±0.17	nt	nt	34.93±2.38
Acide ascorbique	Nt	nt	nt	6.77±1.15

Les valeurs exprimées sont des moyennes  $\pm$  S.D. de trois mesures parallèles ; <sup>a</sup> Valeurs exprimées en CI<sub>50</sub> ( $\mu$ g / ml) ; <sup>b</sup> Valeurs exprimées en CE<sub>50</sub> ( $\mu$ g / ml) ; nt : non testé.

#### IV.5. Coefficients de corrélation (r) pour les relations entre les dosages

Un parallélisme significatif entre les valeurs de CI<sub>50</sub>, CE<sub>50</sub>, et les activités antioxydantes pour toutes les méthodes a été attesté. C'est pourquoi, les coefficients de corrélation entre les capacités antioxydantes et la teneur phénolique totale de l'extrait ont été déterminés (**tableau 10**).

**Tableau 10** : Coefficients de corrélation (r) pour les relations entre les dosages.

	TPC <sup>a</sup>	DPPH <sup>b</sup>	ABTS <sup>c</sup>	CUPRAC <sup>d</sup>	Ferric reducing power <sup>e</sup>
TPC <sup>a</sup>	1	/	/	/	/
DPPH <sup>b</sup>	-0.98955	1	/	/	/
ABTS <sup>c</sup>	-0.97103	0.92646	1	/	/
CUPRAC <sup>d</sup>	-0.96097	0.91106	0.99923	1	/
Ferric reducing power <sup>e</sup>	-0.96045	0.91036	0.99916	0.99999	1

<sup>a</sup> Teneur totale en phénol; <sup>b</sup> Concentration du composé d'essai nécessaire pour produire une inhibition de 50% du radical DPPH; <sup>c</sup> Concentration du composé d'essai nécessaire pour produire une inhibition de 50% du radical ABTS; <sup>d</sup> Coefficient de CUPRAC; <sup>e</sup> Coefficient de pouvoir réducteur ferrique.

#### I. Activité anticholinestérase

L'extrait de *M. officinalis* (CI<sub>50</sub>=110.79±0.47  $\mu$ g/ml) ont montré une faible activité contre l'AChE par rapport au standard galantamine (CI<sub>50</sub>=5.0±0.1 $\mu$ g/ml). L'extrait de *M. officinalis* (CI<sub>50</sub>=16,36±0,15  $\mu$ g/ml) a présenté une activité inhibitrice contre la BChE, plus élevée que celle du standard galantamine (CI<sub>50</sub>=38±0.5  $\mu$ g/ml). (**Tableau 11**).

**Tableau 11** : Inhibition de l'activité anticholinestérase par l'extrait de *M. officinalis*.

Extrait et standard	Activité anticholinestérase	
	AchE <sup>a</sup>	BchE <sup>a</sup>
<i>M. officinalis</i> L	110.79±0.47	16,36±0,15
Galantamine	5.0±0.1	38±0.5

Les valeurs exprimées sont des moyennes  $\pm$  S.D. de trois mesures parallèles ; <sup>a</sup> valeurs exprimées en CI<sub>50</sub> ( $\mu$ g / ml).

## II. Discussion

Dans la deuxième section de notre travail, les composés bioactifs des feuilles de *M. officinalis* ont été extraits en utilisant un solvant polaire qui est le méthanol 'extrait méthanolique'. *In vitro*, une étude complète a été réalisée en utilisant plusieurs tests d'exploration des éventuels pouvoirs antioxydants (le dosage de piégeage des radicaux DPPH, l'activité de piégeage ABTS, la capacité antioxydante réductrice cuivrique et le dosage du pouvoir réducteur ferrique). De plus de multiples informations sur la composition chimique de l'extrait méthanolique de *M. officinalis* ont également été explorées.

La teneur phénolique totale (exprimée en équivalent acide gallique en mg / g matière, (mg EAG/g) de l'extrait de *M. officinalis* L. est présentée dans le tableau 7. Le rendement d'extraction était de 13,37% ; le contenu phénolique total était de  $118,62 \pm 6,57$  mg EAG/g. Le résultat obtenu était supérieur à ceux rapportés pour les mêmes espèces en Égypte et en Inde ( $71,02 \pm 4,43$  et  $48,66 \pm 3,03$  mg EAG/g, respectivement) (Fernandes et al., 2016 ; Hassan et al., 2019). Cependant, les échantillons du Brésil et de Taïwan étaient caractérisés par une teneur égale en phénols ( $177 \pm 13$  mg et  $175,15 \pm 11,02$  mg EAG/g, respectivement) (Lin et al., 2012 ; Franco et al., 2018). Ces différences de teneur en phénols peuvent être attribuables à un large éventail de facteurs, tels que les différences génotypiques, les conditions géographiques et climatiques, le moment de la récolte et les traditions culturelles (Medana et al., 2008 ; Pisoschi & Negulescu, 2012).

La teneur totale en flavonoïdes dans l'extrait de *M. officinalis* L. était de 52,77 mg de quercétine QE / g d'extrait. La valeur obtenue était supérieure à celle déterminée dans l'extrait hydroalcoolique du Brésil ( $26 \pm 3$  mg QE / g d'extrait) (Franco et al., 2018). La plupart des études antérieures sur diverses plantes ont montré que le méthanol absolu est recommandé pour l'extraction des flavonoïdes (Hassan et al., 2019). Ces composés flavonoïdes ont une grande échelle d'activités chimiques et biologiques. En effet, leur force d'activité antioxydante est due à sa formule composée, en fonction des structures chimiques et du nombre et de la position des groupes hydroxyle (Aprioku, 2013).

Après l'évaluation quantitative et l'analyse phytochimique, en utilisant LC-MS, extrait hydroalcoolique de *M. officinalis*, les feuilles ont montré l'existence des principaux phénols. Un total de six composés phénoliques a été identifiés. Cependant, plusieurs éléments de preuve ont été déterminés. L'identification était basée sur la littérature disponible pour ces composés (Barros et al., 2013 ; Ozarowski et al., 2016). Le composant **1** a été identifié comme l'acide caféïque

présentait un ion  $[MH]^-$  à  $m/z$  179 (figure 41 (a)), conduisant à trois pics à 161, 135 et 121 ( $m/z$ ) correspondant à la forme déprotonée de 3-Acide (4-hydroxyphényl) acrylique, 4-vinylbenzène-1,2-diol et 3,4-dihydroxyphényl méthine respectivement (figure 41 (a)) sur la base du schéma de fragmentation trouvé dans la littérature (Zeng et al., 2006). Comme le montre la figure 41 (b), un ion moléculaire  $[MH]^-$  à  $m/z$  312, donnant un ion prédominant à  $m/z$  179. Le composant **2** (acide caftarique) a été identifié selon leur spectre de masse, montrant un ion moléculaire  $[MH]^-$  à  $m/z$  311 et l'ion fragment caractéristique à  $m/z$  179 correspond à la forme déprotonée de l'acide 2-(formyloxy)-3-hydroxysuccinique (figure 41 (b)) (Ozarowski et al., 2016). De plus, ce composant présentait deux pics 135 et 149 ( $m/z$ ) dans leur spectre de masse correspondant respectivement à la forme déprotonée du vinylbenzène-1,2-diol et de l'acide 2,3-dihydroxysuccinique (Zeng et al., 2006). Le composant **3** (glucoside d'acide hydroxyjasmonique) a été identifié selon leur spectre de masse, montrant un ion moléculaire  $[MH]^-$  à  $m/z$  387 et un ion fragment caractéristique à  $m/z$  179 correspondant au 6-(hydroxyméthyl) tétrahydro-2H-pyrane déprotoné -2,3,4,5-tétraol (figure 41 (c)), le composant **3** est dérivé de l'acide jasmonique (Ozarowski et al., 2016). De plus, ce composant présentait un ion  $[M-C_2H_3O_2-OH]^-$  à  $m/z$  310 (figure 41 (c)) et correspond à des résultats similaires précédemment rapportés (Barros et al., 2013 ; Ozarowski et al., 2016). La figure 41 (d) montre un ion moléculaire  $[MH]^-$  à  $m/z$  473 donnant des ions produits à  $m/z$  179 et 310,9 correspondants respectivement au glucose déprotoné et à l'acide caftarique, et sur la base des résultats précédemment rapportés, le composant **4** était identifié comme glucoside d'acide caftarique (dérivé d'acide caftarique) (Barros et al., 2013). Le composant **5** a été identifié comme l'acide rosmarinique présentait un ion moléculaire  $[MH]^-$  ion à  $m/z$  359, conduisant à trois pics à 197, 179 et 161 ( $m/z$ ) correspondant à la forme déprotonée de 3-(3,4 les acides-dihydroxyphényl) lactique et caféique et leurs formes déshydratées, respectivement (figure 41 (e)). Ces résultats étaient en accord avec le schéma de fragmentation proposé par Liu A. H, et al., 2007 . Le composant **6** a été identifié comme de l'acide sagerinique sur la base du modèle de fragmentation trouvé dans la littérature où la dimérisation s'était produite par une union des groupements oléfiniques et soutenue par un ion parent prédominant à  $m/z$  719 compatible avec  $[MH]^-$  et un pic de base à  $m/z$  359 correspondant à  $[M/2-H]^{-2}$  (figure 2 (f)) (Nuengchamnong et al., 2011).

Les propriétés antioxydantes de *M. officinalis L.* sont associées à la forte teneur en composés phénoliques et flavonoïdes qui peuvent contribuer aux activités antioxydantes de la plante (Mabrouki et al., 2018). Dans la présente étude, les activités antioxydantes de *M.*

*officinalis* L. ont été déterminées à l'aide de quatre tests différents: activité de piégeage des radicaux DPPH, activité de piégeage ABTS, pouvoir réducteur cuivrique et réducteur ferrique.

Le piégeage des radicaux libres DPPH par les antioxydants est dû à leur capacité à donner de l'hydrogène (Ma et al., 2019). L'extrait se avérés avoir une activité antioxydante significative car ils nécessitent une faible concentration afin d'inhiber 50% de DPPH ( $20,53 \pm 2,64 \mu\text{g/mL}$ ). En comparant avec d'autres résultats, Caleja et al., (2018) travaillant sur *M. officinalis* et utilisant le même solvant ont rapporté une activité antioxydante plus faible ( $\text{CI}_{50} = 79 \pm 2 \mu\text{g/mL}$ ). En revanche, les résultats obtenus dans cette étude sont similaires à ceux rapportés par Lin et al., (2012) et Mabrouki et al., (2018) ( $\text{CI}_{50} = 36,15 \pm 1,71 \mu\text{g/mL}$ ;  $18,16 \pm 0,64 \mu\text{g/mL}$  respectivement). Une autre méthode pour évaluer l'activité antiradicalaire de l'extrait de *M. officinalis* test de décoloration ABTS est applicable pour les antioxydants hydrophiles et lipophiles pour mesurer la perte de couleur lorsqu'un antioxydant est ajouté au chromophore bleu-vert  $\text{ABTS}^+$  (2,2-azino-bis (acide 3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonique)) (Alam et al., 2013). L'extrait de *M. officinalis* réduit  $\text{ABTS}^+$  en ABTS et le décolore. Le résultat du test ABTS des parties aériennes d'extrait méthanolique de *M. officinalis* présenté une forte activité a montré ( $\text{CI}_{50} = 22,50 \pm 0,67 \mu\text{g/mL}$ ) par rapport à la perfusion de *M. officinalis* à celle rapportée par Gayoso et al., (2018), ( $\text{CI}_{50} = 491,67 \pm 16,67 \mu\text{g/mL}$ ). Les résultats obtenus semblent mieux comparés à ceux de Dastmalchi, K. et Jafarpour, M. avec une  $\text{CI}_{50}$  de  $8,60 \pm 1,48 - 12,7 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$  respectivement, pour l'extrait éthanolique de *M. officinalis*. Les résultats ont montré une association entre le pouvoir réducteur d'un composé bioactif et l'activité antioxydante, ce résultat peut refléter de manière significative son activité antioxydante potentielle (Alam et al., 2013). La méthode du pouvoir réducteur ferrique représente la capacité des antioxydants contenus dans les extraits à transformer  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$ . La somme de  $\text{Fe}^{2+}$  était accompagnée de la mesure à une absorption de 700 nm (Mohammedi et al., 2019). Le tableau 9 présente la valeur du pouvoir réducteur ferrique  $\text{CE}_{50}$  de l'extrait de *M. officinalis* par rapport aux standards  $\alpha$ -tocophérol et acide ascorbique. Nos résultats ont montré que *M. officinalis* avait un pouvoir réducteur ferrique efficace ( $\text{CE}_{50} = 24,09 \pm 0,50 \mu\text{g/mL}$ ) par rapport à l' $\alpha$ -tocophérol ( $\text{CE}_{50} = 34,93 \pm 2,38 \mu\text{g/mL}$ ). Le pouvoir réducteur obtenu était supérieur à celui de l'extrait éthanolique de *M. officinalis* précédemment rapporté ( $\text{CE}_{50} = 49 \pm 1 \mu\text{g/mL}$ ) (Caleja et al., 2018). La méthode CUPRAC est basée sur la réduction de  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^+$  à pH neutre par des réducteurs (antioxydants) présents dans un échantillon, en utilisant le réactif cuivre (II) neocuproïne comme oxydant chromogène (Pisoschi & Negulescu, 2012). Le résultat de l'essai CUPRAC de l'extrait de *M. officinalis* est présenté (tableau 9). L'extrait de *M. officinalis* a

montré une forte activité antioxydante ( $CE_{50} = 29,18 \pm 2,61 \mu\text{g/mL}$ ) est comparable à celle rapportée par Bendjabeur et al., (2018) ( $CE_{50} = 19,40 \pm 0,78 \mu\text{g/mL}$ ). De plus, une activité plus élevée que la perfusion de *M. officinalis* a été signalée par Sentkowska et al., (2015) (267 mg GAE/g et 2,62 mmolTRE / g). L'activité élevée de l'extrait méthanolique de *M. officinalis* contre la BChE, et l'AChE peut être due à la présence plus importante des polyphénols (Ibragić et al., 2014).

Plusieurs études ont montré que l'activité antioxydante des extraits de plantes est étroitement liée aux composés phénoliques totaux et non à un composé phénolique individuel (Aprioku, 2013). Cette étude observe une corrélation négative du contenu phénolique total avec les activités antioxydante. Le coefficient de corrélation entre le contenu phénolique total et l'activité de piégeage des radicaux DPPH ( $r = -0,98955$ ) était le plus élevé, comparé à celui du contenu phénolique total avec les autres tests d'activité ABTS ( $r = -0,97103$ ,  $-0,96097$  et  $-0,96045$ , respectivement pour Activité ABTS, test CUPRAC et pouvoir réducteur ferrique). Parmi toutes les activités antioxydantes, la corrélation la plus élevée entre le pouvoir réducteur et l'activité CUPRAC ( $r = 0,99999$ ). Pendant ce temps, une corrélation positive a été obtenue entre l'activité de piégeage des radicaux DPPH et la valeur de l'activité ABTS ( $r = 0,92646$ ), l'activité de piégeage des radicaux DPPH et le test CUPRAC ( $r = 0,91106$ ) et l'activité de piégeage des radicaux DPPH et le pouvoir de réduction ferrique ( $r = 0,91036$ ). Les corrélations hautement significatives de cette étude soutiennent l'hypothèse selon laquelle les composés phénoliques contribuent de manière significative à la capacité antioxydante totale des espèces végétales examinées à la suite des conclusions de Piluzza & Bullitta, (2011).

*Chapitre II : Etude in vivo des mécanismes de toxicité de Lambda-cyhalothrine au niveau du cerveau (Hippocampe, Cortex, et Striatum) et le rôle cytoprotecteur de l'extrait méthanolique de Mélissa officinalis L : Implication du processus oxydatifs et apoptotiques*

## I. Introduction

Les produits phytosanitaires jouent un rôle essentiel dans l'agriculture ; en protégeant les cultures contre les ravageurs, les maladies, les mauvaises herbes et les insectes ravageurs (Dar et al., 2021). Les insecticides représentent près d'un quart du marché des produits phytosanitaires (El Bouzaidi et al., 2020). Cependant, on s'attend à ce que l'utilisation intensive de ces produits chimiques entraîne la contamination des aliments par leurs résidus, ce qui présente un risque dangereux pour les organismes non cibles, en particulier pour la santé humaine (Neuwirthová et al., 2019). En effet, ces substances chimiques sont responsables de l'apparition de plusieurs types de maladies chez l'homme et l'animal, telles que les troubles hématologiques (El-Bialy et al., 2020), le cancer et les troubles de la reproduction, les perturbations endocriniennes, l'immunomodulation et la neurodégénération et les troubles neurocomportementaux (Gasmi et al., 2017). Une nouvelle génération de pyréthrinoïdes (deltaméthrine et lambda-cyhalothrine) est largement utilisée en agriculture en Algérie car ils sont pratiques et plus hydrosolubles, donc moins persistants, par rapport aux organochlorés et organophosphorés. Bien que leur action insecticide soit bien étudiée, la compréhension du devenir des pyréthrinoïdes de synthèse dans les matrices biologiques et de leur degré de toxicité est devenue une préoccupation dans les pays développés du monde (Allache et al., 2017). Une utilisation intensive des LCT a été associée à de graves effets potentiellement néfastes pour les non-cibles. Organismes, y compris les humains et les animaux. En effet, la LCT a plusieurs effets toxiques, étant donné qu'il agit dans plusieurs voies enzymatiques, il a également un grand potentiel pour déclencher un stress oxydatif, perturber les activités des neurotransmetteurs et moduler l'immunité (Fetoui et al., 2009, Aouey et al., 2019). Plus précisément, selon les travaux de Ansari (Ansari et al., 2012a), l'exposition des rats à ce pesticide non systémique à la dose de 0,5 mg / kg de poids corporel, po, pendant 28 jours, n'a montré aucun effet sur la peroxydation lipidique et les taux de protéine carbonyle chez le cortex frontal, le corps strié, l'hippocampe et l'hypothalamus, tandis que l'étude développée par Bush (Bush et al., 2017), a indiqué qu'une exposition orale de 28 jours au LCT provoque des dommages oxydatifs au cerveau de souris qui à son tour pourraient être responsables de la neurotoxicité. Juste après, une autre étude a suggéré que l'induction du stress oxydatif et des dommages à l'ADN était associée à des changements histologiques dans le cerveau des rats exposés à un tiers de la DL<sub>50</sub> (Yahia et al., 2019). Il convient de mentionner que, selon la littérature consultée, les études menées sur ce pesticide non systémique au niveau régional du cerveau, en particulier dans la zone de l'hippocampe, ne sont pas suffisantes et manquent souvent des mécanismes d'effet sous-jacent de la LCT sur la neurotoxicité animale. Néanmoins, des études plus détaillées sont nécessaires

pour prouver ces effets principalement après une exposition à long terme. Plusieurs maladies neurodégénératives sont émises par l'effet délétère des radicaux libres car elles sont responsables de nombreux types de maladies neurodégénératives qui sont à l'origine de troubles locomoteurs (maladie de Parkinson) et de perte de mémoire et de capacité d'apprentissage (maladie d'Alzheimer) (Cole & Vassar, 2007, Gasmi et al., 2017). Dans ce contexte pathologique, l'attention scientifique est focalisée sur le potentiel cytoprotecteur des phyto-substances nutraceutiques ou bioactives produites par les plantes médicinales. En effet, les plantes médicinales ayant une activité neurobiologique peuvent être des cibles potentielles pour la découverte de médicaments (Gomes et al., 2009). Leurs puissantes bioactivités et leurs toxicités relativement faibles leur ont fourni les bons ingrédients en médecine alternative complémentaire et en supplémentation nutritionnelle (Fernandes et al., 2016).

De plus, plusieurs études ont montré que l'extrait éthanolique de *Melissa officinalis* L. améliore considérablement l'apprentissage et la mémoire chez le rat (Martins et al., 2012, Ozarowski et al., 2016). Certains travaux ont également rapporté que *Melissa officinalis* L. a des effets antioxydants, on peut donc en conclure qu'elle a un potentiel thérapeutique et préventif contre les maladies liées au stress oxydatif (de Carvalho et al., 2011). Néanmoins, selon les données scientifiques actuelles, il semble qu'il n'y ait pas d'attention portée à l'expérience de l'effet *Melissa officinalis* L vers la neurotoxicité des pesticides lors d'une exposition à long terme aux LCT.

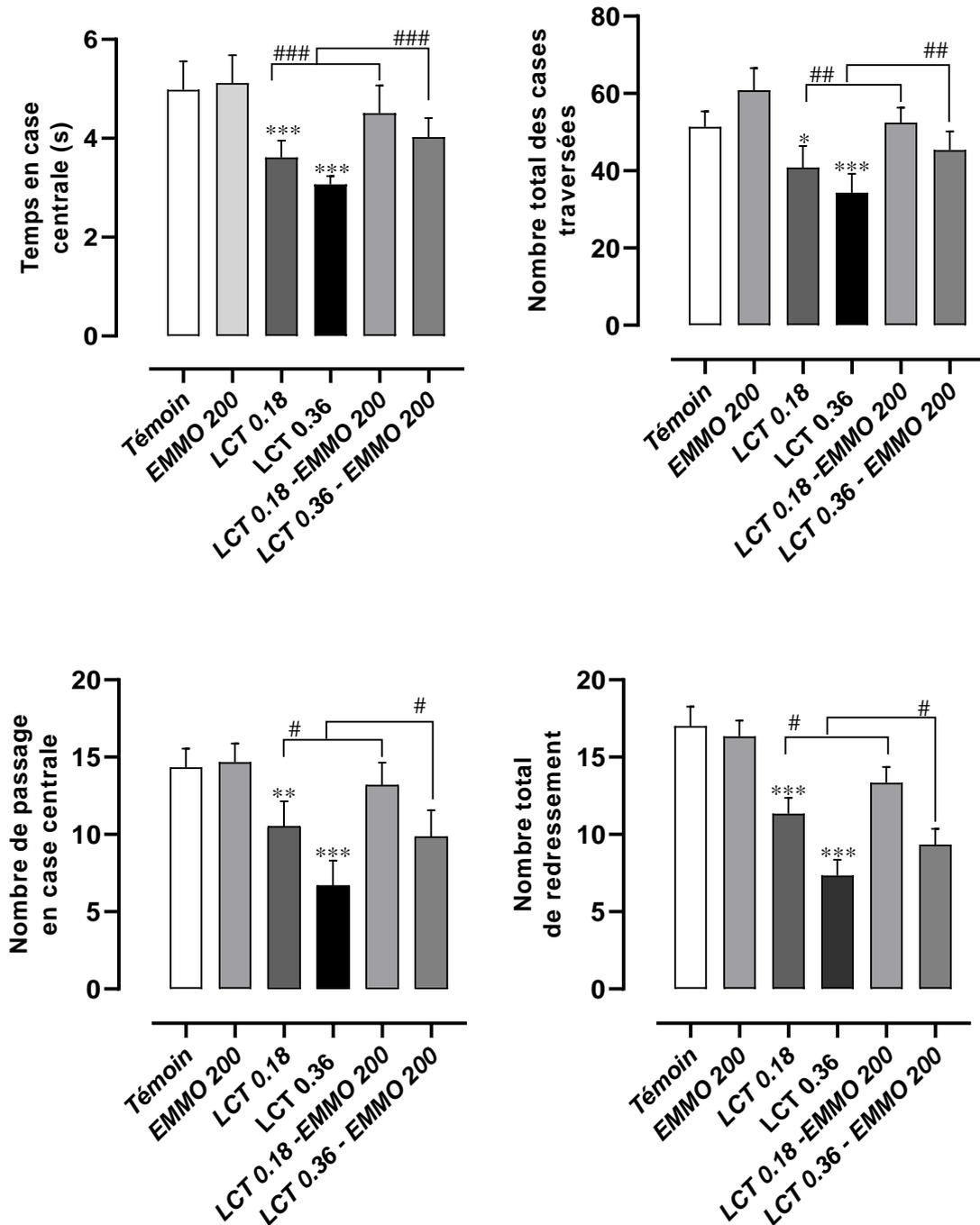
Nous nous sommes intéressés dans ce chapitre à l'étude *in vivo* des mécanismes de toxicité de Lambda-cyhalothrine au niveau de différentes régions du cerveau (hippocampe, cortex, et striatum) à de faibles doses pendant 90 jours de traitement : Implication du processus oxydatifs et apoptotiques, l'étude de l'aspect histopathologique du cerveau ; et aussi, pour rechercher un rôle potentiel dans la cytoprotection barrière de *Melissa officinalis* L.

## II. Mesures comportementales chez les animaux exposés à deux doses de LCT seuls ou mélangées avec EMMO

### II.1. Activité locomotrice et exploratoire des animaux dans le test d'open-field

Effet de l'administration orale de LCT à différentes doses (LCT 0,18 ; et LCT 0,36), extrait de *Melissa officinalis* L (EMMO 200) seul et leur association (EMMO 200 + LCT 0,18 et EMMO 200 + LCT 0,18) pendant 90 jours. Les résultats du test open-field sur l'activité locomotrice et exploratoire sont représentés ci-dessous. (Fig 29). Quatre paramètres ont été choisis pour cette étude : (i) temps en case centrale, (ii) nombre total des cases traversées, (iii) nombre de passage en case centrale et (iv) nombre de redressement.

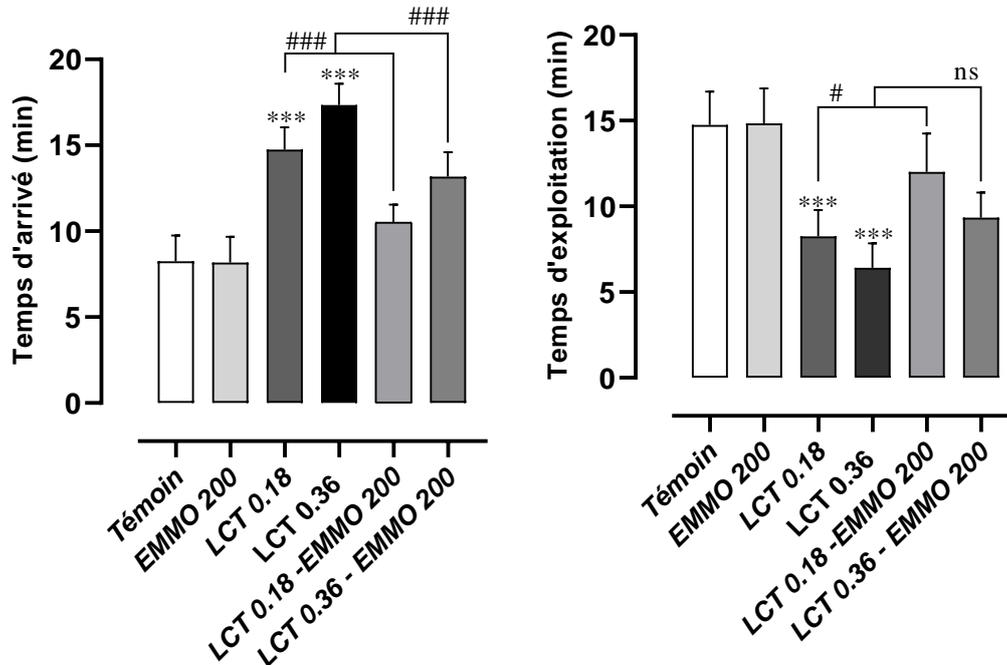
L'analyse statistique des différentes variables mesurées dans ce test a révélé une différence significative entre les groupes traités. Nous avons noté une diminution significative dans les groupes traités par LCT par rapport aux groupes témoins en ce qui concerne le temps de latence en case centrale (LCT 0.18 :  $p = 0.0002$  ; LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ), le nombre total des cases traversées (LCT 0.18 :  $p = 0.0092$  ; LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ), le nombre de passage en case centrale (LCT 0.18 :  $p = 0.0015$  ; LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ), et le nombre de redressement (LCT 0.18 :  $p < 0.0001$  ; LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ), au contraire enregistrée une augmentation significative chez les groupes (EMMO 200 + LCT 0,18 ; EMMO 200 + LCT 0,36) par rapport aux groupes LCT 0,18 et LCT 0,36, le temps de latence en case centrale (EMMO 200 + LCT 0,18  $p = 0.0230$  ; EMMO 200 + LCT 0,36  $p = 0.0132$ ), le nombre total des cases traversées (EMMO 200 + LCT 0,18  $p = 0.0031$  ; EMMO 200 + LCT 0,36  $p = 0.0058$ ), le nombre de passage en case centrale (EMMO 200 + LCT 0,18  $p = 0.0450$  ; EMMO 200 + LCT 0,36  $p = 0.0111$ ), et le nombre de redressement EMMO 200 + LCT 0,18  $p = 0.0329$  ; EMMO 200 + LCT 0,36  $p = 0.0439$ ).



**Figure 26** : Activité locomotrice et exploratoire des rats dans le test d'open-field après l'administration orale de LCT à différentes doses (LCT 0,18 ; et LCT 0,36), extrait de *Melissa officinalis* L (EMMO 200) seul et leur association (EMMO 200+ LCT 0,18 et EMMO 200 + LCT 0,18) pendant 90 jours. Les résultats dans chaque groupe représentent la moyenne  $\pm$  SEM. ;  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ : groupe traité par LCT par rapport au groupe témoin ; ###  $p < 0,001$ : groupes (EMMO 200 + LCT 0,18 et EMMO 200 + LCT 0,36) par rapport aux groupes LCT 0,18 et LCT 0,36 (mg / kg / jour).

## II.2. Niveau d'anxiété des animaux dans labyrinthe classique

Le niveau d'anxiété des animaux après l'administration orale de LCT à différentes doses (LCT 0,18 ; et LCT 0,36), extrait de *Melissa officinalis* L (EMMO 200) seul et leur association (EMMO 200+ LCT 0,18 et EMMO 200 + LCT 0,18) a été évalué après 90 jours. Les résultats sont présentés dans la figure ci-dessous.



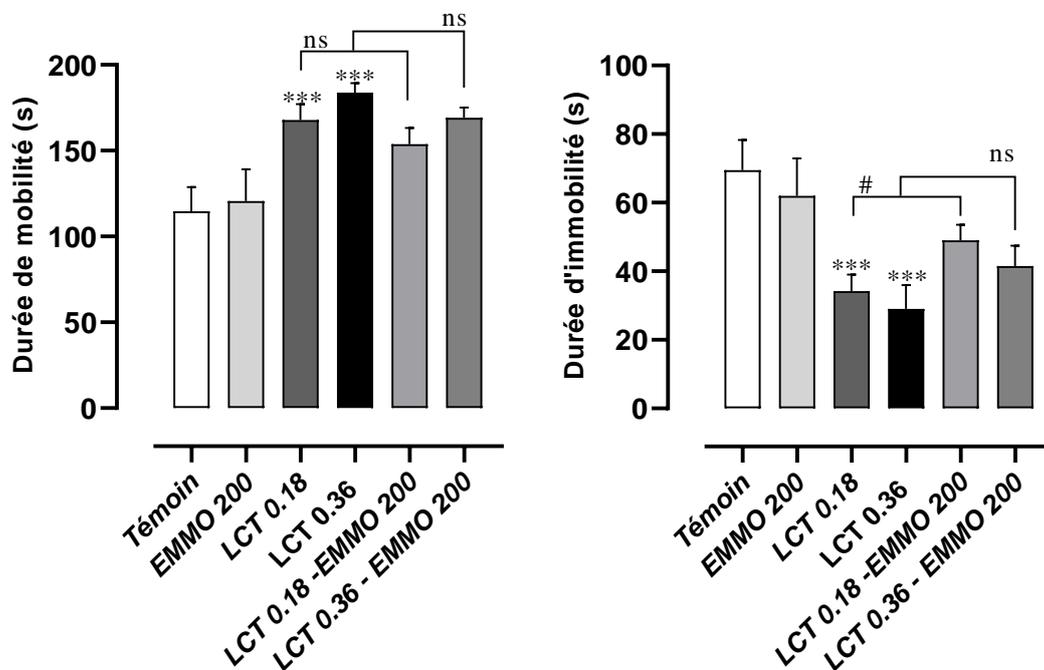
**Figure 27 :** Niveau d'anxiété des animaux dans le labyrinthe classique après l'administration orale de LCT à différentes doses (LCT 0,18 ; et LCT 0,36), extrait de *Melissa officinalis* L (EMMO 200) seul et leur association (EMMO 200+ LCT 0,18 et EMMO 200 + LCT 0,18) pendant 90 jours. Les résultats dans chaque groupe représentent la moyenne  $\pm$  SEM. ;  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ : groupe traité par LCT par rapport au groupe témoin ; ###  $p < 0,001$ : groupes (EMMO 200 + LCT 0,18 et EMMO 200 + LCT 0,36) par rapport aux groupes LCT 0,18 et LCT 0,36 (mg / kg / jour).

Nos résultats ont montré que l'exposition au LCT a affecté le niveau d'anxiété des animaux. Nous avons noté une augmentation significative du temps d'arrivée chez les groupes traités par LCT comparativement aux témoins (LCT 0,18 :  $p < 0,0001$  ; LCT 0,36 :  $p < 0,0001$ ), et une diminution significative de temps d'exploitation chez les groupes traités par LCT par rapport aux groupes témoins (LCT 0,18 :  $p < 0,0001$  ; LCT 0,36 :  $p < 0,0001$ ). Au contraire, nous avons observé une diminution significative chez les groupes (EMMO 200 + LCT 0,18 ;

EMMO 200 + LCT 0,36) par rapport aux groupes LCT 0,18 et LCT 0,36 dans le temps d'arrivée (EMMO 200 + LCT 0,18  $p < 0.0001$  ; EMMO 200 + LCT 0,36  $p = 0.0001$ ), et une augmentation significative chez le group (EMMO 200 + LCT 0,18) par rapport au groupe LCT 0,18 et dans le temps d'exploitation (EMMO 200 + LCT 0,18  $p = 0.0134$  ; EMMO 200 + LCT 0,36  $p = 0.0001$ ). Tandis que ces résultats n'ont montré aucune variation statistiquement significative chez le groupe (EMMO 200 + LCT 0,36) par rapport au groupe LCT 0,36 dans le temps d'exploitation.

### II.3. L'état de dépression des animaux dans le test de nage forcé

L'exposition des rats au LCT pendant 90 jours a révélé un effet anxiogène. Les résultats sont présentés dans la figure ci-dessous.



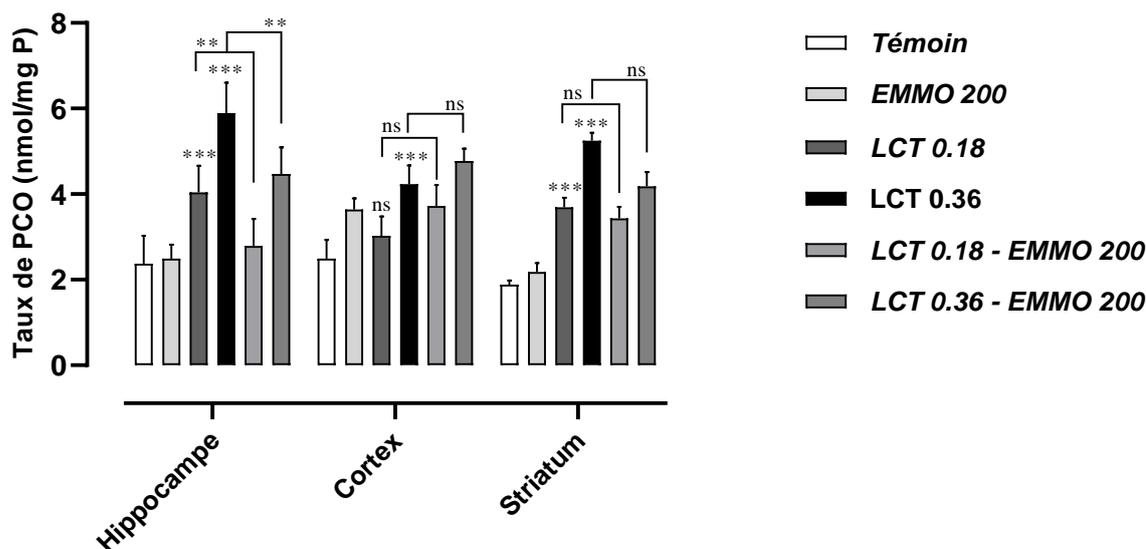
**Figure 28 :** Exploration et état d'anxiété dans le test de nage forcé après l'administration orale de LCT à différentes doses (LCT 0,18 ; et LCT 0,36), extrait de *Melissa officinalis* L (EMMO 200) seul et leur association (EMMO 200 + LCT 0,18 et EMMO 200 + LCT 0,18) pendant 90 jours. Les résultats dans chaque groupe représentent la moyenne  $\pm$  SEM. ;  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ : groupe traité par LCT par rapport au groupe témoin ; ###  $p < 0,001$ : groupes (EMMO 200 + LCT 0,18 et EMMO 200 + LCT 0,36) par rapport aux groupes LCT 0,18 et LCT 0,36 (mg / kg / jour).

L'analyse statistique a montré une diminution significative au niveau du temps d'immobilité des animaux traités par LCT comparativement aux témoins (LCT 0.18 :  $p < 0.0001$  ; LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ), et une augmentation significative du temps mobilité chez les groupes traités par LCT par rapport aux groupes témoins (LCT 0.18 :  $p < 0.0001$  ; LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ). Par contre, nous avons observés une augmentation significative du temps d'immobilité chez le groupe (EMMO 200 + LCT 0,18) par rapport au groupe LCT 0,18 (EMMO 200 + LCT 0,18  $p < 0.0169$ ). Tandis que ces résultats n'ont montré aucune variation statistiquement significative chez les autres groupes.

### **III. Effet du LCT et EMMO sur biomarqueurs de stress oxydant au niveau du cerveau (hippocampe, cortex, et striatum)**

#### **III.1. Effet sur le taux des groupements carbonyles (PCO)**

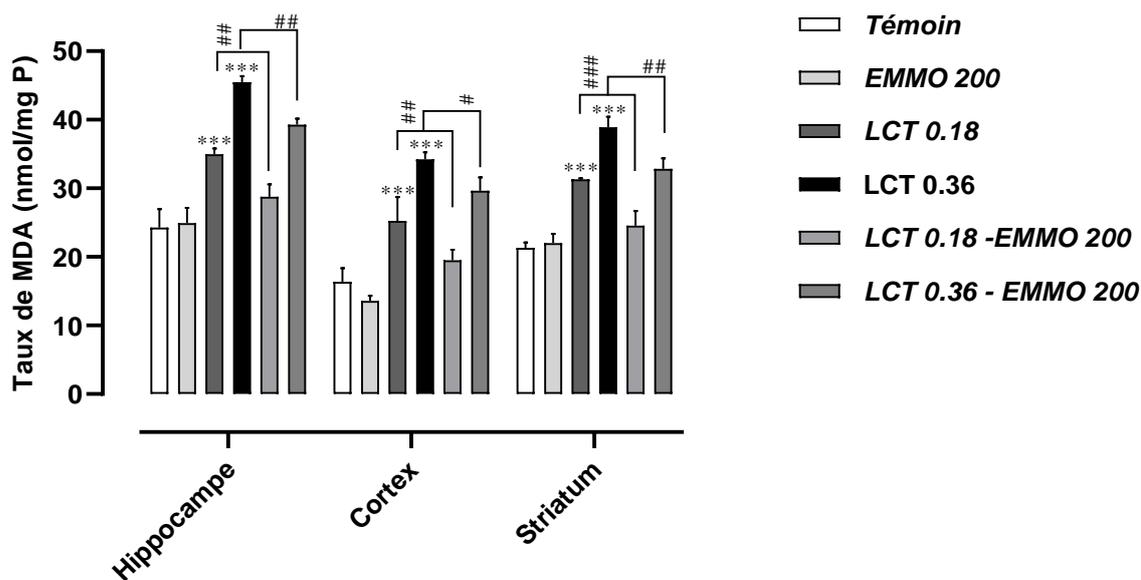
Le **figure 29** montre une augmentation significative du taux des groupements carbonyles (PCO) au niveau de deux régions du cerveau (hippocampe et striatum) chez les rats traités par LCT durant 90 jours comparés aux groupes témoins (LCT 0.18 :  $p = 0.0002$  ; LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ). Aussi une augmentation significative chez le groupe traité par (LCT 0.36) par rapport au groupe témoin dans la région du cortex. En revanche, le taux des groupements carbonyles a diminué de façon significative chez les groupes (EMMO 200 + LCT 0,18 ; EMMO 200 + LCT 0,36) comparées aux groupes LCT 0,18 et LCT 0,36 dans l'hippocampe (EMMO 200 + LCT 0,18  $p = 0.0035$  ; EMMO 200 + LCT 0,36  $p = .0044$ ). Par ailleurs, aucune différence significative n'est observée chez les autres groupes (EMMO 200 + LCT 0,18 ; EMMO 200 + LCT 0,36) dans les deux régions (le cortex et le striatum) comparées aux groupes LCT 0,18 et LCT 0,36.



**Figure 29 :** Taux de PCO dans l'hippocampe, cortex, et striatum chez les rats après l'administration orale de LCT à différentes doses (LCT 0,18 ; et LCT 0,36), extrait de *Melissa officinalis* L (EMMO 200) seul et leur association (EMMO 200 + LCT 0,18 et EMMO 200 + LCT 0,18) pendant 90 jours. Les résultats dans chaque groupe représentent la moyenne  $\pm$  SEM. ;  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ : groupe traité par LCT par rapport au groupe témoin ; ###  $p < 0,001$ : groupes (EMMO 200 + LCT 0,18 et EMMO 200 + LCT 0,36) par rapport aux groupes LCT 0,18 et LCT 0,36 (mg / kg / jour).

### III.2. Effet sur le taux de peroxydation lipidique (TABARS) tissulaire

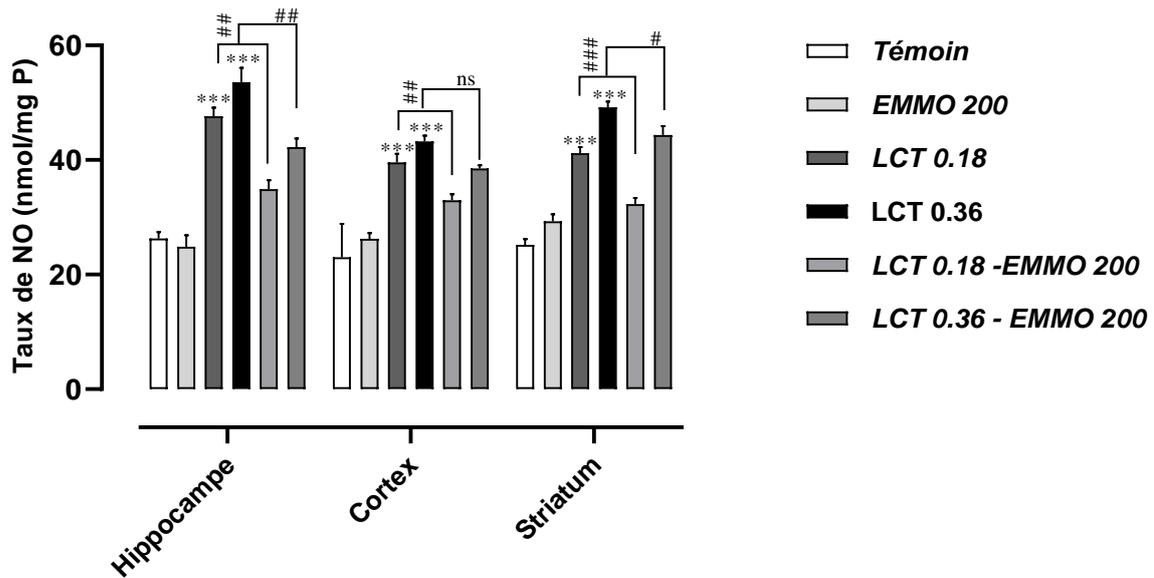
Dans nos conditions expérimentales, le lambda-cyhalothrine a engendré chez les rats des deux groupes (LCT 0,18 et LCT 0,36) une augmentation significative du taux de MDA quand ils sont comparés aux groupes témoins dans les trois régions (**Figure 30**), hippocampe (LCT 0.18 :  $p < 0.0001$  ; LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ), cortex (LCT 0.18 :  $p < 0.0001$  ; LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ), et striatum (LCT 0.18 :  $p < 0.0001$  ; LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ). En revanche, nous avons enregistré une diminution du taux de MDA chez les groupes traités par (EMMO 200 + LCT 0,18 ; EMMO 200 + LCT 0,36) comparés aux groupes (LCT 0,18 et LCT 0,36) dans les trois régions du cerveau, l'hippocampe (EMMO 200 + LCT 0.18 :  $p = 0.0012$  ; EMMO 200 + LCT 0.36 :  $p = 0.0036$ ), le cortex (EMMO 200 + LCT 0.18 :  $p = 0.0029$  ; EMMO 200 + LCT 0.36 :  $p = 0.0262$ ), et le striatum (EMMO 200 + LCT 0.18 :  $p = 0.0004$  ; EMMO 200 + LCT 0.36 :  $p = 0.0016$ ).



**Figure 30 :** Taux de MDA dans l'hippocampe, cortex, et striatum chez les rats après l'administration orale de LCT à différentes doses (LCT 0,18 ; et LCT 0,36), extrait de *Melissa officinalis* L (EMMO 200) seul et leur association (EMMO 200 + LCT 0,18 et EMMO 200 + LCT 0,18) pendant 90 jours. Les résultats dans chaque groupe représentent la moyenne  $\pm$  SEM. ;  $p < 0,01$ ,  $*** p < 0,001$ : groupe traité par LCT par rapport au groupe témoin ;  $### p < 0,001$ : groupes (EMMO 200 + LCT 0,18 et EMMO 200 + LCT 0,36) par rapport aux groupes LCT 0,18 et LCT 0,36 (mg / kg / jour).

### III.3. Effet sur le taux de production d'oxyde nitrique (NO)

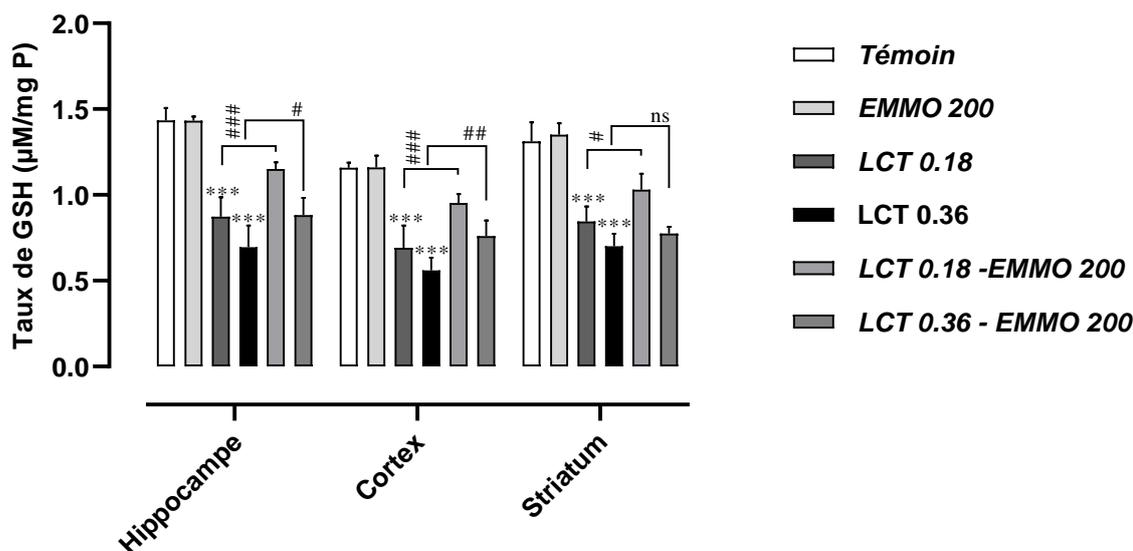
La Figure 31 montre une augmentation significative du taux d'oxyde nitrique (NO) au niveau de l'hippocampe, cortex, et striatum chez les rats traités par LCT 0,18 et LCT 0,36 pendant 90 jours comparés aux groupes témoins. Hippocampe (LCT 0.18 :  $p < 0.0001$  ; LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ), cortex (LCT 0.18 :  $p < 0.0001$  ; LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ), et striatum (LCT 0.18 :  $p < 0.0001$  ; LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ). Par contre, le taux d'oxyde nitrique a diminué de façon significative chez les groupes traités par (EMMO 200 + LCT 0,18 ; EMMO 200 + LCT 0,36) comparés aux groupes (LCT 0,18 et LCT 0,36) dans l'hippocampe et striatum, l'hippocampe (EMMO 200 + LCT 0.18 :  $p < 0.0001$  ; EMMO 200 + LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ), et le striatum (EMMO 200 + LCT 0.18 :  $p < 0.0001$  ; EMMO 200 + LCT 0.36 :  $p = 0.0392$ ), aussi une diminution significative dans le cortex (EMMO 200 + LCT 0.18 :  $p = 0.0019$ ) comparé par le groupe (LCT 0,18). Tandis qu'on n'observe aucun changement significatif chez le groupe (EMMO 200 + LCT 0,36) par rapport (LCT 0,36) dans le cortex.



**Figure 31 :** Taux de NO dans l'hippocampe, cortex, et striatum chez les rats après l'administration orale de LCT à différentes doses (LCT 0,18 ; et LCT 0,36), extrait de *Melissa officinalis* L (EMMO 200) seul et leur association (EMMO 200 + LCT 0,18 et EMMO 200 + LCT 0,36) pendant 90 jours. Les résultats dans chaque groupe représentent la moyenne  $\pm$  SEM. ;  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ : groupe traité par LCT par rapport au groupe témoin ; ###  $p < 0,001$ : groupes (EMMO 200 + LCT 0,18 et EMMO 200 + LCT 0,36) par rapport aux groupes LCT 0,18 et LCT 0,36 (mg / kg / jour).

#### III.4. Effet sur le taux de glutathion réduit (GSHt)

La figure 32 représente entre autres le taux de GSH dans l'hippocampe, cortex, et striatum. Il montre une diminution significative du taux de GSH chez les groupes traités par (LCT 0,18 ; et LCT 0,36) comparés aux témoins. Hippocampe (LCT 0.18 :  $p < 0.0001$  ; LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ), cortex (LCT 0.18 :  $p < 0.0001$  ; LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ), et striatum (LCT 0.18 :  $p < 0.0001$  ; LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ). En revanche, nous avons enregistré une augmentation significative chez les groupes traités par (EMMO 200 + LCT 0,18 et EMMO 200 + LCT 0,36) par rapport aux groupes par (LCT 0,18 ; et LCT 0,36), mais aucun changement significatif n'est observée chez le groupe (EMMO 200 + LCT 0,36) comparé au groupe (LCT 0.36) dans le striatum, l'hippocampe (EMMO 200 + LCT 0.18 :  $p < 0.0001$  ; EMMO 200 + LCT 0.36 :  $p = 0.0104$ ), le cortex (EMMO 200 + LCT 0.18 :  $p < 0.0001$  ; EMMO 200 + LCT 0.36 :  $p = 0.0051$ ), et le striatum (EMMO 200 + LCT 0.18 :  $p = 0.0114$ ).



**Figure 32 :** Taux de GSH dans l'hippocampe, cortex, et striatum chez les rats après l'administration orale de LCT à différentes doses (LCT 0,18 ; et LCT 0,36), extrait de *Melissa officinalis* L (EMMO 200) seul et leur association (EMMO 200 + LCT 0,18 et EMMO 200 + LCT 0,36) pendant 90 jours. Les résultats dans chaque groupe représentent la moyenne  $\pm$  SEM. ;  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ : groupe traité par LCT par rapport au groupe témoin ; ###  $p < 0,001$ : groupes (EMMO 200 + LCT 0,18 et EMMO 200 + LCT 0,36) par rapport aux groupes LCT 0,18 et LCT 0,36 (mg / kg / jour).

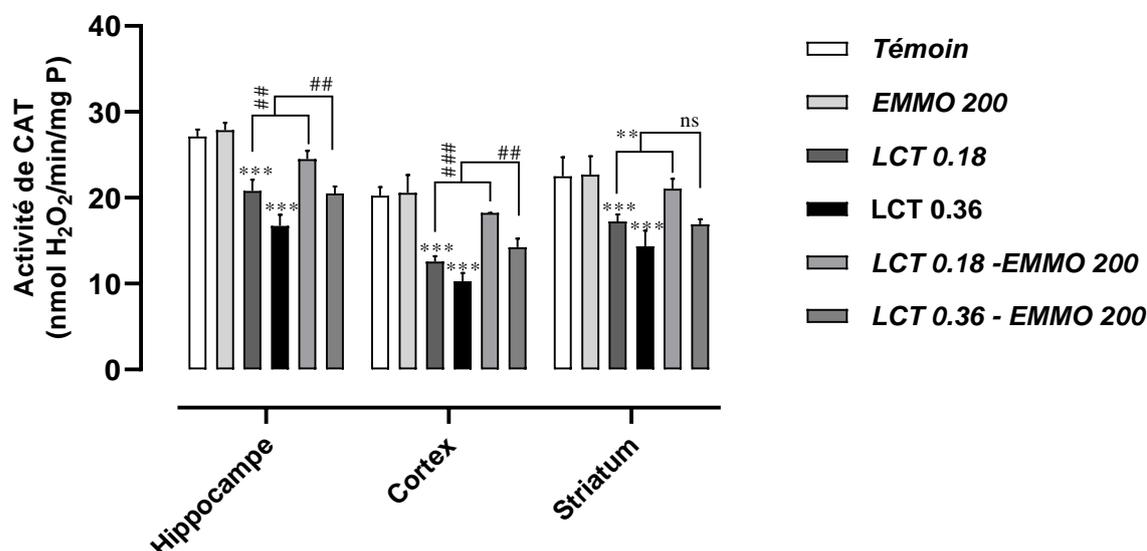
### III. Effet du LCT et EMMO sur le statut enzymatique antioxydant au niveau du cerveau (hippocampe, cortex, et striatum)

Le principal moyen de défense est assuré par les antioxydants enzymatiques qui jouent un rôle important dans l'élimination des radicaux libres et des espèces réactives de l'oxygène.

#### IV.1. L'activité de la catalase (CAT)

Dans nos conditions expérimentales (**Figure 33**), le lambda-cyhalothrine a engendré chez les rats traités par (LCT 0,18 ; et LCT 0,36) une diminution significative des activités de la CAT comparés aux groupes témoins. Hippocampe (LCT 0.18 :  $p < 0.0001$  ; LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ), cortex (LCT 0.18 :  $p < 0.0001$  ; LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ), et striatum (LCT 0.18 :  $p < 0.0001$  ; LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ). En revanche, nous avons enregistré une augmentation significative chez les groupes traités par (EMMO 200 + LCT 0,18 et EMMO 200 + LCT 0,36) par rapport aux groupes par (LCT 0,18 ; et LCT 0,36), l'hippocampe (EMMO 200 + LCT 0.18 :  $p = 0.0042$  ; EMMO 200 + LCT 0.36 :  $p = 0.0037$ ), le cortex (EMMO 200 + LCT 0.18 :  $p <$

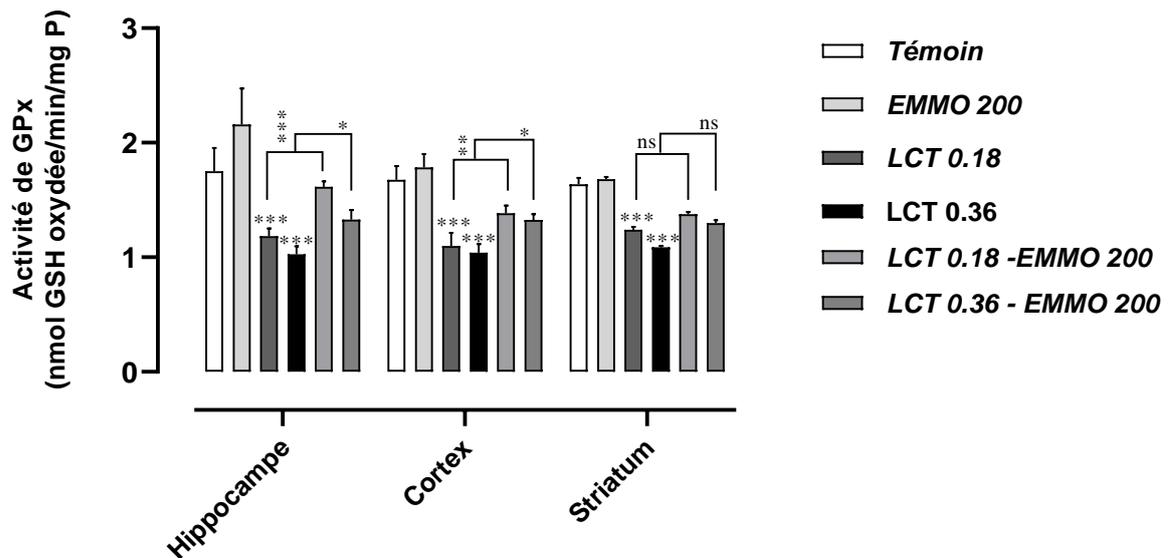
0.0001 ; EMMO 200 +LCT 0.36 :  $p = 0.0047$ ), et le striatum (EMMO 200 + LCT 0.18 :  $p = 0.0030$ ). Mais aucun changement significatif n'est observé chez le groupe (EMMO 200 + LCT 0,36) comparé au groupe (LCT 0.36) dans le striatum.



**Figure 33 :** Activité de CAT dans l'hippocampe, cortex, et striatum chez les rats après l'administration orale de LCT à différentes doses (LCT 0,18 ; et LCT 0,36), extrait de *Melissa officinalis* L (EMMO 200) seul et leur association (EMMO 200 + LCT 0,18 et EMMO 200 + LCT 0,36) pendant 90 jours. Les résultats dans chaque groupe représentent la moyenne  $\pm$  SEM. ;  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ : groupe traité par LCT par rapport au groupe témoin ; ###  $p < 0,001$ : groupes (EMMO 200 + LCT 0,18 et EMMO 200 + LCT 0,36) par rapport aux groupes LCT 0,18 et LCT 0,36 (mg / kg / jour).

#### IV.2. Activité de glutathion peroxydase (GPx)

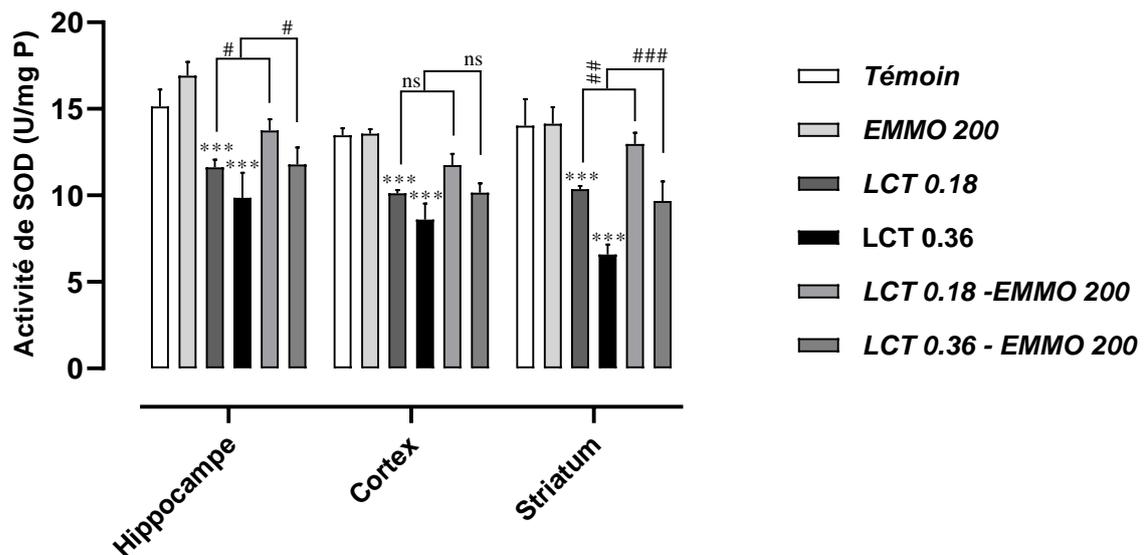
La figure 34 montre une diminution significative de l'activité de glutathion peroxydase (GPx) au niveau de l'hippocampe, cortex, et striatum chez les rats traités par différentes doses (LCT 0,18 ; et LCT 0,36) durant 90 jours par rapport aux groupes témoins. Hippocampe (LCT 0.18 :  $p < 0.0001$  ; LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ), cortex (LCT 0.18 :  $p < 0.0001$  ; LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ), et striatum (LCT 0.18 :  $p = 0.0002$  ; LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ). Au contraire, nous avons observé une augmentation significative chez les groupes (EMMO 200 + LCT 0,18 ; EMMO 200 + LCT 0,36) par rapport aux groupes LCT 0,18 et LCT 0,36 dans l'hippocampe, et cortex ; l'hippocampe (EMMO 200 + LCT 0.18 :  $p < 0.0001$  ; EMMO 200 +LCT 0.36 :  $p = 0.0114$ ), le cortex (EMMO 200 + LCT 0.18 :  $p = 0.0047$  ; EMMO 200 +LCT 0.36 :  $p = 0.0195$ ). Or, aucune différence significative n'est observée chez les groupes (EMMO 200 + LCT 0,18 ; EMMO 200 + LCT 0,36) par rapport aux groupes LCT 0,18 et LCT 0,36 dans le striatum.



**Figure 34 :** Activité de GPx dans l'hippocampe, cortex, et striatum chez les rats après l'administration orale de LCT à différentes doses (LCT 0,18 ; et LCT 0,36), extrait de *Melissa officinalis* L (EMMO 200) seul et leur association (EMMO 200 + LCT 0,18 et EMMO 200 + LCT 0,36) pendant 90 jours. Les résultats dans chaque groupe représentent la moyenne  $\pm$  SEM. ;  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ : groupe traité par LCT par rapport au groupe témoin ; ###  $p < 0,001$ : groupes (EMMO 200 + LCT 0,18 et EMMO 200 + LCT 0,36) par rapport aux groupes LCT 0,18 et LCT 0,36 (mg / kg / jour).

#### IV.3. L'activité de superoxyde dismutase (SOD)

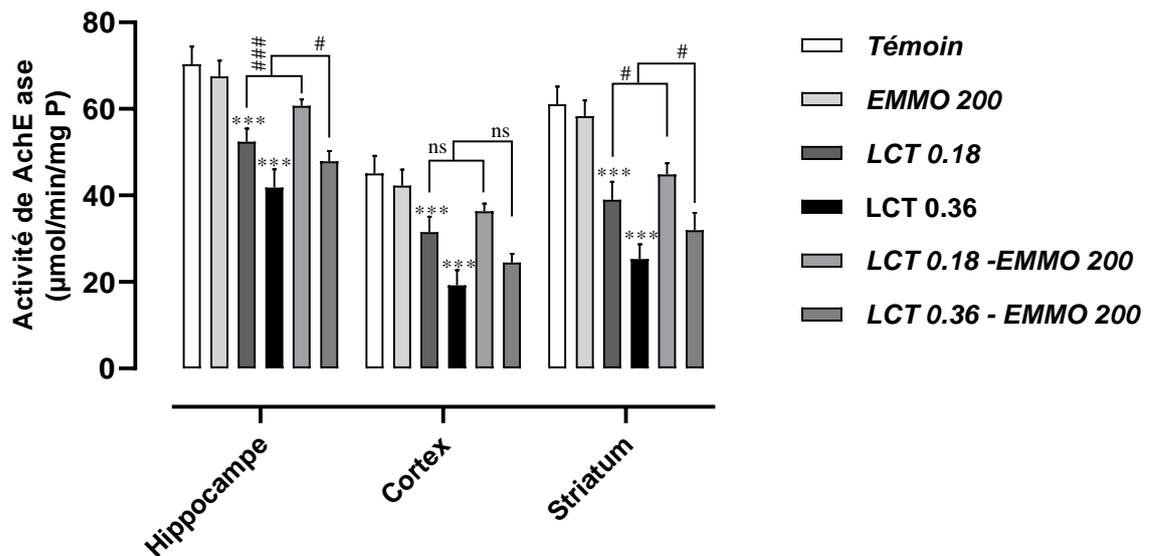
Les résultats de la **figure 35** montrent une diminution significative chez les rats traités par différentes doses (LCT 0,18 ; et LCT 0,36) dans les trois régions du cerveau par rapport aux groupes témoins. Hippocampe (LCT 0.18 :  $p < 0.0001$  ; LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ), cortex (LCT 0.18 :  $p < 0.0001$  ; LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ), et striatum (LCT 0.18 :  $p = 0.0002$  ; LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ). Au contraire, nous avons observé une augmentation significative chez les groupes (EMMO 200 + LCT 0,18 ; EMMO 200 + LCT 0,36) par rapport aux groupes LCT 0,18 et LCT 0,36 dans l'hippocampe, et striatum ; l'hippocampe (EMMO 200 + LCT 0.18 :  $p = 0.0184$  ; EMMO 200 + LCT 0.36 :  $p = 0.0443$ ), le striatum (EMMO 200 + LCT 0.18 :  $p = 0.0019$  ; EMMO 200 + LCT 0.36 :  $p = 0.0002$ ). En revanche, aucune différence significative n'est observée chez les groupes (EMMO 200 + LCT 0,18 ; EMMO 200 + LCT 0,36) par rapport aux groupes LCT 0,18 et LCT 0,36 dans le cortex.



**Figure 35 :** Activité de SOD dans l'hippocampe, cortex, et striatum chez les rats après l'administration orale de LCT à différentes doses (LCT 0,18 ; et LCT 0,36), extrait de *Melissa officinalis* L (EMMO 200) seul et leur association (EMMO 200 + LCT 0,18 et EMMO 200 + LCT 0,36) pendant 90 jours. Les résultats dans chaque groupe représentent la moyenne  $\pm$  SEM. ;  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ : groupe traité par LCT par rapport au groupe témoin ; ###  $p < 0,001$ : groupes (EMMO 200 + LCT 0,18 et EMMO 200 + LCT 0,36) par rapport aux groupes LCT 0,18 et LCT 0,36 (mg / kg / jour).

#### IV. Effet du LCT et EMMO sur l'activité de l'acétylcholinestérase (AchE) au niveau du cerveau (hippocampe, cortex, et striatum)

L'analyse statistique de l'activité de l'acétylcholinestérase (AchE) dans l'hippocampe, cortex, et striatum chez les rats après l'administration orale de LCT à différentes doses (LCT 0,18 ; et LCT 0,36), extrait de *Melissa officinalis* L (EMMO 200) seul et leur association (EMMO 200 + LCT 0,18 et EMMO 200 + LCT 0,36) pendant 90 jours est représentée dans **la figure 36** ci-dessous.



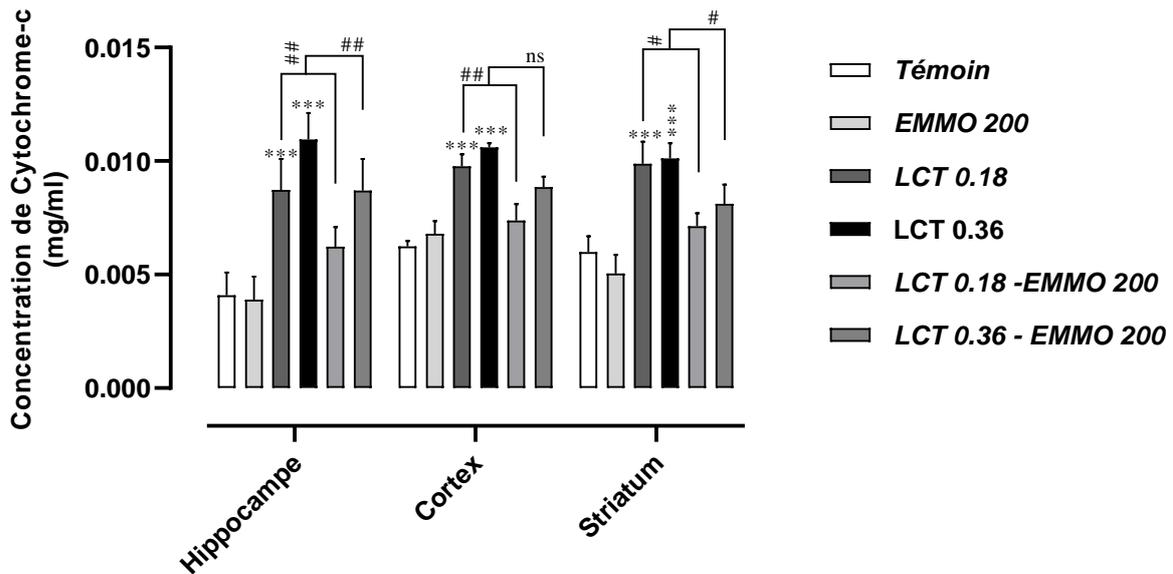
**Figure 36 :** Activité de AchE ase dans l’hippocampe, cortex, et striatum chez les rats après l’administration orale de LCT à différentes doses (LCT 0,18 ; et LCT 0,36), extrait de *Melissa officinalis* L (EMMO 200) seul et leur association (EMMO 200 + LCT 0,18 et EMMO 200 + LCT 0,36) pendant 90 jours. Les résultats dans chaque groupe représentent la moyenne  $\pm$  SEM. ;  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ : groupe traité par LCT par rapport au groupe témoin ; ###  $p < 0,001$ : groupes (EMMO 200 + LCT 0,18 et EMMO 200 + LCT 0,36) par rapport aux groupes LCT 0,18 et LCT 0,36 (mg / kg / jour).

Nos résultats ont montré que l'exposition au LCT à différentes doses (LCT 0,18 ; et LCT 0,36) provoquées une diminution significative dans les trois régions du cerveau par rapport aux groupes témoins. Hippocampe (LCT 0.18 :  $p < 0.0001$  ; LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ), cortex (LCT 0.18 :  $p < 0.0001$  ; LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ), et striatum (LCT 0.18 :  $p = 0.0002$  ; LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ). Au contraire, nous avons observé une augmentation significative chez les groupes (EMMO 200 + LCT 0,18 ; EMMO 200 + LCT 0,36) par rapport aux groupes LCT 0,18 et LCT 0,36 dans l’hippocampe, et striatum ; l’hippocampe (EMMO 200 + LCT 0.18 :  $p = 0.0007$  ; EMMO 200 + LCT 0.36 :  $p = 0.0323$ ), le striatum (EMMO 200 + LCT 0.18 :  $p = 0.0426$  ; EMMO 200 + LCT 0.36 :  $p = 0.0120$ ). Par ailleurs aucune différence significative n’a été observée au niveau de cortex chez les groupes (EMMO 200 + LCT 0,18 ; EMMO 200 + LCT 0,36) comparés aux groupes LCT 0,18 et LCT 0,36.

## VI. Effet du LCT et EMMO sur les biomarqueurs pro-apoptotiques au niveau du cerveau (hippocampe, cortex, et striatum)

Les résultats de l'évaluation des effets pro-apoptotiques de lambda-cyhalothrine à différentes doses (LCT 0,18 ; et LCT 0,36) et l'effet anti-apoptotique de l'extrait méthanolique de *Melissa officinalis* L. (EMMO 200) dans l'hippocampe, le cortex, et le striatum chez les rats, sont récapitulés dans les figures 37 et 38.

### VI.1. Effet sur la concentration du Cytochrome-c

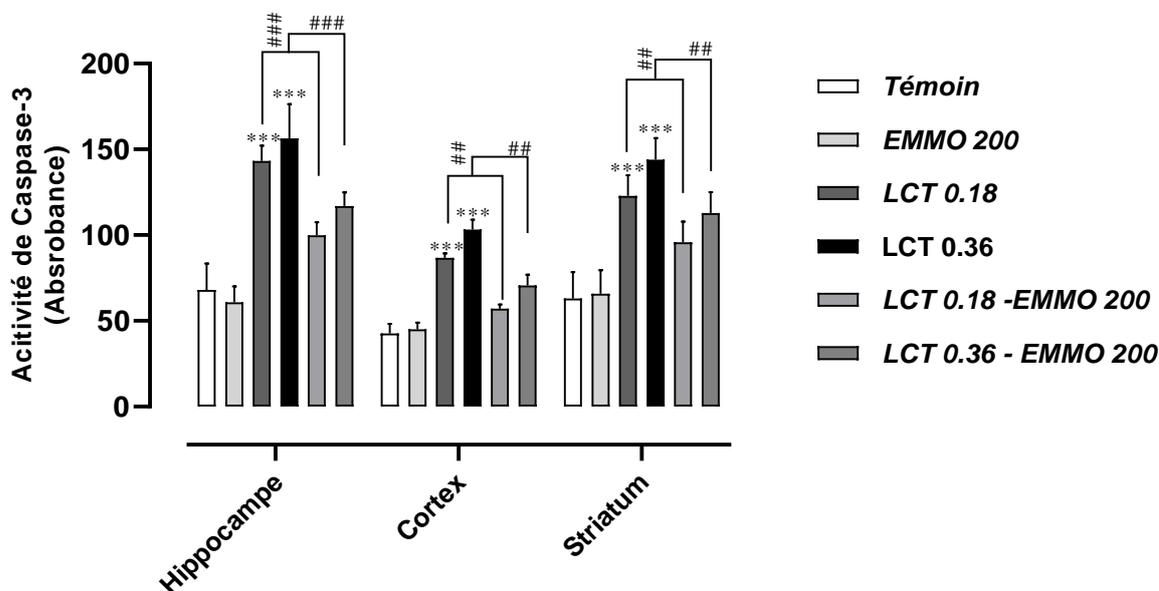


**Figure 37 :** Concentration de Cytochrome-c (Cyt-c) dans l'hippocampe, cortex, et striatum chez les rats après l'administration orale de LCT à différentes doses (LCT 0,18 ; et LCT 0,36), extrait de *Melissa officinalis* L (EMMO 200) seul et leur association (EMMO 200 + LCT 0,18 et EMMO 200 + LCT 0,36) pendant 90 jours. Les résultats dans chaque groupe représentent la moyenne  $\pm$  SEM. ;  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ : groupe traité par LCT par rapport au groupe témoin ; ###  $p < 0,001$ : groupes (EMMO 200 + LCT 0,18 et EMMO 200 + LCT 0,36) par rapport aux groupes LCT 0,18 et LCT 0,36 (mg / kg / jour).

Les résultats de la figure 37 montrent une augmentation significative de concentration de Cyt-c chez les rats traités par différentes doses (LCT 0,18 ; et LCT 0,36) dans les trois régions du cerveau par rapport aux groupes témoins. Hippocampe (LCT 0.18 :  $p < 0.0001$  ; LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ), cortex (LCT 0.18 :  $p < 0.0001$  ; LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ), et striatum (LCT 0.18 :  $p = 0.0002$  ; LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ). En revanche, nous avons enregistré une diminution significative de concentration de Cyt-c chez les groupes traités par (EMMO 200 + LCT 0,18 et EMMO 200 + LCT 0,36) par rapport aux groupes par (LCT 0,18 ; et LCT 0,36), l'hippocampe

(EMMO 200 + LCT 0.18 :  $p = 0.0018$  ; EMMO 200 +LCT 0.36 :  $p = 0.0059$ ), le striatum (EMMO 200 + LCT 0.18 :  $p < 0.0004$  ; EMMO 200 +LCT 0.36 :  $p = 0.0180$ ), et le cortex (EMMO 200 + LCT 0.18 :  $p = 0.0025$ ). Mais aucun changement significatif n'est observé chez le groupe (EMMO 200 + LCT 0,36) comparé au groupe (LCT 0.36) dans le cortex.

### VI.1. Effet sur l'activité de Caspase-3



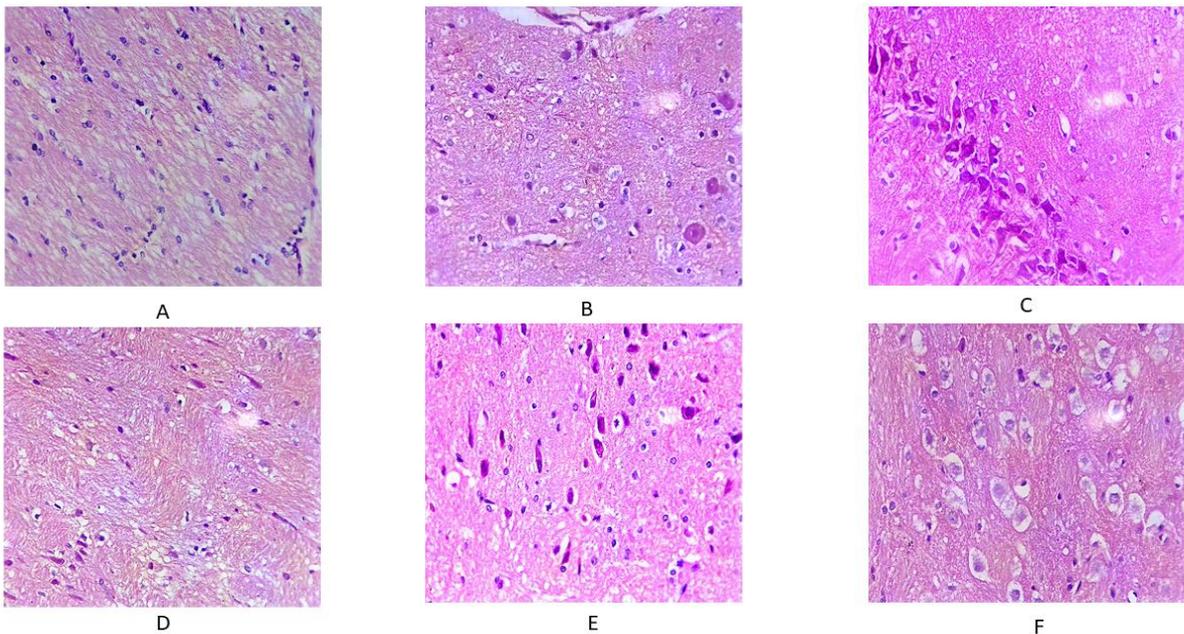
**Figure 38** : Activité de Caspase-3 (Casp-3) dans l'hippocampe, cortex, et striatum chez les rats après l'administration orale de LCT à différentes doses (LCT 0,18 ; et LCT 0,36), extrait de *Melissa officinalis* L (EMMO 200) seul et leur association (EMMO 200 + LCT 0,18 et EMMO 200 + LCT 0,36) pendant 90 jours. Les résultats dans chaque groupe représentent la moyenne  $\pm$  SEM. ;  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ : groupe traité par LCT par rapport au groupe témoin ; ###  $p < 0,001$ : groupes (EMMO 200 + LCT 0,18 et EMMO 200 + LCT 0,36) par rapport aux groupes LCT 0,18 et LCT 0,36 (mg / kg / jour).

Les résultats de **la figure 38** montrent une augmentation significative de l'activité de Casp-3 chez les rats traités par différentes doses (LCT 0,18 ; et LCT 0,36) dans les trois régions du cerveau par rapport aux groupes témoins. Hippocampe (LCT 0.18 :  $p < 0.0001$  ; LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ), cortex (LCT 0.18 :  $p < 0.0001$  ; LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ), et striatum (LCT 0.18 :  $p = 0.0002$  ; LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ). En revanche, nous avons enregistré une diminution de l'activité de Casp-3 chez les groupes traités par (EMMO 200 + LCT 0,18 ; EMMO 200 + LCT 0,36) comparés aux groupes (LCT 0,18 et LCT 0,36) dans les trois régions du cerveau, l'hippocampe (EMMO 200 + LCT 0.18 :  $p < 0.0001$  ; EMMO 200 +LCT 0.36 :  $p < 0.0001$ ), le

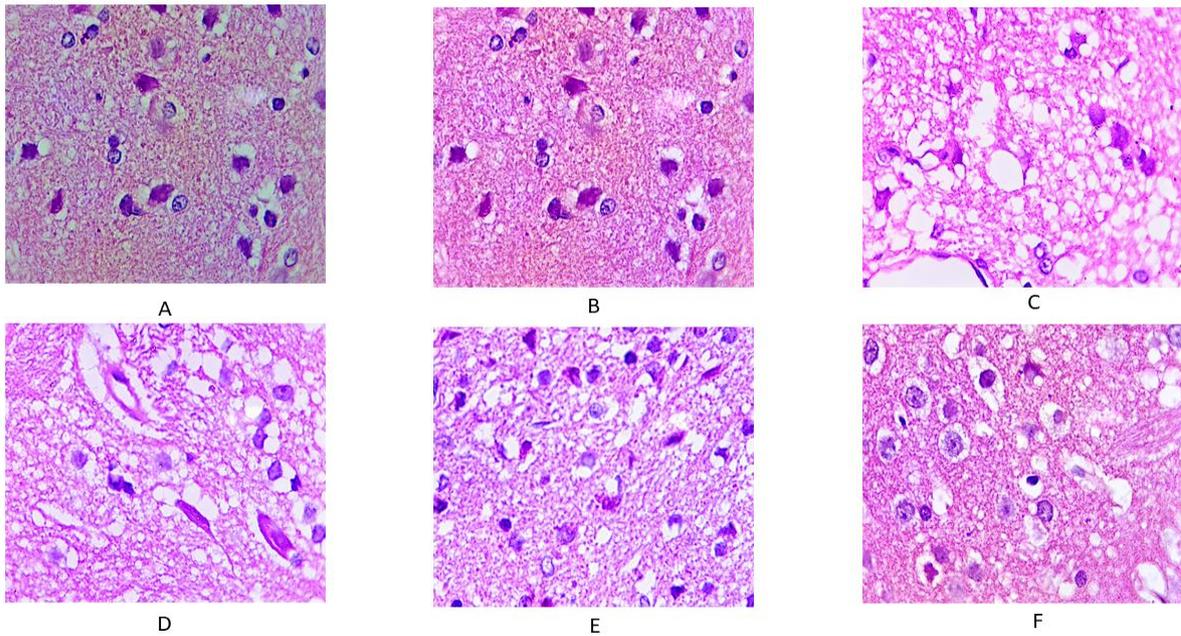
cortex (EMMO 200 + LCT 0.18 :  $p = 0.0032$  ; EMMO 200 +LCT 0.36 :  $p = 0.0010$ ), et le striatum (EMMO 200 + LCT 0.18 :  $p = 0.0097$  ; EMMO 200 +LCT 0.36 :  $p = 0.0019$ ).

## VII. Analyses histologiques

L'examen microscopique des coupes histologiques effectuées au niveau du cerveau a révélé une structure normale chez les rats du groupe contrôle et du groupe traité par EMMO (Figures 39 A, B ; et Figures 40 A, B). Cependant, une altération histologique, très claire du nombre des cellules cérébrales a été observée sur les coupes histologiques du cerveau de rats traités à différentes doses (LCT 0,18 ; et LCT 0,36) durant 90 jours (Figures 39 C, D ; Figures 39 C, D) par rapport aux rats témoins. Ces altérations des cellules affectent la fonction des neurones et peuvent contribuer à une totale désorganisation tissulaire de cet organe. Alors que le traitement des animaux par l'extrait de *Mélissa officinalis* L. associée aux LCT a diminué les altérations induites par LCT (Figures 39 E, F ; et Figures 40 E, F)



**Figure 39 :** Coupes histologiques ( $\times 40$ ) dans le cerveau après l'administration orale de LCT à différentes doses (LCT 0,18 ; et LCT 0,36), extrait de *Melissa officinalis* L (EMMO 200) seul et leur association (EMMO 200 + LCT 0,18 et EMMO 200 + LCT 0,36) pendant 90 jours. (A) Témoin, (B) traité par EMMO 200 mg/kg, (C) traité par LCT 0.18 mg/kg, (D) traité par LCT 0.36 mg/kg, (E) traité par EMMO 200 mg/kg + 0.18 mg/kg, (F) traité par par EMMO 200 mg/kg + 0.36 mg/kg.



**Figure 40 :** Coupes histologiques ( $\times 100$ ) dans le cerveau après l'administration orale de LCT à différentes doses (LCT 0,18 ; et LCT 0,36), extrait de *Melissa officinalis* L (EMMO 200) seul et leur association (EMMO 200 + LCT 0,18 et EMMO 200 + LCT 0,36) pendant 90 jours. (A) Témoin, (B) traité par EMMO 200 mg/kg, (C) traité par LCT 0.18 mg/kg, (D) traité par LCT 0.36 mg/kg, (E) traité par EMMO 200 mg/kg + 0.18 mg/kg, (F) traité par EMMO 200 mg/kg + 0.36 mg/kg.

## VIII. Discussion

L'application étendue des pesticides est habituellement accompagnée avec des problèmes graves de pollution et de risque sanitaire (Son et al., 2017). Les pyréthrinoïdes de synthèse sont de plus en plus employés comme pesticides et peuvent produire un certain toxique au niveau du cerveau, foie, et d'autres organes de divers types des animaux d'expérience par la production des radicaux libres (Ansari et al., 2012a ; Ansari et al., 2012b). De ce fait, tous les constats scientifiques soulignent l'importance d'évaluer l'incidence et les risques toxicologiques de ces produits à des faibles doses. À l'heure actuelle, les médicaments modernes et classiques utilisés dans le traitement des maladies sont parfois insuffisants et peuvent avoir des effets indésirables graves (Gomes et al., 2009). A cet égard, plusieurs recherches s'orientent vers les plantes médicinales considérées comme source énorme de multiples substances phytothérapeutiques dotées d'activités antioxydantes et qui peuvent être l'arme permettant de faire face au stress oxydant et ses dégâts au niveau des organes de l'être vivant. Les études présentées dans ce manuscrit s'inscrivent à plusieurs niveaux dans des problématiques actuelles en santé publique et en toxicologie alimentaire et environnementale, puisqu'elles visent à évaluer la neurotoxicité de polluants ubiquitaires de l'environnement, et d'explorer les mécanismes potentiellement protecteurs de l'extrait méthanolique de *Mélissa officinalis* L contre les manifestations toxiques induites par lambda-cyhalothrine au niveau du cerveau (hippocampe, cortex, et striatum) des rats de la souche « Wistar ».

Plusieurs études ont montré que l'exposition aux pesticides a causé une augmentation de la production des radicaux libres a un effet complexe sur l'activités locomotrices, l'apprentissage, la mémoire et le développement mentale chez l'animal (Gargouri et al., 2019 ; Beghoul et al., 2017 ; Gasmi et al., 2017 ; Fetoui et al., 2008). Nos résultats ont montré que l'exposition au lambda-cyhalothrine LTC a causé une perturbation comportementale a été observé suite à l'évaluation des différents paramètres liés à la biologie neurocomportementale en appliquant les différents tests chez les rats afin d'évaluer leur activité locomotrice, niveau d'anxiété, et état d'exploration. Le résultat du test d'Open Field (OF) montré une diminution dans le passage en case central. Des études similaires (D. Abbud Righi & Palermo-Neto, 2003) effectuées sur des rats exposés à différentes doses de cyhalothrin (1,3 et 7 mg/kg/j) pendant 7 jours diminue le pourcentage du temps émis en case centrale et la fréquence de redressement. Au contraire, une étude réalisée par Takasaki (2013) et ses collaborateurs ont montré qu'une exposition quotidienne des souris au deltaméthrine (10mg/kg, i.p ; pyréthrinoïde de type II) et au perméthrine (5 et 10mg/kg,i.p ; pyréthrinoïde de type I) pendant 7 jours n'a pas affecté

certaines variables mesurés dans le test Open Field. Également, d'autres études ont montré qu'une exposition postnatale, à d'autres pyréthrinoïdes (Gargouri et al., 2018) et à d'autres polluants environnementaux tels que le cadmium (Chouit et al., 2020) provoque des effets neurotoxiques du comportement. Le test de labyrinthe est l'un des modèles de comportement les plus importants pour évaluer l'anxiété. L'augmentation du nombre de tournés, le temps d'arrivée et le temps passé dans les lots traités par LCT dans le milieu de cage sont considérés comme étant les indices les plus représentatifs de l'activité anxiolytique. Ces signes observés chez les animaux traités reflètent les mêmes comportements observés chez des patients atteints de la maladie de Parkinson (Wang et al., 2006 ; Abdallah et al., 2012 ; Zhao et al., 2016 ; Gargouri et al., 2018).

Nos résultats obtenus sont similaires avec des études antérieures (D. Abbud Righi & Palermo-Neto, 2003) réalisées sur des rats exposés au lambda-cyhalothrine à différentes doses (1,3 et 7 mg/kg PC) pendant une semaine, qui ont montré une augmentation de temps passé en milieu de cage et une augmentation de temps d'arrivée. D'autre, une étude antérieure effectuée par la même équipe (Carloni et al. 2012) a montré que l'exposition au perméthrine a entraîné des altérations neurodégénératives au niveau du striatum, associées avec une perte de la fonction et des dommages cellulaires. La dépression est un état d'humeur basse et évite l'activité ou la réduction de la fonction biologique. L'évaluation des activités comportementales est donc devenue une approche utile pour le diagnostic de la dépression. C'est l'une des principales causes de morbidité dans le monde en croissance chez les hommes et les femmes (Takasaki et al., 2013). Par ailleurs, les résultats du test de la nage forcée ont montré que l'exposition au LCT cause une augmentation significative au niveau du temps d'immobilité des animaux. Ces résultats prouvent l'effet dépressif de ce LCT. Des études antérieures (Takasaki et al., 2013) effectuées sur des souris exposées au deltaméthrine et au perméthrine ont montré une diminution du temps d'immobilité chez les rats exposés au deltaméthrine (5 et 10 mg/kg) et non ceux exposés au perméthrine (10 mg/kg). Une étude *in vitro* effectuée sur des cellules neuronales corticales de rat exposés au deltaméthrine active l'expression génique de ce facteur (BDNF) 100 fois plus que chez les témoins et ceci à travers des voies de signalisation faisant intervenir le calcium en tant que second messager (Meijer et al., 2014). En revanche, l'administration de l'extrait méthanolique de *Mélissa officinalis* L à la dose de 200 mg/kg/j pendant 90 jours a amélioré les troubles d'apprentissage et la rétention de la mémoire. Récemment, le rôle de l'extrait de *Mélissa officinalis* L comme cytoprotecteur a été documenté dans plusieurs études (Guginski et al., 2009 ; Emamghoreishi & Talebianpour, 2009 ; López et al., 2009). L'extrait

méthanolique de *Melissa officinalis* L augmente la production d'acétylcholine, évite les lésions oxydatives.

Dans cette étude, nous avons remarqué après 90 jours de traitement chez les rats traités par lambda-cyhalothrine (LCT) une forte peroxydation lipidique, objectivée par une augmentation significative de taux de MDA au niveau de l'hippocampe, cortex, et striatum. La forte peroxydation lipidique, observée dans notre étude pourrait être expliquée d'une part par la richesse de les trois régions du cerveau (hippocampe, cortex, et striatum) en acides gras polyinsaturés qui rend ces organes susceptibles aux radicaux libres et d'autre part à la génération excessive d'espèces réactives d'oxygène suite au traitement par LCT via plusieurs mécanismes (Ansari et al., 2012a). Ces résultats sont en accord avec des études antérieures (Ndonwi et al., 2019) qui ont montré une forte peroxydation lipidique dans différentes régions du cerveau. Des études *in vivo* ont démontré que LCT induit directement un état de stress oxydatif et la génération excessive des EROs a été associée à des taux faibles des enzymes antioxydants et à une forte peroxydation lipidique (A Abbassy, 2014 ; Venturini et al., 2019). Une autre étude *in vitro* effectuée par Hsu et ses collaborateurs (2018) a montré que l'exposition au lambda-cyhalothrine peut induire un stress oxydatif profond conduisant à la production de radicaux libres capables de détruire directement les membranes plasmiques des neurones, des cellules gliales et des cellules endothéliales. Également, nous avons remarqué une augmentation significative du taux des groupements carbonylés (PCO), produits finaux de l'oxydation des protéines, au niveau de de l'hippocampe, cortex, et striatum. La production excessive des espèces réactives d'oxygène est considérée actuellement comme étant l'un des processus par lequel l'exposition du LCT exerce ses effets délétères au niveau du cerveau (El-Demerdash, 2011 ; Aouey et al., 2019). En fait, cette production accentuée de ces radicaux libres constitue un facteur important impliqué dans le mécanisme de la mort cellulaire et la neurodégénérescence (Fetoui et al., 2008 ; Moser et al., 2016).

L'oxyde nitrique (NO), source d'espèces réactives de l'azote, est un oxydant très réactif produit par l'action de l'isoforme de la NO synthase inductible (iNOS). Dans l'étude actuelle, l'exposition au LTC induit une augmentation significative du niveau de NO. L'oxyde nitrique peut également aggraver le stress oxydatif en réagissant avec les EROs, en particulier avec l'anion superoxyde formant ainsi le radical peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) qui affecte l'équilibre redox des cellules induisant des modifications au niveau des protéines, des lipides, et de l'ADN (Yahia et al., 2019). Nos résultats sont également en accord avec ceux obtenus par El-Bialy et al.,

(2020). Des études antérieures (White et al., 2000) ont montré que l'activation des cellules gliales inflammatoires est à la base d'un processus dégénératif où la production excessive de NO est l'une des principales causes de l'apoptose/nécrose des neurones. Dans ce contexte, Q. Zhang et al., (2010) ont étudié *in vitro* l'effet de LCT qui peut augmenter la génération des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les niveaux de dommages à l'ADN et provoquer une cytotoxicité dans les cellules de manière proportionnelle à la dose et au temps. Les résultats impliquaient pour la première fois une augmentation des ROS endogènes et des dommages à l'ADN en tant que co-médiateurs de la cytotoxicité induite par la LCT dans les macrophages. Et d'autres études ont suggéré que LCT induit des réponses pro-inflammatoires *in vivo* qui peuvent être déclenchés par la génération de EROs et NO (Fetoui et al., 2008 ; Fouzai et al., 2020).

LTC, pyréthriinoïde de type II, est caractérisé par un ester d'alcool secondaire avec un groupe cyano au niveau du carbone- $\alpha$  de la partie d'alcool. Donc, la toxicité de LTC pourrait également être due à la libération des cyanohydrins chimiquement instables, qui pourraient agir en tant que source des radicaux libres (Khemiri et al., 2017). Les espèces réactives d'oxygène (ERO) et les espèces réactives nitrogènes (ERN) sont considérées comme des marqueurs du stress oxydatif qui réagissent avec les molécules biologiques (lipides, protéines et acides nucléiques). Ces molécules sont protégées par des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (Ndonwi et al., 2019). En effet, la GPx, la CAT, et la SOD, jouent des rôles importants dans la protection contre les effets délétères de la peroxydation lipidique (Chtourou et al., 2016).

La SOD est une enzyme importante dans la vie cellulaire. Elle maintient les conditions physiologiques à l'état normal (Erkekoglu et al., 2012). La SOD est connue aussi comme la première ligne de défense contre les effets délétères des radicaux oxygénés dans la cellule en catalysant la dismutation de l'anion superoxyde  $O_2^-$  pour former le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  (Elwej et al., 2016). Dans notre étude, on remarque une diminution de l'activité catalytique de SOD chez les rats traités par LCT dans les trois régions du cerveau. Cette diminution est due à la production intensive de l'anion superoxyde suite à la présence du LCT. Par conséquent, les niveaux de SOD ne sont pas efficaces pour lutter contre les dommages oxydatifs. (Marwa M Abd Elkawy, (2013) a suggéré que la cytotoxicité a été examinée aux niveaux de stress oxydatif intracellulaire mesurée par épuisement du GSH, production de MDA, inhibition de SOD et génération de ROS. Ces résultats ont confirmé que le stress oxydatif pourrait être une voie essentielle dans la cytotoxicité du LCT. De plus, La littérature a documenté que ROS et le stress oxydatif sont des critères valables pour évaluer la toxicité des pesticides, car les deux jouent un

rôle important dans l'induction de blessures associées aux pesticides. La CAT est une enzyme omniprésente dans les organismes aérobies de structure tétramériques dont chaque unité porte une molécule d'hème et une molécule de NADPH. Chez les mammifères, elle se trouve dans le foie et dans les globules rouges et plus précisément dans les peroxysomes et les mitochondries. Cette enzyme présente la 1<sup>ère</sup> ligne de défense contre le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Schrader & Fahimi, 2006). Elle a donc pour rôle d'accélérer la réaction spontanée de dismutation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en oxygène et en eau (Sara et al., 2016). Dans notre étude, on remarque une diminution et inhibition de l'activité catalytique de CAT qui provoque une accumulation intensive de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nos résultats sont en accord avec l'étude de Gargouri et al (2019), qui ont remarqué une diminution de l'activité catalase au niveau du l'hippocampe et chez des rats exposés au bifenthrine (pyréthrianoïde type II) ce qui montre une élévation apparente des niveaux de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de MDA et une diminution significative de l'activité du GSH par comparaison au contrôle. La GPx est présente dans le cytoplasme où elle joue un rôle majeur dans la régulation de l'état redox physiologique intracellulaire des cellules vasculaires. Elle catalyse la réduction des hydroperoxydes (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et des peroxydes lipidiques en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme donneur d'hydrogène (Madkour, 2012). La glutathion peroxydase également joue un rôle crucial dans la détoxification du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formé au niveau cellulaire mais aussi elle participe dans la neutralisation des hydroperoxydes lipidiques utilisant du glutathion comme substrat. Dans notre étude, on remarque une diminution de l'activité catalytique de GPX.

Cette diminution au niveau des activités enzymatiques est corrélée avec la surproduction des radicaux libres générés lors de la peroxydation lipidique et l'oxydation des protéines excessives qui pourraient causer des endommagements irréversibles au niveau neuronal. Nos résultats sont en accord avec les données de la littérature révélant une augmentation des taux de TBARS nerveux chez les rats traités par LCT ; connue comme un indicateur de lésion tissulaire et une altération de la fonction cellulaire (Fetoui et al., 2008). De même nos résultats ont montré un épuisement de l'activité des enzymes antioxydants. Ceci pourrait être du à la formation excessive des anions superoxydes qui désactivent ces enzymes (Ansari et al., 2012a).

L'utilisation de l'extrait méthanolique de *Mélissa officinalis* L contre les effets délétères de lambda-cyhalothrine a amélioré de façon significative le statut redox dans le cytosol de l'hippocampe, le cortex, et le striatum, ce qui confirme ses vertus contre le stress oxydant en renforçant indirectement les systèmes oxydants cellulaires ou en scavengant directement les ROS.

Dans les lots traités par LCT nous avons noté une inhibition de l'activité d'AChE ase au niveau des trois régions du cerveau et ceci comparativement aux lots témoins. Nos résultats sont en accordance avec ceux de (Ansari et al., 2012a). En outre, à la base de données et de nos résultats, l'activité du système cholinergique est vitale pour un comportement normal et de la fonction musculaire (Kale et al., 1999). Les modifications de l'activité de cette enzyme ont été observées dans plusieurs troubles neurologiques. L'exposition à deux doses de lambda-cyhalothrine a provoqué une inhibition de l'activité AChE dans le cerveau des rats, ce qui suggère un lien entre l'inhibition de l'acétylcholinestérase et des altérations comportementales. Ces résultats, pris collectivement, renforcent l'hypothèse que l'activité de l'acétylcholinestérase cérébrale est impliquée dans les troubles de comportement causés par LCT chez les rats. Les résultats actuels sont conformes à d'autres études qui démontrent que les pyréthrinoïdes de synthèses type II provoquent des modifications du comportement et des effets neurotoxiques chez les rats (Gasmi et al., 2017 ; Beghoul et al., 2017). Également, Gargouri et ses collaborateurs (2019) ont montré que l'inhibition d'AChE ase pourrait être due à une accumulation de l'acétylcholine au niveau de la fente synaptique et par conséquent une inhibition de l'expression des récepteurs cholinergiques au niveau du cerveau. Des nombreux produits chimiques environnementaux comme les pyréthrinoïdes pourraient inhiber l'activité de l'acétylcholinestérase au niveau des cerveaux des rats (Ansari et al., 2012a).

Les mitochondries sont impliquées dans un grand nombre de processus physiologiques tels que la production énergétique d'ATP, le métabolisme des acides aminés et des lipides, l'homéostasie calcique, la thermogenèse, la production d'espèces réactives à l'oxygène, le transport axonal, l'apoptose. Un dysfonctionnement de chacun de ces processus est susceptible de contribuer aux mécanismes de neurodégénérescence. L'implication d'une défaillance mitochondriale a ainsi été établie dans les principales maladies neurodégénératives que sont la maladie d'Alzheimer, de Parkinson, et d'Huntington (Guillet-Pichon & Verny, 2016). L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée dont la voie intrinsèque fait intervenir la mitochondrie. Cette voie consiste en la libération dans le cytoplasme cellulaire de molécules pro-apoptotiques situées dans l'espace intermembranaire mitochondrial suite à la perméabilisation de la membrane externe. Deux mécanismes de perméabilisation ont été proposés, l'un impliquant l'ouverture d'un canal appelé pore de transition de perméabilité (PTP), l'autre basé sur la formation de canaux constitués des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, et Bax. Parmi les protéines pro-apoptotiques libérées, on retrouve le cytochrome c qui participe à la formation de l'apoptosome, aboutissant à l'activation des caspases, protéases

effectrices de l'apoptose (PELLETIER & VALLETTE, 2001). La libération de Cyto-c dans le cytosol permet l'activation du complexe Apaf-1 susceptible d'activer la maturation de la procaspase-9 en caspase-9 et la caspase-3 qui induit l'apoptose (Gasmi et al., 2017). Dans ce contexte, les résultats de la présente étude ont fait constater que le traitement des animaux par LCT induit des taux élevés de concentration de Cyt-c et de l'activité casp-3 cytosoliques suggérant un phénomène apoptotique mitochondrie-dépendant après un fort gonflement et perméabilité membranaires de ces organelles sous l'effet de LCT (Martínez et al., 2018), ce résultat est en accord avec de nombreuses études (Anadón et al., 2013 ; Sara et al., 2016 ; White et al., 2000). En revanche, on observe une amélioration du statut apoptotique après l'administration de l'extrait méthanolique de *Mélissa officinalis* L. En effet, selon une étude expérimentale *in vitro*, l'extrait de *Mélissa officinalis* L. a un effet protecteur (antioxydant et anti-apoptotique) sur le stress oxydatif induit par A $\beta$  (dépôt extracellulaire du peptide bêta-amyloïde, principal résultat de la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer), conduit à des dommages oxydatifs et à l'apoptose des neurones et l'apoptose dans les neurones cérébelleux granulaires (Soodi et al., 2016).

# Discussion générale

Les plantes, comme tout organisme vivant, ont développé des mécanismes de protection contre les conditions de stress environnementale. En effet, elles sont capables de synthétiser des molécules pouvant agir à différents niveaux, parmi lesquelles nous pouvons citer les antioxydants qui inhibent la formation des espèces réactives d'oxygène (ERO) et interrompent la chaîne de propagation des réactions d'oxydation, conduisant à la dégradation des protéines, des lipides ou de l'ADN. Ces composés peuvent être de nature lipophile (caroténoïdes, vitamine E) ou de nature hydrophile (polyphénols, vitamine C).

L'analyse phytochimique de l'extrait méthanolique de *M. officinalis* a révélé des taux notables en composés phénoliques. La teneur de ces composés dans l'extrait étudié semble être légèrement supérieure à celles trouvées par d'autres auteurs pour les mêmes espèces (Pereira et al., 2014 ; Barakat et al., 2016). Cette différence dans les teneurs peut être expliquée par les conditions environnementales, climatiques, période de collecte ainsi que par les facteurs génétiques et les conditions expérimentales. De même, Miron et al., (2013), ont montré que la solubilité des composés phénoliques dépend de la polarité des solvants utilisés. Nous avons procédé aussi à l'identification des principaux composés présents dans de l'extrait méthanolique de *M. officinalis* en utilisant CLHP/SM. Cette dernière a permis de montrer la présence des composés polyphénoliques. L'évaluation de l'effet bénéfique du *M. officinalis* contre le stress oxydant est l'objectif principal de notre étude, c'est la raison pour laquelle il était indispensable de l'étudier *in vitro* avant de passer à l'étude *in vivo*. Pour cela, quatre tests sont réalisés : le dosage de piégeage des radicaux DPPH, l'activité de piégeage ABTS, la capacité antioxydante réductrice cuivrique (CUPRAC), le dosage du pouvoir réducteur ferrique, les activités acétylcholinestérase (AChE), et butyrylcholinestérase (BChE). Diverses études ont déterminé expérimentalement les capacités des extraits naturels à piéger les radicaux libres. Cette activité dépend d'un certain nombre de paramètres : la dose, la structure, les substituant et le degré de polymérisation de la molécule. Le DPPH est un radical libre stable, qui accepte un électron ou un proton pour donner une molécule diamagnétique stable. Il est très utilisé dans le criblage des activités de piégeage des radicaux libres. La réaction chimique dans la technique DPPH implique un transfert d'électrons d'un donneur (antioxydant) vers le radical libre DPPH et la réduction de ce dernier en a-a,diphényl-b-picryl-hydrazine de couleur jaune. Les résultats obtenus par ce test montrent que l'extrait méthanolique de *M. officinalis* présente un effet antioxydant remarquable. Le pouvoir antioxydant manifesté a été interprété par une action combinée des différents antioxydants endogènes contenus dans l'extrait qui possèdent la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène.

Le test ABTS est applicable pour les antioxydants hydrophiles et lipophiles pour mesurer la perte de couleur lorsqu'un antioxydant est ajouté au chromophore bleu-vert ABTS<sup>+</sup> (2,2-azino-bis (acide 3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonique)). En effet, il est déjà prouvé que les polyphénols alimentaires protègent les cellules animales et bactériennes de la toxicité induite par les radicaux libres, avec notamment des composés phénoliques comme les esters d'acide gallique et d'acide caféique. Nos résultats du test ABTS des parties aériennes d'extrait méthanolique de *M. officinalis* présentés une forte activité.

Les polyphénols contribuent à l'inhibition de la formation des radicaux libres par la chélation de métaux de transition tels que le fer (Fe<sup>2+</sup>) et le cuivre (Cu<sup>+</sup>), qui sont essentiels pour de nombreuses fonctions physiologiques. Ils entrent notamment dans la composition des hémoprotéines et de cofacteurs d'enzymes du système de défense antioxydant (Fe pour la catalase et Cu pour la superoxyde dismutase). Cependant, ils peuvent aussi être responsables de la production du radical OH<sup>•</sup> par la réduction de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En outre, l'autoxydation des ions Fe<sup>2+</sup> et Cu<sup>+</sup> est une source de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ainsi, complexer les ions du fer et du cuivre sous une forme qui bloque leur activité redox est un mécanisme d'action antioxydante. Nos résultats ont montré que *M. officinalis* avait un pouvoir réducteur ferrique efficace par rapport à l' $\alpha$ -tocophérol, aussi ont montré une forte activité pour convertir Cu<sup>2+</sup> en Cu<sup>+</sup> est comparable à celle rapportée par Bendjabeur et al., (2018). L'acétylcholinestérase (AChE) est l'enzyme responsable de la métabolisation de l'acétylcholine, neurotransmetteur du système cholinergique qui est impliqué notamment dans les fonctions cognitives. L'inhibition de cette enzyme va engendrer une diminution du turnover de l'acétylcholine et donc augmenter les effets cholinergiques. Nos résultats montrent une activité élevée de l'extrait méthanolique de *M. officinalis* contre la BChE, et une activité modérée contre l'AChE peut être due à la présence plus importante des polyphénols.

L'usage intensif ces 50 dernières années des produits phytosanitaires a conduit à une contamination importante de l'atmosphère, le sous-sol et les océans, ainsi que les espèces qui y vivent. Les êtres vivants sont constamment exposés à ces composés et doivent être capables de faire face à certaines de leurs propriétés potentiellement délétères. Parmi les produits phytosanitaires polluants de l'environnement, nous pouvons citer les pesticides synthétiques qui occupent une place importante compte tenu de leurs nocivités particulières sur l'environnement et la santé publique. Cependant, ces substances peuvent affecter la santé humaine et l'équilibre biologique de la biosphère. En effet, les organismes vivants possèdent des systèmes de défense par des antioxydants réagissant contre les radicaux libres sous l'effet

de certains stimuli pathologiques endogènes ou exogènes. Un déséquilibre s'installe provoquer soit par une production exagérée de radicaux libres soit par une diminution du système de défense antioxydant.

La deuxième partie de notre étude s'intéresse à la fois aux effets sur le comportement des rats exposés à deux doses de la lambda-cyhalothrine pendant 90 jours. Cette étude a été réalisée à la fin du traitement en se basant sur différents tests de références ; le test d'activité locomotrice (open-field) le test d'anxiété (labyrinthe classique), test de dépression (la nage forcé). Nos résultats ont montré des différences significatives entre les rats traités et témoins au niveau de certains paramètres mesurés dans le test open-field (nombre de cases traversées et nombre de passage en case centrale), dans le test labyrinthe classique (temps d'arrivé et temps d'exploitation) et le test de nage forcé (durée d'immobilité). Ces résultats sont corrélés avec des études antérieures effectuées sur des rats exposés au lambda-cyhalothrine (Moser et al., 2016). Les mêmes résultats sont remarqués chez des rats exposés à d'autres types de pyréthrinoïdes (type II) telle que ; bifenthrine (Gargouri et al., 2019). Des études ont montré que l'initiation des maladies neurodégénératives est associée à une accumulation des fortes concentrations de insecticides tels que lambda-cyhalothrine, deltaméthrine, et bifenthrine, dans les régions du cerveau et associées avec une perte de la fonction et des dommages cellulaires (Ansari et al., 2012a ; Takasaki et al., 2013 ; Gargouri et al., 2018).

La lambda-cyhalothrine a provoqué une diminution du poids corporel des rats traités en comparant avec les animaux témoins. Nos résultats sont en accord avec les études menées par Aouey et al., en 2017 qui ont montré que l'administration de la lambda-cyhalothrine a différents doses par voie orale pendant 60 jours induit une baisse de la croissance pondérale des rats. Cette réduction du poids peut être expliquée par une réduction de la consommation des aliments, mais aussi par les possibilités d'interactions dose/absorption et par la diminution de la quantité de nourriture absorbée. L'administration de l'extrait méthanolique de *M. officinalis* avec la lambda-cyhalothrine provoque une amélioration de la masse pondérale des animaux traités qui pourrait s'expliquer par le pouvoir thérapeutique de ces plantes et leurs effets bénéfiques sur la croissance générale (Ozarowski et al., 2016 ; Sedighi et al., 2019).

L'effet neurologique de ce type de pyréthrinoïde dans notre étude a été évalué également par l'évaluation de certains biomarqueurs de stress oxydatif au niveau de l'hippocampe, cortex, et striatum chez les rats traités. Nous avons remarqué une augmentation de la peroxydation lipidique (MDA), de l'oxydation des protéines (PCO), et une production excessive de NO chez les rats exposés à LCT par rapport aux témoins, qui sont considérés comme étant des marqueurs

"stables" du stress oxydant. La forte peroxydation lipidique, observée dans notre étude pourrait être expliquée d'une part par la richesse du cerveau en acides gras polyinsaturés qui rend cet organe susceptible aux radicaux libres (El-Demerdash, 2011) et d'autre part à la génération excessive d'espèces réactives d'oxygène suite au traitement par LCT via plusieurs mécanismes. Ces résultats sont en accordance avec des études antérieures (Fetoui et al., 2008) qui ont montré dans des différentes régions du cerveau une forte peroxydation lipidique. La lambda-cyhalothrine, administré par voie orale traverse la muqueuse gastro-intestinale et par la voie sanguine, atteint le cerveau, organe cible des pesticides et provoque une neurotoxicité probablement due à la production excessive en espèces réactives d'oxygène. Parmi ces espèces nous pouvons citer  $O_2^-$ , les radicaux hydroxyles ( $OH^\cdot$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) qui fonctionnent principalement en tant que molécules oxydatives impliquées dans plusieurs conditions pathologiques et le processus de vieillissement conduisant à l'endommagement cellulaire ou leur mort (Fetoui et al., 2010). Également, nous avons remarqué une défaillance du statut antioxydant enzymatique et non enzymatique suite à l'exposition au LCT. Cette défaillance est objectivée par une diminution de l'activité des enzymes de défenses tels que la catalase, le superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase, le glutathion réduit, prouve l'échec du système de défense antioxydant à réduire les espèces réactives de l'oxygène. Comme les enzymes antioxydantes agissent en coopération avec les antioxydants non enzymatiques afin de piéger les radicaux libres, complètent l'activité du système antioxydant enzymatique et ceci quand le stress oxydatif se trouve en excès et participent à l'élimination des substances intermédiaires réactives en réduisant la réaction de  $H_2O_2$  en produits non toxiques neutralisant ainsi les ERO (X. Wang et al., 2016). Nos résultats sont en accordance avec ceux de Gasmi et ses collaborateurs (2017) qui ont montré une activation du système de défense antioxydant au niveau du striatum et hippocampe chez des rats traités par deltaméthrine (pyréthriinoïde type II). L'acétylcholine est le seul neurotransmetteur agissant au niveau du contrôle des mouvements qui n'est pas fabriqué à partir d'un acide aminé. Les régions du cerveau qui offrent la plus forte densité de neurones utilisant la choline, sont celles qui dégènèrent dans la maladie d'Alzheimer (Pereira et al., 2014). L'augmentation de la fabrication d'acétylcholine est à l'origine de troubles de la contraction musculaire, de la mémoire, manque de concentration, oublis ...etc. Ce neuromédiateur est dégradé par l'acétylcholine-estérase (AChE) dans la fente synaptique après chaque influx nerveux cholinergique (Ansari et al., 2012a). Les résultats de cette étude, présentent une diminution de l'activité d'AChE dans l'hippocampe, cortex, et le striatum chez les rats exposés aux deux doses de LCT. Cette diminution implique l'augmentation de l'Ach, traduisant une variation neurocomportementale telle que la réduction de l'efficacité

d'apprentissage et le potentiel de mémorisation. Ces résultats sont en adéquation avec plusieurs résultats d'autres recherches évaluant l'impact des pesticides sur le rendement neurocomportemental chez l'organisme animal (Gargouri et al., 2018 ; Gargouri et al., 2019).

L'effet neurotoxique de cet insecticide a été évalué également par la mesure de biomarqueurs d'apoptose au niveau de l'hippocampe, le cortex, et le striatum (Cyto-c, et Casp-3 ces biomarqueurs sont considérés comme des bons indicateurs de l'apoptose. Dans cette étude, nous avons noté une augmentation élevée de la concentration de Cyto-c et de l'activité de Casp-3. Ces résultats ont montré que l'exposition au LCT présente un effet apoptotique. Des résultats similaires ont été retrouvés dans une étude récente (Gasmi et al., 2017) qui ont observés un neuro-apoptose dans l'hippocampe, le striatum, et le cerveau total induite par surproduction de Cyto-c et Casp-3 chez des rats exposées à différents insecticides.

L'effet cytoprotecteur de *M. officinalis* a réduit la peroxydation des lipides, l'oxydation des protéines, et la production d'oxyde nitrique au niveau des trois régions du cerveau. En outre, l'EMMO améliore les activités de la SOD, la CAT, de la GPx, AchE, et le taux de GSH par rapport au groupe traité par deux doses de LCT. Aussi diminué la concentration de Cyto-c et l'activité de Casp-3 dans les trois régions. L'effet antioxydant puissant de l'extrait de *M. officinalis* pourrait être dû au des composés phytochimiques, tels que l'acide caféique, l'acide rosmarinique trouvés dans les feuilles de *M. officinalis* (Weitzel & Petersen, 2011).

# Conclusion et Perspectives

La lambda-cyhalothrine est considérée parmi les pyréthriinoïdes de synthèse les plus utilisés dans le monde. Toutefois, une exposition prolongée à cet insecticide peut mener à des dysfonctionnements et des perturbations de certains tissus chez le rat. De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et ce dans le but de réduire la toxicité induite par les polluants chimiques. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs et, d'autre part du besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce et sans effets secondaires. Le présent travail a mis le point sur deux volets principaux : Tout d'abord l'accent est mis sur l'évaluation du pouvoir protecteur de la *Mélissa officinalis* L en se basant sur l'identification de leurs principes actifs responsables de réduire ces effets et prévoir les applications thérapeutiques possibles. Ensuite, nous avons exploré les manifestations toxiques de la lambda-cyhalothrine sur certaines fonctions vitales chez le rat.

La première partie est consacré à l'exploration des effets biologiques de *M. officinalis* pour mieux assimiler leurs mécanismes d'action vis-à-vis la toxicité de la lambda-cyhalothrine et ceci par le biais d'une étude phytochimique. Cette étude a montré que l'extrait méthanolique de *M. officinalis* est riche en composés chimiques tels que les phénols totaux, les flavonoïdes. Nous avons étudié également les propriétés antioxydantes et anticholinestérasiques de *M. officinalis* par différentes techniques complémentaires (le dosage de piégeage des radicaux DPPH, l'activité de piégeage ABTS, la capacité antioxydante réductrice cuivrique (CUPRAC), le dosage du pouvoir réducteur ferrique, les activités acétylcholinestérase (AChE), et butyrylcholinestérase (BChE). Ces tests antioxydants *in vitro* montrent que les multiples substances contenues dans la *M. officinalis* sont capables de piéger et neutraliser les radicaux libres, et par conséquent, prévenir plusieurs dégâts oxydatifs.

La deuxième partie se rapporte sur l'évaluation des interactions possibles entre le traitement par la lambda-cyhalothrine et la prévention par la *Mélissa officinalis* pendant 90 jours au niveau du cerveau régional. L'effets sur comportement. Cette étude a été réalisée à la fin du traitement en se basant sur différents tests de références ; le test d'activité locomotrice (open-field) le test d'anxiété (labyrinthe classique), test de dépression (la nage forcé). Nos résultats ont montré des différences significatives entre les rats traités et témoins au niveau de certains paramètres mesurés dans le test open-field (nombre de cases traversées et nombre de passage en case centrale), dans le test labyrinthe classique (temps d'arrivé et temps d'exploitation) et le test de nage forcé (durée d'immobilité). En effet, au niveau du cerveau régional (hippocampe,

cortex, et striatum), des effets néfastes ont été notés suite à l'administration orale de la lambda-cyhalothrine chez les rats. Nos résultats ont montré que la lambda-cyhalothrine peut induire un état de stress oxydant objectivé par une augmentation de la peroxydation lipidique, de l'oxydation des protéines, et d'oxyde nitrique. De plus, la lambda-cyhalothrine a inhibé l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, CAT, GPx) ainsi que le taux du GSH et l'activité d'acétylcholinestérase. Cet état de stress oxydatif conduit à un désordre net d'un ensemble des biomarqueurs apoptotiques (élévation de la concentration de cytochrome-c, et de l'activité de Caspase-3). Ces perturbations ont été confirmées par une étude histologique rapportant des altérations au des trois régions du cerveau. Associé au *M. officinalis*, la lambda-cyhalothrine voit ses effets négatifs chuter. Ceci est montré par une diminution du taux des radicaux libres et une stimulation des systèmes de défenses antioxydants. Par conséquent, une restauration de différents marqueurs apoptotiques altérés menant à une structure du trois régions normales. Les effets neurotoxiques générés par la lambda-cyhalothrine chez le rat pourrait être à l'origine de l'apparition de certaines maladies neurodégénératives.

Ce travail de thèse peut être complété par des études plus mécanistiques et comme perspectives on propose de :

- De développer le but de cette étude par le dosage des autres biomarqueurs par des autres appareilles sophistiqués (HPLC, ELISA, CPG...).
- Déterminer les effets de métabolites finals de la lambda-cyhalothrine sur l'organisme après une exposition dans les mêmes conditions expérimentales.
- Développer une dose spécifique et plus efficace de *M. officinalis*, capable d'utilisé comme antidotes spécifiques contre les différents types d'intoxication par ce pesticide (hépatotoxique, neuro. néphro et pneumotoxique).

# References

## References

### A

- A Abbassy, M. (2014). Impact of Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Induced by Lambda-cyhalothrin on P450 in Male Rats: The Ameliorating Effect of Zinc. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, *04*(04). <https://doi.org/10.4172/2161-0525.1000218>
- Abdallah, F. Ben, Fetoui, H., Zribi, N., Fakhfakh, F., & Keskes, L. (2012). Protective role of caffeic acid on lambda cyhalothrin-induced changes in sperm characteristics and testicular oxidative damage in rats. *Toxicology and Industrial Health*, *28*(7), 639–647. <https://doi.org/10.1177/0748233711420470>
- Ahlem, M. (2012). Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L. *Memoire En Biochimie Appliquée*, 87.
- Ahmad, S., Zia-ul-Haq, M., Imran, M., Iqbal, S., Iqbal, J., & Ahmad, M. (2008). Determination of residual contents of pesticides in rice (*oryza sativa* L.) CROP from different regions of Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, *40*(3), 1253–1257.
- Akhtar, N., Kayani, S. A., Ahmad, M. M., & Shahab, M. (1996). Insecticide-induced changes in secretory activity of the thyroid gland in rats. *Journal of Applied Toxicology*, *16*(5), 397–400. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1263\(199609\)16:5<397::AID-JAT362>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1263(199609)16:5<397::AID-JAT362>3.0.CO;2-Y)
- Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *21*(2), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>
- Allache, F., Demnati, F., & Houhou, M. A. (2017). Population changes of *Tuta absoluta* (Gelechiidae) and fruit loss estimates on three tomato cultivars in greenhouses in Biskra, Algeria. *Environmental and Experimental Biology*, 201–208. <https://doi.org/10.22364/eeb.15.20>
- Anadón, A., Martínez, M. A., Martínez, M., Castellano, V., Ares, I., Romero, A., Fernández, R., & Martínez-Larrañaga, M. R. (2013). Differential induction of cytochrome P450 isoforms and peroxisomal proliferation by cyfluthrin in male Wistar rats. *Toxicology Letters*, *220*(2), 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.04.015>
- Anderson, E. J., Katunga, L. A., & Willis, M. S. (2012). Mitochondria as a source and target of lipid peroxidation products in healthy and diseased heart. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, *39*(2), 179–193. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05641.x>
- Ansari, R. W., Shukla, R. K., Yadav, R. S., Seth, K., Pant, A. B., Singh, D., Agrawal, A. K., Islam, F., & Khanna, V. K. (2012a). Cholinergic dysfunctions and enhanced oxidative stress in the neurobehavioral toxicity of lambda-cyhalothrin in developing rats. *Neurotoxicity Research*, *22*(4), 292–309. <https://doi.org/10.1007/s12640-012-9313-z>
- Ansari, R. W., Shukla, R. K., Yadav, R. S., Seth, K., Pant, A. B., Singh, D., Agrawal, A. K., Islam, F., & Khanna, V. K. (2012b). Involvement of dopaminergic and serotonergic systems in the neurobehavioral toxicity of lambda-cyhalothrin in developing rats. *Toxicology Letters*, *211*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.02.012>
- Antioxydants, L. (n.d.). *Livret Nutrition*.
- Aouey, B., Derbali, M., Chtourou, Y., Bouchard, M., Khabir, A., & Fetoui, H. (2017). Pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin and its metabolites induce liver injury through the activation of oxidative stress and proinflammatory gene expression in rats following acute and subchronic exposure. *Environmental Science and Pollution Research*, *24*(6), 5841–5856. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8323-4>
- Aouey, B., Fares, E., Chtourou, Y., Bouchard, M., & Fetoui, H. (2019). Lambda-cyhalothrin exposure alters purine nucleotide hydrolysis and nucleotidase gene expression pattern in platelets and liver of rats. *Chemico-Biological Interactions*, *311*(June), 108796. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108796>
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(26), 7970–7981. <https://doi.org/10.1021/jf048741x>
- Aprioku, J. S. (2013). Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis. *Journal of Reproduction and Infertility*, *14*(4), 158–172.

## B

- BADIAGA. (2012). Etude ethnobotanique , phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith , une plante médicinale africaine récoltée au Mali Mamadou Badiaga To cite this version : HAL Id : tel-00719564. *Thesis*, 184.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- Barakat, S. A., Hudaib, M., El-Asad, N., & Burns, D. T. (2016). Composition of volatile oil and methanolic extract of Jordanian *Melissa officinalis* L. and actions against human cancer cell lines. *Oriental Journal of Chemistry*, 32(5), 2355–2362. <https://doi.org/10.13005/ojc/320506>
- Barja, G. (2014). The mitochondrial free radical theory of aging. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 127, 1–27. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394625-6.00001-5>
- Barros, L., Dueñas, M., Dias, M. I., Sousa, M. J., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). , in vitro cultured and commercial samples of *Melissa officinalis* L. infusions. *Food Chemistry*, 136(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.107>
- Basir, A., Khan, A., Mustafa, R., Zargham Khan, M., Rizvi, F., Mahmood, F., & Yousaf, A. (2011). Toxicopathological effects of lambda-cyhalothrin in female rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Human and Experimental Toxicology*, 30(7), 591–602. <https://doi.org/10.1177/0960327110376550>
- Beghou, A., Kebieche, M., Gasmi, S., Chouit, Z., Amiour, C., Lahouel, A., Lakroun, Z., Rouabhi, R., Fetoui, H., & Soulimani, R. (2017). Impairment of mitochondrial integrity and redox status in brain regions during a low-dose long-term exposition of rats to pyrethroids: the preventive effect of quercetin. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(24), 19714–19722. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9675-0>
- Bendjabeur, S., Benchabane, O., Bensouici, C., Hazzit, M., Baaliouamer, A., & Bitam, A. (2018). Antioxidant and anticholinesterase activity of essential oils and ethanol extracts of *Thymus algeriensis* and *Teucrium polium* from Algeria. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(4), 2278–2288. <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9845-x>
- Bhardwaj, K., Sharma, R., Abraham, J., & Sharma, P. (2020). Pyrethroids: A Natural Product for Crop Protection. *Natural Bioactive Products in Sustainable Agriculture*, 113–130. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-3024-1\\_8](https://doi.org/10.1007/978-981-15-3024-1_8)
- Birdane, Y. O., Büyükokuroglu, M. E., Birdane, F. M., Cemek, M., & Yavuz, H. (2007). Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Melissa officinalis* L. in rodents. *Revue de Medecine Veterinaire*, 158(2), 75–81.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical [10]. *Nature*, 181(4617), 1199–1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- Bolkent, S., Yanardag, R., Karabulut-Bulan, O., & Yesilyaprak, B. (2005). Protective role of *Melissa officinalis* L. extract on liver of hyperlipidemic rats: A morphological and biochemical study. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(3), 391–398. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.02.038>
- Boros, B., Jakabová, S., Dörnyei, Á., Horváth, G., Pluhár, Z., Kilar, F., & Felinger, A. (2010). Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography-mass spectrometry in *Thymus* species. *Journal of Chromatography A*, 1217(51), 7972–7980. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.07.042>
- Bossou, Y. M., Côté, J., Mantha, M., Haddad, S., Achard, S., & Bouchard, M. (2020). Impact of pesticide coexposure: an experimental study with binary mixtures of lambda-cyhalothrin (LCT) and captan and its impact on the toxicokinetics of LCT biomarkers of exposure. *Archives of Toxicology*. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02810-6>
- BOUNIHI, A. (2016). *Criblage phytochimique, Étude Toxicologique et Valorisation Pharmacologique de Melissa officinalis et de Mentha rotundifolia (Lamiacées)*. 1–199.
- Boyer, F. (2016). *Stress oxydant et pathologie diabétique : impact de l'hyperglycémie et de l'albumine glyquée sur les cellules cardiaques et adipeuses*. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01379536>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254.
- Bush, D., Bisby, J. A., Bird, C. M., Gollwitzer, S., Rodionov, R., Diehl, B., McEvoy, A. W., Walker,

M. C., & Burgess, N. (2017). Human hippocampal theta power indicates movement onset and distance travelled. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(46), 12297–12302. <https://doi.org/10.1073/pnas.1708716114>

## C

- Caleja, C., Barros, L., Barreira, J. C. M., Ciric, A., Sokovic, M., Calhelha, R. C., Beatriz, M., Oliveira, P. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Suitability of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract rich in rosmarinic acid as a potential enhancer of functional properties in cupcakes. *Food Chemistry*, 250, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.034>
- Capecka, E., Mareczek, A., & Leja, M. (2005). Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. *Food Chemistry*, 93(2), 223–226. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.09.020>
- Carnat, A. P., Carnat, A., Fraisse, D., & Lamaison, J. L. (1998). The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 72(5), 301–305. [https://doi.org/10.1016/S0031-6865\(97\)00026-5](https://doi.org/10.1016/S0031-6865(97)00026-5)
- Carović-Stanko, K., Petek, M., Grdiša, M., Pintar, J., Bedeković, D., Ćustić, M. H., & Satovic, Z. (2016). Medicinal plants of the family lamiaceae as functional foods-A review. *Czech Journal of Food Sciences*, 34(5), 377–390. <https://doi.org/10.17221/504/2015-CJFS>
- Casida, J. E. (1980). Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticides. *Environmental Health Perspectives*, VOL.34(February), 189–202. <https://doi.org/10.2307/3428960>
- Chakroborty, B., Pradhan, A., Maiti, P., & Choudhury, S. M. (2019). Alleviating Impact of Taurine on Renal Lipid Peroxidation and Oxidative Stress in Lambda-Cyhalothrin Exposed Rat. *Toxicology and Forensic Medicine – Open Journal*, 4(1), 1–7. <https://doi.org/10.17140/tfmoj-4-126>
- Chalubinski, M., & Kowalski, M. L. (2006). Endocrine disrupters - Potential modulators of the immune system and allergic response. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 61(11), 1326–1335. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2006.01135.x>
- Chambial, S., Dwivedi, S., Shukla, K. K., John, P. J., & Sharma, P. (2013). Vitamin C in disease prevention and cure: An overview. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 28(4), 314–328. <https://doi.org/10.1007/s12291-013-0375-3>
- Chen, Q., Vazquez, E. J., Moghaddas, S., Hoppel, C. L., & Lesnefsky, E. J. (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: Central role of complex III. *Journal of Biological Chemistry*, 278(38), 36027–36031. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304854200>
- Chimie, M. E. N. (2017). *Caractéristiques physico-chimiques de quelques extraits d ' une plante : Ferula communis L Remerciements*.
- Chouit, Z., Djellal, D., Haddad, S., Hanfer, M., Hachemi, M., Lakroun, Z., Chafaa, S., Fetoui, H., Kebieche, M., & Soulimani, R. (2020). Potentiation of the apoptotic signaling pathway in both the striatum and hippocampus and neurobehavioral impairment in rats exposed chronically to a low-dose of cadmium. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10755-7>
- Chtourou, Y., Aouey, B., Aroui, S., Kebieche, M., & Fetoui, H. (2016). Chtourou, Y., Aouey, B., Aroui, S., Kebieche, M., Fetoui, H., 2016. Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of naringin on cisplatin-induced renal injury in the rat. *Chem. Biol. Interact.* 243, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.11.019>Anti-apopto. *Chemico-Biological Interactions*, 243(November), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.11.019>
- Cillard, J., & Cillard, P. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 13(1), 24–29. <https://doi.org/10.1051/ocl.2006.6666>
- Cole, S. L., & Vassar, R. (2007). The Alzheimer's disease  $\beta$ -secretase enzyme, BACE1. *Molecular Neurodegeneration*, 2(1), 1–25. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-2-22>
- Complex, A. R. (1983). *Stereospecific Insecticides. 1981*, 1981–1983.
- Dar, S. A., Mir, S. H., Wani, S. H., Dolkar, T., Showkat, A., & Dawa, T. (2021). *Insect Pest Management in Organic Agriculture- A Fast Growing Approach of 21 st Century*. 3(1), 1–6.

## D

- Dastmalchi, K., Damien Dorman, H. J., Oinonen, P. P., Darwis, Y., Laakso, I., & Hiltunen, R. (2008). Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *LWT - Food Science and Technology*, 41(3), 391–400.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.03.007>

- Davies, K. J. A. (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*, 50(4–5), 279–289. <https://doi.org/10.1080/15216540051081010>
- de Carvalho, N. C., Corrêa-Angeloni, M. J. F., Leffa, D. D., Moreira, J., Nicolau, V., de Aguiar Amaral, P., Rossatto, Â. E., & de Andrade, V. M. (2011). Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Melissa officinalis* in mice. *Genetics and Molecular Biology*, 34(2), 290–297. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572011000200021>
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47–95.
- Duarte, T. L., & Lunec, J. (2005). Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Radical Research*, 39(7), 671–686. <https://doi.org/10.1080/10715760500104025>

## E

- Edenharder, R., & Grünhage, D. (2003). Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 540(1), 1–18. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(03\)00114-1](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(03)00114-1)
- El-Bialy, B. E. S., Abd Eldaim, M. A., Hassan, A., & Abdel-Daim, M. M. (2020). Ginseng aqueous extract ameliorates lambda-cyhalothrin-acetamiprid insecticide mixture for hepatorenal toxicity in rats: Role of oxidative stress-mediated proinflammatory and proapoptotic protein expressions. *Environmental Toxicology*, 35(2), 124–135. <https://doi.org/10.1002/tox.22848>
- El-Demerdash, F. M. (2011). Lipid peroxidation, oxidative stress and acetylcholinesterase in rat brain exposed to organophosphate and pyrethroid insecticides. *Food and Chemical Toxicology*, 49(6), 1346–1352. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.03.018>
- El Bouzaidi, H., Hafiane, F. Z., & Fekhaoui, M. (2020). Inventory of Pesticides and their impact on the environment by calculating the frequency of treatment indicator in the Gharb plain (Morocco). *Mediterranean Journal of Chemistry*, 10(4), 406. <https://doi.org/10.13171/mjc10402005041137fzh>
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Elwej, A., Grojja, Y., Ghorbel, I., Boudawara, O., Jarraya, R., Boudawara, T., & Zeghal, N. (2016). Barium chloride induces redox status unbalance, upregulates cytokine genes expression and confers hepatotoxicity in rats—alleviation by pomegranate peel. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(8), 7559–7571. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-6023-0>
- Emamghoreishi, M., & Talebianpour, M. S. (2009). Antidepressant effect of *Melissa officinalis* in the forced swimming test. *Daru*, 17(1), 42–47.
- Erkekoglu, P., Giray, B. K., Kizilgün, M., Rachidi, W., Hininger-Favier, I., Roussel, A. M., Favier, A., & Hincal, F. (2012). Di(2-ethylhexyl)phthalate-induced renal oxidative stress in rats and protective effect of selenium. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 22(6), 415–423. <https://doi.org/10.3109/15376516.2012.666652>
- European Medicines Agency. (2013). Assessment report on *Melissa officinalis* L., folium. *European Medicines Agency*, 44(May), 1–20.

## F

- Fernandes, R. P. P., Trindade, M. A., Tonin, F. G., Lima, C. G., Pugine, S. M. P., Munekata, P. E. S., Lorenzo, J. M., & de Melo, M. P. (2016). Evaluation of antioxidant capacity of 13 plant extracts by three different methods: cluster analyses applied for selection of the natural extracts with higher antioxidant capacity to replace synthetic antioxidant in lamb burgers. *Journal of Food Science and Technology*, 53(1), 451–460. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1994-x>
- Fetoui, H., Garoui, E. M., Makni-ayadi, F., & Zeghal, N. (2008). Oxidative stress induced by lambda-cyhalothrin (LTC) in rat erythrocytes and brain: Attenuation by vitamin C. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 26(2), 225–231. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2008.04.002>
- Fetoui, H., Garoui, E. M., & Zeghal, N. (2009). Lambda-cyhalothrin-induced biochemical and

- histopathological changes in the liver of rats: Ameliorative effect of ascorbic acid. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 61(3), 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2008.08.002>
- Fetoui, H., Makni, M., Mouldi Garoui, E., & Zeghal, N. (2010). Toxic effects of lambda-cyhalothrin, a synthetic pyrethroid pesticide, on the rat kidney: Involvement of oxidative stress and protective role of ascorbic acid. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 62(6), 593–599. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2009.08.004>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2013). *Specifications and evaluations for agricultural pesticides : Lambda-cyhalothrin*. 49.
- Fortin, M. C., Bouchard, M., & Carrier, G. (2009). Comparaison de l'excrétion urinaire de biomarqueurs d'exposition aux pyréthrinoïdes et aux pyréthrines chez les résidents de régions urbaine et rurale de la Province de Québec, Canada. *Revue d'Epidemiologie et de Sante Publique*, 57(6), 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.respe.2009.08.009>
- Fouzai, C., Trabelsi, W., Bejaoui, S., Telahigue, K., Rabeh, I., Nechi, S., Chelbi, E., El Cafsi, M., & Soudani, N. (2020). Cellular toxicity mechanisms of lambda-cyhalothrin in *Venus verrucosa* as revealed by fatty acid composition, redox status and histopathological changes. *Ecological Indicators*, 108(January 2019), 105690. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105690>
- France, E. (2012). *Plante médicinale*. 1–8.
- Franco, J.M., Pugine, S.M.P., Scatoline, A.M., De Melo, M.P., 2018. Antioxidant capacity of *Melissa officinalis* L. On biological systems. *Eclat. Quim.* 43, 19–29. <https://doi.org/10.26850/1678-4618eqj.v43.3.p19-29>
- Franco, J. M., Pugine, S. M. P., Scatoline, A. M., & De Melo, M. P. (2018). Antioxidant capacity of *Melissa officinalis* L. On biological systems. *Eclética Química*, 43(3), 19–29. <https://doi.org/10.26850/1678-4618eqj.v43.3.p19-29>

## G

- Gargouri, B., Bhatia, H. S., Bouchard, M., Fiebich, B. L., & Fetoui, H. (2018). Inflammatory and oxidative mechanisms potentiate bifenthrin-induced neurological alterations and anxiety-like behavior in adult rats. *Toxicology Letters*, 294(May), 73–86. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.05.020>
- Gargouri, B., Bouchard, M., Saliba, S. W., Fetoui, H., & Fiebich, B. L. (2019). Repeated bifenthrin exposure alters hippocampal Nurr-1/AChE and induces depression-like behavior in adult rats. *Behavioural Brain Research*, 370(December 2018), 111898. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.04.012>
- Gasmi, S., Rouabhi, R., Kebieche, M., Boussekine, S., Salmi, A., Toualbia, N., Taib, C., Bouteraa, Z., Chenikher, H., Henine, S., & Djabri, B. (2017). Effects of Deltamethrin on striatum and hippocampus mitochondrial integrity and the protective role of Quercetin in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(19), 16440–16457. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9218-8>
- Gayoso, L., Roxo, M., Cavero, R. Y., Calvo, M. I., Ansorena, D., Astiasarán, I., & Wink, M. (2018). Bioaccessibility and biological activity of *Melissa officinalis*, *Lavandula latifolia* and *Origanum vulgare* extracts: Influence of an in vitro gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 44(November 2017), 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.03.003>
- Ghosh, D., & Scheepens, A. (2009). Vascular action of polyphenols. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53(3), 322–331. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800182>
- Gomes, N. G. M., Campos, M. G., Órfão, J. M. C., & Ribeiro, C. A. F. (2009). Plants with neurobiological activity as potential targets for drug discovery. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(8), 1372–1389. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.07.033>
- Grune, T., Reinheckel, T., & Davies, K. J. A. (1997). Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *The FASEB Journal*, 11(7), 526–534. <https://doi.org/10.1096/fasebj.11.7.9212076>
- Guginski, G., Luiz, A. P., Silva, M. D., Massaro, M., Martins, D. F., Chaves, J., Mattos, R. W., Silveira, D., Ferreira, V. M. M., Calixto, J. B., & Santos, A. R. S. (2009). Mechanisms involved in the antinociception caused by ethanolic extract obtained from the leaves of *Melissa officinalis* (lemon balm) in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 93(1), 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.03.014>
- Guillet-Pichon, V., & Verny, C. (2016). Mitochondria and neurodegenerative disorders. *Pratique*

*Neurologique - FMC*, 7(2), 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.praneu.2016.01.024>  
Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(1), 1–93. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.07.008>

## H

- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007). Le stress oxydant. *Revue Medicale de Liege*, 62(10), 628–638.
- Hall, B. (1998). *FOOD AND AGRICULTURAL RESEARCH COUNCIL SECOND ANNUAL MEETING OF AGRICULTURAL SCIENTISTS Second Annual Meeting of Agricultural Scientists. AUGUST 1997*, 12–13.
- Halliwell, B., Fu, S., Stocker, R., Davies, M. J., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., Ahn, B. W., Stadtman, E. R., Williams, J. A., Stadtman, E. R., Schacter, E., Levine, R. L., Tsai, L., Halmes, N. C., Hinson, J. A., Pumford, N. R., & Packer, L. (1999). [ 17 ] M e a s u r e m e n t of Protein Carbonyls in H u m a n Brain Tissue. *Methods in Enzymology*, 300(145), 0076–0687.
- Hamel, T., Sadou, S., & Seridi, R. (2018). Pratique traditionnelle d' utilisation des plantes médicinales dans la population de la péninsule de l' edough ( nord-est algéri en). *Ethnopharmacologia*, 59, 75–81.
- Hamel, T., Seridi, R., Belair, G. de, Slimani, A., & Babali, B. (2013). Flore vasculaire rare et endémique de la péninsule de l'Edough (Nord-Est algérien). *Synthèse: Revue Des Sciences et de La Technologie*, 26, 65–74.
- Hansen, L. L., Ikeda, Y., Olsen, G. S., Busch, A. K., & Mosthaf, L. (1999). Insulin signaling is inhibited by micromolar concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Evidence for a role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in tumor necrosis factor  $\alpha$ -mediated insulin resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 274(35), 25078–25084. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.35.25078>
- Harrison, R. (2002). Structure and function of xanthine oxidoreductase: Where are we now? *Free Radical Biology and Medicine*, 33(6), 774–797. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00956-5](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00956-5)
- Hartmann, T. (2007). From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68(22–24), 2831–2846. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.09.017>
- Hassan, R., Abotaleb, S., Hamed, H., & Eldeen, M. (2019). Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Melissa officinalis* L. (Lemon Balm) Extracts. *Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 10(9), 183–187. <https://doi.org/10.21608/jacb.2019.56823>
- Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 96, Issues 2–3). [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(02\)00298-X](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(02)00298-X)
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., & Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 2(1), 3–6. <https://doi.org/10.1007/s10298-004-0003-8>
- Herodež, Š. S., Hadolin, M., Škerget, M., & Knez, Ž. (2003). Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *Food Chemistry*, 80(2), 275–282. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00382-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00382-5)
- Hsu, S. S., Jan, C. R., & Liang, W. Z. (2018). The investigation of the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin (LCT)-affected Ca<sup>2+</sup> homeostasis and -activated Ca<sup>2+</sup>-associated mitochondrial apoptotic pathway in normal human astrocytes: The evaluation of protective effects of BAPTA-AM (a selective . *NeuroToxicology*, 69, 97–107. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.09.009>

## I

- Ibragić, S., Salihović, M., Tahirović, I., & Toromanović, J. (2014). Quantification of some phenolic acids in the leaves of *Melissa officinalis* L. from Turkey and Bosnia. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina*, 42, 47–50.
- Ibrahim, H. M. (2016). Evaluation of the Immunotoxic Effects of Sub-Chronic Doses of Lambda-Cyhalothrin in Murine Model. *MOJ Immunology*, 3(6). <https://doi.org/10.15406/moji.2016.03.00108>
- Index des fiches par régions*. (2010). 2010.
- INERIS. (2011). *Lambda-Cyhalothrine. 1*, 1–18.

## J

- Jafarpour, M., & Fard, A. N. (2016). The effects of aqueous extract of *Melissa officinalis* on some blood parameters and liver of *Oncorhynchus mykiss*. *AAFL Bioflux*, 9(3), 748–758.
- Jean BRUNETON 2015. (n.d.). *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales 5eme édition*.
- Jung, K. H., Choi, H. S., Kim, D. H., Han, M. Y., Chang, U. J., Yim, S. V., Song, B. C., Kim, C. H., & Kang, S. A. (2008). Epigallocatechin gallate stimulates glucose uptake through the phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathway in L6 rat skeletal muscle cells. *Journal of Medicinal Food*, 11(3), 429–434. <https://doi.org/10.1089/jmf.2007.0107>

## K

- Kale, M., Rathore, N., John, S., & Bhatnagar, D. (1999). Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat tissues in pyrethroid toxicity: Possible involvement of reactive oxygen species. *Journal of Nutritional and Environmental Medicine*, 9(1), 37–46. <https://doi.org/10.1080/13590849961825>
- Khemiri, R. (n.d.). *Étude de la toxicocinétique de biomarqueurs*.
- Khemiri, R., Côté, J., Fetoui, H., & Bouchard, M. (2017). Documenting the kinetic time course of lambda-cyhalothrin metabolites in orally exposed volunteers for the interpretation of biomonitoring data. *Toxicology Letters*, 276, 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.05.022>
- Kilian, E., Delpont, R., Bornman, M. S., & De Jager, C. (2007). Simultaneous exposure to low concentrations of dichlorodiphenyltrichloroethane, deltamethrin, nonylphenol and phytoestrogens has negative effects on the reproductive parameters in male Sprague-Dawley rats. *Andrologia*, 39(4), 128–135. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2007.00777.x>
- Kojima, H., Katsura, E., Takeuchi, S., Niiyama, K., & Kobayashi, K. (2004). Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by in vitro reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells. *Environmental Health Perspectives*, 112(5), 524–531. <https://doi.org/10.1289/ehp.6649>
- Kontogianni, V. G., Tomic, G., Nikolic, I., Nerantzaki, A. A., Sayyad, N., Stosic-Grujicic, S., Stojanovic, I., Gerothanassis, I. P., & Tzakos, A. G. (2013). Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. *Food Chemistry*, 136(1), 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.091>
- Krief, S., & M, S. K. (2004). *M'etabolites secondaires des plantes et comportement animal : surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanz'es (Pan troglodytes schweinfurthii) en Ouganda. Activit'es biologiques et ees To cite this version : May 2004*.
- Ksouri, R., Megdiche, W., Falleh, H., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Smaoui, A., & Abdelly, C. (2008). Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *Comptes Rendus - Biologies*, 331(11), 865–873. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2008.07.024>

## L

- Li, Y., Huang, T. T., Carlson, E. J., Melov, S., Ursell, P. C., Olson, J. L., Noble, L. J., Yoshimura, M. P., Berger, C., Chan, P. H., Wallace, D. C., & Epstein, C. J. (1995). Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nature Genetics*, 11(4), 376–381. <https://doi.org/10.1038/ng1295-376>
- Lin, J. T., Chen, Y. C., Lee, Y. C., Rolis Hou, C. W., Chen, F. L., & Yang, D. J. (2012). Antioxidant, anti-proliferative and cyclooxygenase-2 inhibitory activities of ethanolic extracts from lemon balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *LWT - Food Science and Technology*, 49(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.04.009>
- Liu, A. H., Guo, H., Ye, M., Lin, Y. H., Sun, J. H., Xu, M., & Guo, D. A. (2007). Detection, characterization and identification of phenolic acids in Danshen using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1161(1–2), 170–182. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.05.081>
- Liu, Q., Liu, F., Zhang, L., Niu, Y., Liu, Z., & Liu, X. (2017). Comparison of chicoric acid, and its metabolites caffeic acid and caftaric acid: In vitro protection of biological macromolecules and inflammatory responses in BV2 microglial cells. *Food Science and Human Wellness*, 6(4), 155–

166. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2017.09.001>

- Liu, Y., Fiskum, G., & Schubert, D. (2002). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Neurochemistry*, 80(5), 780–787. <https://doi.org/10.1046/j.0022-3042.2002.00744.x>
- López, V., Martín, S., Gómez-Serranillos, M. P., Carretero, M. E., Jäger, A. K., & Calvo, M. I. (2009). Neuroprotective and neurological properties of melissa officinalis. *Neurochemical Research*, 34(11), 1955–1961. <https://doi.org/10.1007/s11064-009-9981-0>
- Lu, N., Huang, S., & Matzuk, M. M. (1996). *Neurodegeneration, myocardial*. 93(September), 9782–9787.
- Lytvyn, Y., Perkins, B. A., & Cherney, D. Z. I. (2015). Uric Acid as a Biomarker and a Therapeutic Target in Diabetes. *Canadian Journal of Diabetes*, 39(3), 239–246. <https://doi.org/10.1016/j.cjcd.2014.10.013>

## M

- Ma, C., Dunshea, F. R., & Suleria, H. A. R. (2019). LC-ESI-QTOF/MS characterization of phenolic compounds in palm fruits (Jelly and fishtail palm) and their potential antioxidant activities. *Antioxidants*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/antiox8100483>
- Mabrouki, H., Duarte, C. M. M., & Akretche, D. E. (2018). Estimation of Total Phenolic Contents and In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of Various Solvent Extracts of Melissa officinalis L. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 43(7), 3349–3357. <https://doi.org/10.1007/s13369-017-3000-6>
- Madkour, N. K. (2012). Protective effect of curcumin on oxidative stress and DNA fragmentation against lambda cyhalothrin-induced liver damage in rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(12), 76–81. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2012.21214>
- Mandl, J., Szarka, A., & Bánhegyi, G. (2009). Vitamin C: Update on physiology and pharmacology. *British Journal of Pharmacology*, 157(7), 1097–1110. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00282.x>
- Manna, S., Bhattacharyya, D., Mandal, T. K., & Das, S. (2005). Repeated dose toxicity of deltamethrin in rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 37(3), 160–164. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.16212>
- Manucha, W., Ritchie, B., & Ferder, L. (2014). Hypertension and Insulin Resistance: Implications of Mitochondrial Dysfunction. *Current Hypertension Reports*, 17(1). <https://doi.org/10.1007/s11906-014-0504-2>
- Marongiu, B., Porcedda, S., Piras, A., Rosa, A., Deiana, M., & Dessì, M. A. (2004). Antioxidant activity of supercritical extract of Melissa officinalis subsp. officinalis and Melissa officinalis subsp. inodora. *Phytotherapy Research*, 18(10), 789–792. <https://doi.org/10.1002/ptr.1549>
- Martin, S., & Andriantsitohaina, R. (2002). Cellular mechanism of vasculo-protection induced by polyphenols on the endothelium. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*, 51(6), 304–315. [https://doi.org/10.1016/S0003-3928\(02\)00138-5](https://doi.org/10.1016/S0003-3928(02)00138-5)
- Martínez, M. A., Ares, I., Rodríguez, J. L., Martínez, M., Roura-Martínez, D., Castellano, V., Lopez-Torres, B., Martínez-Larrañaga, M. R., & Anadón, A. (2018). Pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin induces hepatic cytochrome P450 enzymes, oxidative stress and apoptosis in rats. *Science of the Total Environment*, 631–632, 1371–1382. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.030>
- Martins, E. N., Pessano, N. T. C., Leal, L., Roos, D. H., Folmer, V., Puntel, G. O., Rocha, J. B. T., Aschner, M., Ávila, D. S., & Puntel, R. L. (2012). Protective effect of Melissa officinalis aqueous extract against Mn-induced oxidative stress in chronically exposed mice. *Brain Research Bulletin*, 87(1), 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.10.003>
- Marwa M Abd Elkawy, M. M. A. E. (2013). Effect of Solanum nigrum Linn against Lambda Cyhalothrin Induced Toxicity in Rats. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 5(5), 55–62. <https://doi.org/10.9790/3008-0555562>
- Matsuya, Y., Ihara, D., Fukuchi, M., Honma, D., Itoh, K., Tabuchi, A., Nemoto, H., & Tsuda, M. (2012). Synthesis and biological evaluation of pyrethroid insecticide-derivatives as a chemical inducer for Bdnf mRNA expression in neurons. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 20(8), 2564–2571. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.02.048>

- Maxwell, S. R. J., Thomason, H., Sandler, D., Leguen, C., Baxter, M. A., Thorpe, G. H. G., Jones, A. F., & Barnett, A. H. (1997). Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *European Journal of Clinical Investigation*, 27(6), 484–490. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.1997.1390687.x>
- Medana, C., Carbone, F., Aigotti, R., Appendino, G., & Baiocchi, C. (2008). Selective analysis of phenolic compounds in propolis by HPLC-MS/MS. *Phytochemical Analysis*, 19(1), 32–39. <https://doi.org/10.1002/pca.1010>
- Meijer, M., Dingemans, M. M. L., van den Berg, M., & Westerink, R. H. S. (2014). Inhibition of voltage-gated calcium channels as common mode of action for (mixtures of) distinct classes of insecticides. *Toxicological Sciences*, 141(1), 103–111. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu110>
- Michelangeli, F., Robson, M. J., East, J. M., & Lee, A. G. (1990). The conformation of pyrethroids bound to lipid bilayers. *BBA - Biomembranes*, 1028(1), 49–57. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(90\)90264-O](https://doi.org/10.1016/0005-2736(90)90264-O)
- Miron, T. L., Herrero, M., & Ibáñez, E. (2013). Enrichment of antioxidant compounds from lemon balm (*Melissa officinalis*) by pressurized liquid extraction and enzyme-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 1288, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.075>
- Mohammedi, H., Idjeri-Mecherara, S., Menaceur, F., & Hassani, A. (2019). The effect of solvents and extraction procedure on the recovery of phenolic compounds and the antioxidant capacity of Algerian *Bassia muricata* L. extracts. *Chemistry Journal of Moldova*, 14(2), 79–89. <https://doi.org/10.19261/cjm.2019.637>
- Moretto, A. (1991). Indoor spraying with the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin: Effects of spraymen and inhabitants of sprayed houses. *Bulletin of the World Health Organization*, 69(5), 591–594.
- Moser, V. C., Liu, Z., Schlosser, C., Spanogle, T. L., Chandrasekaran, A., & McDaniel, K. L. (2016). Locomotor activity and tissue levels following acute administration of lambda- and gamma-cyhalothrin in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 313, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.10.020>
- Müller, L., Gnoyke, S., Popken, A. M., & Böhm, V. (2010). Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT - Food Science and Technology*, 43(6), 992–999. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.02.004>
- Munir, K. M., Chandrasekaran, S., Gao, F., & Quon, M. J. (2013). Mechanisms for food polyphenols to ameliorate insulin resistance and endothelial dysfunction: Therapeutic implications for diabetes and its cardiovascular complications. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 305(6). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00377.2013>
- Muranli, F. D. G. (2013). Genotoxic and cytotoxic evaluation of pyrethroid insecticides  $\lambda$ -cyhalothrin and  $\alpha$ -cypermethrin on human blood lymphocyte culture. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 90(3), 357–363. <https://doi.org/10.1007/s00128-012-0909-z>

## N

- Ndonwi, E. N., Atogho-Tiedeu, B., Lontchi-Yimagou, E., Shinkafi, T. S., Nanfa, D., Balti, E. V., Indusmita, R., Mahmood, A., Katte, J. C., Mbanya, A., Matsha, T., Mbanya, J. C., Shakir, A., & Sobngwi, E. (2019). Gestational exposure to pesticides induces oxidative stress and lipid peroxidation in offspring that persist at adult age in an animal model. *Toxicological Research*, 35(3), 241–248. <https://doi.org/10.5487/TR.2019.35.3.241>
- Neuwirthová, N., Trojan, M., Svobodová, M., Vašíčková, J., Šimek, Z., Hofman, J., & Bielská, L. (2019). Pesticide residues remaining in soils from previous growing season(s) - Can they accumulate in non-target organisms and contaminate the food web? *Science of the Total Environment*, 646, 1056–1062. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.357>
- Nikitaki, Z., Hellweg, C. E., Georgakilas, A. G., & Ravanat, J. L. (2015). Stress-induced DNA damage biomarkers: Applications and limitations. *Frontiers in Chemistry*, 3(JUN), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fchem.2015.00035>
- Nile, S. H., & Park, S. W. (2014). Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*, 30(2), 134–144. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.04.007>
- Nuengchamnon, N., Krittasilp, K., & Ingkaninan, K. (2011). Characterisation of phenolic antioxidants in aqueous extract of *Orthosiphon grandiflorus* tea by LC-ESI-MS/MS coupled to

## O

- Odum, E. P., Ejilemele, A. A., & Wakwe, V. C. (2012). Antioxidant status of type 2 diabetic patients in Port Harcourt, Nigeria. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 15(1), 55–58. <https://doi.org/10.4103/1119-3077.94099>
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307–315. <https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>
- Ozarowski, M., Mikolajczak, P. L., Piasecka, A., Kachlicki, P., Kujawski, R., Bogacz, A., Bartkowiak-Wieczorek, J., Szulc, M., Kaminska, E., Kujawska, M., Jodynis-Liebert, J., Gryszczynska, A., Opala, B., Lowicki, Z., Seremak-Mrozikiewicz, A., & Czerny, B. (2016). Influence of the Melissa officinalis Leaf Extract on Long-Term Memory in Scopalamine Animal Model with Assessment of Mechanism of Action. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9729818>

## P

- Paravicini, T. M., & Touyz, R. M. (2008). NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*, 31 Suppl 2. <https://doi.org/10.2337/dc08-s247>
- PELLETIER, M., & VALLETTE, F. (2001). Apoptose et maladies neurodégénératives. *La Lettre Du Pharmacologue (Boulogne)*, 15(9), 159–166.
- Pereira, R. P., Boligon, A. A., Appel, A. S., Fachinnetto, R., Ceron, C. S., Tanus-Santos, J. E., Athayde, M. L., & Rocha, J. B. T. (2014). Chemical composition, antioxidant and anticholinesterase activity of Melissa officinalis. *Industrial Crops and Products*, 53, 34–45. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.007>
- Pereira, R. P., Fachinnetto, R., De Souza Prestes, A., Puntel, R. L., Santos Da Silva, G. N., Heinzmann, B. M., Boschetti, T. K., Athayde, M. L., Bürger, M. E., Morel, A. F., Morsch, V. M., & Rocha, J. B. T. (2009). Antioxidant effects of different extracts from melissa officinalis, matricaria recutita and cymbopogon citratus. *Neurochemical Research*, 34(5), 973–983. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9861-z>
- Piluzza, G., & Bullitta, S. (2011). Correlations between phenolic content and antioxidant properties in twenty-four plant species of traditional ethnoveterinary use in the Mediterranean area. *Pharmaceutical Biology*, 49(3), 240–247. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.501083>
- Pisoschi, A. M., & Negulescu, G. P. (2012). Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 01(01), 1–10. <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000106>
- Privratsky, J. R., Wold, L. E., Sowers, J. R., Quinn, M. T., & Ren, J. (2003). AT1 blockade prevents glucose-induced cardiac dysfunction in ventricular myocytes: Role of the AT1 receptor and NADPH oxidase. *Hypertension*, 42(2), 206–212. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000082814.62655.85>

## R

- Ravanat, J. L. (2005). Measuring oxidized DNA lesions as biomarkers of oxidative stress: An analytical challenge. *Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30(2), 100–113.
- Réseau National des Chambres d'Agriculture du Niger. (2013). *Fiche conseil pour la matière active : Deltaméthrine (insecticide) Famille : pyréthriinoïdes*. 1–5.
- Riederer, A. M., Bartell, S. M., Barr, D. B., & Ryan, B. (2008). Diet and nondiet predictors of urinary 3-Phenoxybenzoic acid in NHANES 1999-2002. *Environmental Health Perspectives*, 116(8), 1015–1022. <https://doi.org/10.1289/ehp.11082>
- Righi, D. A., Xavier, F. G., & Palermo-Neto, J. (2009). Effects of type II pyrethroid cyhalothrin on rat innate immunity: A flow cytometric study. *International Immunopharmacology*, 9(1), 148–152. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.10.009>
- Righi, D., Abbud, & Palermo-Neto, J. (2003). Behavioral effects of type II pyrethroid cyhalothrin in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 191(2), 167–176. <https://doi.org/10.1016/S0041->

- Saad, A. F., Virella, G., Chassereau, C., Boackle, R. J., & Lopes-Virella, M. F. (2006). OxLDL immune complexes activate complement and induce cytokine production by MonoMac 6 cells and human macrophages. *Journal of Lipid Research*, 47(9), 1975–1983. <https://doi.org/10.1194/jlr.M600064-JLR200>
- Sabah Chermat, & Rachid Gharzouli. (2015). Quézel, P., & Santa, S. 1962–1963: Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Vol. 1, 2. CNRS, Paris, 566, 1170. *Journal of Materials Science and Engineering A*, 5(2), 50–59. <https://doi.org/10.17265/2161-6213/2015.1-2.007>
- Sabu, M. C., Smitha, K., & Kuttan, R. (2002). Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 83(1–2), 109–116. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00217-9](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00217-9)
- Sadowska-Bartosz, I., Galiniak, S., & Bartosz, G. (2014). Polyphenols protect against protein glycooxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, 75, S47. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.810>
- Sankar, P., Telang, A. G., & Manimaran, A. (2012). Protective effect of curcumin on cypermethrin-induced oxidative stress in Wistar rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64(5), 487–493. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2010.11.003>
- Sara, H., Rachid, R., Salim, G., Aml, A., Amna, A., Aya, S., Nadjiba, T., Chahinez, T., Zina, B., Hajer, C., Samira, B., Mohamed, K., Mariem, A., & Belgacem, D. (2016). Oxidative stress status, caspase-3, stromal enzymes and mitochondrial respiration and swelling of *Paramecium caudatum* in responding to the toxicity of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 8(2), 161–167. <https://doi.org/10.1007/s13530-016-0273-1>
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4), 287–306. <https://doi.org/10.1080/1040869059096>
- Schechter, M. S., Green, N., & LaForge, F. B. (1949). Constituents of *Pyrethrum* Flowers. XXIII. Cinerolone and the Synthesis of Related Cyclopentenolones1. *Journal of the American Chemical Society*, 71(9), 3165–3173. <https://doi.org/10.1021/ja01177a065>
- Schrader, M., & Fahimi, H. D. (2006). Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1763(12), 1755–1766. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.09.006>
- Sears, B., & Ricordi, C. (2012). Role of fatty acids and polyphenols in inflammatory gene transcription and their impact on obesity, metabolic syndrome and diabetes. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 16(9), 1137–1154.
- Sedighi, M., Faghihi, M., Rafieian-Kopaei, M., Rasouljan, B., & Nazari, A. (2019). Cardioprotective effect of ethanolic leaf extract of *Melissa officinalis* L against regional ischemia-induced arrhythmia and heart injury after five days of reperfusion in rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 18(3), 1530–1542. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2019.1100761>
- Sentkowska, A., Biesaga, M., & Pyrzynska, K. (2015). Polyphenolic Composition and Antioxidative Properties of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) Extract Affected by Different Brewing Processes. *International Journal of Food Properties*, 18(9), 2009–2014. <https://doi.org/10.1080/10942912.2014.960932>
- Sepand, M. R., Soodi, M., Hajimehdipour, H., & Sahraei, E. (2013). Comparison of neuroprotective effects of melissa officinalis total extract and its acidic and non-acidic fractions against A $\beta$ -induced toxicity. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 12(2), 415–423. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2013.1294>
- Shakeri, A., Sahebkar, A., & Javadi, B. (2016). *Melissa officinalis* L. - A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 188, 204–228. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.05.010>
- Shao, B., & Bayraktutan, U. (2014). Hyperglycaemia promotes human brain microvascular endothelial cell apoptosis via induction of protein kinase C- $\beta$ I and prooxidant enzyme NADPH oxidase. *Redox Biology*, 2(1), 694–701. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.05.005>

- Shiva, S., Crawford, J. H., Ramachandran, A., Ceaser, E. K., Hillson, T., Brookes, P. S., Patel, R. P., & Darley-Usmar, V. M. (2004). Mechanisms of the interaction of nitroxyl with mitochondria. *Biochemical Journal*, *379*(2), 359–366. <https://doi.org/10.1042/BJ20031758>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. J. (1965). Colorimetry to total phenolics with phosphomolybdic acid reagents. *American Journal of Enology and Viniculture*, *16*(48), 144–158. <http://garfield.library.upenn.edu/classics1985/A1985AUG6900001.pdf>
- Son, D., Somda, I., Legreve, A., & Schiffers, B. (2017). Pratiques phytosanitaires des producteurs de tomates du Burkina Faso et risques pour la santé et l'environnement. *Cahiers Agricultures*, *26*(2). <https://doi.org/10.1051/cagri/2017010>
- Song, M. (2013). *membrane ondulante Thèse présentée pour l'obtention du grade de Docteur de l'UTC*.
- Soodi, M., Dashti, A., Hajimehdipoor, H., Akbari, S., & Ataei, N. (2016). Melissa officinalis acidic fraction protects cultured cerebellar granule neurons against beta amyloid-induced apoptosis and oxidative stress. *Cell Journal*, *18*(4), 556–564. <https://doi.org/10.22074/cellj.2016.4722>
- Spiridon, I., Colceru, S., Anghel, N., Teaca, C. A., Bodirlau, R., & Armatu, A. (2011). Antioxidant capacity and total phenolic contents of oregano (*Origanum vulgare*), lavender (*Lavandula angustifolia*) and lemon balm (*Melissa officinalis*) from Romania. *Natural Product Research*, *25*(17), 1657–1661. <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.521502>
- Štajn, A., Žikić, R. V., Ognjanović, B., Saičić, Z. S., Pavlović, S. Z., Kostić, M. M., & Petrović, V. M. (1997). Effect of cadmium and selenium on the antioxidant defense system in rat kidneys. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology*, *117*(2), 167–172. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(97\)00063-7](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(97)00063-7)
- Steffner, R. J., Wu, L., Powers, A. C., & May, J. M. (2004). Ascorbic acid recycling by cultured  $\beta$  cells: Effects of increased glucose metabolism. *Free Radical Biology and Medicine*, *37*(10), 1612–1621. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.07.032>
- Stump, C. S., Henriksen, E. J., Wei, Y., & Sowers, J. R. (2006). The metabolic syndrome: Role of skeletal muscle metabolism. *Annals of Medicine*, *38*(6), 389–402. <https://doi.org/10.1080/07853890600888413>

## T

- Tabatabaei-Malazy, O., Nikfar, S., Larijani, B., & Abdollahi, M. (2014). Influence of ascorbic acid supplementation on type 2 diabetes mellitus in observational and randomized controlled trials; A systematic review with meta-analysis. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *17*(4), 554–582. <https://doi.org/10.18433/j3zg6r>
- Tabuti, J. R. S., Lye, K. A., & Dhillon, S. S. (2003). Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda: Plants, use and administration. *Journal of Ethnopharmacology*, *88*(1), 19–44. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00161-2](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00161-2)
- Taiz, A.K., Eduardo, E.P., Efoto, L.E., Ngbolua, J.P.K., Tangou, T.T., Kalulu, N., Makaly, E., 2006. Dépollution biologique des lixiviats de la décharge des déchets de Mpsa à Kinshasa , R D Congo avec le jus d' Avertroha carambola ( Oxhalinaceae, A. K., Phuku, E. P., Efoto, L. E., Ngbolua, J. P. K., Tangou, T. T., Kalulu, N., & Makaly, E. (2006). Dépollution biologique des lixiviats de la décharge des déchets de Mpsa à Kinshasa , R D Congo avec le jus d' Avertroha carambola ( Oxhalinaceae ). *International Journal of Current Innovations in Advanced Research*, *1*(6), 107–117.
- Takasaki, I., Oose, K., Otaki, Y., Ihara, D., Fukuchi, M., Tabuchi, A., Tsuneki, H., Tabuchi, Y., Kondo, T., Saitoh, A., Yamada, M., & Tsuda, M. (2013). Type II pyrethroid deltamethrin produces antidepressant-like effects in mice. *Behavioural Brain Research*, *257*, 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.09.044>
- Tayade, S. (2013). Pesticide Contamination in Food: A Review. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*, *6*(1), 07–11. <https://doi.org/10.9790/2380-0610711>
- Teshima, Y., Takahashi, N., Nishio, S., Saito, S., Kondo, H., Fukui, A., Aoki, K., Yufu, K., Nakagawa, M., & Saikawa, T. (2014). Production of reactive oxygen species in the diabetic heart: Roles of mitochondria and NADPH oxidase. *Circulation Journal*, *78*(2), 300–306. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-13-1187>
- Thallas-Bonke, V., Jandeleit-Dahm, K. A. M., & Cooper, M. E. (2015). Nox-4 and progressive kidney

- disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 24(1), 74–80. <https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000082>
- Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarikürkcü, C., Öztürk, M., & Ulubelen, A. (2007). A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*, 103(3), 816–822. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.028>
- Tshisikhawe, P. (2002). Medicinal Plants Medicinal Plants. *Science And Technology*, 0484, 36–38.
- Tsimogiannis, D. I., & Oreopoulou, V. (2006). The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3',4'-hydroxy substituted members. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 7(1–2), 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.09.001>
- Tsuneki, H., Ishizuka, M., Terasawa, M., Wu, J. Bin, Sasaoka, T., & Kimura, I. (2004). Effect of green tea on blood glucose levels and serum proteomic patterns in diabetic (db/db) mice and on glucose metabolism in healthy humans. *BMC Pharmacology*, 4(4212), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2210-4-18>
- Tzima, K., Brunton, N. P., & Rai, D. K. (2018). Qualitative and quantitative analysis of polyphenols in lamiaceae plants—a review. *Plants*, 7(2), 1–30. <https://doi.org/10.3390/plants7020025>

## V

- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Valko, Marian, Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(1), 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Venturini, F. P., de Moraes, F. D., Rossi, P. A., Avilez, I. M., Shiogiri, N. S., & Moraes, G. (2019). A multi-biomarker approach to lambda-cyhalothrin effects on the freshwater teleost *Brycon amazonicus*: single-pulse exposure and recovery. *Fish Physiology and Biochemistry*, 45(1), 341–353. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0566-1>
- Version, D., Biomarkers, H. E., Commonly, S., & Pesticides, U. (2020). *Human Exposure Biomarkers of Some Commonly Used Pesticides*.
- Vinson, J. A., Dabbagh, Y. A., Serry, M. M., & Jang, J. (1995). Plant Flavonoids, Especially Tea Flavonols, Are Powerful Antioxidants Using an in Vitro Oxidation Model for Heart Disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(11), 2800–2802. <https://doi.org/10.1021/jf00059a005>

## W

- Wang, J.-Y., Wen, L.-L., Huang, Y.-N., Chen, Y.-T., & Ku, M.-C. (2006). Dual Effects of Antioxidants in Neurodegeneration: Direct Neuroprotection against Oxidative Stress and Indirect Protection via Suppression of Gliamediated Inflammation. *Current Pharmaceutical Design*, 12(27), 3521–3533. <https://doi.org/10.2174/138161206778343109>
- Wang, X., Martínez, M. A., Dai, M., Chen, D., Ares, I., Romero, A., Castellano, V., Martínez, M., Rodríguez, J. L., Martínez-Larrañaga, M. R., Anadón, A., & Yuan, Z. (2016). Permethrin-induced oxidative stress and toxicity and metabolism. A review. *Environmental Research*, 149, 86–104. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.05.003>
- Weiner, M. L., Nemec, M., Sheets, L., Sargent, D., & Breckenridge, C. (2009). Comparative functional observational battery study of twelve commercial pyrethroid insecticides in male rats following acute oral exposure. *NeuroToxicology*, 30(SUPPL.). <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2009.08.014>
- Weitzel, C., & Petersen, M. (2011). Cloning and characterisation of rosmarinic acid synthase from *Melissa officinalis* L. *Phytochemistry*, 72(7), 572–578. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.039>
- When, B. (2015). *Preprint*. 49.
- White, B. C., Sullivan, J. M., DeGracia, D. J., O'Neil, B. J., Neumar, R. W., Grossman, L. I., Rafols, J. A., & Krause, G. S. (2000). Brain ischemia and reperfusion: Molecular mechanisms of neuronal

injury. In *Journal of the Neurological Sciences* (Vol. 179, Issues 1–2). [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(00\)00386-5](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(00)00386-5)

Wolansky, M. J., Gennings, C., & Crofton, K. M. (2006). Relative potencies for acute effects of pyrethroids on motor function in rats. *Toxicological Sciences*, 89(1), 271–277. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj020>

## Y

Yahia, D., Ali, M. F., & Abd El-Maguid, D. S. (2019). Estimation of bone marrow DNA damage induced by lambda cyhalothrin and dimethoate insecticides using alkaline comet assay. *Journal of Advanced Veterinary Research*, 9(1), 23–28.

Yao, L. H., Jiang, Y. M., Shi, J., Tomás-Barberán, F. A., Datta, N., Singanusong, R., & Chen, S. S. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59(3), 113–122. <https://doi.org/10.1007/s11130-004-0049-7>

Yekeen, T. A., Fawole, O. O., Bakare, A. A., & Emikpe, B. O. (2016). Alteration in haematological, biochemical and reproductive indices of *Rattus norvegicus* treated with lambda-cyhalothrin. *Zoology and Ecology*, 26(1), 47–56. <https://doi.org/10.1080/21658005.2016.1142702>

## Z

Zeng, G., Xiao, H., Liu, J., & Liang, X. (2006). Identification of phenolic constituents in *Radix Salvia miltiorrhizae* by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(3), 499–506. <https://doi.org/10.1002/rcm.2332>

Zhang, M., Ay, L. K., Anilkumar, N., Chibber, R., Pagano, P. J., Shah, A. M., & Cave, A. C. (2006). Glycated proteins stimulate reactive oxygen species production in cardiac myocytes: Involvement of Nox2 (gp91phox)-containing NADPH oxidase. *Circulation*, 113(9), 1235–1243. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.581397>

Zhang, Q., Wang, C., Sun, L., Li, L., & Zhao, M. (2010). Cytotoxicity of lambda-cyhalothrin on the macrophage cell line RAW 264.7. *Journal of Environmental Sciences*, 22(3), 428–432. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(09\)60125-X](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(09)60125-X)

Zhao, Q., Yang, X., Cai, D., Ye, L., Hou, Y., Zhang, L., Cheng, J., Shen, Y., Wang, K., & Bai, Y. (2016). Echinacoside Protects Against MPP+-Induced Neuronal Apoptosis via ROS/ATF3/CHOP Pathway Regulation. *Neuroscience Bulletin*, 32(4), 349–362. <https://doi.org/10.1007/s12264-016-0047-4>

Ziaková, A., & Brandšteterová, E. (2003). Validation of HPLC determination of phenolic acids present in some Lamiaceae family plants. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 26(3), 443–453. <https://doi.org/10.1081/JLC-120017181>

Zoumenou, B., Aïna, M. P., Agbohessi, P., Imorou Toko, I., & Scippo, M.-L. (2015). Effets toxicologiques et méthodes d'analyse de la lambda-cyhalothrine et de l'acétamipride utilisés dans la protection phytosanitaire du cotonnier au Bénin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 9(4), 2184. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v9i4.38>