



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Larbi Tebessi –Tebessa-
Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie
Département de 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. Gasmi Salim**

Intitulée :

Neurotoxicité de deux pesticides (Acetamipride et Deltamethrine) et la prévention de cette toxicité par la quercétine chez le rat

Devant le jury :

M. Djabri B	Prof	Université de Tébessa	Président
M. Rouabhi R	Prof	Université de Tébessa	Rapporteur
M. Kebieche M	Prof	Université de Jijel	Co-Rapporteur
M. Arab K	Prof	Université de Boumerdes	Examineur
Mm. Boussekine S	MCA	Université de Tébessa	Examinatrice
Mm. Yahiaoui K	MCA	Université de Boumerdes	Examinatrice

Date de soutenance : 08 / 01 / 2018

ملاحظة

يمكن استعمال أي فكرة أو معلومة مكتوبة في هذا الملف شرط أن يتم ذكر مصدرها. وهو كالآتي

Gasmi Salim, Neurotoxicité de deux pesticides (Acetamipride et Deltamethrine) et la prévention de cette toxicité par la quercétine chez le rat, 2018, Thèse Doctorat, Université de Tébessa. 217p.

Remarque :

Toutes les idées ou les informations écrites dans ce fichier peut être utilisée à condition que sa source doive être mentionnée:

Gasmi Salim, Neurotoxicité de deux pesticides (Acetamipride et Deltamethrine) et la prévention de cette toxicité par la quercétine chez le rat, 2018, Thèse Doctorat, Université de Tébessa. 217p.

Note:

Any ideas or information written in this file may be used and the source must be mentioned:

Gasmi Salim, Neurotoxicité de deux pesticides (Acetamipride et Deltamethrine) et la prévention de cette toxicité par la quercétine chez le rat, 2018, Thèse Doctorat, Université de Tébessa. 217p.

Dans le texte : (Gasmi S., 2018)

Résumé

Le Parkinson est une maladie neurodégénérative d'origine multifactorielle faisant intervenir des facteurs environnementaux et génétiques. Des études épidémiologiques et toxicologiques montrent que la plupart des maladies neurodégénératives associées à une exposition chronique aux produits phytosanitaires. Dans cette étude nous nous sommes intéressés à l'évaluation d'un côté de la neurotoxicité de deux pesticides, un pyréthrinaïde ; la deltaméthrine et un néonicotinoïde ; l'acetamipride, sur un modèle animal ; les rats *Wistar*, et d'un autre côté l'effet préventif et correcteur d'un polyphénol ; la quercétine contre cette toxicité. Notre expérimentation est divisée en six axes d'études ; étude des paramètres mitochondriaux régional (hippocampe et striatum) et globale, étude des paramètres cytosoliques régional (hippocampe et striatum) et globale, étude des paramètres apoptotiques cellulaires, évaluation de taux des neurotransmetteurs, étude comportementales et en fin l'étude histologique tissulaire et de la topographie de cerveau globale. Nos résultats montrent une neurotoxicité par les deux pesticides utilisés (AC et DM), à travers l'augmentation de stress, la perturbation des neurotransmetteurs 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. L'étude biochimique a mis en évidence une perturbation des principales macromolécules à savoir ; protéines, glucides, lipides et ce parallèlement à une inhibition de la croissance corporelle (réduction du poids total). Sur un autre plan le suivi des biomarqueurs de stress a révélé d'importants effets pour les deux molécules, qui se sont manifestées par une induction des activités CAT, GST, SOD, GPx et une diminution des taux de GSH. Nous avons également mis en évidence l'induction d'un stress oxydatif confirmé par une augmentation du taux de MDA. L'isolement des mitochondries nous a permis de mettre en évidence une perturbation des fonctions structurales et énergétiques (consommation d'O₂, gonflement et perméabilité membranaire), une inhibition des activités de Catalase, GPx et GSH et aussi une augmentation de MDA GST, SOD, cytosolique et mitochondrial qui a été enregistré. A partir de l'analyse des résultats d'apoptose, on a observé que le traitement par les deux pesticides soit individuellement ou sous forme d'une mixture augmente le taux des caspase-3 et cytochrome-c, cette augmentation provoque un état de mort cellulaire organisé dans le cerveau. Aussi, l'évaluation de neurotransmetteurs montre une perturbation très claire chez les rats exposés aux pesticides. L'étude histologique régionale (hippocampe et striatum) montre une destruction des cellules cérébrales chez les lots traités par les pesticides comparés avec les témoins, ainsi que la topographie du cerveau (coupes transversales du cerveau total) présente des modifications structurales de la forme de cerveau et de la structure spéciale de l'hippocampe et le striatum avec des taches noires qui peuvent être les restes d'une destruction tissulaire par les insecticides. Sur un autre plan, nous avons évalué les effets préventifs de la quercétine sur les paramètres récents après le traitement par les deux insecticides. Nos résultats ont démontré que la quercétine corrige les différents paramètres perturbés et élimine la toxicité du deltaméthrine et d'acetamipride soit individuellement ou sous forme de mixture.

Mots clés : Neurotoxicité, Deltaméthrine, Acetamipride, Rats *Wistar*, Stress Oxydant, Mitochondries, Apoptose.

Abstract

Parkinson is a neurodegenerative disease of multifactorial origin involving environmental and genetic factors. Epidemiological and toxicological studies show that most neurodegenerative diseases associated with chronic exposure to pesticides. In this study, we were interested in the evaluation of the neurotoxicity of two pesticides, a pyrethroid is deltamethrin (DM) and a neonicotinoid is acetamiprid (AC), on an animal model *Wistar* rats and on the other hand the preventive effect and corrector of a polyphenol quercetin against this toxicity. Our study is planned in six axes of experimentation; study of total and regional (hippocampal and striatal) brain; cytosolic and mitochondrial parameters, evaluation of cellular apoptotic parameters, evaluation of neurotransmitter levels, behavioral studies and finally, a histological study and Brain topography. Our results show neurotoxicity by the two pesticides used (AC and DM), through increased stress, neurotransmitter perturbation and brain cell degeneration. We have also shown changes in the psychic behavior of rats that have manifested themselves in cases of anxiety, memory disturbance and learning. The biochemical study revealed a disturbance of the main macromolecules; Proteins, carbohydrates, lipids and in parallel with an inhibition of the growth of the body (total weight reduction). On the other hand, the monitoring of stress biomarkers revealed important effects for both molecules, which were manifested by an induction of CAT, GST, SOD, GPx activities and a decrease in GSH levels. We also demonstrated the induction of an oxidative stress confirmed by an increase in MDA. The isolation of the mitochondria allowed us to demonstrate a disruption of their structural and energy functions (O_2 consumption, swelling and membrane permeability), inhibition of Catalase, GPx and GSH activities and also an increase in MDA GST, SOD, Cytosolic and mitochondrial is recorded. From the analysis of the results of apoptosis, it should be observed that the treatment with both pesticides either individually or as a mixture increases the level of caspase-3 and cytochrome-c, this responsible increase of causing a state of organized cell death in the brain. In addition, the evaluation of neurotransmitters shows a very clear disturbance in rats exposed to pesticides. The regional histological study (hippocampus and striatum) shows a destruction of brain cells in batches treated with pesticides compared with controls. Also the brain topography (transverse cuts in total brain) presents structural modifications of brain shape and special structure of the hippocampus and the striatum with black spots may be the remains of tissue destruction by insecticides. On the other hand, we evaluated the preventive effects of quercetin on recent parameters after treatment with both insecticides. Our results showed that quercetin corrected the various disturbed parameters and eliminated the toxicity of deltamethrin and acetamiprid either individually or as a mixture.

Key words: *Neurotoxicity, Deltamethrin, Acetamipride, Wistar rats, Oxidative stress, Mitochondria, Apoptosis, Pesticide, Brain, hippocampus, striatum.*

ملخص

الباركسون مرض مزمن يصيب الجهاز العصبي وينتف الذائكة، مصدره العديد من العوامل البيئية والجينية، وقد أظهرت بعض الدراسات الوبائية والسمية الحديثة أنه من بين العوامل البيئية التي قد تسببه تلك المل تبطئة بالعرض للمبيدات الحشرية بمختلف أنواعها خاصة لمدة طويلة حتى ولو بكميات صغيرة.

في الجزء الأول من هذه الدراسة نظرنا الى تقييم السمية العصبية لمبيد حشريين الأول من صنف اليربنتر ويدات وهو الديلنا مشرين والثاني من عائلة النيكوتينويدات الحديثة وهو الأسيثاميريد، حيث استخدمنا جرذان من صنف ويسنار كمودج حيواني للنجرب، أما في جزئها الثاني فقد قمنا بتقييم التأثير الوقائي والعلاجي للكس سينين ضد هذه السمية. وقد اسهذفت تجاربنا عدة محاور أساسية للنجرب، إبتداءً من تقييم عمل الانزيمات الخلوية الى إنزيمات المينوكوندريا؛ النواقل العصبية؛ السلوك العصبي؛ الموت الخلوي وختمت بدراسة نسبية.

بعد التجرب أظهرت نتائجنا نوعاً من السمية العصبية للمبيدات المستخدمة في التجرب، وذلك من خلال ظهور أعراض الإجهاد التأكسدي عند الافراد المنعضة لهذه المبيدات، وتعطل وسائط النقل العصبية والذي يرجع الى تآكل خلايا المخ، وقد لاحظنا أيضاً تغير في السلوك النفسي والمزاجي للفئران الذي تجلى في حالات من القلق والسلوك العدواني؛ اضطراب في الذائكة؛ نقص في الذكاء وميزة الذكاء. كما كشفت دراساتنا البيوكيميائية عن اضطراب في الجزئيات البنوية الكبيرة كالبروتين والكس بوهيدرات والشحوم وهذا مواز مع تناقص شديد في معدل نمو الجسم مر عبر عنه من خلال نقصان الوزن الملاحظ.

وعلى مستوى آخر، كشفت دراساتنا لعوامل الإجهاد التأكسدي عن آثار سلبية عديدة للمبيدات، قد تجلت في العديد من حالات الشيط او الشيط الغير طبيعية لعمل الانزيمات والبيبيدات المضادة للأكسدة في الجسم، كما ان تقييمنا لنواتج أيض الليبيدات في الخلية قد أكد صحة النتائج السابقة. أما فيما يخص تأثير المبيدات على الثاعلات الطاقوية في الجسم فقد سمح لنا عزل المينوكوندريا بالكشف عن اضطرابات عديدة في وظائفها الهيكلية والحيوية، من إستهلاك للأكسجين، إنقاع وفاذية غشائها، تثيط بعض الانزيمات المضادة للأكسدة لها، وكذلك زيادة في مخلفات حرق الدهون وهذا عند الافراد المنعضة لهذه السموم.

من تحليل النتائج السابقة، يلاحظ أن العرض لهذه المبيدات بصورة فريدة أو في شكل خليط قد يزيد من معدل موت وتآكل خلايا المخ، وهذا ما أكد تقييم معاملات الموت الخلوي المنظم كالكاسباز والسينوكروم.

وقد بينت الدراسة النسيجية التي قمنا بها سواء في مناطق معينة أو في كامل المخ مدى تلف خلايا الدماغ عند الفئران المنعضة لهذه المبيدات السامة مقارنة بمقارننا بالحالات الطبيعية. أيضاً المقاطع العرضية في المخ تبين التغيرات الهيكلية في شكل الدماغ وبنى بعض المناطق الحساسة فيه. كما أن وجود عدة بقع سوداء بها يرجح أن يكون جراء الموت الخلوي المنظم بعد إصابة من كثر الطاقة في الخلية (المينوكوندريا). على مستوى آخر، قررنا أن من الآثار الوقائية للكس سينين بعد المعالجة هذه المبيدات الحشرية؛ حيث أظهرت نتائجنا أن هذا المركب جد فعال تجاه مفعول أو شدة هذه السمية.

الكلمات الدالة: السمية العصبية؛ الديلنا مشرين؛ الأسيثاميريد؛ الجرذان ويسنار؛ الإجهاد التأكسدي؛ الكس سينين.

Liste des Abréviations

μmol	Micromoles
½ O₂	Oxygène singulet
3-PBA	d'acide 3-phénoxybenzoïque
4-HNE	4-hydroxy-2-nonénal
5-HT	5-hydroxytryptamine ou sérotonine
AC	Acetamipride
ACh	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADN mt	Acide Désoxy riboNucléique mitochondrial
ADP	Adénosine diphosphate
AG	Acide gras
Akt	protéines de survie de tumeur voie mitochondrial
AIF	apoptosis inducing factor
ANOVA	Analyse de variance
ARLA	L'Agence canadienne pour la régulation de la lutte antiparasitaire
ARN	Acide Ribonucléique
ATP	Adenosine triphosphate
bcl-2	Protéines anti-apoptotiques
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BHT	Butyl hydroxy toluene
BSA	Bovine Sérum Albumine
BSA	Sérum albumine bovine
Ca²⁺	ion calcium
Cap	Caspase
CAT	Catalase
CD	Cluster Déterminant
CDNB	1-chloro, 2,4-dinitrobenzène
CL₅₀	Concentration létal 50
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
-CN	radical cyanide
CO₂	Dioxyde de carbone
COMT	Cathecol-O-methyl transférase
COX	Cyclo-oxygénase
CPF	Chlorpyrifos
CPG	Chromatographie a phase gazeux
Cu	Cuivre
Cyt	Cytochrome
DA	Dopamine
DJA	Dose journalière admissible
DL50	Dose mortel 50
DLM	Deltamethrine
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DOPAL	dopamine quinone ou (3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde)
DTNB	Acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) ou réactif d'Ellman.
EDTA	Acide Ethylène-Diamine-Tétraacétique
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EOA	Espèces Oxygénées Activées

ABREVIATIONS

EPA	Agence de Protection de l'Environnement
ERN	Espèces Réactives de l'azote
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
ESM	Erreur standard sur la moyenne
FAD⁺	(FAD/FADH ₂) Flavine adénine dinucléotide oxydée / réduite
FAS	Fatty acid synthase
G6PDH	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
GMPc	Guanosine 3,5-monophosphate cyclique
GPx	Glutathion peroxydase
Grx	Glutarédoxine
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydée
GST	Glutathion-S-transférase
H	hydrogène
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
H₃₀₂	Substance nocif en cas d'ingestion
HAPs	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HDL	High density lipoproteins (lipoprotéines de haute densité)
HE	Hématoxyline éosine
Hip	Hippocampe
HO	Hème Oxygénase
HPLC	Chromatographie liquide a haute performance
Hsp	Heat shock protein
i.p.	Intra péritonéale (piqûre intra péritonéale)
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IMF	Intensité Moyenne de Fluorescence
INF	Interféron
Kg	Kilogramme
L[•]	Radical libre lipidique
LB	Lymphocyte B
LI	index d'apprentissage (learning index)
LOO[•]	Radical peroxyde d'acide gras
LOOH	Lipoperoxyde d'acide gras
LPO	Lipides Peroxydés
MA	Maladie d'Alzheimer
MAO	monoamines oxydases
MAC	mitochondrial apoptosis-induced channel
MAPK	mitogen activated protein kinase
MBR	Récepteur mitochondrial aux benzodiazépines
MCA	Médecine Complémentaire et Alternatives
MDA	Acide Malon-dialdéhyde
mg	Milligramme
mmol	Milimole
MP	Maladie de parkinson
MPO	myéloperoxydase
mPT	perméabilité transitoire mitochondriale
NADPH	Nicotinamide-adéninedinucléotide-phosphate réduit.
NK	cellules tueuses naturelles
NO	Monoxyde d'azote
NOAEL	No observed adverse effect level
NOX-2	NADPH oxidase 2
O₂^{•-}	Radical superoxyde (anion superoxyde)

ABREVIATIONS

OH[•]	Radical hydroxyle
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OP	Insecticides organophosphorés
P53	Protéine suppresseur de tumeur
p.o.	per os
PAMP	Motif Moléculaire Associé à un Pathogène
PBS	(Phosphate Buffer Solution) Tampon phosphate
PCB	biphényles polychlorés
PCR	Réaction en Chaîne par Polymérase
Pi	Phosphate inorganique
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PON1	paraoxonase 1
POPs	Polluants organiques persistants
PTP	Pore de transition de perméabilité dépendant du calcium
Pro G	Protéine G
QR	Quercetine
RCB	Récepteur des Cellules B
RE	réticulum endoplasmique
RH	Radical libre oxygéné
RT-PCR	Réaction en Chaîne par Polymérase en Temps Réel
s.c.	piqure sous cutanée
Se	Sélénium
SN	Système nerveux
SNC	Système Nerveux Central
SNP	Système Nerveux Périphérique
SOD	Super oxyde-dusmitase
Str	striatum
T	Témoin
TBA	L'acide thiobarbiturique
TCA	Trichloroacétique.
TCP	trichloro)pyridinol
Th	Lymphocyte T helper
TMB	3,3', 5,5' Tetraméthylbenzidine
TNF	Facteur Transformant de nécrose
TRIAD	Facteur de mort cellulaire atypique
UI	Unité international
Ub	Ubiquinone
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
Xn	Substance nocif
XO	xanthine oxydase
PIP2	<i>Phosphatidylinositol biphosphate</i>
IP3	inositol triphosphate
PLC:	Phospholipase C
PKC	Protéine kinase C
DAG	Diacylglycérol
P	Phosphate
RhoGDI	Protéine G Rho Dissociaton Inhibitor
GTP	Guanosine triphosphate
GDP	Guanosine diphosphate

Remerciements

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé au sein du Laboratoire de Toxicologie, Département de biologie, Université de Jénessa

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 Jénessa, 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 profite de l'occasion qui m'est offerte pour adresser mes remerciements aussi au mon Co-encadreur **M. Kebieche M**, professeur à l'université de Jijel, pour sa disponibilité et son souci constant afin que cette thèse se passe dans les meilleures conditions possible. 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.

Je vous prie de croire en ma profonde reconnaissance et l'expression de mon profond respect Je tiens à remercier vivement **M. Arab K**, professeur à l'université de Boumerdes, 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 **M. Djabri B**, professeur à l'université de Jénessa, 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 **Mm. Yahiaoui K** professeur 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 **Mm. Boussekine S** maître de conférences à l'université de Jénessa, pour ces encouragements et ces nombreux conseils, et pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

Nous tenons à remercions le chef de département et tous les enseignants de biologie, en particulier :

A Monsieur : Menaceur F, Soltani N, Akroum A, Goudjil T, Djeddi C, Tine S, Lakhel A, Mesli L, Boukoucha M, Djeddi MS, Slimani M, Khalel M, Selami S, Mihji A, Djeddi H, Djeddi J, Draïfia A, Elhamza O, Rouane AR, Hadje M, Chihabe M, Fares ND, Djabari F, Melki J. Bouzida A, Mebarkia M. Azez Kh et Z.

A Madame : Hamel M, Boukazoula F, Bouadila S, Djaleb S, Mehaline S, Ben Amara A, Tine F, Rouachdia R, Benarfa N, Zghib A. Kabout N, Ziani S, Toumi N, Sbiki H, Sbiki M, Bouchrite, Bouguessa L, Aoune S.

A mon équipe : Ben-aïcha B, Touahria C, Maalem H. Saker H, Mechri H, Amroune S, Benkhdir K et son père Taber., Dhifallah A, Turchane M, Taib C, chnikher H, Toualbia N, Salmi A, Slimi Y, Hafi S, Lazreg M, Nsib L, Lailmi S, Aounallah S, Maaïouf N, et l'équipe d'Elzarche :Tabar, Ammar, Elhadidi et Salah Gasmî.

A tous mes collègues et amis du l'Université de Jijel, en particulier : **M^{elle} Lahouel A, M. Djetni AD, M. Edoui H, Benaziza H, M^{elle} Chouite Z, Mm. Beghoule A.**

A tous mes collègues et enseignants du l'Université de El-Oued, en particulier : **M. Khalef Y, Mm. Aouimer M.**

A tous mes collègues et amis du l'Université de Jénessa, de Sidi Bel-Abbes, de Tlemcen, d'Annaba, d'Oran, de Tunis et de les autres universités, je les remercie pour l'ambiance chaleureuse et conviviale et pour l'aide qu'ils m'ont apportés dans le cadre de ce travail.

A tous les techniciens des laboratoires, les agents de sécurité, de ménage et l'équipe administrative du l'Université de Jénessa

Nos sentiments de reconnaissance et de remerciements vont également à toute personne qui a participé de près ou de loin directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.



بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

تم إنجاز هذا العمل بنوفيق من الله عز وجل له الحمد على كل شيء، حيث في ظلمة كالليل بينما كنت أسير في هذا الطريق أرى بصيص من الأمل يشع نحو الأفق يقترب مني كلما ابتعدت وتخفزني على مواصلة الدرب كلما تتأملت، كما أنه تبجلي الصعاب عن طريقي كلما طغت.

خلال فترة الدراسة كان الأساتذة من أقراب الأساتذة لي، كانوا مختلفان جدا عن البقية حيث شاركاني خبرتهم وآرائهم في جميع الشؤون إضافة إلى المكتب، الحاسوب والسيارة الشخصية لكل منهم، لم تكن أيام العطل أو الأوقات المتأخرة مساءً التي أحدهما عن ذلك، كما أنه لم يكن ممكنا الوصول لهذا الكم من النتائج لولا تشجيعهما الدائم حيث كانا ناصحين ومعلمين كما أن النحدي والعزم والنشجع أبرز مميزاتهم، الأساتذة كيش إضافة إلى أنه كان يستقبلني في بيته العائلي كل لقاء بيجل كان يحرص على أن يكون هذا العمل مميزا جدا ... هذا اللطف وكرمكمما أساتذاتي الفاضلين. شكرا جزيلًا لكما.

في الجامعة كنت التقي أحيانا مع الأساتذة فوجد الطاهر حيث ينهني ويوصيني على أن أكون أكثر اجتهادا لأفوز بأول الرتب ... تحياتي لك سيدي. الأساتذة بوسكين سميرة إضافة إلى التسهيلات التي أتاحتها لنا للدخول بمحور علم النسم أو إدخال معدات بعض التجارب لتسريع البيولوجيا لم تكن لنسمح لا تشغالاتها الإدارية أن تصدها عن تشجيعي الدائم وحنها المتواصل لي على الثوق.

على امتداد مدة هذا العمل كانت الأساتذة جلاب سهام بمثابة الامر الحنون التي لم تبخل علينا بأي طلب تقدمنا به إليها ... شكرا جزيلًا أساتذة

في الجامعة أو محيطها كانت الأوقات تمر على نحو أفضل عندما أكون مع أصدقائي المميزين حيث كنت أحس معهم أنني سعيد ومثوق

أصدقائي الذين أحس معهم أنني كل شيء أندر كل شيء أيضا

بعد كل فترة من الغياب كنت أراجع إلى البيت فقط لرؤية والدتي التي تسترجع أفاسي وتجعل عزمي فقط بانسائها.

قاسمي سليم

يناير 2017

الى تلك الوردية التي تجدد أنفاسي وتثبت مركائزي ... الى أمي العزيزة

الى ذلك الجبل الذي يعيش من أجل أن أبقى شامخا ... الى أبي الغالي

الى ذلك السند الدائم ... الى الشفري

الى ... عز الدين مرخي وجعفر عبد القادر

أهدي هذا العمل

Liste des Abréviations

μmol	Micromoles
½ O₂	Oxygène singulet
3-PBA	d'acide 3-phénoxybenzoïque
4-HNE	4-hydroxy-2-nonénal
5-HT	5-hydroxytryptamine ou sérotonine
AC	Acetamipride
ACh	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADN mt	Acide Désoxy riboNucléique mitochondrial
ADP	Adénosine diphosphate
AG	Acide gras
Akt	protéines de survie de tumeur voie mitochondrial
AIF	apoptosis inducing factor
ANOVA	Analyse de variance
ARLA	L'Agence canadienne pour la régulation de la lutte antiparasitaire
ARN	Acide Ribonucléique
ATP	Adenosine triphosphate
bcl-2	Protéines anti-apoptotiques
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BHT	Butyl hydroxy toluene
BSA	Bovine Sérum Albumine
BSA	Sérum albumine bovine
Ca²⁺	ion calcium
Cap	Caspase
CAT	Catalase
CD	Cluster Déterminant
CDNB	1-chloro, 2,4-dinitrobenzène
CL₅₀	Concentration létal 50
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
-CN	radical cyanide
CO₂	Dioxyde de carbone
COMT	Catechol-O-methyl transférase
COX	Cyclo-oxygénase
CPF	Chlorpyrifos
CPG	Chromatographie a phase gazeux
Cu	Cuivre
Cyt	Cytochrome
DA	Dopamine
DJA	Dose journalière admissible
DL50	Dose mortel 50
DLM	Deltamethrine
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DOPAL	dopamine quinone ou (3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde)
DTNB	Acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) ou réactif d'Ellman.
EDTA	Acide Ethylène-Diamine-Tétraacétique
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EOA	Espèces Oxygénées Activées

ABREVIATIONS

EPA	Agence de Protection de l'Environnement
ERN	Espèces Réactives de l'azote
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
ESM	Erreur standard sur la moyenne
FAD⁺	(FAD/FADH ₂) Flavine adénine dinucléotide oxydée / réduite
FAS	Fatty acid synthase
G6PDH	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
GMPc	Guanosine 3,5-monophosphate cyclique
GPx	Glutathion peroxydase
Grx	Glutarédoxine
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydée
GST	Glutathion-S-transférase
H	hydrogène
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
H₃₀₂	Substance nocif en cas d'ingestion
HAPs	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HDL	High density lipoproteins (lipoprotéines de haute densité)
HE	Hématoxyline éosine
Hip	Hippocampe
HO	Hème Oxygénase
HPLC	Chromatographie liquide a haute performance
Hsp	Heat shock protein
i.p.	Intra péritonéale (piqûre intra péritonéale)
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IMF	Intensité Moyenne de Fluorescence
INF	Interféron
Kg	Kilogramme
L[•]	Radical libre lipidique
LB	Lymphocyte B
LI	index d'apprentissage (learning index)
LOO[•]	Radical peroxyde d'acide gras
LOOH	Lipopéroxyde d'acide gras
LPO	Lipides Peroxydés
MA	Maladie d'Alzheimer
MAO	monoamines oxydases
MAC	mitochondrial apoptosis-induced channel
MAPK	mitogen activated protein kinase
MBR	Récepteur mitochondrial aux benzodiazépines
MCA	Médecine Complémentaire et Alternatives
MDA	Acide Malon-dialdéhyde
mg	Milligramme
mmol	Milimole
MP	Maladie de parkinson
MPO	myéloperoxydase
mPT	perméabilité transitoire mitochondriale
NADPH	Nicotinamide-adéninedinucléotide-phosphate réduit.
NK	cellules tueuses naturelles
NO	Monoxyde d'azote
NOAEL	No observed adverse effect level
NOX-2	NADPH oxidase 2
O₂^{•-}	Radical superoxyde (anion superoxyde)

ABREVIATIONS

OH[•]	Radical hydroxyle
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OP	Insecticides organophosphorés
P53	Protéine suppresseur de tumeur
p.o.	per os
PAMP	Motif Moléculaire Associé à un Pathogène
PBS	(Phosphate Buffer Solution) Tampon phosphate
PCB	biphényles polychlorés
PCR	Réaction en Chaîne par Polymérase
Pi	Phosphate inorganique
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PON1	paraoxonase 1
POPs	Polluants organiques persistants
PTP	Pore de transition de perméabilité dépendant du calcium
Pro G	Protéine G
QR	Quercetine
RCB	Récepteur des Cellules B
RE	réticulum endoplasmique
RH	Radical libre oxygéné
RT-PCR	Réaction en Chaîne par Polymérase en Temps Réel
s.c.	piqure sous cutanée
Se	Sélénium
SN	Système nerveux
SNC	Système Nerveux Central
SNP	Système Nerveux Périphérique
SOD	Super oxyde-dusmitase
Str	striatum
T	Témoin
TBA	L'acide thiobarbiturique
TCA	Trichloroacétique.
TCP	trichloro)pyridinol
Th	Lymphocyte T helper
TMB	3,3', 5,5' Tetraméthylbenzidine
TNF	Facteur Transformant de nécrose
TRIAD	Facteur de mort cellulaire atypique
UI	Unité international
Ub	Ubiquinone
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
Xn	Substance nocif
XO	xanthine oxydase
PIP2	<i>Phosphatidylinositol biphosphate</i>
IP3	inositol triphosphate
PLC:	Phospholipase C
PKC	Protéine kinase C
DAG	Diacylglycérol
P	Phosphate
RhoGDI	Protéine G Rho Dissociaton Inhibitor
GTP	Guanosine triphosphate
GDP	Guanosine diphosphate

Liste des figures

Figure N°	Titre de figure	Page N°
01	Modes d'exposition des organismes vivant aux pesticides	08
02	Exemples des insecticides appartenant aux types I et II des pyréthriinoïdes	09
03	Les voies de métabolisation de la Deltaméthrine chez les mammifères	11
04	Voie de métabolisme de l'acetamipride chez l'abeille	15
05	Structure d'un neurone	19
06	Structures et formes des cellules gliales	20
07	Mode de transmission des signaux nerveux	21
08	Variation du potentiel électrique du cytoplasme d'un axone	21
09	Illustration de la progression de l'influx nerveux	22
10	Mécanisme de la transmission synaptique de l'influx nerveux	23
11	Mécanisme de la perméabilité membranaire mitochondriale par le PTP	29
12	Les cibles principales des pesticides	30
13	Sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire	33
14	Cascade d'activation de Nox2 et formation d'anion superoxyde	34
15	Chaine de réactions lors de l'oxydation de l'hypoxanthine en acide urique	35
16	La voie principale de la production de NO à partir de L-Arg	35
17	Les principaux producteurs des ROS et le système antioxydant dans les neurones	38
18	Structure de la QR leurs caractéristiques	42
19	Schématisation des modes d'action de quercetine sur la signalisation par TRA1L	43
20	Schéma récapitulatif du protocole expérimental	48
21	Les instruments du test de Piscine de Morris	50
22	Les instruments du test d'open Field	51
23	Les instruments de labyrinthe classique	52
24	Les instruments de test de sucrose	53
25	Evolution du poids corporelle chez les rats traités	63
26	Evolution du gain de poids corporelle chez les rats traités	64
27	Evolution du poids relatif du cerveau chez les rats traités	65
28	Variation de la respiration mitochondrial dans le cerveau total chez les rats traités	76
29	Variation de la respiration mitochondrial dans l'hippocampe chez les rats traités	77
30	Variation de la respiration mitochondrial dans le striatum chez les rats traités	78
31	Variation de gonflement mitochondrial des cellules de cerveau chez les rats traités	78
32	Variation de gonflement mitochondrial dans l'hippocampe chez les rats traités	79
33	Variation de gonflement mitochondrial le striatum chez les rats traités	79
34	Variation de perméabilité mitochondrial dans le cerveau total chez les rats traités	80
35	Variation de perméabilité mitochondrial dans l'hippocampe chez les rats traités	81
36	Variation de perméabilité mitochondrial dans le striatum chez les rats traités	81
37	Variation d'activité de Caspase 3 dans le cerveau chez les rats traités.	82
38	Variation d'activité de Caspase 3 dans l'hippocampe chez les rats traités.	83
39	Variation d'activité de Caspase 3 cérébral dans le striatum chez les rats traités.	83
40	Variation de cytochrome c dans le cerveau global chez les rats traités.	84
41	Variation de cytochrome-c cérébral dans l'hippocampe chez les rats traités.	85
42	Variation de cytochrome c cérébral dans le striatum chez les rats traités.	85
43	Variation des données de test Labyrinthe Classique chez les rats traités.	92
44	Variation des données du test Open Field chez les rats traités.	93
45	Variation des paramètres du test de piscine de Morris chez les rats traités.	94
46	Variation du test de préférence au sucrose chez les rats traités.	95
47	Coupes histologiques du cerveau total montrant l'hippocampe chez les rats traités.	96
48	Coupes histologiques du cerveau total montrant le striatum chez les rats traités.	97
49	Coupes histologiques régionaux montrant l'hippocampe chez les rats traités.	98
50	Coupes histologiques régionaux montrant le striatum chez les rats traités.	99
51	Hypothèse	116
A	Annexe : Courbe d'étalonnage pour dosage des glucides	134
B	Annexe : Courbe d'étalonnage pour dosage des lipides	134
C	Annexe : Courbe d'étalonnage pour dosage des protéines	135

Liste des tableaux

Tableau N°	Titre de tableau	page N°
01	Principales propriétés physico-chimiques et toxicologiques de la DM	10
02	Principales caractéristiques de l'Acetamipride	13
03	Principales caractéristiques de la quercetine	41
04	Teneur en équivalent Quercetine de quelques fruits et légumes	42
05	Variation mitochondrial des Protéines, glucides et des lipides dans le cerveau total, l'hippocampe et le striatum chez les rats traités	68
06	Variation Cytosolique de GSH, MDA, GPx, GST, SOD et CAT dans le cerveau chez les rats traités	70
07	Variation mitochondrial de de GSH, MDA, GPx, GST, SOD et CAT dans le cerveau chez les rats	75
08	Variation cervical de Gonflement, Respiration et Perméabilité mitochondrial, et l'activité de caspase3 et cytochrome c dans le cerveau total, l'hippocampe et le striatum chez les rats traités.	86
09	Variation cervical de Dopamine, Sérotonine, Adrénaline, Glutamate et d'activité d'AchE dans le cerveau total, l'hippocampe et le striatum chez les rats traités	90
A	Annexe : Réalisation de la courbe d'étalonnage pour dosage des glucides	134
B	Annexe : Réalisation de la courbe d'étalonnage pour dosage des lipides	134
C	Annexe : Réalisation de la courbe d'étalonnage pour dosage des protéines	135

Sommaire

Introduction	1
---------------------------	---

Partie bibliographique

Chapitre I : Pesticides

1. Généralités sur les pesticides.....	6
1.1. Définition.....	6
1.2. Classification des pesticides.....	6
1.2.1. Selon leur cible.....	6
1.2.2. Selon leur structure chimique.....	6
1.2.3. Selon leur persistance dans l'environnement	7
1.3. Devenir des pesticides dans l'environnement	7
1.4. Modes d'expositions aux pesticides	8
2. Les pyréthri-noïdes.....	8
2.1. Généralités.....	8
2.2. Classification.....	9
2.3. Exemple sur les pyréthri-noïdes : La Deltamethrine	9
2.3.1. Propriétés	9
2.3.2. Toxicocinétique de deltamethrine.....	10
2.3.3. Toxicité de la deltamethrine.....	12
3. Néonicotinoïdes.....	12
3.1. Généralités.....	12
3.2. Classification.....	12
3.3. Exemple sur les Néonicotinoïdes : L'Acetamipride.....	13
3.3.1. Propriétés	13
3.3.2. Toxicocinétique de l'acetamipride	13
3.3.3. Toxicité de l'acetamipride.....	15

Chapitre II : Neurotoxicité

1. Généralités sur neurotoxicité	18
1.1. Le cerveau	18
1.1.1. Histologie du cerveau	18
1.1.2. Physiologie du cerveau.....	19
2. Fonctionnement du système nerveux	20
2.1. Le flux nerveux et l'intégration synaptique.....	20
2.2. Les neurotransmetteurs.....	22
3. Majeurs pathologies neuronales	25
4. Intégration des neurotransmetteurs dans les fonctions cérébrales	25
4.1. Intégration dans la mémorisation	25
4.2. Intégration dans l'apprentissage	26
4.3. Intégration dans la conscience.....	27
4.4. Intégration dans l'anxiété.....	27
5. Intégration de la mitochondrie dans la fonction neuro-énergétique.....	27
5.1. Mécanisme de la perméabilisation membranaire mitochondriale	28
5.2. Perméabilité mitochondriale transitoire et maladies neurodégénératives.....	28

6.	Neurotoxicité des pesticides	30
6.1.	Neurotoxicité d'acetamipride.....	30
6.2.	Neurotoxicité de deltamethrine	31

Chapitre III : stress oxydatif et antioxydants

1.	Généralités sur le stress oxydant	33
2.	Effets des radicaux libres sur l'organisme	36
2.1.	Peroxydation lipidique.....	36
2.2.	Oxydation des protéines.....	36
2.3.	Oxydation de l'ADN.....	36
3.	Antioxydants.....	36
3.1.	Système antioxydant enzymatique.....	36
3.1.1.	Superoxyde dismutase (SOD)	36
3.1.2.	Glutathion peroxydase (GPx)	37
3.1.3.	Catalase (CAT)	37
3.2.	Système antioxydant non enzymatique	37
3.2.1.	Glutathion (GSH)	37
3.2.2.	Vitamines	37
3.2.3.	Oligoéléments.....	38
3.2.4.	Ubiquinones et cytochrome c.....	39
3.2.5.	Polyphénols.....	39

Chapitre IV : Quercétine

1.	Généralité sur la quercétine	41
2.	Propriétés de la quercétine.....	41
3.	Classification et sources de quercétine.....	41
4.	Mode d'action de la quercétine.....	42
5.	Toxicité de la quercétine	44
6.	Impact bénéfique quercétine sur l'organisme	44

Partie pratique

1.	Matériel et méthodes.....	46
1.1.	Matériel	46
1.1.1.	Produits chimiques.....	46
1.1.2.	Les animaux de laboratoire	46
1.2.	Méthodologie.....	46
1.2.1.	Entretien des animaux.....	46
1.2.2.	Choix des doses.....	46
1.2.3.	Répartition et traitement des rats.....	47
1.2.4.	Evaluation de la neurotoxicité des pesticides et effet préventif de la quercétine.....	49
2.	Résultats.....	63
2.1.	Effets des pesticides et la quercétine sur les paramètres de la croissance globale	63
2.1.1.	Poids corporel	63
2.1.2.	Gain de poids (GP).....	64
2.1.3.	Poids relatif du cerveau (PRc)	64
2.2.	Effets des pesticides et la quercétine sur les paramètres biochimiques et statut redox....	65
2.2.1.	Effets des pesticides et la quercétine sur les paramètres biochimiques mito.....	65
2.2.2.	Effets des pesticides et la quercétine sur le statut redox dans le cerveau	69

2.3.	Effets des pesticides et la quercétine sur les paramètres mitochondriaux de cerveau ...	76
2.3.1.	Effet des pesticides et la quercétine sur la respiration mitochondriale.....	76
2.3.2.	Effet des pesticides et la quercétine sur le gonflement mitochondrial.....	77
2.3.3.	Effet des pesticides et la quercétine sur la perméabilité mitochondriale.....	80
2.3.4.	Effets pro-apoptotique des pesticides et la quercétine dans le cerveau	82
2.4.	Effets des pesticides et de la quercétine sur les neurotransmetteurs	87
2.4.1.	Dopamine	87
2.4.2.	Adrénaline.....	87
2.4.3.	Sérotonine	88
2.4.4.	Glutamate	88
2.4.5.	Acétylcholine estérase.....	89
2.5.	Effets des pesticides et la quercétine sur le neurocomportemental chez le rat	91
2.5.1.	Test de labyrinthe classique.....	91
2.5.2.	Test de «Open field ».....	91
2.5.3.	Test de la Piscine de Morris.....	91
2.5.4.	Test de préférence au sucrose.....	92
2.6.	Effets des pesticides et de la quercétine sur l'histologie du cerveau	94
2.6.1.	Histologie du cerveau total (Topographie du cerveau)	94
2.6.2.	Histologie de l'hippocampe et le striatum	95
3.	Discussion	100
3.1.	Effets des pesticides et la quercétine sur les paramètres de la croissance globale.....	100
3.2.	Effets des pesticides et la quercétine sur les paramètres biochimiques	101
3.3.	Effets des pesticides et la quercétine sur l'intégrité des mitochondries	102
3.4.	Effets des pesticides et la quercétine sur le statut redox.....	103
3.5.	Effets des pesticides et la quercétine sur la voie de la signalisation apoptotique.....	105
3.6.	Effets des pesticides et la quercétine sur la neurotransmission cérébrale	107
3.7.	Effets des pesticides et la quercétine sur le neuro-comportement des animaux.....	108
3.8.	Effets des pesticides et la quercétine sur la topographie et l'histologie cérébrale	110
	Conclusion et perspectives	113
	Hypothèse	116
	References	118
	Annexes	134

Introduction

INTRODUCTION

Au cours des deux dernières décennies, la révolution industrielle et le développement technologique dans le domaine de l'agriculture a considérablement compliqué les problèmes de l'environnement (**Andra et al., 2017**). 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 (**El-Hassani et al., 2008 ; Stoytcheva, 2011**). Parallèlement, il y a eu un progrès considérable de la recherche en toxicologie environnementale ayant abouti à définir avec succès une panoplie de substances susceptibles d'occasionner les risques toxiques sur l'organisme vivant et la santé publique tels que les pesticides, les hydrocarbures polycycliques, ... (**Hatcher et al., 2008 ; Cavas et al., 2014**). Selon des travaux de recherche ultérieurs, la contamination par les pesticides, même à petites doses, induit notamment avec le temps, des effets néfastes sur la santé des populations, soit par une exposition directe à ces polluants, soit indirectement via les matrices alimentaires (**Mnif et al., 2011; Bonvallot, 2014**), sachant que seule une petite partie des doses des pesticides utilisées atteint la cible (<1%), tandis que la majeure partie (plus de 99%) est répartie dans l'environnement (**Drire, 2003 ; Wilson, 2010**).

Après les dégâts environnementaux de 1970 provoqués par quelques groupes de pesticides ; trois grandes familles d'insecticides ont dominé le marché : les organophosphorés, les organochlorés, les carbamates (**Meyer, 1999 ; Wauchope et al., 2002**). Néanmoins, la résistance aux ravageurs a limité leur utilisation ce qui a poussé les fabricants à se retourner vers la synthèse chimique de nouveaux groupes de pesticides qui seraient plus efficaces et moins toxiques pour l'environnement et les mammifères. En effet, ce passage a donné naissance à une nouvelle gamme comportant des pyréthrinoïdes et des néonicotinoïdes présentant une forte efficacité pesticide et une faible toxicité pour l'environnement (**Wozniak et al., 1990 ; Masoumi, 2009**). Les pyréthrinoïdes sont les analogues synthétiques des pyréthrines, qui sont des substances naturelles présentes dans les fleurs des plantes (**Grojean, 2002**). L'un de ces pyréthrinoïdes est la deltaméthrine (DM), qui est un composé fortement lipophile utilisé comme insecticide dont les canaux sodiques sont les principales cibles (**Rodríguez et al., 2016**). On note également l'arrivée d'un nouveau membre de la génération d'insecticides appartenant à la famille des néonicotinoïdes en l'occurrence l'acetamipride (AC) (**Chakroun et al., 2016 ;**

EFSA, 2013). En fait, ce néonicotinoïde est considéré comme ayant une excellente activité contre les insectes susceptible de provoquer des effets agonistes en se liant aux récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (RnAch), entraînant ainsi une excitation, une paralysie anormale et la mort d'organismes nuisibles (**Fernandez et al., 2002 ; Tian et al., 2016**). En Algérie, les deux types d'insecticides sont largement utilisés avec des précautions moindres tant dans le domaine de l'agriculture qu'à l'usage domestique, ce qui augmente leurs risques toxiques à long terme même s'ils sont exposés à de faibles doses (**Beghouel et al., 2017 ; Chakroun et al., 2016**). Néanmoins, les quelques études sur ce sujet réalisés avant n'ont pas permis de mieux comprendre la relation entre les néonicotinoïdes par exemple et l'étiologie de certaines maladies telles que les maladies métaboliques et neurodégénératives, le dysfonctionnement reproductif, les altérations neuro-développementales et le cancer, qui constituent à présent un danger pour la santé publique dans le monde et surtout dans les pays en développement (**Baldi et al., 2012**). De nombreuses études antérieures ont montré que les pesticides sont toxiques pour l'organisme animal tant en exposition aigue qu'en chronique à de faibles doses, en provoquant une neurodégénérescence des cellules du cerveau, le dysfonctionnement de l'activité locomotive, l'apprentissage et la fonction de mémorisation (**El Hassani et al., 2008**). Cette étiologie est assurée par l'accumulation de ces substances toxiques, souvent lipophiles, dans les fractions lipidiques de l'organisme notamment le cerveau qui est considéré comme étant un organe riche en lipide. En effet, le cerveau est le plus grand consommateur d'énergie d'où la production intense des radicaux libres. Cette évidence explique l'importance du cerveau dans le corps, mais aussi sa sensibilité aux xénobiotiques qui affectent globalement les enzymes mitochondriales, les enzymes de détoxification, les neurotransmetteurs ou encore induisent la voie de signalisation apoptotique, la nécrose cellulaire dans le cerveau (**Bruder et al., 2011**). D'autres études ont ajouté à notre connaissance une affirmation plus poussée concernant l'implication de la deltaméthrine et de l'acetamipride dans l'induction de différentes lésions cérébrales (**Shi et al., 2010; Shi et al., 2011**). Néanmoins, la documentation consultée dans cette étude n'a pas rapporté suffisamment d'informations sur les mécanismes d'action par lesquels l'acetamipride ou la deltaméthrine, seuls ou en mixture, altèrent l'intégrité structurale et fonctionnelle des cellules cérébrales chez l'organisme animal, en particulier après une exposition à long terme à des doses réalistes. Cette carence scientifique nous a imposé la légitimité et le devoir scientifique de bien cerner les aspects mécanistiques des effets neurotoxiques et étiologiques de ces pesticides et de proposer par occasion des essais préventifs contre cette toxicité en utilisant la quercétine. Ce composé phénolique est reconnu pour son activité antioxydante,

capable d'éliminer des radicaux libres susceptibles d'être un facteur étiologique pour les maladies neurodégénératives (**Abdel-Daim et al., 2016, Lakroun et al., 2015 ; Beghoul et al., 2017**).

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 d'approches, tant biochimiques et histologiques que neurocomportementales, seront appliquées conformément aux orientations de la biochimie moléculaire, de la signalisation cellulaire et de la biologie neurocomportementale, en commençant par les aspects oxydo-réductifs cellulaires et leurs implications sur l'intégrité structurales et moléculaire des cellules du cerveau total ou régional (striatum et hippocampe). On terminera cette étude par l'examen de l'impact de telles lésions neuronales sur le neuro-développement de l'organisme animal et l'évaluation des effets préventifs de la quercétine contre les effets délétères de ces pesticides.

Partie

Bibliographique

Chapitre 1 : Pesticides

1. Généralités sur les pesticides

1.1. Définition

Le terme "pesticide" est une appellation générique couvrant toutes substances ou produits utilisés dans l'agriculture et dans d'autres secteurs pour combattre les prédateurs des cultures, des produits agricoles ou encore pour protéger les espaces publics contre les insectes, les végétaux, les animaux ou les microorganismes nuisibles (**Stachowski-Haberkorn, 2008 ; ACTA, 2005**). La diffusion de ces composés chimiques dans l'environnement par contamination de l'air, le sol, l'eau et les produits alimentaires provoque l'exposition continue des organismes vivants d'une manière tant aiguë que chronique à des risques de toxicité susceptible d'engendrer des diverses pathologies (**Toumi, 2013 ; Pandey & Mohanty, 2015**).

1.2. Classification des pesticides

Les pesticides peuvent être regroupés de manière différente selon l'aspect sous lequel ils sont étudiés. Ils peuvent être classés en fonction de leur cible, de leur structure chimique, de leur persistance dans la nature, de leur mode ou mécanisme d'action (**Guler et al., 2010 ; Djefal, 2014**). La classification reposant sur le mécanisme d'action présente un intérêt moindre car des pesticides de structures chimiques différentes peuvent avoir des mécanismes d'action similaires ; c'est le cas par exemple des organophosphorés et des carbamates (**Guler et al., 2010 ; Mohajeri et al., 2011**). De plus, le mécanisme d'action de certains pesticides n'est pas complètement élucidé (**Testud et Grillet, 2007**). Donc, il y a beaucoup des critères de classement pour les pesticides, parmi ces critères nous citons les suivants :

1.2.1. Selon leur cible

D'après leur cible, les pesticides sont divisés en herbicides désignés pour tuer les mauvaises herbes ; en insecticides pour combattre les insectes ; en fongicides qui luttent contre les champignons ; en acaricides pour tuer les acariens ; en hélicides ou molluscicides pour éradiquer les nématocères ; en rodenticides ou raticides pour combattre les rongeurs vertébrés (**Guler et al., 2010 ; Toumi, 2013 ; Utip et al., 2013**).

1.2.2. Selon leur structure chimique

D'après la nature chimique de la substance active, les pesticides peuvent être des organochlorés, organophosphorés, organostaniques, carbamates, benzimidazoles, triazoles, pyréthriinoïdes de synthèse, néonicotinoïdes, pyrimidines et autres (**Testud et Grillet, 2007 ; Guler et al., 2010**).

1.2.3. Selon leur persistance dans l'environnement

Les pesticides sont classés en deux types principaux :

- *Les pesticides conservatifs (persistants)* : qui ne sont pas éliminés du milieu, qu'ils soient dissous dans l'eau ou fixes sur le matériel particulaire. Ce sont des pesticides organiques non biodégradables (**Belhaouchet, 2014**). La classification de Polluants Organiques Persistants (*POPs*) regroupe tous ces polluants conservatifs tels que les HAPs, PCBs, dioxines, furans, dieldrine, chlordane, DDT, HCH, HCB, lindane, endrine, aldrine, Mirex, toxaphene, chlordeone, heptachlore. La production et l'utilisation de ces pesticides ne sont pas autorisées par plusieurs conventions internationales à cause de leur risques sur l'homme et l'environnement (**Ademe, 2004 ; Toumi, 2013 ; Utip et al., 2013**).
- *Les pesticides non conservatifs (non persistants)* : qui à terme, disparaissent dans peu de temps à cause de leur biodégradabilité rapide tels que certains OP, pyréthriinoïdes, néonicotinoïdes et biopesticides (**Belhaouchet, 2014**).

1.3. Devenir des pesticides dans l'environnement

Malgré un souci croissant de protection de l'environnement, lors de l'utilisation des pesticides, une certaine quantité de ces substances se retrouve dans l'environnement (**Pimentel, 1995 ; Arias-Estévez et al., 2008**). Les voies de dispersion et de transfert de pesticides sont nombreuses. Les gouttelettes de ces produits peuvent atteindre directement le sol sans être stoppées par le feuillage, ou alors indirectement, lorsque la pluie va lessiver les gouttelettes, non encore absorbées par les feuilles (**Belhaouchet, 2014**). Les pesticides peuvent être entraînés par dérive loin des zones de culture visées ou être directement volatilisés vers l'atmosphère lors de leur pulvérisation (**Toumi, 2013**). La ré-volatilisation à partir du sol et des végétaux joue également un rôle important dans la contamination de l'air. Enfin, le lessivage et le ruissellement, lors des précipitations, vont entraîner la contamination des eaux de surface et souterraines (**Druart, 2011 ; INERIS, 2005**). La présence de polluants constitue un stress induisant des modifications au niveau physiologique et métabolique dans l'organisme (**Timbrell, 1994**), ce dernier peut réagir par des réponses mécanistiques limitant les effets toxiques des contaminants en protégeant les cellules et en facilitant leur excrétion. Bien que les mécanismes de défense cellulaire soient actuellement mieux connus, il est cependant nécessaire de les approfondir en raison notamment des interactions existant entre les xénobiotiques présents simultanément dans le même milieu (**Testud et Grillet, 2007 ; Guler et al., 2010**).

1.4. Modes d'expositions aux pesticides

Les pesticides sont utilisés, non seulement dans l'agriculture, mais aussi dans divers secteurs (industries, collectivités territoriales) ainsi qu'en usage domestique et vétérinaire. Des problèmes de résidus dans les légumes, les fruits etc..., sont aussi mis en évidence (**Belhaouchet, 2014**). Les pesticides peuvent contaminer les organismes vivants via multiple voies d'exposition (*fig.01*). En effet, ces polluants pouvant pénétrer dans l'organisme par contact cutané, par ingestion des matrices alimentaires contaminées et encore par inhalation de l'air pollué (**Utip et al., 2013**). La grande variété de produits rend difficile l'évaluation des expositions chez les populations, qu'il s'agisse de la population exposée professionnellement (agriculteurs ou manipulateurs), ou de la population générale (**Bourbia, 2013**).

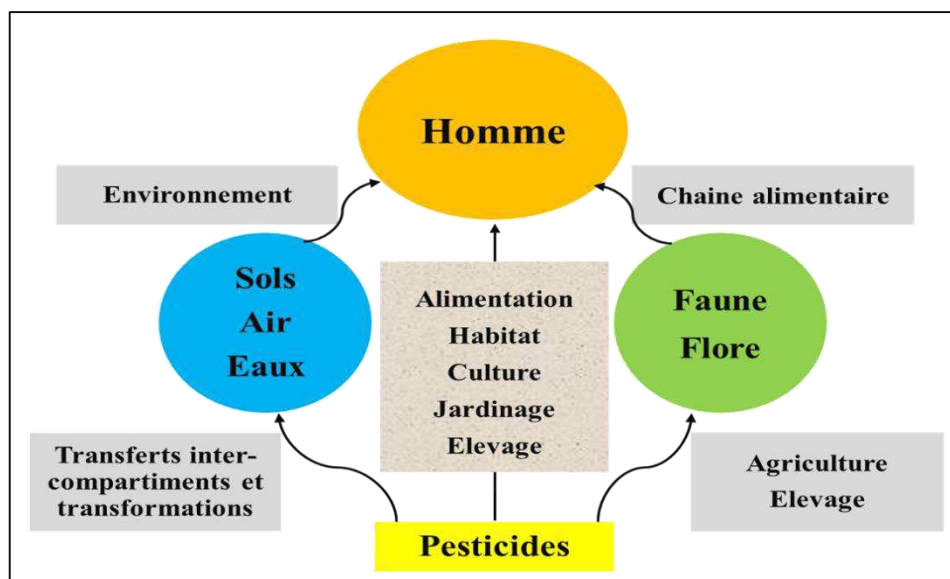


Figure 01. Modes d'exposition des organismes vivant aux pesticides (**Barriuso, 2004**).

2. Les pyréthrinoïdes

2.1. Généralités

Les pyréthrines sont connues depuis 2000 ans. En effet, la littérature chinoise mentionne l'utilisation d'insecticides d'origine végétale par les chinois depuis le 1^{er} siècle après Jésus Christ (**Testud et Grillet, 2007**). En 1973, la découverte d'une nouvelle série de pyréthrines synthétiques « les pyréthrinoïdes » doués d'une photostabilité sensiblement accrue et d'un large spectre d'efficacité permettant une utilisation agricole et même vétérinaire de ces pyréthrinoïdes (**Charreton, 2015**). Les Pyréthrinoïdes sont des insecticides utilisés pour lutter contre les parasites des grandes cultures (arachide, betterave, canne à sucre, céréales, pomme de terre, coton, mil) et contre les parasites des arbres fruitiers et les légumes (**Toumi, 2013**).

2.2. Classification

Les pyréthriinoïdes sont classés en deux catégories en fonction de la présence ou non d'un radical cyanide. Ainsi, les pyréthriinoïdes de type I (Alléthrine, Tétraméthrine,) sont dépourvus du radical cyanide alors que les pyréthriinoïdes de type II (Deltaméthrine, Cyperméthrine) portent le radical cyanide (*fig.02*) (Testud et Grillet, 2007). L'activité insecticide des pyréthriinoïdes dépend par ailleurs de la stéréochimie de la molécule. Ainsi les pyréthriinoïdes ayant une conformation en 1R ou 2S ont une activité insecticide alors que les pyréthriinoïdes en 1S ou 2R n'en ont pas. De même, les isomères cis sont en général plus toxiques que les isomères trans (Bradberry et al., 2005 ; Pyabalo Aklesso Kadala, 2015).

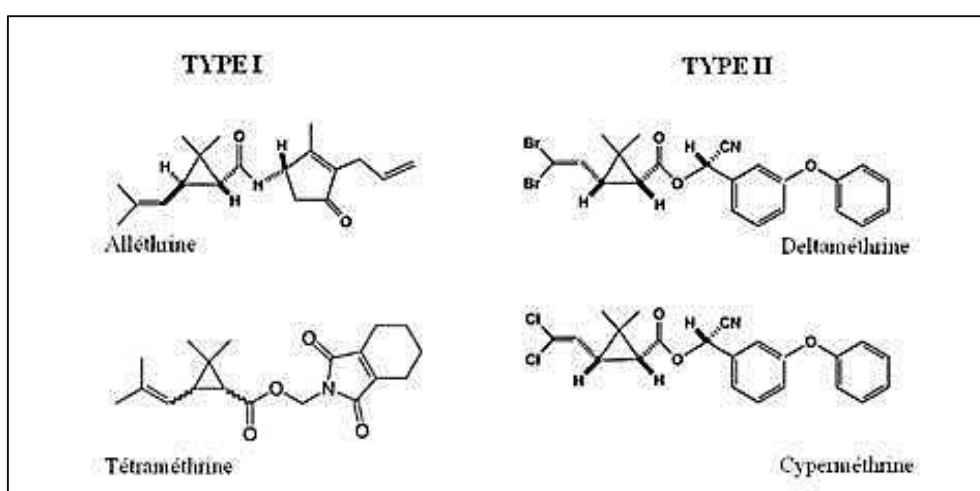


Figure 02. Exemples des insecticides appartenant aux types I et II des pyréthriinoïdes (Pyabalo Aklesso Kadala, 2015).

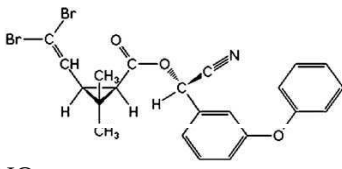
2.3. Exemple sur les pyréthriinoïdes : La Deltaméthrine

C'est un Pyréthriinoïde de synthèse de type II, mis au point en 1974 et est utilisé principalement comme insecticide et répulsif pour les insectes en raison de ses propriétés neurotoxiques. La deltaméthrine est un insecticide non systémique à action rapide par contact et ingestion (Guler et al., 2010 ; Utip et al., 2013 ; Shivanoor et David, 2014).

2.3.1. Propriétés

La deltaméthrine est caractérisée par les paramètres physicochimiques et toxicologiques résumés dans le tableau 01 ci après.

Tableau 01. Principales propriétés physico-chimiques et toxicologiques de la deltaméthrine (INRS, 2007 ; Toumi, 2013 ; Shivanoor et David, 2014)

Nom chimique	R-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-diméthyl-cyclopropane carboxylate de (S)- α -cyano-3-phénoxybenzyle
Structure chimique	
Formule chimique	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃
Masse molaire	505,20 g/mole
Point de fusion	90 °C
Solubilité dans l'eau	≤0.0002 mg/l à 25°C
Etat physique	Cristaux blancs
DL₅₀	130 mg/kg chez le rat
DJA	100 à 150µg/kg/j
Effets toxiques	Médiatement toxique (irritation, inflammation, ...)

2.3.2. Toxicocinétique de deltaméthrine

- Absorption

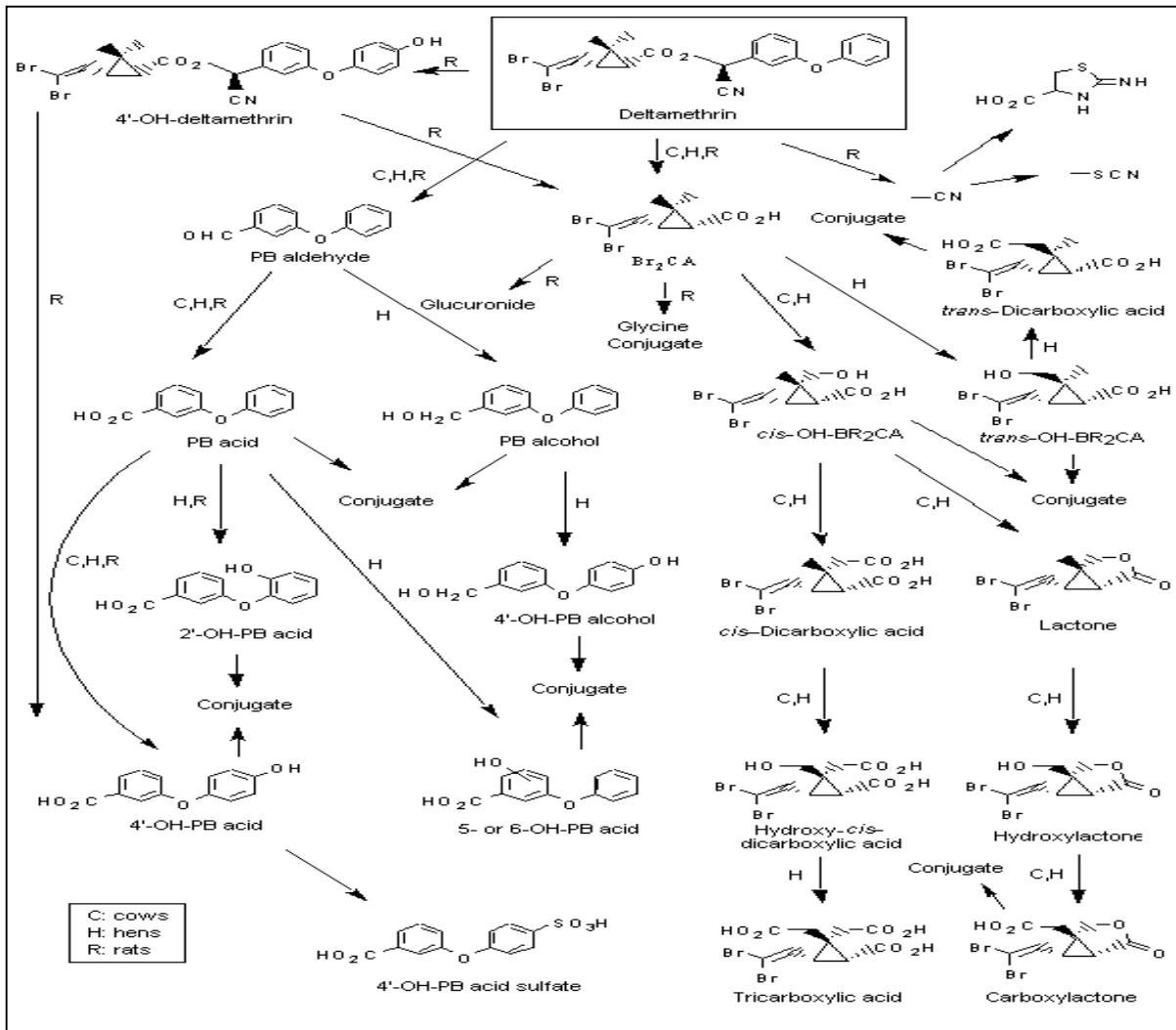
La deltaméthrine est une molécule lipophile, peu soluble dans l'eau, pouvant être absorbée principalement par voie orale, et secondairement par voie cutanée ou encore par inhalation (Utip *et al.*, 2013). Le taux d'absorption de la deltaméthrine par voie orale n'est pas précisément connu ; on peut cependant considérer qu'il est important, de l'ordre de 90 %. Le taux d'absorption par inhalation est probablement faible et même par voie cutanée qui est de l'ordre de 3,6 % chez le rat (Ruzo *et al.*, 1978 ; IPCS, 1990 ; Decourtye, 2004).

- Distribution

Des études chez les animaux de laboratoires montrent qu'après ingestion, la deltaméthrine se distribue dans les différents tissus de l'organisme, avec une concentration légèrement plus importante dans les graisses (demi-vie de 7 à 9 jours). Le pic plasmatique apparaît 1 à 2 heures après l'administration de la deltaméthrine par voie orale et reste détectable jusqu'à 48 heures. Elle passe dans le lait en faibles proportions (demi-vie estimée à 1 jour) (IPCS, 1990 ; Testud et Grillet, 2007 ; INRS, 2007).

- Métabolisme

La deltaméthrine est métabolisée en composés non toxiques par oxydation, par hydrolyse de la fonction ester et par conversion du groupement cyano en thiocyanate. Chez l'homme, elle est rapidement métabolisée au niveau hépatique avec formation d'acide 3-phénoxybenzoïque, d'acide décamétrique (ou acide *cis*-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-diméthyl-cyclopropane-1-carboxylique ou *cis*-Br₂CA). Les métabolites oxydés sont ensuite sulfo- ou gluco-conjugués, facilitant ainsi leur élimination dans les urines (*fig.03*) (Ruzo *et al.*, 1979 ; IPCS, 1990).



- Elimination

La deltaméthrine est éliminée de façon sensiblement équivalente, par les urines et les fèces chez le rat et la souris. Chez l'homme, l'élimination urinaire représente entre 51 et 59 % de la dose absorbée ; l'élimination fécale de 10 à 26 %. La deltaméthrine peut être éliminée soit sous forme de 3-PBA, de *cis*-Br₂CA, soit sous forme inchangée. La demi-vie d'élimination varie entre 10 et 13,5 heures (IPCS, 1990 ; INRS, 2007 ; Shivanoor et David, 2014).

2.3.3. Toxicité de la deltaméthrine

La deltaméthrine (DM) est répertoriée en classe II par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et par l'Agence de Protection de l'Environnement (EPA, USA) et dans la liste noire par la Convention de Stockholm (Green Peace) (Utip *et al.*, 2013). Elle est très toxique pour les poissons et les abeilles (EuroCom, 2002 ; HSDB, 2001 ; US EPA, 1998). En solution, dans un solvant non aqueux, la deltaméthrine présente sa plus faible DL₅₀ de 19mg/kg par voie orale chez la souris et d'environ 130 mg/kg/j chez le rat (IPCS, 1990). La toxicité de DM par voie cutanée est faible ; la DL₅₀ correspondante est supérieure à 800mg/kg chez le rat et supérieure à 2000 mg/kg chez le lapin (INRS, 2016). L'intoxication aiguë se manifeste chez le rat et la souris par les signes suivants : hypersalivation, diarrhée, dyspnée, faiblesse, défaut de coordination motrice, hypotonie, tremblements, mouvements cholériformes, tachycardie, difficultés respiratoires et convulsions cloniques. Les paralysies des muscles respiratoires sont susceptibles de conduire à la mort. La sévérité des symptômes est corrélée à la concentration de DM dans le cerveau (He *et al.*, 1989 ; INRS, 2016). La deltaméthrine provoque une salivation excessive, secousses cloniques, mouvements involontaires, convulsions toniques et cloniques. On a noté aussi des altérations neurologiques avec démyélinisation (Scassellati *et al.*, 1994 ; Toumi, 2013).

3. Néonicotinoïdes

3.1. Généralités

Les insecticides de type néonicotinoïdes sont des analogues synthétiques de la nicotine, qui est un alcaloïde naturel extrait des feuilles de tabac, utilisée depuis des siècles comme insecticide (Jeschke *et al.*, 2011). Les néonicotinoïdes sont des neurotoxiques ; leurs cible est le récepteur post-synaptique à l'Ach dont le blocage induit paralysie et mort de l'insecte (Seifert *et al.*, 2005), ce mécanisme proprement dit sera traité d'une manière plus approfondie dans la section de la neurotoxicité. La démarche adoptée pour développer les néonicotinoïdes, c'est-à-dire reproduire l'activité pharmacologique de la nicotine en augmentant la sélectivité vis-à-vis des insectes pour limiter la toxicité chez les mammifères, a été en tous points semblables à celle conduite avec les pyréthrinoïdes, analogues des pyréthrines naturelles présentes dans les fleurs de certaines variétés de chrysanthèmes (David *et al.*, 2007 ; EFSA, 2016).

3.2. Classification

Les néonicotinoïdes constituent un ensemble de substances chimiques exclusivement utilisées pour leur action insecticide dans le domaine agricole et pour leur action biocide dans les domaines domestiques et professionnels. Sept substances néonicotinoïdes sont (ou ont été)

exploitées depuis leur introduction sur le marché dans les années 90 : la clothianidine, le dinotéfurane, l'imidaclopride, le nitenpyrame, le thiaclopride, le thiaméthoxame et l'acetamipride. Au niveau mondial, les ventes de substances néonicotinoïdes représentent un quart des ventes totales d'insecticides. Ces tonnages sont principalement dédiés à la protection des cultures de maïs (David et al., 2007 ; Anderson, 2015).

3.3. Exemple sur les Néonicotinoïdes : L'Acetamipride

L'acetamipride est un des insecticides très largement utilisé dans le monde et dont les ventes ne cessent d'augmenter depuis leur apparition sur le marché international dans les années 90 (Terayama et al., 2016). Il joue un rôle d'inhibition irréversible sur l'acétylcholinestérase laissant une concentration élevée de l'acétylcholine dans la fente synaptique favorisant une sensibilisation continue des récepteurs à l'acétylcholine (*nAChR*). Sa caractéristique physicochimiques le rend peu persistant dans l'environnement (Sheets, 2010 ; Testud, 2014).

3.3.1. Propriétés

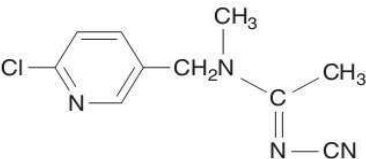
L'acetamipride est un pesticide utilisé dans le traitement des arbres fruitiers, des rosiers, des semences de céréales et de betteraves, ainsi que dans le traitement des bâtiments ou les locaux d'élevage d'animaux domestiques (Couteux et Lejeune, 2012). Les préparations commerciales se présentent sous forme de concentrés solubles (5, 10, 20, 50, 75 ou 95% de substance active), poudres mouillables ou granulés dispersibles dans l'eau. Dans certaines formulations liquides, l'insecticide est en solution dans un solvant organique (Couteux et Lejeune, 2012 ; Testud, 2014). Le tableau 2 récapitule l'essentiel des propriétés physico-chimiques et biologiques de l'acetamipride.

3.3.2. Toxicocinétique de l'acetamipride

- Absorption

Après l'ingestion des matières contaminée, la pénétration digestive est la majeure voie de contamination par l'acetamipride. Aussi, la voie percutanée est prédominante en milieu professionnel agricole par ce pesticide (Testud, 2014 ; Terayama et al., 2016). Les études animales de toxicité par voie dermique indiquent qu'elle est vraisemblablement extrêmement faible (Di Prisco, 2013). Par contre, la voie respiratoire est négligeable compte tenu de l'absence de volatilité des molécules d'acetamipride, dont les tensions de vapeur sont toutes inférieures à 1 Pa à 25°C. Il peut néanmoins exister une déglutition secondaire de microgouttelettes d'aérosols inhalées (David et al., 2007 ; Terayama et al., 2016).

Tableau 02. Principales caractéristiques de l'acetamipride (Testud, 2014)

Formule chimique	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄
Structure	
Nom chimique	(E)-N-[(6-Chloro-3-pyridinyl)méthyl]-N'-cyano-N-méthyléthanimid
Propriétés physicochimiques	Poudre blanche peu hydrosoluble (3 à 4 g/L selon pH) et non volatile (tension de vapeur < 1 µPa à 25°C)
Persistance d'action	Demi-vie sur le sol comprise entre 1 et 8 jours.
Teneurs max en résidus dans les denrées	0,01 à 5mg/kg selon le type de culture
DJA	70 µg/kg/jour pour l'homme
DL₅₀	195 mg/kg par voie orale. >2000 mg/kg par voie dermale chez le rat
Organes cibles	SNC : ataxie et trémulations. Foie : hypertrophie Centrolobulaire
NOAEL	7 mg/kg/jour
Génotoxicité	Résultats équivoques sur tests in vitro, négatifs sur tests in vivo
Reprotoxicité	Pas d'effet tératogène ni fœtotoxique (rat, lapin)

- Distribution

La nature lipophile des néonicotinoïdes comme l'acetamipride facilite leur passage de toutes les barrières biologiques. La distribution digestive est rapide et complète ; le pic plasmatique est obtenu à la deuxième heure. La barrière hémato-méningée des mammifères est très peu perméable au l'acetamipride (David *et al.*, 2007 ; EFSA, 2016 ; Terayama *et al.*, 2016).

- Métabolisme

Communes à l'ensemble des molécules. Les voies métaboliques d'acetamipride passent par les cytochromes P450 cérébraux (Dively, 2015). Le principal métabolite conduit à N-méthyl (6-chloro-3-pyridyl) méthylamine, qui est conjugué au méthyl (Terayama *et al.*, 2016). L'oxydation d'acetamipride produit du N'-[(6-chloro-3-pyridyl)méthyl]-N-cyanoacetimidine ; une voie accessoire donnerait naissance à du méthylamine (*fig.04*. Dont l'affinité pour les récepteurs nicotiques des mammifères serait proche de celle de la nicotine) (AGRITOX, 2015 ; Tian *et al.*, 2016).

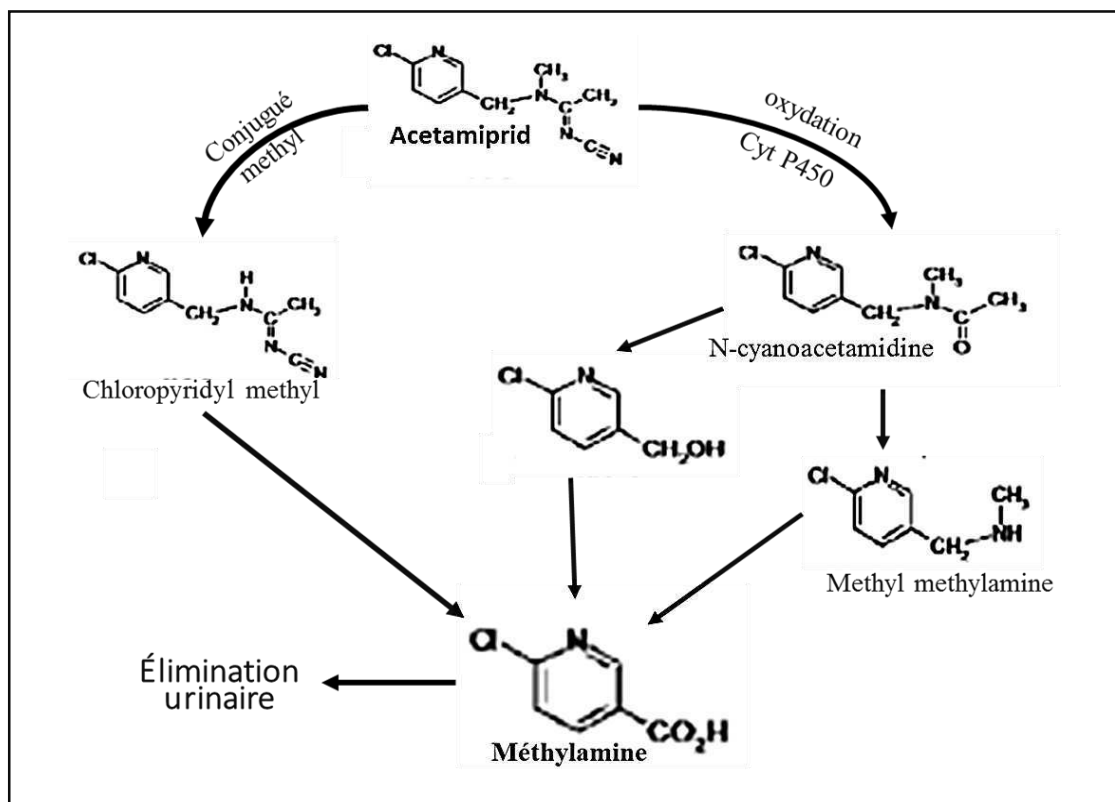


Figure 04. Voie de métabolisme de l'acetamipride dans l'organisme.

- Élimination

Dans l'organisme, une fraction de l'ordre de 10% de ce pesticide est éliminée sous forme inchangée. L'acetamipride est converti en méthylamine, plus active que la molécule mère. Il n'y a pas d'accumulation d'acetamipride dans l'organisme ; plus de 90 % d'une dose orale sont éliminés en moins de 72 heures, la totalité en 96 heures. Les voies urinaire (*fig.04*) et fécale sont les principales voies d'élimination pour l'acetamipride. (Seifert, 2005 ; Sheets, 2010 ; Chen et al., 2014).

3.3.3. Toxicité de l'acetamipride

La toxicité aiguë d'acetamipride pour les mammifères est variable selon les espèces dont la DL₅₀ varie de 125 à 475 mg/kg. Les animaux intoxiqués présentent au bout de 2 à 6 heures une apathie, des tremblements avec ataxie, une hypothermie et un arrêt respiratoire (Seifert, 2005 ; Sheets, 2010 ; Terayama et al., 2016). Les études disponibles sur la toxicité par l'acetamipride sont limitées dans certaines régions du monde où la vente de ce néonicotinoïde est libre et bon marché tels que dans les pays du Sud-est-Asiatiques et la plupart des pays Africaines (Kimura et al., 2012 ; Testud, 2014 ; Terayama et al., 2016). Selon Kimura-Kuroda et al. (2012) l'acetamipride conduit à des anomalies morphologiques du développement cérébral et des troubles du comportement chez les mammifères. Il se produit une stimulation du système

nerveux central se traduisant cliniquement par des convulsions tonico-cloniques violentes. Surviennent également des nausées, vomissements, une diarrhée, une paresthésie de la langue et de la face. Les suicides par l'ingestion de l'acetamipride sont très courants (**Terayama et al., 2016**). En d'autres termes, l'étude de **Jeschke et al (2011)** a identifié un effet potentiel nocif sur le développement des neurones et des structures cérébrales chez un fœtus ou un jeune enfant. Les défaillances cardiaque et respiratoire entraînent la mort en quelques heures. L'inhalation des poussières d'acetamipride fait apparaître une irritation de bouche et des poumons avec hypersécrétion bronchique (**Woodcock et al., 2016**). L'agence canadienne pour la régulation de la lutte antiparasitaire (ACRLA) considère que l'acetamipride est un perturbateur endocrinien potentiel et suspecte des effets sur la reproduction chez les animaux (**Jeschke et al., 2011 ; Chen et al., 2014 ; Terayama et al., 2016**). Les études de cancérogènes animale sont plus ou moins négatives pour l'acetamipride, il est classé non cancérogène pour l'homme par *Environmental Protection Américaine Agency* (**McKelvey et al., 1988 ; Parks et al., 1988 ; Obata et al., 2001**).

Chapitre II : Neurotoxicité

1. Généralités sur neurotoxicité

La neurotoxicité est un changement structural ou une altération fonctionnelle du système nerveux, qui trouve son origine dans l'exposition des agents biologique, physique ou chimique (Philbert et al., 2000 ; Bear et al., 2016).

1.1. Le cerveau

Chez l'adulte, le cerveau pèse environ 1,3 kg et contient des milliards de cellules nerveuses. Il est logé dans la boîte crânienne qui le protège des chocs. Le cerveau est également entouré de trois membranes protectrices ; les méninges (dure-mère, arachnoïde, et pie-mère) (Cambier, 2008). Il appartient à l'encéphale, qui comprend le diencephale, le tronc cérébral et le cervelet en suspension dans le liquide céphalo-rachidien, un liquide amortisseur de chocs qui permet le transport de molécules et la récupération des déchets (Pascal 2010). Le cerveau est divisé en deux parties l'hémisphère droit et l'hémisphère gauche. Chaque hémisphère commande une partie opposée du corps, l'hémisphère gauche gère le côté droit du corps et inversement (Cambier, 2008 ; Peterson et al., 2015). L'hémisphère gauche est généralement associé à la logique et au langage, alors que le droit est le siège des intuitions, des émotions et du sens artistique (Bear et al., 2016). La surface des hémisphères est recouverte de cortex cérébral, c'est la substance grise car elle contient les corps cellulaires des neurones. Le cortex est parcouru de circonvolutions, qui sont des replis du tissu cérébral (Peterson et al., 2015).

1.1.1. Histologie du cerveau

Le système nerveux (SN) est l'ensemble des systèmes qui mettent le corps dans un état d'équilibre. Il est subdivisé en deux systèmes : centrale (SNC) et périphérique (SNP).

- Le SNC : C'est le centre de régulation et de communication de l'organisme, il est formé de l'encéphale et de la moelle épinière (Bear et al., 2016).

- Le SNP : c'est la ligne de communication entre le SNC et l'organisme, et est situé à l'extrémité de SNC. Il est formé principalement des nerfs (crâniens et spinaux) issus de l'encéphale et de la moelle épinière qui comprend deux types de voies, (Marieb, 2005).

- *La voie sensitive (afférente)* : il transporte l'influx des récepteurs sensoriels (la peau, les organes des sens du muscle squelettique) vers le SNC.
- *La voie motrice (efférente)* : cette voie renferme aussi deux parties : SN somatique (volontaire) et SN végétatif (autonome) qui est subdivisé à son tour en SN sympathique et parasympathique, l'un est stimulé et l'autre inhibé (Marieb, 2005).

1.1.2. Physiologie du cerveau

Le SN détecte les différentes stimulations (externe et interne) et réagit rapidement avec une très haute coordination, les signaux électriques sont constitués des potentiels d'action qui se propagent rapidement le long des axones d'un neurone à l'autre ou d'un neurone à une cellule effectrice (Imbert, 2006 ; Verkhatsky & Butt, 2007 ; Bear et al., 2016).

- **Les neurones**

Un neurone est une cellule fondamentale du SN spécialisée dans le traitement d'informations et la communication. Les neurones qui acheminent l'information en provenance des récepteurs sensoriels de l'organisme, ils sont composés du corps cellulaire entouré de dendrites et d'axone terminé par arborisation des boutons synaptiques (fig.05) (William 1981 ; Pascal 2010).

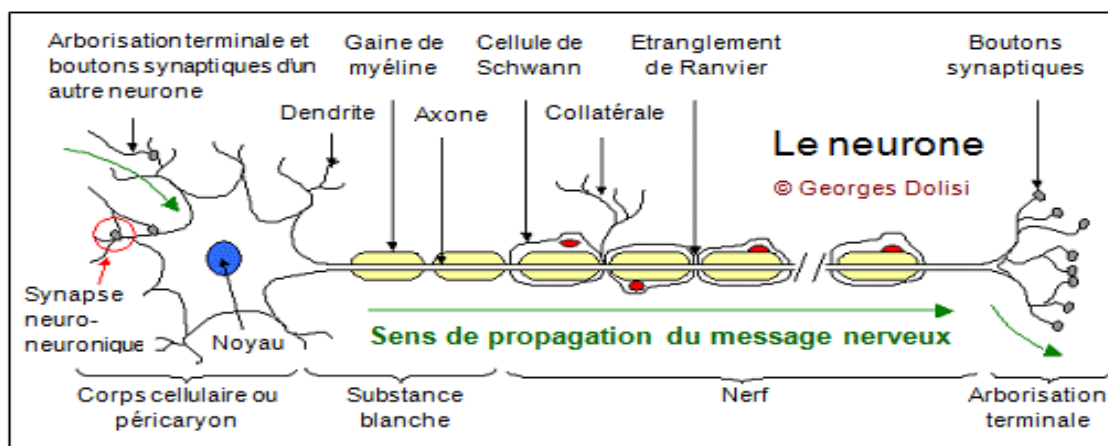


Figure 05. Structure d'un neurone (Jean-François et al., 2005).

Le rôle principal des neurones est la transmission du signal nerveux, ce sont les cellules gliales qui se chargent de leur protéger, de leur nourrir et d'optimiser leur fonctionnement (Christensen et al., 2013).

- **Les cellules gliales**

On se trouve quatre types des cellules gliales dans le SN ; les oligodendrocytes, la microglie, les épendymaires et les astrocytes (William, 1981 ; Block et Hong, 2005). Elles entourent les neurones et participent au contrôle de l'environnement chimique et électrique en leur fournissant des nutriments et en éliminant leurs déchets (William, 1981). Elles sont appelées cellules de support neuronales parce qu'elles produisent des facteurs de croissance et réutilisent les neurotransmetteurs (fig.06) (Christensen et al., 2013). Les cellules gliales présentes un rôle très important dans la pathologie de système nerveux. Par exemple dans la maladie d'Alzheimer

ces cellules sont suspectées d'induire une inflammation chronique dans le cerveau en réponse au dépôt des plaques β amyloïdes (Koistinaho *et al.*, 2004; Pihlaja *et al.*, 2011).

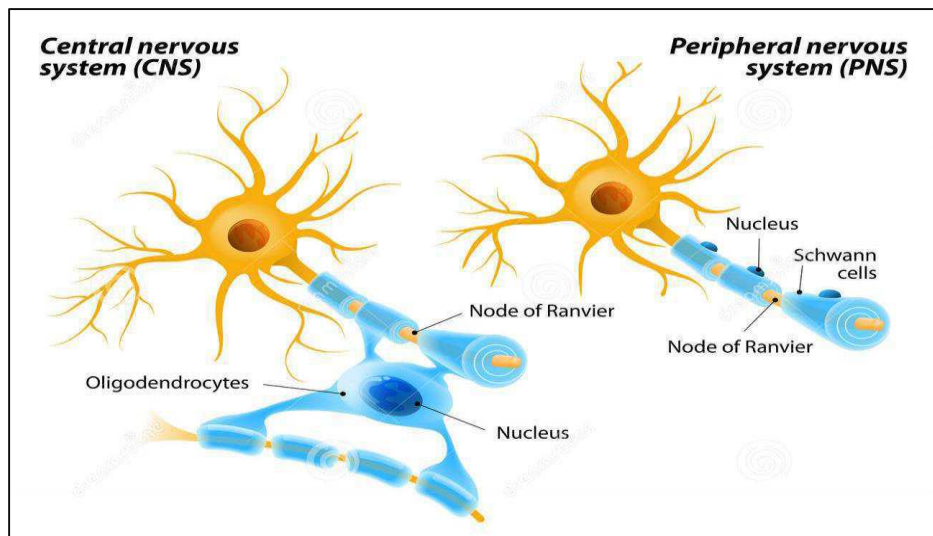


Figure 06. Structures et formes des cellules gliales (Jean-François *et al.*, 2005).

De plus, les astrocytes sont considérées comme une source majeure de production de peroxy-nitrite, ce dernier induit la nitration des protéines y compris les β amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer, interfèrent avec plusieurs voies de signalisation, perturbent la respiration mitochondriale et provoquent la mort cellulaire (Kummer *et al.*, 2011).

2 Fonctionnement du système nerveux

2.1 Le flux nerveux et l'intégration synaptique

La transmission de l'influx nerveux par les cellules nerveuses est due aux propriétés électrochimiques de leurs membranes plasmiques. Le signal se transmet d'une cellule nerveuse à une autre par des jonctions qu'on appelle synapses (Purves *et al.*, 2004 ; Brooker *et al.*, 2001), un type bien particulier de ces synapses est celui qui relie le neurone à une cellule effectrice telle qu'une fibre musculaire, cette synapse est alors dite jonction neuromusculaire (Gerard *et al.*, 2002 ; Ganong *et al.*, 2005). Le passage de l'information dans une synapse est assuré par des molécules chimiques appelés neurotransmetteurs (Kolb *et al.*, 2002). Au niveau des synapses, lorsque l'influx nerveux atteint les terminaisons présynaptiques déclenchent des événements qui aboutissent à la libération d'un neurotransmetteur à travers la fente synaptique qui modifie la perméabilité de la membrane post-synaptique (Marieb, 2005). Les canaux Na^+ voltage dépendants sont responsables de l'initiation et la propagation de ces potentiels d'action sur le long de l'axone, le canal de sodium forme un pore dans la membrane qui est hautement

sélectif pour les ions Na^+ . A l'état de repos, les canaux sont fermés. Lorsque la membrane est dépolarisée, ces canaux sont ouverts (fig.07) (Guéguen et al., 2005 ; Imbert, 2006).

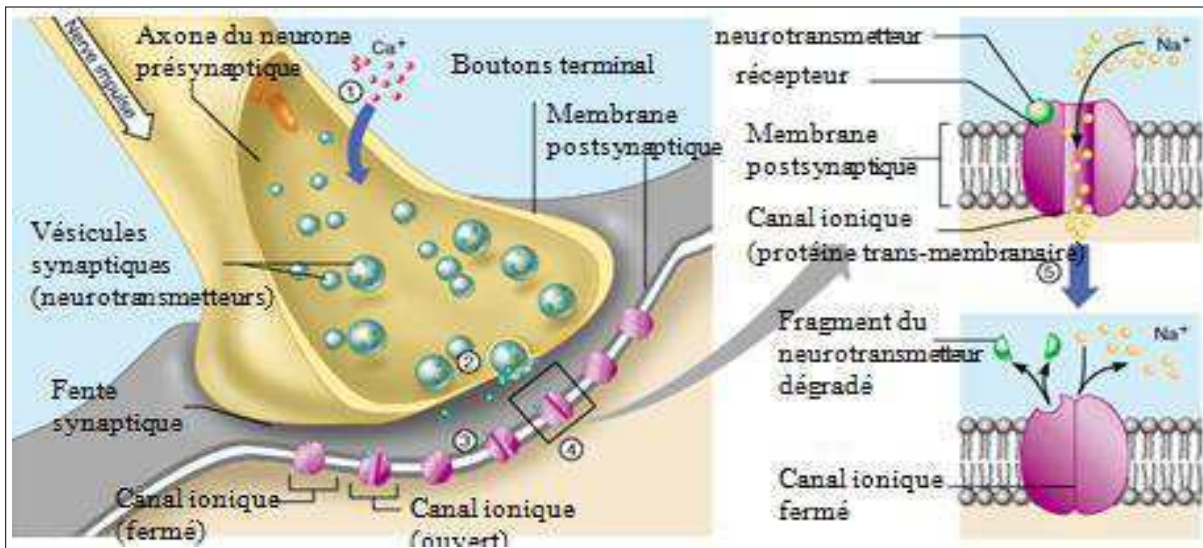


Figure 07. Mode de transmission des signaux nerveux (Marieb, 2005).

La capacité d'un neurone d'accepter et de relayer de l'information résulte premièrement de différences dans la distribution des ions sur la membrane cellulaire (Bear et al., 2016). Ce qui crée une différence de potentiel électrique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule au repos (Lacombe, 2006), et deuxièmement de modifications momentanées de la perméabilité de cette membrane à certains ions ce qui engendre une dépolarisation électrique de la membrane. Cette dernière se transmet de proche en proche le long de l'axone et constitue la transmission de l'information nerveuse ou influx nerveux (Siegel et al., 2005). Après avoir été dépolarisée, la membrane retrouve rapidement son état initial polarisé, mais jusqu'à ce que les ions soient revenus à leur place, l'axone ne peut conduire de nouvel influx, cette période est nommée réfractaire (fig.08) (Cambier, 2008 ; Lacombe, 2006).

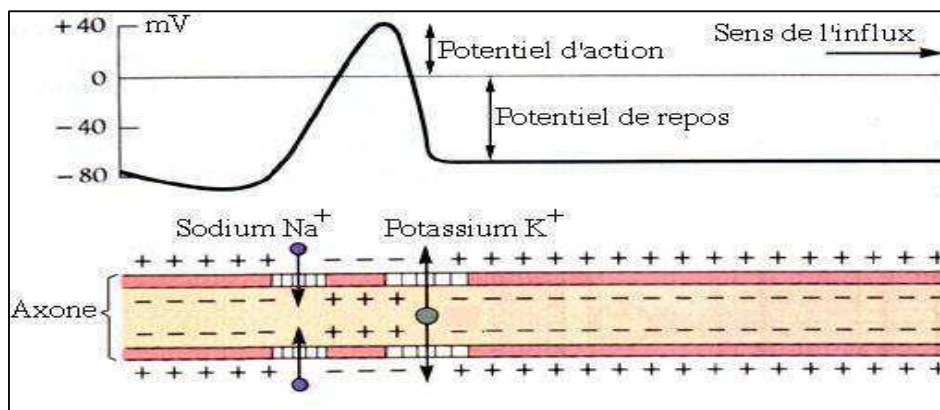


Figure 08. Variation du potentiel électrique du cytoplasme d'un axone par rapport à l'extérieur, et origine de la dépolarisation (Bernard et al., 2007)

Dans les fibres amyéliniques, la vitesse n'est de l'ordre que de 1,5-2 m/s, alors qu'elle atteint 100 m/s le long des fibres myéliniques (Cambier, 2008). Dans ce dernier cas, la dépolarisation électrique se déplace par sauts, de nœud de Ranvier en nœud de Ranvier, la gaine de myéline étant électriquement isolante. Les premières gaines de myéline n'apparaissent qu'à la fin de la vie fœtale et au cours de la première année, et la quantité de myéline augmentant jusqu'à la maturité, il est aisé de comprendre pourquoi les réactions d'un enfant et surtout d'un nouveau-né ne sont pas aussi rapides et aussi coordonnées que celles d'un adulte (*fig.09*) (Brailion, 2002 ; Guéguen *et al.*, 2005 ; Bernard *et al.*, 2007).

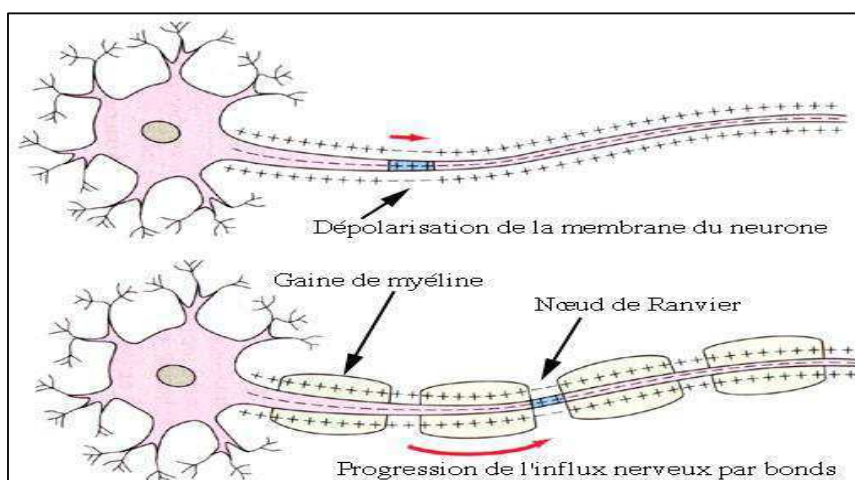


Figure 09. Présentation de la progression de l'influx nerveux le long d'un neurone amyélinique (en haut) et le long d'un neurone myélinique (en bas) (Cambier, 2008)

L'influx nerveux doit fréquemment se transmettre d'un neurone à un autre : il le fait au niveau d'une synapse ou jonction synaptique (Cambier, 2008 ; Lacombe, 2006). Dans les boutons terminaux se trouvent de petites vésicules synaptiques contenant des neurotransmetteurs ou neuromédiateurs, substances synthétisées par le neurone (*fig.10*) (Tritsch *et al.*, 1999). Lorsque l'influx nerveux atteint le bouton synaptique, il cause la libération des neurotransmetteurs dans un espace infime de 20 à 50nm (fente synaptique) séparant les neurones pré et postsynaptiques (Cambier, 2008). Ces neurotransmetteurs se fixent sur des récepteurs de la membrane du neurone postsynaptique et induisent, selon leur nature chimique, plusieurs réactions (Tritsch *et al.*, 1999).

2.2 Les neurotransmetteurs

La transmission chimique de l'information nerveuse au niveau de la synapse impose un délai de transmission de 0,5 ms, alors qu'il ne serait que de 1,10 à 6 s dans le cas d'une transmission purement électrique. Mais la nature chimique de ce mode de transmission permet d'agir sur la propagation de l'influx nerveux (Verkhratsky & Butt, 2007).

Les neurotransmetteurs sont des substances chimiques libérées par un neurone au niveau d'une synapse qui modifie de manière spécifique l'activité d'une autre cellule. Ils sont diffusent vers la région post-synaptique pour activer leurs récepteurs puis sont rapidement éliminés (Guénard, 2001) soit par diffusion en dehors de la fente synaptique, soit dégradés par une enzyme spécifique et réabsorbés par le bouton terminal (Guéguen *et al.*, 2005).

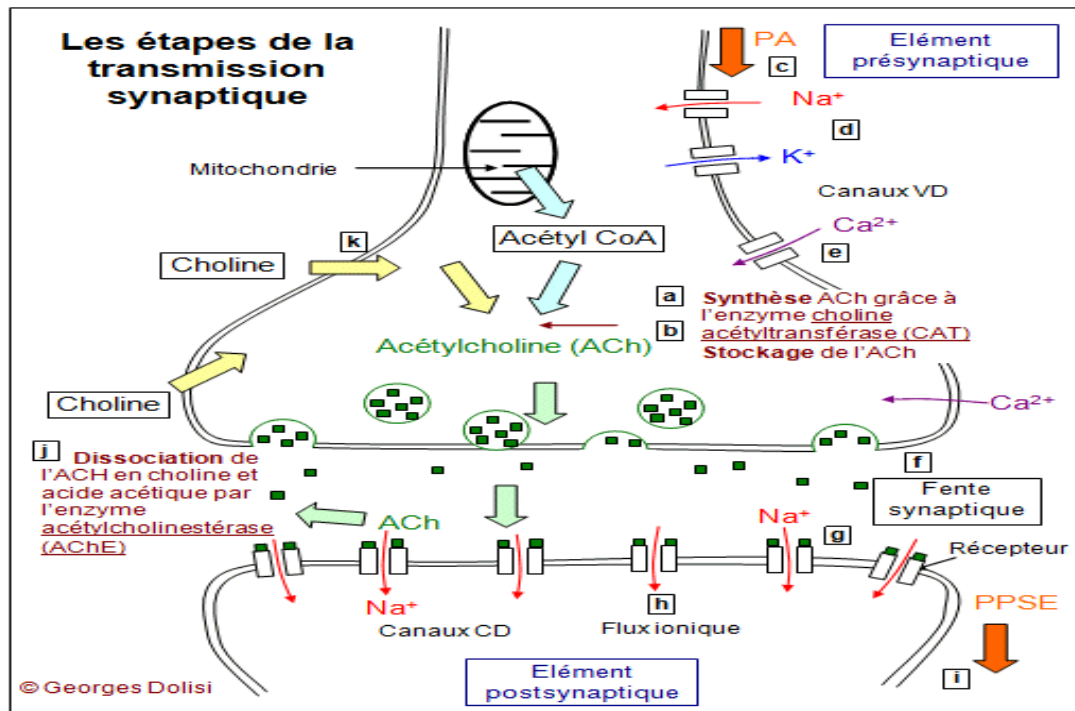


Figure 10. Mécanisme du transmission synaptique de l'influx nerveux (Chuiko *et al.*, 1997).

- Acétylcholine (ACh)

Une fois arrivé à la terminaison nerveuse, l'influx moteur provoque l'ouverture des canaux calciques, ce qui déclenche une entrée massive des ions de calcium à l'intérieur de la cellule. Le Ca^{2+} favorise la sécrétion d'ACh dans la fente synaptique (Guénard, 2001 ; Kolb *et al.*, 2002). Chaque deux molécules d'ACh diffusent de l'autre côté et liées avec un récepteur cholinergique (Lodish, *et al.*, 2005 ; Martin *et al.*, 2006), ce dernière provoque l'ouverture d'un canal sodique, ce qui favorise l'entrée des ions du sodium à l'intérieur de la fibre musculaire, dépolarisant ainsi la membrane post-synaptique et créant un potentiel de plaque (Lodish, *et al.*, 2005). En fonction du nombre des récepteurs activés, ce potentiel peut dépasser une valeur seuil et déclencher ainsi un potentiel d'action musculaire qui va diffuser vers l'ensemble de la membrane musculaire et provoquer une contraction de la fibre musculaire (fig.10). Les molécules d'ACh sont rapidement détruites par l'enzyme AChE présente au niveau de la fente synaptique a deux molécule ; acétate et choline (Martin *et al.*, 2006).

- Adrénaline (Ad)

L'adrénaline joue un rôle important dans la régulation au niveau de l'ensemble des organes et la réaction de l'organisme face au stress, en cas de situations critiques ou nocives (danger, traumatisme, infection, refroidissement). La libération de ce neuromédiateur implique alors toute une série de réactions nerveuses involontaires, comme l'accélération des rythmes cardiaque et respiratoire pour préparer le corps à l'effort de la lutte ou de la fuite (**Martin et al., 2006 ; Verkhatsky & Butt, 2007**).

- Dopamine (Da)

La dopamine est un neurotransmetteur synthétisé par certaines cellules nerveuses à partir de la tyrosine (**Bear et al., 2016**). Elle est le neuromédiateur inhibiteur d'un petit groupe de neurones qui affecte le mouvement musculaire, la croissance des tissus, le fonctionnement du système immunitaire. Elle intervient dans la sécrétion de l'hormone de croissance (**Kazushige et al., 2000 ; Meiser et al., 2013 ; Dias et al., 2014**).

- GABA

Le GABA ou acide g-aminobutyrique est un neurotransmetteur inhibiteur, dont le récepteur se lie aussi au valium. Le GABA et le valium aident à soulager l'anxiété et diminuent l'angoisse. Il est le principal neurotransmetteur inhibiteur et il joue un rôle critique dans la régulation de l'activité neuronale (hyperpolarisation membranaire) chez les vertébrés et les invertébrés. (**Buckingham et al., 2005 ; Verkhatsky & Butt, 2007**).

- Sérotonine (5-HT)

La sérotonine ou 5-hydroxytryptamine (*5-HT*) est un neurotransmetteur inhibiteur qui intervient dans des phénomènes tels que le sommeil, la conscience et les états émotionnels (**Wang et al., 2007**). Le système sérotoninergique implique la *5-HT* qui est considérée comme le neurotransmetteur le plus important impliqué dans l'anxiété. Il a été démontré qu'un anxiolytique agissant via le système sérotoninergique cérébral diminue le taux de la *5-HT* dans le cerveau (**Hoyer et al., 2002 ; Caramaschi et al., 2007 ; Meneses et al., 2007**).

- Morphine

Les morphines naturelles du corps humain sont des neuropeptides appelés endorphines et enképhalines (**Martin et al., 2006**). Les enképhalines sont des inhibiteurs et compétiteurs que l'on retrouve dans les synapses traitant les influx de l'humeur, de l'émotion et de la douleur : en se fixant sur les récepteurs postsynaptiques à la place des neurotransmetteurs effecteurs, elles bloquent la propagation des influx nerveux (**Guéguen et al., 2005 ; Nieuwenhuys et al., 2008**).

3 Majeurs pathologies neuronales

- *Maladie d'Alzheimer* : La maladie d'Alzheimer est une affection neurodégénérative qui entraîne un dommage progressif définitif et irréversible des cellules nerveuses, qui commence par la perte de mémoire des événements récents puis la perte des fonctions cognitives (aphasie, apraxie, agnosie) (Kelley, 2011 ; Wang et al., 2016 ; Bonda et al., 2015).

- *Maladie de Parkinson* : maladie neurodégénérative qui résulte de la mort lente et progressive des neurones d'une zone du cerveau qui joue un rôle important dans le contrôle de nos mouvements. C'est pourquoi les personnes atteintes font peu à peu des gestes rigides, saccadés et incontrôlables (Defebvre et Vérin, 2006 ; Verkhatsky & Butt, 2007).

- *Tumeur cérébrale* : multiplication dans le cerveau de cellules anormales. La tumeur peut-être bénigne ou maligne (Peterson et al., 2015).

4 Intégration des neurotransmetteurs dans les fonctions cérébrales

Les récentes études comportementales ont montré que l'apprentissage et la mémoire sont les plus particulièrement touchés chez les individus suite à une exposition chronique à des xénobiotiques environnementales pendant ou après le développement. Une des explications à cette observation réside donc dans l'effet d'une telle exposition aux ces toxiques sur les processus à la base de la mémoire, que l'on tentera d'analyser ensuite des neurotransmetteurs au niveau moléculaire comme un exemple (Bailey et al., 1996 ; Rouvière et Delmas, 2002).

4.1 Intégration dans la mémorisation

La mémoire se définit comme la capacité de capter, de coder, de conserver et de pouvoir restituer une information donnée (Sherwood et al., 2006). Elle joue un rôle déterminant dans notre vie (Rodríguez, 2016). Au fait, sans mémoire il n'y aurait aucun sens à la vie. Elle est la moyenne de se situer dans le temps, c'est le tissu qui façonne l'histoire de chacun (Ganong et al., 2005 ; Godefroid, 2008). En cas d'une neurotoxicité, les personnes ayant subi une ablation ou altération des deux hippocampes (jouent un rôle clef dans les différentes aires sensorielles et de mémorisation) (Akchiche, 2009) ne peuvent plus enregistrer de nouveaux souvenirs dans leur mémoire (Soprano et al., 2009). La mémoire procédurale ne solliciterait pas du tout l'hippocampe (Kolb et al., 2002). Elle serait plutôt associée à des modifications dans le cervelet, l'amygdale, les ganglions de la base et le cortex moteur. Aussi le cortex préfrontal joue un rôle primordial dans la mémoire de travail (Kazushige et al., 2000 ; Guéguen et al., 2005 ; Sherwood et al., 2006). La perte de la mémoire est le plus souvent liée soit directement avec la dégradation structurale de l'hippocampe ou les régions de

mémorisation ou indirectement avec la perturbation de la sécrétion des neurotransmetteurs par l'intervention d'un xénobiotique ou d'un facteur psychique (Jaako et al., 2005). La destruction rapide de l'acétylcholine (*Ach*) permet d'éviter la prolongation de la contraction musculaire, il est commande la capacité à retenir une information, la stocker et la retrouver au moment nécessaire (Patro, 1997). Lorsque le système qui utilise l'*Ach* est perturbé apparaissent des troubles de la mémoire, voire dans les cas extrêmes des formes de démence sénile (Kazushige et al., 2000). L'*Ach* est un neurotransmetteur excitateur au niveau des fibres nerveuses et de la plaque motrice, mais intervient aussi au niveau du système nerveux central car la perte de mémoire de certaines personnes âgées a été associée à une insuffisance de ce neurotransmetteur dans le cerveau. La mort des neurones utilisant l'*Ach* est parmi les premiers causes du maladie d'Alzheimer (Latash et al., 2002 ; Ono et al., 2003 ; Guéguen et al., 2005).

4.2 Intégration dans l'apprentissage

Dans les conditions physiologiques, le contrôle de la motricité, la mémoire, l'apprentissage, l'attention et la motivation se fait par la sécrétion de plusieurs neurotransmetteurs comme le GABA, l'*Ach* et la dopamine (Ray, 2003). Cette dernière est une catécholamine qui représentent seulement 0,3% des cellules du cerveau dans des zones très localisées de l'encéphale et plus particulièrement dans la substance noire (*locus Niger*) (Dias et al., 2014). La perte de dopamine dans certaines parties du cerveau (principalement le striatum) entraîne la rigidité musculaire typique de la maladie de Parkinson (Clarke et Adermark, 2015). Les réseaux dopaminergiques du cerveau sont étroitement associés aux comportements d'exploration, à la vigilance, la recherche du plaisir et l'évitement actif de la punition (Caramaschi et al., 2007; Meneses et al., 2007). La diminution de la synthèse ou de l'excrétion de dopamine crée un déséquilibre entre le contrôle inhibiteur dopaminergique et le contrôle excitateur cholinergique qui exercent une super-excitation et aussi une augmentation du contenu des neurones présynaptiques en dopamine ce qui induit l'accumulation de leurs métabolites (Clarke et Adermark, 2015). Cette état pathologique crée un désordre progressif chronique caractérisé par une perte des neurones Nigro-Striataux de dopamine et la formation des inclusions intra neuronales nommées le Corp de Lewis (Guéguen et al., 2005 ; Chattopadhyaya et al., 2015 ; Elwan et al., 2016). Comme conclusion, une dysfonctionnement de dopamine causés directement une perturbation de l'apprentissage, et augmentés l'état d'anxiété (Guéguen et al., 2005 ; Wang et al., 2007).

4.3 Intégration dans la conscience

La conscience peut définir plusieurs choses comme le pouvoir de focaliser son attention, l'état d'éveil, la faculté d'abstraction et de verbalisation, c'est-à-dire d'exprimer les événements par des mots ; la capacité d'élaborer des projets et d'établir de nouvelles relations mentales à partir d'expériences passées ; la prise de conscience du soi et la faculté d'établir des valeurs (**Gerald et al., 2008**). Elle est une expérience purement subjective et n'est donc accessible qu'à la personne qui l'expérimente, ainsi son étude doit se faire à travers des sujets, et le modèle animal est très peu contributif car on ne sait pas encore avec certitude quelle forme de conscience leur attribuer (**Kazushige et al., 2000 ; Vibes, 2001**). Puis parce qu'elle fait intervenir beaucoup de structures encéphaliques et d'autres fonctions supérieures telles que la mémoire et le langage. Une perturbation de transmission nerveuse (dopaminergique) est touchée de manière directe la connaissance (**Chan et al. 2002 ; Margaret et al., 2001**).

4.4 Intégration dans l'anxiété

Le système sérotoninergique implique la *5-HT* qui est considérée comme le neurotransmetteur le plus important impliqué dans l'anxiété (**Wang et al., 2007**). Des toxiques naturels diminuent les concentrations de *5-HT* et de *GABA* au niveau du cerveau (**Dulawa et al., 2004**). Cela crée des crises d'anxiété, des contractions musculaires exagérées allant jusqu'à des convulsions et de la tachycardie (**Jonathan & Jeffrey, 2015**). L'inhibition de sécrétion de la *5-HT* provoque des troubles de la perception, de l'humeur et de la pensée (**Hoyer et al., 2002**). Aussi, une augmentation de la libération de glutamate mesuré au niveau de la substance grise est observée chez les patients ayant subi un traumatisme cérébral. Cependant, dans les maladies neurodégénératives chroniques, il est beaucoup moins probable que la libération de glutamate soit augmentée (**Shuichi, et al., 2012 ; Akhmetshina et al., 2016**).

5 Intégration de la mitochondrie dans la fonction neuro-énergétique

La mitochondrie est un lieu de régulation de la mort des cellules cérébrales de type ; apoptotique (**Polster and Fiskum, 2004**), nécrotique ou autophagique (**Liu et al., 2016**). Une mutation génétique d'une protéine exprimée au niveau mitochondrial provoqué la dysfonction de ces unités énergétiques et associées à des maladies neurodégénératives (**Polster and Fiskum, 2004**). Les mécanismes de neurodégénérescence potentiellement mis en jeu sont l'activation des caspases et l'apoptose, l'activation des calpaïnes et la nécrose, l'activation des cathepsines et l'autophagie ou la mort cellulaire atypique de type *TRIAD* (**Liu et al., 2016 ; Lemasters et al., 1998**). La régulation de l'apoptose par les mitochondries fait intervenir différentes protéines membranaires participant à la formation des canaux, permettant la

perméabilité transitoire mitochondriale (*mPT*) et la relocalisation cytosolique de protéines proapoptotiques activant des caspases effectrices (Aydin, 2011). A côté de cette cascade, des protéines anti-apoptotiques de la famille de *bcl-2* sont chargées d'inhiber la mort neuronale par une action au niveau de la membrane externe mitochondriale. La régulation de la nécrose par la mitochondrie se fait au niveau de la régulation du calcium et de la perméabilisation membranaire (Taib et al., 2016 ; Lemasters et al., 1998 ; Liu et al., 2016).

5.1 Mécanisme de la perméabilisation membranaire mitochondriale

Les protéines pouvant participer à la formation des canaux responsables de la libération de protéines proapoptotiques sont de deux types ; les pores de transition de perméabilité dépendant du calcium (*PTP*) et les canaux formés par *Bax* (Dejean et al., 2005). L'ouverture du *PTP* est conditionnée par une forte concentration du Ca_2^+ dans la matrice mitochondriale ou un état de stress oxydatif. Sa perméabilité est régulée par le glutamate, le *NADH*, le *NADPH*, l'*ATP*, l'état de phosphorylation par la *PKA*, l'actine *G*, la famille des protéines *Bcl-2* dont *Bcl-x L*, la chaîne légère de la dynéine et *HSP70* mitochondriale (Colombini, 2004). Le *PTP* est impliqué dans la mort cellulaire par apoptose ou par nécrose selon le niveau d'*ATP*. Il induit la libération du *Cyt-c* et de *AIF* dans le cytosol à partir de l'espace intermembranaire et l'activation des caspases 2 et 9 (Cai et al., 1998). Le second type de canal est formé par *Bax*, protéine cytosolique se relocalisant à la membrane externe mitochondriale, avec ou sans porine, sous forme de polymère constituant le *MAC*, perméable au cytochrome-c intermembranaire et permettant l'initiation de l'apoptose (fig.11) (Dejean et al., 2005).

5.2 Perméabilité mitochondriale transitoire et maladies neurodégénératives

L'ouverture du *PTP* interviendrait dans l'ischémie cérébrale car l'inactivation du gène de la cyclophiline D (Schinzel et al., 2005) ou l'utilisation de la cyclosporine A, inhibiteur des pores sont efficaces à bloquer la mort cérébrale (Warnsmann et al., 2017). Dans les modèles in vitro de la maladie de Parkinson, la cyclosporine permet l'inhibition de l'apoptose induite par le *MPP+* (Seaton et al., 1998). Une augmentation de la *mPT* induite par le calcium a été observée au niveau des mitochondries des lymphoblastes des patients atteints de la maladie de Huntington (Panov et al., 2002). La cyclosporine A protège partiellement de la libération du cytochrome-c par les mitochondries en présence d'*APP*, protéine impliquée dans la maladie d'Alzheimer (Kim et al., 2010). Par ailleurs, l'augmentation de la fixation du ligand des *PBR*, *PK-11195* dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer est compatible avec une augmentation d'expression du *PTP*. La surexpression de *Bax* dans les régions lésées des cerveaux de patients atteints de maladies neurodégénératives chroniques est en faveur de

l'implication de Bax dans la libération du Cyt-c dans la maladie de Parkinson (fig.11) (Schon et al., 2010 ; Warnsmann et al., 2017).

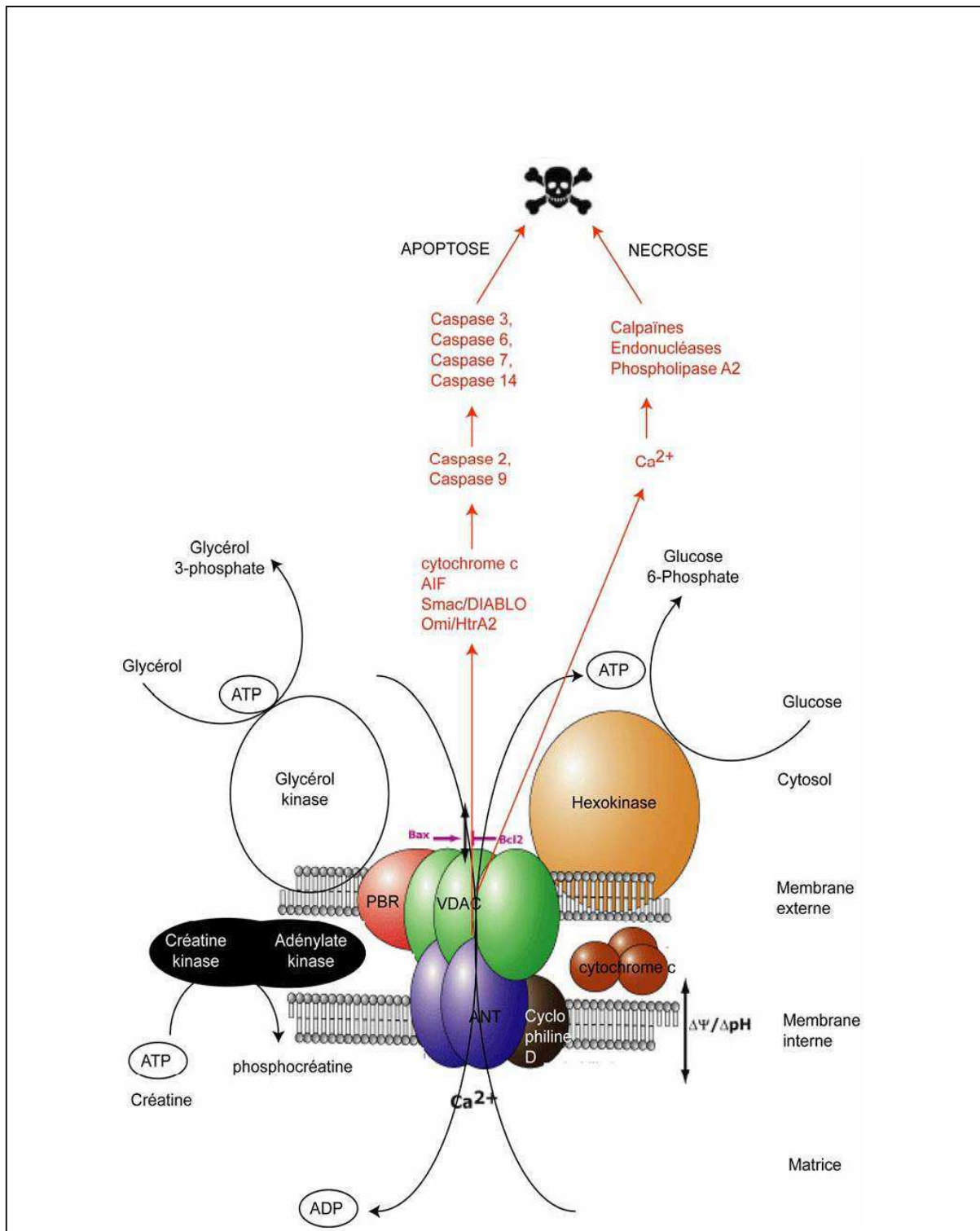


Figure 11. Mécanisme de la perméabilité membranaire mitochondriale par le PTP et les protéines mitochondriales proapoptotiques libérées en cas de stress.

(http://www.mitoscience.com/other_complex.html)

6 Neurotoxicité des pesticides

Les pesticides sont des substances toxiques pour les insectes, les animaux, y compris l'homme (Lauvverys *et al.*, 2007). Ils interfèrent principalement les canaux ioniques et les neurotransmetteurs, ainsi que l'*AchE* (fig.12) (Costa, 2006 ; Kanthasamy *et al.*, 2012).

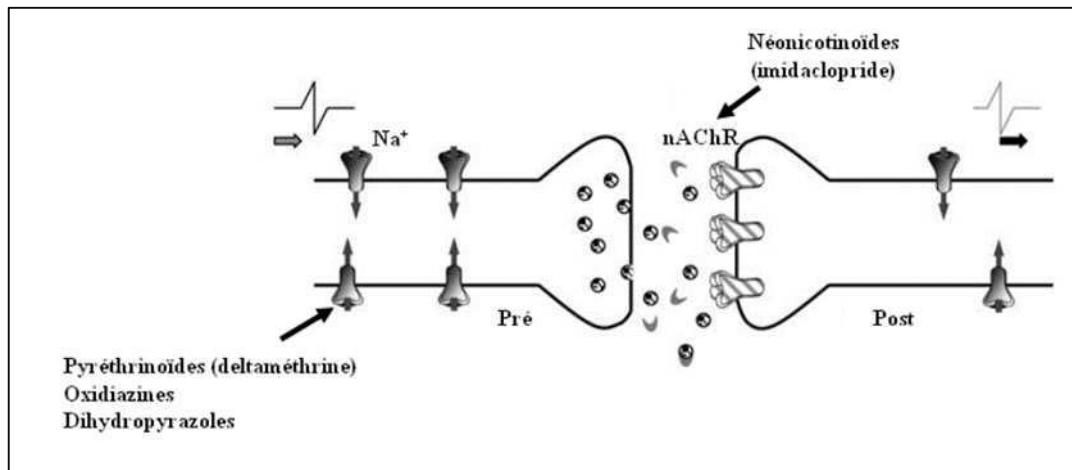


Figure 12. Les cibles principales des pesticides (Pyabalo Aklesso Kadala, 2015).

6.1 Neurotoxicité d'acetamipride

Le cerveau est le principal organe qui a été touché par l'acetamipride après une induction enzymatique chronique des cytochromes *P450*. Ce pesticide favorise l'accumulation de l'*Ach* dans les fentes synaptiques lors d'une stimulation nerveuse mène à une hyperstimulation des récepteurs cholinergiques (Kimura *et al.*, 2012 ; Nawaza *et al.*, 2015 ; EFSA, 2016). Leur mécanisme d'action principalement repose sur la fixation covalente au Acétylcholinestérase du système nerveux central en s'opposant à l'hydrolyse physiologique d'*Ach* qui devient alors irréversiblement non fonctionnel (Seifert *et al.*, 2005). Leur liaison irréversible à ces récepteurs entraîne initialement une stimulation, puis rapidement un blocage des canaux $Na^+/K^+-ATPase$ et des troubles de flux sortant de potassium entraînant ainsi un potentiel très négatif au niveau de la membrane des axones. Aussi, inhibée de la $Mg^{2+}-ATPase$ du système nerveux central, enzyme associée aux réactions de phosphorylations oxydatives et au maintien d'une concentration intracellulaire faible en Ca^{2+} qui inhibée de la transmission de l'influx nerveux (Kim *et al.*, 2010). Par conséquent, le passage de l'information nerveuse est bloqué jusqu'au non fonctionnement des synapses (Seifert *et al.*, 2005 ; Lin *et al.*, 2013). Selon Jeschke *et al* (2011) & Terayama *et al* (2016), l'exposition à l'acetamipride au stade de développement réduit le nombre des cellules nerveuses, ce qui contribue à des déficits neurocomportementaux, et engendre un changement transcriptionnel des gènes du cycle cellulaire et favorisé l'apoptose neuronal (Hung *et al.*, 2005).

6.2 Neurotoxicité de deltaméthrine

L'exposition au deltaméthrine (DM) même à des faibles doses induit l'augmentation des radicaux libres au niveau du réticulum endoplasmique (RE) donnant un stress oxydatif proapoptotique chez les neurones via l'augmentation des produits de la peroxydation lipidique et la diminution de l'activité des enzymes anti oxydantes (**Chin-Chan et al., 2015 ; Hossaine et al., 2015 ; Li et al., 2016**). La principale cible de la deltaméthrine (DM) est les canaux sodiques, elle se fixe sur ces canaux et prolonger la durée d'ouverture de ces derniers en réponses à une stimulation électrique (**Raymond-Delpech et coll, 2005**). En conséquence, l'influx continue de Na^+ favorise une dépolarisation prolongée de la membrane plasmique et augmente la concentration intracellulaire du Ca^+ ce qui induit l'activation des protéines Chops simultanément, suivie par une cascades d'activation des caspases 12, 9 et 3 respectivement ce qui provoque la fragmentation d'ADN (**He et al., 2012 ; Khalatbarry et al., 2015**). En plus, la DM peu bloqué les récepteurs de neurotransmetteur GABA (antagoniste non compétitif) dans les neurocytes (**Pellerin et al., 1994**). L'inhibition de ces récepteurs provoque une hyperexcitabilité neuronale et notamment une entrée massive de Ca^{+2} au niveau des récepteurs glutamatergique (**Grojean et al., 2001**).

*Chapitre III : Stress oxydatif et
antioxydants*

1. Généralités sur le stress oxydant

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre entre la production et l'élimination des radicaux libres (Lü et al., 2010 ; Uno et al., 2010), ces derniers sont des molécules ou des atomes qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe (Gardès-Albert et al., 2006), formés par la perte ou le gain d'électrons à partir d'un composé non radicalaire (Berger, 2006; Fontaine, 2007). Les radicaux libres sont souvent des molécules possédant un électron non apparié à son orbite externe ce qu'il le rend instable, donc il va augmenter son pouvoir oxydant et tentera de prendre un électron des substrats biologiques environnants. Les ROS possèdent deux sources de production, exogène comme les produits de radiation, les médicaments, les polluants d'air, les pesticides et les solvants organiques (Vergely et Rochette, 2005 ; Flora et al., 2008), et les sources endogènes notamment résident dans la mitochondrie, via sa chaîne respiratoire (Favier, 2003). En effet, environ 2 à 5 % de l'oxygène font l'objet d'une réduction monovalente suite à une fuite des électrons dans la matrice mitochondriale au cours de leurs transfert du complexe I au cycle des quinones (Balaban et al., 2005; Vergely et Rochette, 2005). Cette fuite est plus importante dans le cerveau à cause de ses demandes énergétiques élevées (20% de l' O_2 consommé) (Halliwell, 2006). En effet, pendant la réduction de l'oxygène par les cytochromes ils se forment les ROS comme l' O_2^\bullet , H_2O_2 et HO^\bullet sous l'effet des complexes I et III considérés comme générateurs potentiels de ces radicaux libres (fig.13).

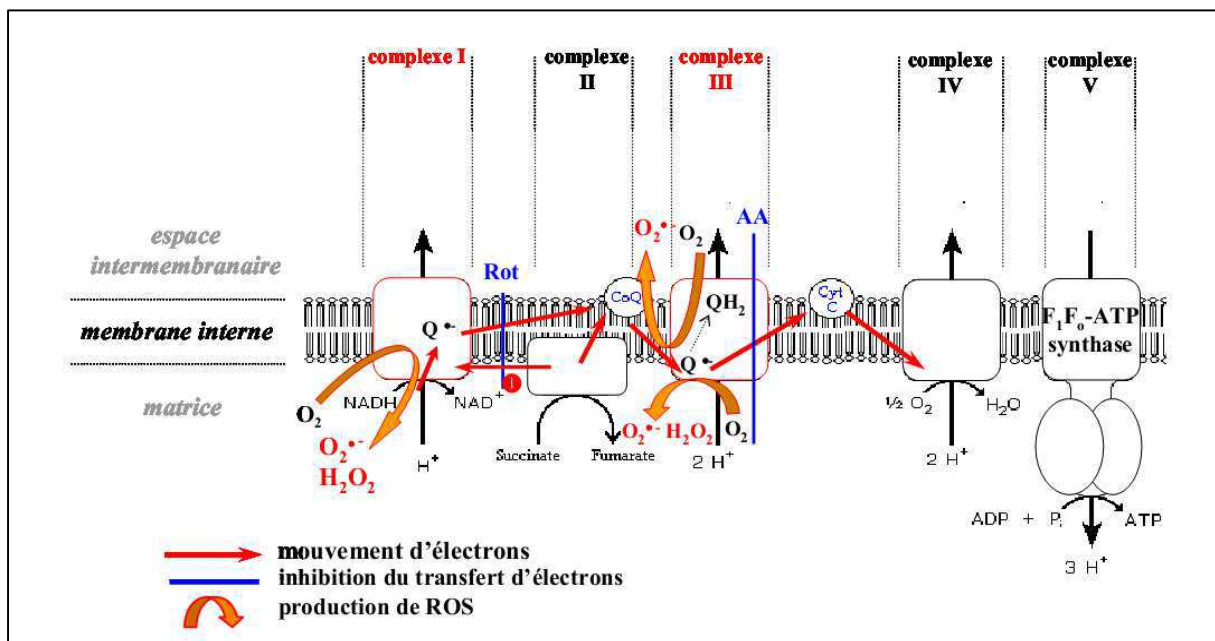
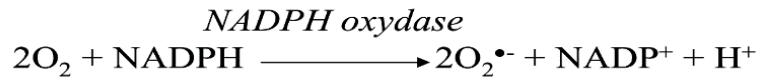


Figure 13. Sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire (Garait, 2006).

Par ailleurs plusieurs systèmes enzymatiques sont entraînés dans la production des ROS, entre autres la *NADPH* oxydase, xanthine oxydase, *NO* synthase, Myéloperoxydase.

- **NADPH oxydase** présente notamment dans les cellules phagocytaires, et est susceptible de produire de l'anion superoxyde lors de la phagocytose, en catalysant la réduction mono électrique du dioxygène en utilisant le *NADPH* ou le *NADH* comme donneur d'électrons selon la réaction suivante (Maghzal et al., 2012) :



Cette enzyme peut être activée par une voie de signalisation cellulaire intégrant la sensibilisation d'un récepteur membranaire associé à la protéine *G* suite à la fixation des facteurs cytosoliques tels que les Interleukines, le *TNF* ou encore les polysaccharides bactériens et médiée par les seconds messagers *DAG* et *IP3* (fig.14).

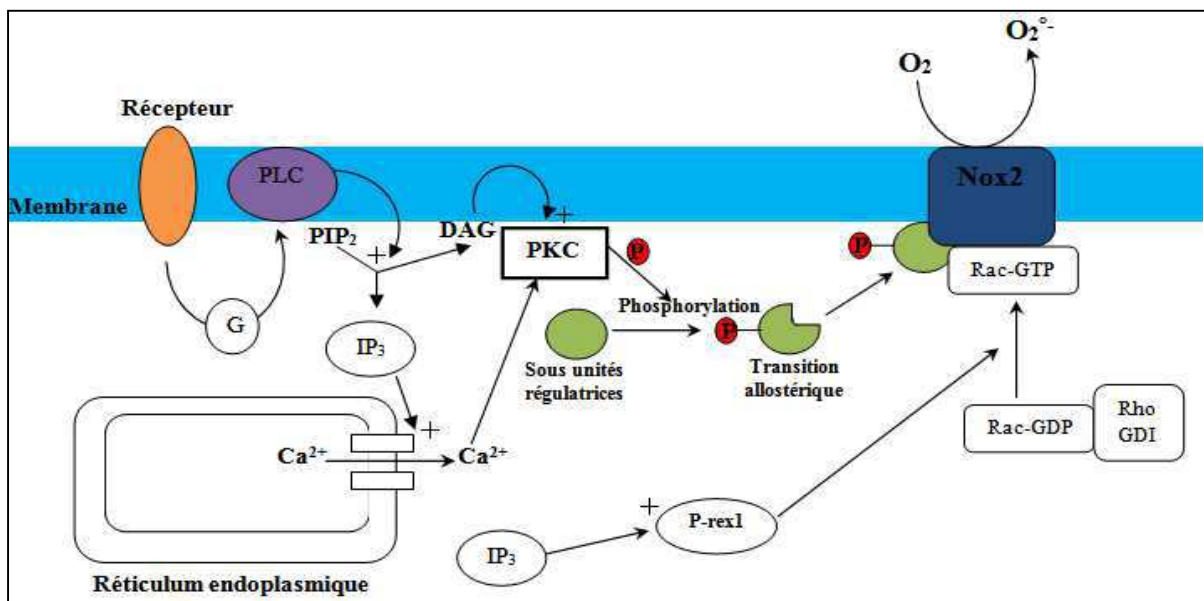
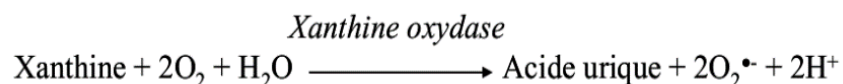


Figure 14. Cascade d'activation de Nox₂ et formation d'anion superoxyde (Barouki, 2006).

- La **xanthine oxydase (XO)** catalyse la dégradation de l'hypoxanthine en acide urique en condition de forte demande d'*ATP* et de déficit en oxygène. Mais elle peut également catalyser l'oxydation de la xanthine en acide urique, notamment lors d'ischémie reperfusion ou d'hypoxie. Dans cette réaction, l'oxygène moléculaire agit comme un accepteur d'électron produisant ainsi des radicaux superoxydes selon la réaction suivante (Barouki, 2006 ; Fontaine, 2007) :



La XO possède un complexe de cofacteur d'oxydoréduction *FAD* ; *Fe/S* et *MO*. Le *FAD* peut être réduit soit en *FADH₂* soit partiellement en *FADH*. Ces deux derniers subissent encore une fois une ré-oxydation par l'*O₂* selon l'illustration schématique suivante (fig.15) :

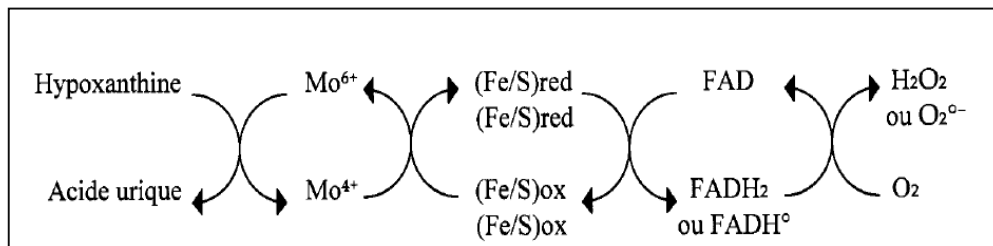


Figure 15. Chaîne de réactions lors de l'oxydation de l'hypoxanthine en acide urique (Barouki, 2006).

- **La NO synthase** est présente dans la cellule nerveuse et plus abondante chez la cellule phagocytaire et endothéliale. Sa structure est formée de deux sous unités (fig.16). La première sous unité représente le domaine réductase qui se trouve à l'extrémité C-terminale, et la deuxième sous unité représente le domaine oxydase qui se trouve à l'extrémité N-terminale. Le domaine réductase possédant 2 flavines *FMN* et *FAD* et un autre site pour la fixation de *NADPH* qui est le générateur d'électron, et un domaine oxydase possédant un hème et un coenzyme particulier le *BH4* et un autre site pour la L-arginine (Vamecq et al., 2004).

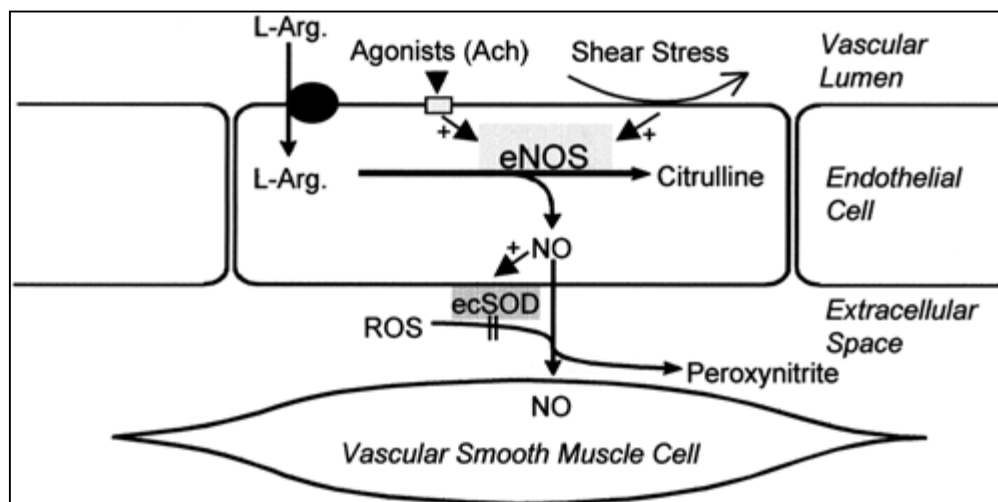
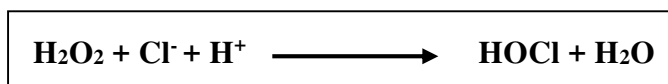


Figure 16. La voie principale de la production de NO à partir de *L-Arg* dans la cellule endothéliale (Walther, 2004).

Les deux domaines sont reliés par un pont protéique qui fixe une molécule de calmoduline qui est indispensable aux fonctionnements de complexe :

- **La myéloperoxydase (MPO)** de son côté catalyse la réaction suivante :



En utilisant le peroxyde d'hydrogène comme substrat oxydant, la myéloperoxydase sous forme pro-MPO et MPO mature exerce une activité de peroxydase et une activité de chloration (Bossy-Wetzel et al., 1998 ; Barouki, 2006).

2. Effets des radicaux libres sur l'organisme

2.1. Peroxydation lipidique

Les acides gras polyinsaturés comme les acides linoléiques ou arachidoniques sont les cibles privilégiées des radicaux libres oxygénés, Ceci conduit à une réaction en chaîne de peroxydation lipidique, qui modifie la fluidité et la perméabilité de la membrane (Martínez-Cayuela, 1995). L'auto-oxydation de molécules telles que la dopamine, l'adrénaline, les flavines et les hydroquinones est une importante source de ROS (Freeman & Crapo, 1981). Le produit direct de ces auto-oxydations est souvent l' $O_2^{\cdot-}$. Ainsi, l'auto-oxydation de la dopamine est en partie impliquée dans le processus apoptotique lors de pathologies neurodégénératives, notamment lors de la maladie de PA (Thannickal & Fanburg, 2000).

2.2. Oxydation des protéines

Les radicaux libres oxygénés induits des modifications dans les structures primaires, secondaires et tertiaires des protéines par la formation des dérivés protéiques carbonylés via plusieurs mécanismes incluant la fragmentation et l'oxydation des acides aminés (Aurousseau, 2004 ; Baudin, 2006).

2.3. Oxydation de l'ADN

Les ROS peuvent réagir avec la base de guanine (G) de l'ADN, pour la transformer en 8-hydroxy-2'déoxyguanosine (8-OH2DG) qui est capable d'induire des mutations spécifiques dans l'ADN pouvant conduire au développement du cancer (Collins et al., 1997).

3. Antioxydants

3.1. Système antioxydant enzymatique

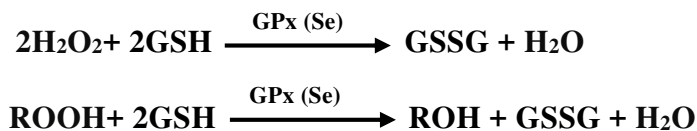
3.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)

Est la première ligne de défense enzymatique, catalyse la conversion de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) produit par la chaîne respiratoire mitochondrial en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), Chez les mammifères on trouve la SOD cytoplasmique (Cu-Zn-SOD), la SOD mitochondrial (Mn-SOD) (Badary et al., 2003). La SOD est retrouvée dans toutes les régions du cerveau. L'augmentation intense de son activité a été associée à des événements maniaques et dépressifs (Andreazza et al., 2007).



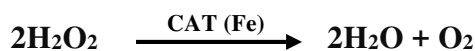
3.1.2. Glutathion peroxydase (GPx)

C'est la deuxième ligne de défense enzymatique, empêche la formation des radicaux libres, chez les mammifères. C'est une enzyme à sélénium présente dans le cytosol et la mitochondrie. Elle peut réduire d'une part l' H_2O_2 en H_2O et d'autre part les hydroperoxydes organiques (ROOH) en alcool (ROH) (Favier, 2003 ; Fontaine, 2007).



3.1.3. Catalase (CAT)

La CAT est présente principalement dans les peroxysomes, lysosomes et les mitochondries. Neutralise le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et oxygène moléculaire. La CAT et la GPx ayant des niveaux faibles dans le cerveau par rapport au niveau de SOD, c'est pourquoi un effort oxydant créé par un taux élevé de métabolisme peut favoriser les maladies neurodégénératives (Casetta et al., 2005).



3.2. Système antioxydant non enzymatique

3.2.1. Glutathion (GSH)

Le glutathion réduit est un tripeptide caractérisé par la présence d'un groupement sulfidryle, ce dernier est responsable de la réduction des radicaux libres (Gardès-Albert, et al., 2003), selon la réaction :



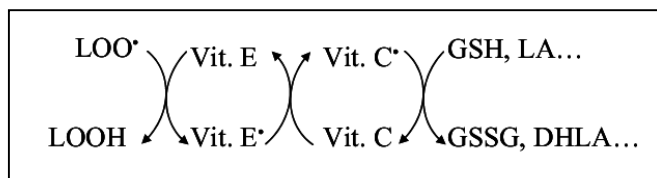
Le glutathion peut également réagir avec les ions Fe^{3+} et Cu^{2+} et ainsi limiter leur participation à la génération des radicaux libres par la réaction de Fenton :



3.2.2. Vitamines

Chez l'homme le α -tocophérol est la forme la plus active de la vitamine E, sa fonction principale est de protéger contre la peroxydation lipidique. Dans le système nerveux des

mammifères, la vitamine E joue un rôle important et son insuffisance peut causer des maladies neurologiques (Atessahin et al., 2005). C'est une vitamine hydrosoluble importante et puissante à des concentrations très élevées dans le cerveau particulièrement dans les compartiments vésiculaires des neurotransmetteurs mono-aminergiques (Lee et al., 2004). Les réactions d'élimination des radicaux lipidiques par les vitamines comme suivant :



Les systèmes producteurs de ROS et antioxydants doivent exister en équilibre pour maintenir les cellules neuronales dans un état fonctionnel normal et les prévenir des effets délétères des espèces radicalaires (fig.17).

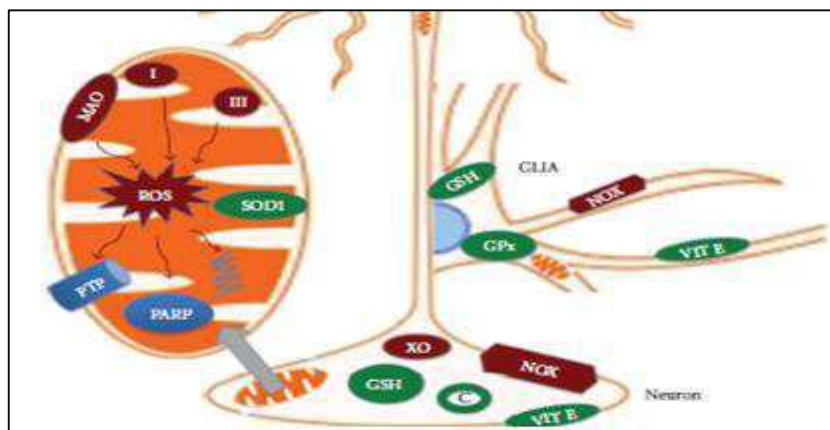


Figure 17. Les principaux producteurs des ROS et le système antioxydant dans les neurones et les cellules gliales (Gandhi et Abramov, 2012).

3.2.3. Oligoéléments

Le cuivre, le zinc, le manganèse, le sélénium et le fer sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant (Zahran et al., 2017). Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPx de sélénium. Cependant, certains oligoéléments, notamment le fer, lorsqu'ils sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite, peuvent avoir une action pro-oxydante (réaction de Fenton, d'Haber-Weiss) (Garait, 2006).

3.2.4. Ubiquinones et cytochrome c

Il a été décrit précédemment que les ubiquinones, sous leur forme semi-radicalaire, jouaient un rôle fondamental dans la production de *ROS*. Inversement, il a pu être défini que la forme "*ubiquinol*" agissait comme antioxydant. L'ubiquinol protège les membranes de la peroxydation lipidique par une diminution de la formation et de la propagation de radicaux peroxy. L'ubiquinone est également impliquée dans la régénération de la vitamine E ce qui amplifie son rôle protecteur contre les *ROS* (Packer et al, 1997). Le cytochrome c présent dans l'espace intermembranaire a un rôle de détoxification en captant l'électron libre d' $O_2^{\cdot-}$ produit au niveau de la chaîne respiratoire. Ainsi réduit, il cède cet électron au complexe IV formant du *Cyt-c* oxydé et de l' H_2O (Garait, 2006).

3.2.5. Polyphénols

Les polyphénols sont des composés issus de végétaux, dont la principale caractéristique structurale commune est la présence d'une ou de plusieurs fonctions hydroxyles (OH) liées à un noyau aromatique, formant ainsi des groupes benzéniques (Bors et al., 2001 ; Turner et al., 2016). Ils sont produits par les plantes où ils jouent un rôle dans les mécanismes de défense contre les pathogènes ou les radiations. Ces molécules sont également des pigments qui donnent leurs couleurs aux plantes. Dans notre alimentation, les polyphénols sont présents dans les fruits et les légumes, mais aussi dans le vin, le thé ou le café (Toumi, 2016). L'apport alimentaire de ces composés aurait des effets bénéfiques dans la prévention de pathologies diverses, telles que les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, l'ostéoporose ou le cancer. L'activité biologique des polyphénols est principalement attribuée à leurs propriétés antioxydantes par leurs structures chimiques et la présence de groupements hydroxyles réactifs (Godoy et al., 2016). En plus de leurs actions préventives, les polyphénols ont également un potentiel thérapeutique intéressant. A des fortes concentrations, ils sont capables d'induire l'apoptose de cellules cancéreuses, mais de telles concentrations sont peu compatibles avec une application clinique (Liu et al. 2006 ; Dong et al., 2014 ; Bouhaddouda, 2016).

Dans cette étude nous avons choisi la quercétine pour essayer comme protecteur contre la neurotoxicité de deltaméthrine et d'acetamipride.

Chapitre IV : Quercetine

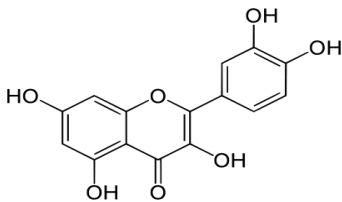
1. Généralité sur la quercétine

La quercétine est un flavonoïde alimentaire important présent dans plusieurs fruits et légumes (Sashindran, 2015). Elle est connue pour être une molécule anti-inflammatoire, anticancéreuse, antioxydante et neuroprotecteur contre les dommages de stress oxydatif par l'élimination des actions délétères des radicaux libres auprès de structures cellulaires dont l'ADN et les membranes phospholipidiques et par leur capacité à moduler intracellulaire des signaux favorisant la survie cellulaire (Leclerc, 2012 ; Godoy et al., 2016 ; Turner et al., 2016).

2. Propriétés de la quercétine

Le tableau 03 présente les principales caractéristiques physico-chimiques et biologiques de la quercétine.

Tableau 03 : Principales caractéristiques de la quercétine (Leclerc, 2012 ; Godoy et al., 2016)

Nom et Formule chimique	3,3',4',5,7-pentahydroxy-2-phénylchromén-4-one (C ₁₅ H ₁₀ O ₇)
Structure	
Propriétés Physicochimiques	Poudre blanche peu hydrosoluble (3 à 4 g/L selon pH) et non volatile (tension de vapeur < 1 µPa à 25°C)
Classement réglementaire	T : Directive 67/548/EEC
Persistance d'action	Demi-vie sur le sol comprise entre 4 à 6 jours. Délai d'emploi avant récolte selon le type de culture
Teneurs max en résidus dans et sur les denrées	0,03 (Thé noir) à 1800 (Câpre) mg/kg selon le type de culture
DL₅₀	161 mg/kg/j (oral chez les rats)
Organes cibles	SNC : ataxie et trémulations. Foie : hypertrophie lobulaire.
Génotoxicité	Résultats équivoques sur tests in vitro, négatifs sur tests in vivo
Reprotoxicité	Pas d'effet tératogène ni fœtotoxique (rat, lapin)

3. Classification et sources de quercétine

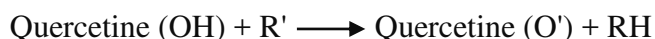
On trouve la quercétine (QR) dans la catégorie des flavonols. Elle est caractérisée par une particularité structurale posséder des groupes hydroxyles (OH) aux positions 3, 5, 7, 3' et 4'. La QR se trouve le plus couramment dans la nature sous une forme glycosylée (Guillaume Jacquemin, 2010 ; Leclerc, 2012). Elle se trouve en plus grande quantité dans certains aliments (tab.04). Sa teneur peut varier fortement selon des facteurs génétiques ou physiologiques liés à la plante (Bouhaddouda, 2016).

Tableau 04. Teneur en équivalent quercétine de quelques fruits et légumes (Leclerc, 2012).

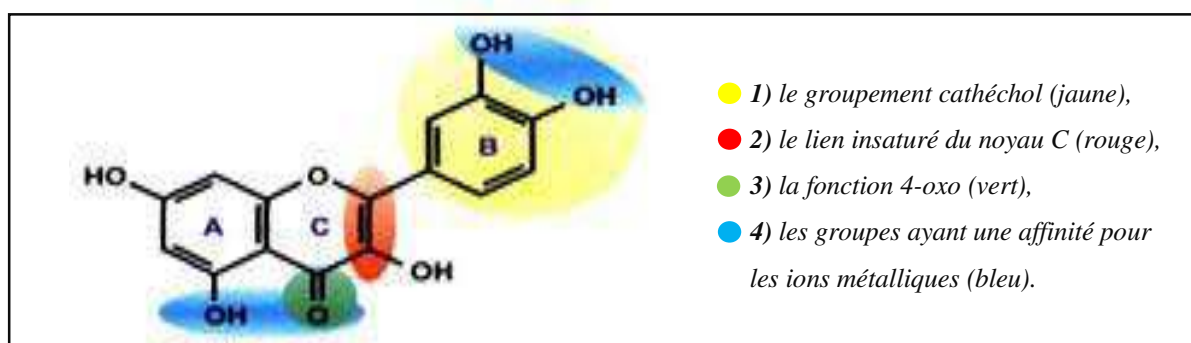
Fruit ou légume	Quantité (mg/100g)
Oignon	3,5
Pomme	4 -14
Tomate	1,1
Canneberge	13
Olive	6 - 12,2
Raisin	3,6

4. Mode d'action de la quercétine

La quercétine peut d'abord piéger directement un radical libre et réagir avec lui pour le stabiliser, selon l'équation suivante :



Où le **R'** est le radical libre et le **RH** est le radical libre oxygéné. Ici, c'est le groupement hydroxyle (OH) de la quercétine qui réagit avec le radical libre (O°). Il en résulte une oxydation de la quercétine par le radical libre qui lui devient inactif (Nijveldt *et al.*, 2001). Ce sont les deux hydroxyles du groupement catéchol (fig.18) ainsi que accéder au paramètre de l'insaturation en 2,3, conjugué à la fonction 4-oxo, du noyaux C qui sont responsables de la capacité antioxydante de ce flavonoïde (Bors *et al.*, 2001). Une manière de palier à ce manque de solubilité consiste à conjuguer la quercétine pour former un complexe capable de rester en suspension dans le milieu aqueux. Elle est aussi capable d'associer avec certaines molécules solubles comme la cyclodextrine (Ficarra *et al.*, 2002 ; Calabrô *et al.*, 2004).

**Figure 18.** Structure de la quercétine et leurs caractéristiques. (Williams *et al.*, 2004).

La quercétine est capable d'agir au niveau la voie intrinsèque et/ou extrinsèque pour contourner la résistance à *TRAIL* (Manouchehri *et al.*, 2016), en modulant des régulateurs clés de l'apoptose (Fig.19) tels que les récepteurs de *TRAIL*, *c-FLIP*, les protéines des familles *Bcl-2* ou *IAP*, facteurs de transcription, des voies de survie tels l'*Akt* et les *MAPK* (Turner *et al.*, 2016 ; Williams *et al.*, 2004 ; Toumi, 2016).

Cette polyvalence expliquée comment ces composés sont capables de contourner différents types de résistance à *TRAIL*, comme par exemple un blocage de la voie extrinsèque, de la voie intrinsèque, ou l'activation de voies de survie. Dans la plupart des cas, le suppresseur de tumeur *p53* n'est pas requis pour l'obtention de l'effet synergique (Bouhaddouda., 2016 ; Manouchehri et al., 2016 ; Turner et al., 2016). La grande capacité de quercétine à contrecarrer les radicaux libres et à chélater les ions des métaux de transition est directement reliée à leurs caractéristiques structurales. Il est prouvé que cette activité est due aux nombres et aux positions des groupements hydroxyles présents sur les cycles benzoïques (Turner et al., 2016). La quercétine agit contre la peroxydation lipidique de deux façons ; par la protection des lipides contre les initiateurs de l'oxydation ou par l'arrêt de la phase de propagation. Dans le premier cas, les antioxydants dits préventifs entravent la formation des *ERO* ou éliminent les espèces réactives responsables de l'initiation de l'oxydation comme O_2° , O° et OH° (Maalik et al., 2014). Dans le deuxième cas, les antioxydants dits briseurs de chaîne perdent généralement un atome d'hydrogène en faveur des radicaux propagateurs de l'oxydation (LOO°) pour stopper la propagation de la peroxydation (fig.19) (Laguerre et al., 2007 ; Leopoldiniet al., 2011).

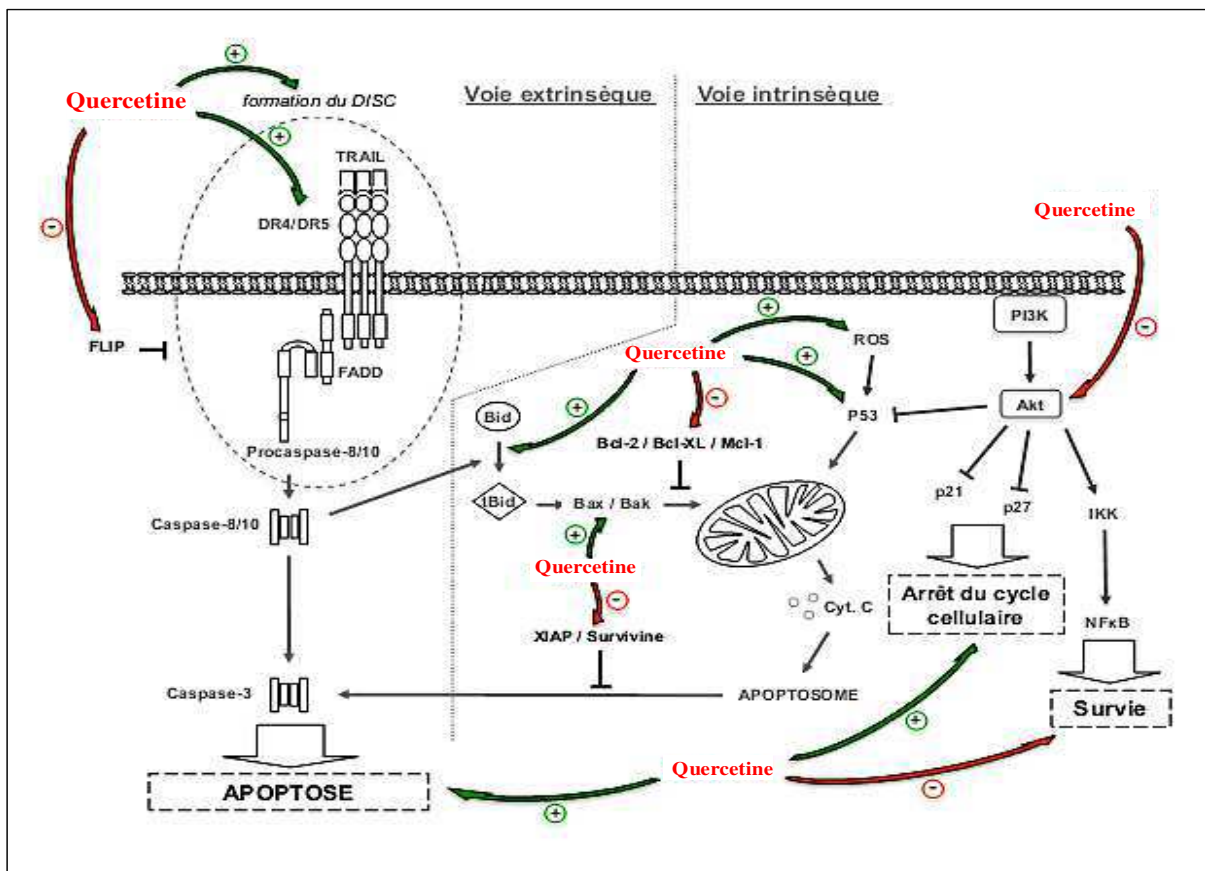


Figure 19. Modes d'action de la quercétine dans la cellule cérébrale (Bouhaddouda, 2016).

5. Toxicité de la quercétine

A plus fortes doses (>40 μM), la quercétine aurait un effet pro-oxydant en favorisant la formation de radicaux libres (Sakao *et al.*, 2009). Ce stress oxydatif entraînerait des dommages à l'ADN irréversibles, conduisant au déclenchement de l'apoptose (Manouchehri *et al.*, 2016). La quercétine utilisée à de telles concentrations aurait donc un effet thérapeutique, et préventif (Turner *et al.*, 2016). De façon surprenante, cet effet proapoptotique de la quercétine cible spécifiquement les cellules malignes en épargnant les cellules saines. L'origine de cette spécificité n'est pas encore clarifiée (Guillaume Jacquemin, 2010).

6. Impact bénéfique quercetine sur l'organisme

La quercetine est très reconnue comme produisant des effets physiologiques précis. On parle alors de la phase pharmacodynamique, ou de l'étude des effets biochimiques et physiologiques des principes actifs et de leurs mécanismes d'action. Sa capacité antioxydante est souvent considérée comme la principale manière dont la quercetine agit sur l'organisme (Nijveldt, 2001 ; Leclerc, 2012). Cependant, Williams *et al.* (2004) ont aussi suggéré que les effets de quercetine n'est pas seulement liés à sa capacité de piéger des radicaux libres dans son environnement, mais aussi à sa présence à certains sites dans l'organisme où elle peut interagir avec des molécules tels des récepteurs, des enzymes ou des facteurs de transcription. Cette conclusion met en lumière la nécessité, pour la quercetine, administrées par voie orale, de parvenir à son site d'action (Turner *et al.*, 2016). La quercetine provenant des aliments serait associée à la modulation de nombreuses fonctions biologiques et physiologiques, dont les principaux bénéfiques seraient un effet protecteur contre le cancer ou certaines maladies neurodégénératives (Maalik *et al.*, 2014), ainsi qu'un effet anti inflammatoire (inhibition de deux enzymes jouant un rôle de médiateurs de l'inflammation ; la cyclooxygénase et de la lipoxygénase) et la prévention de maladies cardio-vasculaires (Leclerc, 2012 ; Liu *et al.*, 2016). La quercetine aurait présenté un effet préventif contre certains cancers. En effet, des études tant *in vitro* que *in vivo* ont démontré que la quercetine avait la capacité de ralentir la croissance de cellules tumorales humaines (Kuo *et al.*, 2004) d'une part, mais aussi en fort dose capable d'induire l'apoptose, ou mort programmée de celles-ci (Kuo *et al.*, 2004 ; Guillaume Jacquemin, 2010 ; Lucio *et al.*, 2016).

Partie

Pratique

1. Matériel et méthodes

1.1. Matériel

1.1.1. Produits chimiques

Dans ce travail, nous avons utilisé la quercétine pourchassée de Sigma Aldrich, Germany ; l'acetamipride (*Mospilan*[®]) acheté de Yu Full Industry Co., Ltd, India. La deltamethrine (*Deltamethrin*[®]) fabriqué par Averstar industrial Co., Ltd, Sz, La Chine. Pour l'évaluation des paramètres biologiques nous avons utilisé des produits et des réactifs majoritairement provenant de sigma, Germany et Biochem, France. Aussi des kits pour doser les neuromédiateurs et les enzymes (Cytochrome-c, Caspase-3, Acétylcholine...).

1.1.2. Les animaux de laboratoire

La présente étude a été réalisée sur des rats mâles *Rattus rattus* de la souche Wistar au nombre de 64 rats, provenant de l'institut Pasteur d'Alger, âgés de 06 à 08 semaines pesant environ 220-260g. Ce sont des mammifères de l'ordre des rongeurs. Largement utilisés dans divers domaines de la recherche expérimentale.

1.2. Méthodologie

1.2.1. Entretien des animaux

Les rats ont été répartis en huit (08) lots à raison de huit (08) rats par lot. Ils ont été soumis à une période d'adaptation de 10 jours dans l'animalerie de département de biologie, Faculté des Sciences, Université de Tébessa. La température ambiante est de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ et une photopériode naturelle 12/12H avec une hygrométrie de 60 %. Les rats sont élevés dans des cages en polyéthylène (04 rats pour chaque cage) qui sont tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois. Les cages sont nettoyées et la litière est changée une fois par deux jours jusqu'à la fin de l'expérimentation. Les animaux ont été nourris d'un concentré de croquets énergétiquement équilibré composé de maïs 62(%), le soja 26(%), phosphate 1,6(%), cellulose 1,0(%), minéraux 1,0(%), vitamines 1,0(%).

1.2.2. Choix des doses

Dans cette étude, nous avons utilisé deux pesticides (l'acetamipride et la deltamethrine) seuls ou en mixture à des doses consécutives de 3,14mg/kg/j et 0,32mg/kg/j administrées chroniquement par voie orale pendant 90 jours. Le choix de ces doses est basé sur des études réalisées sur l'exploration de ces deux pesticides dans les matrices biologiques qui ont montré

des valeurs de 0,2 à 800ng/g de deltaméthrine (DM) dans le miel (**Haddadi & Shirani, 2014 ; Shirani et al., 2016**) et de 24 à 105ng/l d'acetamipride (AC) dans l'eau (**EFSA, 2013 ; Zhang et al., 2017**). Il est à mentionner que ces doses sont très proches à la réalité et sont susceptibles de contaminer la population générale. Par ailleurs, la dose de la quercétine (QR) utilisée en traitement préventif des animaux contre la toxicité des pesticides utilisés était de 10mg/kg/j selon des études récents (**Teixeira, 2002 ; Lahoual et al., 2015 ; Beghoul et al., 2017**).

1.2.3. Répartition et traitement des rats

La répartition et le traitement des animaux sont récapitulés dans la figure 20 et illustrés comme suit :

- Lots T : lot témoin (T) reçoit l'eau distillée par gavage 0,5ml/jour pendant 90jours.
- Lots QR : traité par la QR recevant 10mg/kg/jour pendant 90jours
- Lots AC : traité par l'AC recevant 3,14mg/kg/jour pendant 90jours.
- Lots DM : traité par la DM à la dose de 0,32mg/kg/jour pendant 90 jours.
- Lots QR/AC : traité par la QR (10mg/kg/j) et l'AC (3,14mg/kg/j) pendant 90 jours.
- Lots QR/DM : recevant la QR (10mg/kg/j) et la DM (0,32mg/kg/j pendant 90 jours.
- Lots AC/DM : traité par l'AC (3,14mg/kg/j) et la DM (0,32mg/kg/j pendant 90jours.
- Lots QR/DM/QR : traité par la QR (10mg/kg/j), l'AC (3,14mg/kg/j) et la DM (0,32mg/kg/j) pendant 90 jours.

Remarque : Deux rats de chaque lot a été utilisé pour l'étude histologique et les six restants ont été utilisés pour les dosages des différents paramètres biologiques.

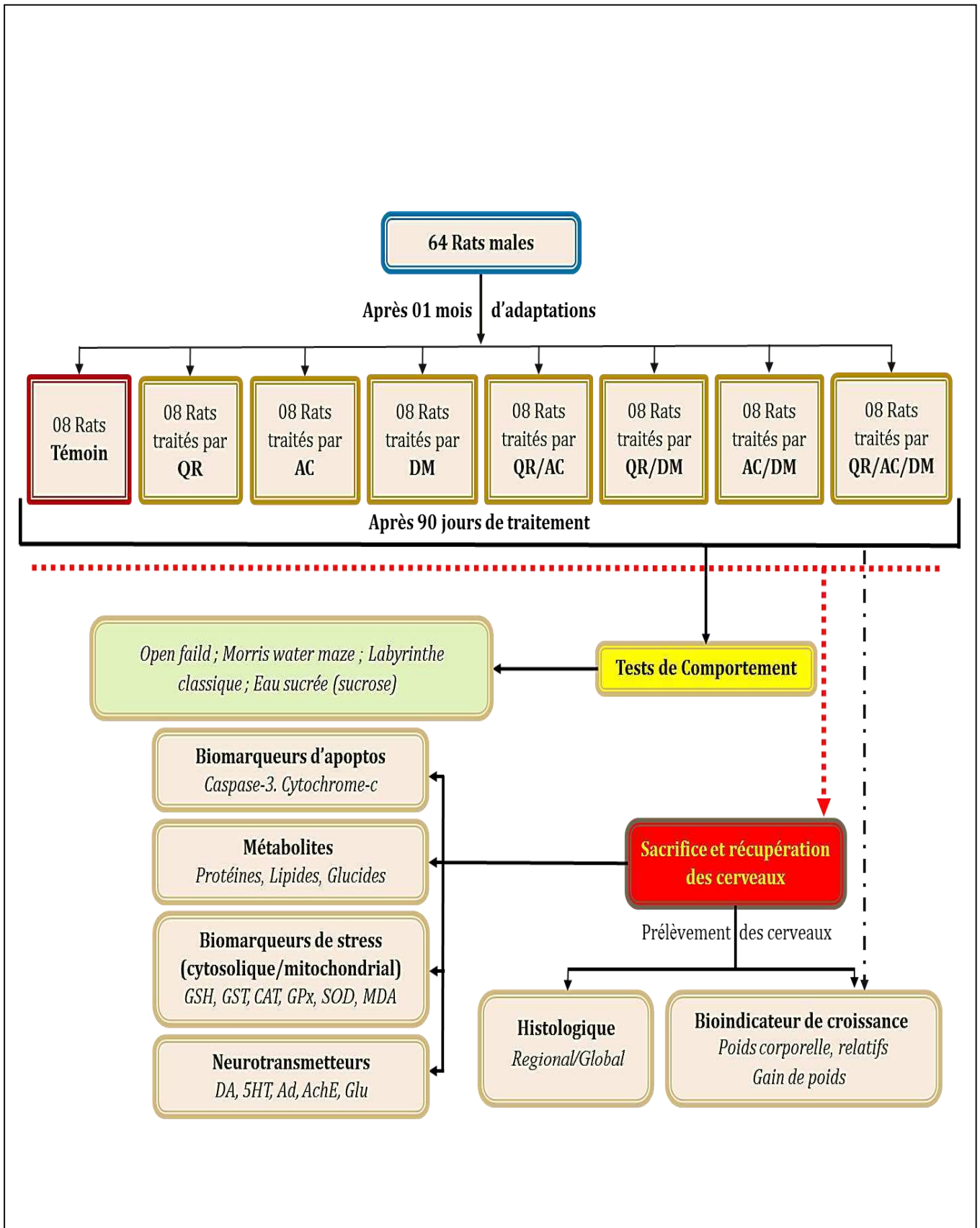


Figure 20. Schéma récapitulatif du protocole expérimental

1.2.4. Evaluation de la neurotoxicité des pesticides et effet préventif de la quercétine

Après 3 mois de l'exposition des animaux aux pesticides, deux méthodes d'approches ont été appliquées pour évaluer l'impact de ces pesticides sur le neurocomportement des rats et l'évaluation également de l'intégrité structurale et fonctionnelle des cellules nerveuses tant au niveau global que régional du cerveau, rajouté à cela l'évaluation de l'activité préventive de la quercétine contre cette neurotoxicité.

1.2.4.1. Mesure de poids

La mesure de poids est effectuée sur les rats tout jour pendant la durée d'élevage, soit au cours de l'adaptation (pour l'évaluation des changements possibles par la nourriture ou le lieu (facteurs externes)) ou au cours de traitement (pour évalue les effets des xénobiotiques) à l'aide de petit balance de 500g (Marque Aston®),

1.2.4.2. Etude neurocomportementale

Cette approche est une première dans notre faculté ayant pour but d'évaluer les effets neurotoxiques induits par l'exposition aux polluants sur le comportement global des animaux en l'occurrence la mémorisation, l'apprentissage et l'anxiété, et l'effet protecteur de la quercétine. Pour atteindre cet objectif, plusieurs tests ont été élaborés tels que : le *test de la piscine de Morris*, *test d'Open Field*, *test de labyrinthe classique*, *test de sucrose (test d'anhédonie)*.

- **Test de la piscine de Morris**

Le but de ce test est l'évaluation des capacités des rats à mémoriser et à gérer l'information spatiale pour échapper à une situation aversive (l'eau d'un bassin) en atteignant un refuge le plus rapidement possible (**Morris, 1984**). Le dispositif expérimental est constitué d'un bassin circulaire en métal blanc de 150 cm de diamètre et de 50 cm de hauteur. Ce bassin est rempli d'eau que l'on rend opaque par addition de lait en poudre après le 5^{ème} jour du test. L'eau est changée quotidiennement. La température relativement basse de l'eau (20°C) confère à ce test un caractère aversif pour l'animal. Une plate-forme (15 cm de diamètre) poreuse est disposée à l'intérieur de l'enceinte de couleur transparente, située en relief (1cm) de la surface de l'eau et visible pour l'animal le premier jour du test (fig.21). Elle est rendue invisible par l'ajout de lait à l'eau et submergée de 1 cm de la surface de l'eau. Dans la pièce, sont disposés plusieurs indices distaux (armoire, évier, chaise, tables) susceptibles de permettre à l'animal de se repérer dans l'espace. Ainsi, l'animal peut repérer la position de la plate-forme par rapport à

un cadre de référence allocentrique comportant ces divers indices distaux. Dans cette tâche, l'animal cherche à trouver refuge sur la plate-forme le plus rapidement possible. Le test a été réalisé en six jours :

Le 1^{er} jour : Le test se déroule en quatre essais de 1min à 15min (la durée de résistance dans l'eau du rat) durant lesquels la plate-forme est visible (l'eau limpide) et en relief. Les positions de la plate-forme et les points de lâcher prise des rats sont différents dans chaque essai, alors que la distance entre le point de lâcher prise de l'animal et l'emplacement de la plate-forme est identique dans les 4essais. Ce jour est réservé uniquement à initier les animaux à ce test sans prendre des mesures.

Du 2^{eme} au 5^{eme} jour : Le protocole consiste à localiser la plate-forme immergée rendue invisible dont la position reste inchangée (ici dans le quadrant Ouest) au cours des 4jours consécutifs. Chaque rat subit une séance quotidienne de 4essais séparés par un délai de 15min. A chaque essai, l'animal est déposé dans l'eau face à la paroi depuis un point de départ déterminé qui varie d'essai en essai. L'essai se termine lorsque le rat a atteint la plate-forme, ou après l'écoulement d'une 1min, le rat qui ne trouve pas la plate-forme est guidé vers cette dernière et y reste 20secondes pour mémorisation.

6^{eme} jour : les rats subissent un test de rétention dans le bassin de 60s, le protocole consiste à retirer la plate-forme du bassin et mesurer principalement le temps passé dans le quadrant qui contenait la plate-forme (PF) au cours des essais précédents (le quadrant Ouest), ainsi que le nombre de passages au-dessus de l'emplacement exact où se trouvait la plate-forme (CP) le plus rapidement possible.

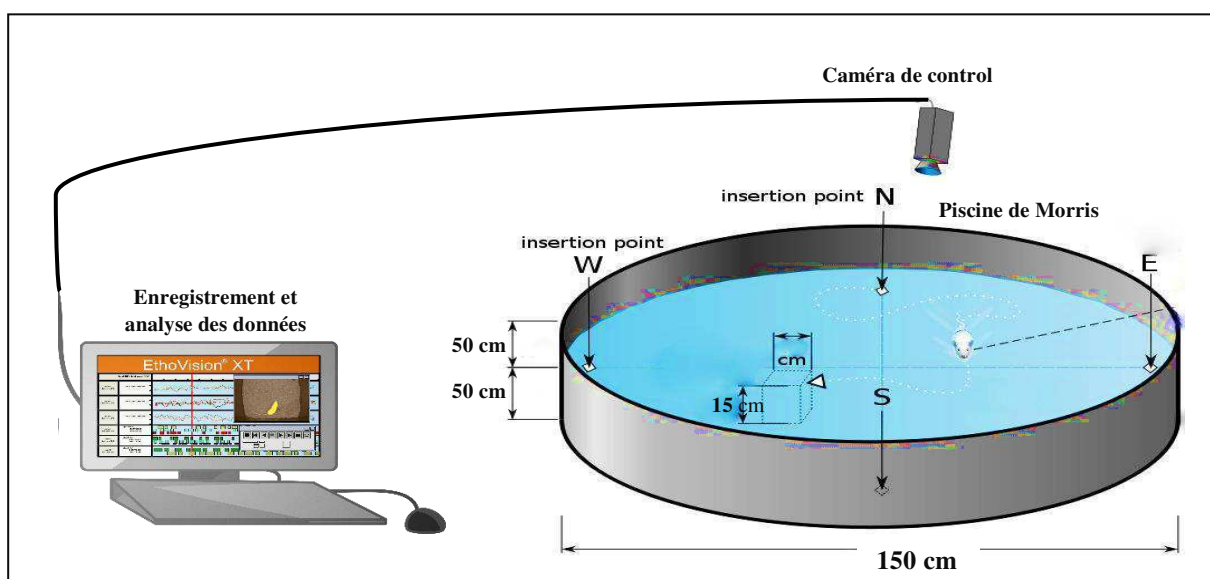


Figure 21. Les instruments du test de Piscine de Morris.

- **Test d'Open Field**

Ce test a été réalisé pour évaluer l'activité locomotrice des rats (**Zhang et al., 2007**). Il est caractérisé par les mouvements horizontaux et verticaux des animaux dans la cage d'expérimentation. L'Openfield constitue un environnement stressant pour le rat. Il s'agit en effet d'un animal nocturne qui préfère les espaces confinés, clos et peu éclairés, et est effrayé par les grands espaces, où il va peu au centre et longe les murs. L'Openfield utilisé était une boîte transparente en verre, carrée et ouverte (50×50×40cm) (fig.22). L'observation des animaux commence quelques secondes après l'introduction des animaux dans la cage d'observation. Ce test analyse le comportement exploratoire du rat dans un espace clos. On l'utilise avant tout pour mesurer ses fonctions motrices, mais aussi, pour évaluer son degré d'anxiété. Un animal anxieux évite le centre du terrain qui est ouvert, et reste au périphérique. Chaque rat était initialement placé dans un des quatre coins de l'Open Field, la tête orientée vers le coin. Son comportement a été observé pendant quelques minutes pour mesurer la distance parcourue par les rats, entre chaque essai on nettoie la cage avec l'éthanol 10%.

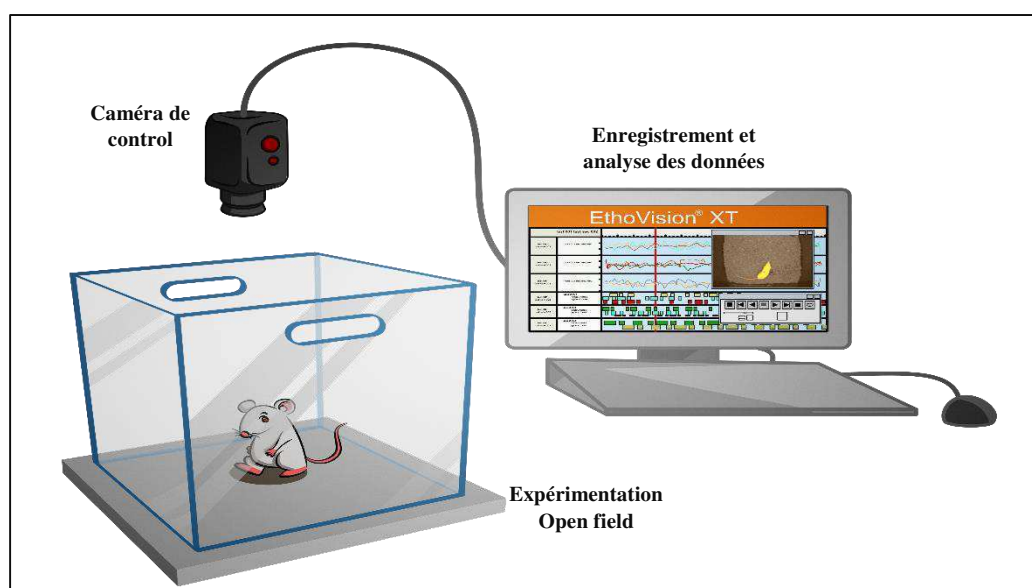


Figure 22. Les instruments du test d'open Field

- **Test de labyrinthe classique**

Pour élucider le comportement de mémorisation et d'apprentissage en cas de l'animal stressé, nous avons procédé à la réalisation d'une expérimentation d'anxiété (test de labyrinthe classique). Ce test est réalisé dans une enceinte de forme carré (120x120x35 cm) en plastique 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 (fig.23). Ce labyrinthe 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.

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. La durée du test est de 20min, et entre chaque essai le labyrinthe est nettoyé avec de l'éthanol 10% (Ku Ili Jaako-Movits et *al.*, 2005).



Figure 23. Les instruments du test de labyrinthe classique

- **Test de sucrose (test d'anhédonie)**

Dans ce test, on mesure le taux de l'eau sucrée (saccharose) consommé selon **Serchov et al., (2016)**. Les effets des xénobiotiques sur la consommation de saccharose ont été examinés par un test utilisant deux bouteilles similaires de 150ml, l'une est contenant l'eau pure et l'autre contenant de l'eau sucrée. Les rats ont libre accès aux bouteilles. On mesure le volume

d'eau dans ces bouteilles chaque trois heures, le volume consommé est la moyenne de consommation de trois essais au minimum (fig.24).



Figure 24. Les instruments de test de sucrose (Serchov *et al.*, 2016).

Les trois tests réalisés (Open Field, labyrinthe et piscine de Morris) ont été filmé à l'aide d'une caméra vidéo qui transmet l'image à un ordinateur qui les digitalise et l'enregistre. A partir de cet enregistrement, l'ordinateur calcule les paramètres requis à l'aide d'un logiciel *Ethovision video tracking system, version 10, Noldus Information Technology, France*.

1.2.4.3. Etude de l'intégrité cellulaire et moléculaire des neurocytes

A. Sacrifice et extraction du cerveau

A la fin de la période d'administration des xénobiotiques (QR, AC et DM) de 03mois, les animaux sont sacrifiés par décapitation, les cerveaux ont été rapidement prélevés et rincés dans le tampon de lavage à froid, puis séchés à basse température (4°C) par un papier semi absorbant. Les cerveaux de chaque lot sont pesés et répartis comme suivant :

- 01 cerveau conservé totalement dans la solution préparée de Formol (10%) pour une étude histologique globale (topographie du cerveau).
- 01 cerveau est conservé sous forme de régions (hippocampe, striatum) dans la solution préparée de Formol (5%) pour une étude histologique tissulaire.
- Les 06 autres cerveaux servent à l'extraction de l'hippocampe et de striatum et cerveau global servant d'échantillons pour évaluer le gonflement, la perméabilité et respiration mitochondriales sur des mitochondries fraîches et aussi d'échantillons à conserver à -80°C pour le dosage des paramètres biochimiques apoptotiques (Cytochrome c et Caspase 3) et du stress oxydatif tels que le GSH, GST, GPx, CAT, SOD et MDA dans la mitochondrie et le cytosol des neurocytes.

B. Estimation du poids relatif du cerveau

Le poids relatif des cerveaux extraits des rats (PRC [g/100g de poids corporel]) est calculé par rapport au poids total du rat selon la formule suivant :

$$\text{PRC (g/100g de PT)} = \text{PC/PT} \times 100$$

PC : poids du cerveau (g). *PT* : poids total de rat (g). *PRC* : poids relatif des cerveaux (g)

C. Préparation des échantillons cytosoliques

un gramme de tissu nerveux a été homogénéisé dans 2ml de solution de tampon phosphate salin (PBS ; pH 7,4). Ensuite les homogénats ont été centrifugés à 3000t/min pendant 15min à 4°C et le surnageant résultant a été utilisé pour la détermination de taux de MDA, GSH et l'activité enzymatique de GST, GPx, SOD et CAT.

D. Préparation des suspensions mitochondriales

L'extraction des mitochondries se fait selon la méthode décrite par **Rustin et al (1994)**, il s'agit d'une purification par centrifugation différentielle. Brièvement, après décapitation des rats, les cerveaux sont rapidement prélevés et immerger dans du tampon TSE (10mM tris, 250mM sucrose, 0,1mM EDTA, pH 7,2 à 4C°). Les tissus nerveux sont coupés finement et potérisés dans 3,5ml de TSE, ce qui permet la destruction des cellules et la libération des mitochondries. L'homogénat récupéré est centrifugé à 10000t/min pendant 10min permettant ainsi l'élimination des gros débris cellulaires. Le culot récupéré est centrifugé une deuxième fois à 10000t/min pendant 10min. Les surnageant issus des deux centrifugations sont récupérés et centrifugés à 14000t/min à 4C° pendant 10min. Le culot obtenu est resuspendu dans 1ml du TSE et centrifugé à 14000t/mn pendant 10min. Le culot issu de cette dernière centrifugation est resuspendu dans 1ml du tampon TS (250mM sucrose, 50mM tris, pH 7,2 à 20 C°) et centrifugé pendant 10min à 14000t/mn. Le culot final constitué des mitochondries, et est récupéré dans 500µl de tampon TS pour obtenir la suspension mitochondriale fraîche dont une fraction servira directement dans l'évaluation de l'intégrité structurale et fonctionnelle des mitochondries, le reste est conservé à -80° C pour la suite des dosages.

E. Préparation de la matrice mitochondriale

La suspension mitochondriale est congelé-décongelé de 6 à 8 fois avec potérisation accrue et répétée, afin d'éclater les mitochondries. Après centrifugation de 10min à 9600t/min, le surnageant est utilisé comme source des paramètres de stress (**Lahouel et al., 2015**).

F. Evaluation du gonflement, perméabilité et respiration mitochondriales

Selon la méthode de **Crystal et al (1996)**, nous avons réalisé l'estimation de la perméabilité mitochondriale basée sur le taux des ions de Ca^{++} qui traversée leur membranes, cette perméabilité suivie par une augmentation de la taille de la mitochondrie détectée à une longueur d'onde de 540 nm pendant 3 minutes et chaque 30sec. La respiration a été estimée en utilisant un Oxygraph (*Hansatech*®) selon la méthode décrite par **Rouabhi et al (2006 ; 2009)**.

G. Evaluation des paramètres de stress oxydatif

• Dosage de glutathion (GSH)

Le dosage du glutathion est réalisé selon la méthode de **Weckbeker et Cory (1988)**. Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance de l'acide 2-nitro-5-mercaptopurique, ce dernier résulte de la réduction de l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion. Une fois préparé, l'échantillon (cytosol/matrice) doit subir une déprotéinisation par l'acide sulfosalicylique (0.25%) afin de protéger les groupements-SH du glutathion. Brièvement ; les échantillons (200mg de tissu) sont mis individuellement en présence de 8 ml de solution d'EDTA (Acide Ethylène Diamine Tétracétique) à 0,2M. Le mélange mis dans des glaçons est broyé à l'aide d'un pilon en porcelaine. L'homogénat est ensuite déprotéinisé en prenant 0.8ml de ce dernier auquel on ajoute 0.2ml d'une solution d'acide sulfosalicylique (SSA) à 0.25%. Le mélange est vortexé et laissé pendant 15min dans un bain de glace, et centrifugé ensuite pendant 5min à 1000t/min. 0.5ml du surnageant est prélevé auquel est ajouté 1ml de tampon tris-HCL+EDTA (0.02M), pH 9.6. Au mélange est ajouté 0.025ml de l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à 0.01M dissous dans le méthanol absolu. Le mélange est laissé reposer pendant 5min à température ambiante et l'absorbance (A) est mesurée à 412nm.

• Dosage du MDA

Le dosage du MDA est réalisé selon la méthode d'**Esterbauer et al (1992)**. Le principe de ce dosage est basé sur la condensation de MDA en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique, pour former un pigment rose. Une quantité de 375µl de surnageant est prélevée dans un tube sec, auquel est ajouté un volume de 150µl de la solution TBS (tris 50mM, NaCl (150mM ; pH7.4) et 375µl de la solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%), le mélange est Vortexé et centrifugé à 1000t/min pendant 10min. Un volume de 400µl est

prélevé du surnageant auquel on ajoute 80µl du HCL 0.6M et 320µl de la solution tris-TBA (tris 26mM, TBA120mM). En fin, le mélange est vortexé et est ensuite incubé au bain marie à 80°C pendant 10minutes. La lecture de la densité optique des échantillons est mesurée par spectrophotométrie à 530 nm.

- **Dosage de glutathion peroxydase (GPx)**

L'activité enzymatique de la GPx est mesurée par la méthode de **Flohe et Gunzler (1984)**, en utilisant H₂O₂ comme substrat. Un volume de 0.2ml de cytosol/matrice est récupéré dans un tube contenant 0.4ml de GSH 0.1mM et 0.2ml de tampon phosphate 0.067M, pH 7.8. Le mélange est incubé au bain marie à 25°C pendant 05min. 0.2ml d'H₂O₂ 1.3mM est ajouté pour initier la réaction. Après 10min 1ml de TCA 1% (acide tri chloro-acétique) est rajouté dans le but d'arrêter la réaction et le mélange est mis dans la glace pendant 30min et centrifugé durant 10min a 3000t/mn. Un volume de 0.48 ml de surnageant est placé dans une cuve auquel on ajoute 2.2ml de Na₂HPO₄ 0.32M avec 0.32ml de DNTB 1mM. Ce mélange formé un composé coloré et sa densité optique est mesurée à 412nm chaque 30sec pendant 05min.

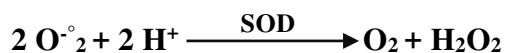
- **Dosage de l'activité de glutathion S-Transférase (GST)**

La mesure de l'activité de glutathion S-Transférase (GST) est déterminée selon la méthode de **Habig et al. (1974)**, Elle est basée sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat, le CDNB (1-Chloro2,4-dinitrobenzène) en d'un cofacteur le glutathion (GST), la conjugaison entraine la formation d'une molécule nouvelle ; 1-S-Glutathionyle 2-4Di nitrobenzène permettant de mesurer l'activité de GST.

La valeur de la densité optique mesurée est directement proportionnelle à la quantité de conjugué formé elle-même liée à l'intensité de l'activité GST. Les échantillons sont homogénéisés dans 1ml de tampon phosphate (0.1M, pH6). L'homogénat est centrifugé à 14000 t/min pendant 30 min et le surnageant récupéré servira comme source d'enzymes. Le dosage consiste à faire réagir 200µl du surnageant avec 1.2ml du mélange CDNB (1mM), GSH (5mM) [20.26mg CDNB, 153.65mg GSH, 1ml éthanol, 100ml tampon phosphate (0.1M, PH 6)]. La lecture des absorbances est effectuée pendant une minute et chaque 15sec à une longueur d'onde de 340 nm contre un blanc contenant 200 µl d'eau distillée remplaçant la quantité de surnageant.

- **Evaluation de l'activité du superoxyde dismutase (SOD)**

La SOD est une enzyme antioxydante très importante qui permet le maintien d'une basse concentration de l'anion superoxyde. Il catalyse la dismutation de l' $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 et en O_2 selon la réaction suivant :



L'activité enzymatique de la SOD est évaluée selon la méthode de **Beauchamp et Fridovich (1971)**. Le principe de la méthode repose sur la capacité de l'enzyme à inhiber la réaction entre le nitroblu-tétrazolium (NBT) et l'anion superoxyde produit suite à la photo réaction de l'oxygène et de la riboflavine en présence d'un donneur d'électron comme la méthionine.

La réduction du NBT par l'anion superoxyde en Formazan peut être suivie par spectrophotométrie à 560nm. Une unité d'activité de la SOD est définie comme étant la quantité d'enzyme capable d'inhiber 50% de la réduction de NBT.

Pour le dosage de la SOD, un milieu réactionnel est préparé contenant 1ml de cyanide de Sodium (NaCN) 0.01M, 0.1ml d'une solution de NBT 0.176mM, 1ml d'EDTA 66mM, 0.1ml d'une solution de riboflavine 0.002mM et du tampon phosphate (KH_2PO_4) à pH 7.2, 5 μ l de la source enzymatique (cytosolique ou matrice mitochondriale), et 0,1ml de solution de méthionine 10^{-2} M. Un tube contrôle est préparé avec du tampon phosphate dans les mêmes conditions que les échantillons. Le mélange est soumis à un rayonnement par lampe de 15watts pendant 10min et l'absorbance est mesurée à 560nm dans des cuves en quartz.

- **Dosage de l'activité Catalase (CAT)**

Le dosage spectrophotométrique de l'activité catalase (CAT) est réalisé suivant la méthode de **Cakmak et Horst (1991)**. La décroissance de l'absorbance est enregistrée pendant trois minutes par un spectrophotomètre pour une longueur d'onde de 240nm et un coefficient d'extinction linéique molaire $\epsilon=39400 \mu M^{-1}.cm^{-1}$.L pour un volume final de 3ml, le mélange réactionnel contient : 100 μ l de l'extrait enzymatique brut, 50 μ l de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 à 0,3% et 2850 μ l de tampon phosphate (50mM, pH 7,2). L'étalonnage de l'appareil se fait en l'absence de l'extrait enzymatique. La réaction est déclenchée par l'addition d'eau oxygénée.

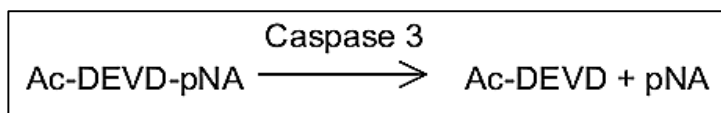
H. Evaluation de biomarqueurs d'apoptose

- **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 ferrocytochrome c. Mélanger 200µl d'échantillon dans 100µl de tampon #1 (10mM tris, 250mM sucrose, pH 7,2 et 1,02mg n-Dodecyl-b-D-maltoside (#D4641)). Centrifuger a 10000t/min durée de 10min. récupérer le surnagent, re-ajouté 100µl de tampon #1 et répéter la centrifugation a 10000t/min pendant 10min. incuber le surnagent dans un bain à 28°C. Ajouter 0,95 ml de tampon #2 et 200µl de tampon #3 (tampon de dilution) à une cuve de quartz, ajuster le spectrophotomètre à zéro ajouté 100µl de surnagent et démarrez la réaction par l'ajoute de 50 µl de ferrocytochrome c (Substrat). Dans ce dosage, la lecture a 550nm et le taux de réaction initial est mesuré chaque 15sec pendant la première 45 secondes de la réaction.

- **Évalué 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 10µl de solution (Stauro-Sporine de concentration 1µg/ml) avec 100µl de surnagent (5mg tissu avec 200µl tampon #A centrifuger a 5000t/min) mélanger et incuber 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.

I. Estimation des neurotransmetteurs

• Dosage de la sérotonine

Le dosage de la sérotonine s'effectue par kit colorimétrique de sigma®, Germany. Le protocole expérimental se résume comme suit : Ajouter 100µl d'homogénat avec 250 µl de solution #R1 (lysente), mélanger et centrifuger l'ensemble à 2500 t/min pendant 15min. Ensuite, ajouté 100µl de tampon tris (50mM, pH 7.4) avec le surnageant et incubé pendant deux heures dans la glace. Pour arrêter la réaction substrat en ajoutant 50 µl de solution #R2 et agiter rapidement le contenu à l'aide agitateur. Laisser 10min et ajouté 25µl de solution réactionnel incubé l'ensemble dans bain marée 10 min à température 37°C et lire directement l'absorbance a une longueur d'onde de 450 nm.

• Dosage de la dopamine

La dopamine a été analysée sur le surnageant par l'utilisation de kit colorimétrique «Dopamine Research# BA 10-5330, sigma®, Germany». Déposer 50µl de solution Dopac®, 100µl d'échantillon et 50µl de tampon phosphate. Incuber pendant 5min à température ambiante (20-25°C). Laisser 10min dans bain de glace et incubé le mélange d'autre fois dans 30min à température ambiante (20-25 °C) sur un agitateur. Centrifuger 10min à 1000t/min (à l'obscurité). Ajouter 25µl de solution tampon avec 175µl de surnageant. Lire l'absorbance après 10 min à une longueur d'onde de 450 nm.

• Dosage de adrénaline

Le dosage d'adrénaline effectué par une méthode spectrophotométrique par l'utilisation de kit colorimétrique «Adrenalin kit HER06362, bioch, Germany». Des tubes contiennent 10µl d'échantillon mélangés avec 1ml de la solution réactionnel (AdRE® 30mM, Solution de lyse 10%, Phosphate buffer 150mM pH 6,4), alors que le tube du standard contient 10µl de la solution étalon et 1ml du mélange réactionnel. Les tubes sont agités et incubés Pendant 10min à température ambiante. L'absorbance est mesuré à 505nm contre le blanc réactif.

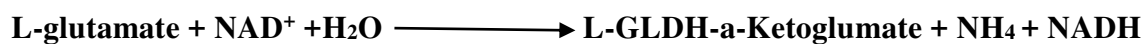
- **Dosage du glutamate**

Dans la présente étude nous avons utilisé un kit pour évaluer le taux de Glutamate «Glutamate kits K629-100, Sigma®. Germany ». Dont ce kit est comporte quatre éléments ; deux réactifs mères et deux solutions tampons. On prépare les échantillons par l'utilisation de tampon de préparation (EDTA/phosphate buffer 150mM), ont appliqué une centrifugation de 1000t/min pendant 10min à température ambiante.

On mélangé 20µl de Réactif a (Rf: MS3/2) avec 150µl de surnagent pour la détermination de la glutamine selon la réaction suivante :



Après 10min ont ajouté 50µl de Réactif mère (Rf: MS3/1) et 10µl de tampon (Tris-HEPES 50mM pH 7.8), mélangé l'ensemble à la condition de température de 25°C, pour la déshydrogénation du glutamate par la réduction du NAD⁺ comme suivant :



Au même temps, ont préparé un blanc dont l'échantillon remplacé par 150µl d'eau distillé. La lecture spectrophotométrique à 450nm.

Remarque : les calculs des taux de sérotonine, dopamine, adrénaline se fait par l'équation déduite de la gamme d'étalonnage (**Annexes**).

- **Dosage de l'acétylcholinestérase (AChE)**

La méthode de dosage de l'acétylcholinestérase (AChE) la plus courante (**Ellman et al., 1961**) consiste à fournir à l'enzyme un substrat, l'acétylthiocholine, dont l'hydrolyse libère de la thiocholine et de l'acide acétique. Les échantillons sont homogénéisés dans 1ml de solution détergente (38,03mg éthylène glycol tris-β-aminoéthy éther N N N' N, 1ml triton X 100%, 5,845g NaCl, 80ml tampon tris 10mM) à l'aide d'un homogénéisateur à ultrasons puis centrifugés à 5000t/min pendant 5mn. Le surnageant est utilisé immédiatement pour la mesure de l'activité AChE. Les étapes du dosage d'AChE sont les suivantes : 100µl de surnageant sont additionnées à 100µl de DTNB (0,1M, pH 8) (39,6mg de DTNB, 15mg CO₃Na, dans 10ml tris 0,1M, pH 7) et 1ml du tampon tris (0,1M, pH 7). Après 5min de repos nécessaire pour épuiser la réaction spontanée, 100µl de substrat acétylthiocholine (118mg ACh dans 5ml d'eau distillée) sont ajoutés. La lecture des densités optiques s'effectue à 412nm toutes les 4min pendant 20min.

J. Evaluation des paramètres biochimiques

• Dosage des glucides

Le dosage des glucides solubles totaux a été fait selon la méthode de **Dubois, (1956)**. L'extraction des sucres solubles consiste à mettre 100µl d'homogénat dans des tubes à essai puis à ajouter 2ml d'éthanol à 80%, le tout est laissé 48h. Le dosage se fait par évaporation totale de l'alcool en mettant les tubes à essai dans un bain marie à 70°C. Après refroidissement, on complète le volume de chaque tube à essai à 20ml avec de l'eau distillée ensuite on prélève 1ml de la solution et on ajoute 1ml de phénol à 5% en prenant soin de bien agiter, puis on ajoute 2ml d'acide sulfurique concentré dans des tubes déposés préalablement dans un bain de glace. Enfin le tout est laissé se reposer pendant 25min, puis on procède à la lecture à une longueur d'onde de 490nm. Le calcul des concentrations réelles se fait par l'équation déduite de la gamme d'étalonnage préparé à partir d'une solution mère de glucose.

• Dosage des lipides

Les lipides tissulaires sont évaluée selon la méthode (**Goldsworthy et al., 1972**), on utilise 200µl d'homogénat dans 5ml de l'acide trichloroacétique 20% (TCA), on broyé et ont filtré ce mélange ; et directement ont appliqué une centrifugation à 5000t/min pendant 10min. Le culot est gardé dans tube contient 1ml du mélange Ether/Chlorophorme, et après centrifugé ce mélange a 5000t/min pendant 10min, on prélève 100µl du surnageant, auquel on ajoute 1ml de l'acide sulfurique et en met après agitation les tubes dans un bain marie à 100°C pendant 10min. Après refroidissement, on prélève encore une fois au moyen d'une micropipette 200µl de l'extrait auquel on ajoute 2.5ml du mélange sulfophosphanillinique à 85% (0.38g vanilline+195ml acide orthophosphorique+55ml H₂O) et laissé ce mélange 30min à l'obscurité, la lecture à une longueur d'onde 530nm. Le calcul des concentrations réelles se fait à partir de l'équation déduite de la gamme d'étalonnage réalisée à partir d'une solution mère préparée en utilisant de l'huile de tournesol (**Annexes**).

• Dosage des protéines

La méthode utilisée pour le dosage des protéines est celle de **Bradford (1976)** qui utilise la BSA comme standard, sur le même échantillon utilisé pour doser les lipides, on récupère le culot issu de la deuxième centrifugation auquel on a ajouté 1ml du NaOH (0.1N) et on agite énergétiquement pour la dissolution des protéines. Après, on prélève, au moyen d'une micropipette, un volume de 100µl auquel on ajoute 4ml du réactif BBC (Bleu Brillant de Coumassie) (50mg BBC +50ml d'acide orthophosphorique à 85% et on complète à 500ml

avec l'eau distillée). Ainsi une couleur bleue se développe et on passe directement les échantillons pour lecture à une longueur d'onde 595nm. Le calcul des concentrations se fait par l'équation déduite de la gamme d'étalonnage réalisé à partir d'une solution d'albumine de sérum de bœuf (**Annexes**).

K. Tests Histologiques

La technique utilisée est celle décrite par (**Houlot, 1984**) qui comporte les étapes suivantes ; La fixation des échantillons dans le formol, puis mise de ces échantillons tissulaires dans des cassettes spéciales à parois tournées afin de permettre le passage des liquides. Déshydratation et progressif les échantillons dans des bains d'éthanol de concentration croissante (70%, 95% et 100%). Inclusion et réalisation des blocs, Les pièces sont alors plongées dans des bains de paraffine liquide. Les tissus étant maintenu et imbibés de paraffine, viennent alors l'étape de l'enrobage qui consiste à inclure le tissu imprégné dans un bloc de paraffine qui, en se solidifiant, va permettre sa coupe. La réalisation des coupes minces de quelques microns est possible grâce à Microtomes. Ces coupes sont photographiées à l'aide d'un appareil photos liée à une loupe (*Eso Bx305F*).

1.2.4.4. Analyses statistique

Les résultats obtenus ont été exprimés par la moyenne de six répétitions (moyen \pm écart type), et pour mieux visualiser en utilisant l'office Excel 2013 pour représentés ces résultats sous forme des graphiques et des histogrammes. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Minitab[®] 17.1. La signification de différence entre le lot témoin et les lots traités est vérifiée en utilisant le test de *Dunette* et le test t «*Student*», et le résultat de comparaison comme suivant :

- $p > 0,05$ = la différence n'est pas significative,
- (*) $0,05 > P > 0,01$ = la différence est significative,
- (**) $0,01 > P > 0,001$ = la différence est hautement significative,
- (***) $P < 0,001$ = la différence est très hautement significative.

2. Résultats

2.1. Effets des pesticides et la quercétine sur les paramètres de la croissance globale des animaux

Les résultats de l'évaluation des paramètres de croissance en terme de poids corporel, le gain de poids et le poids relatif durant les 90 jours de traitement des différents groupes d'animaux par les différents pesticides, leur mixture et le composé phénolique sont illustrés par les figures 25-27.

2.1.1. Poids corporel

Les résultats de l'évaluation du poids corporel montrent une diminution significative ($p \leq 0,00$) de poids corporel chez les rats traités par AC, DM et AC/DM (fig.25-A) par rapport aux rats témoins.

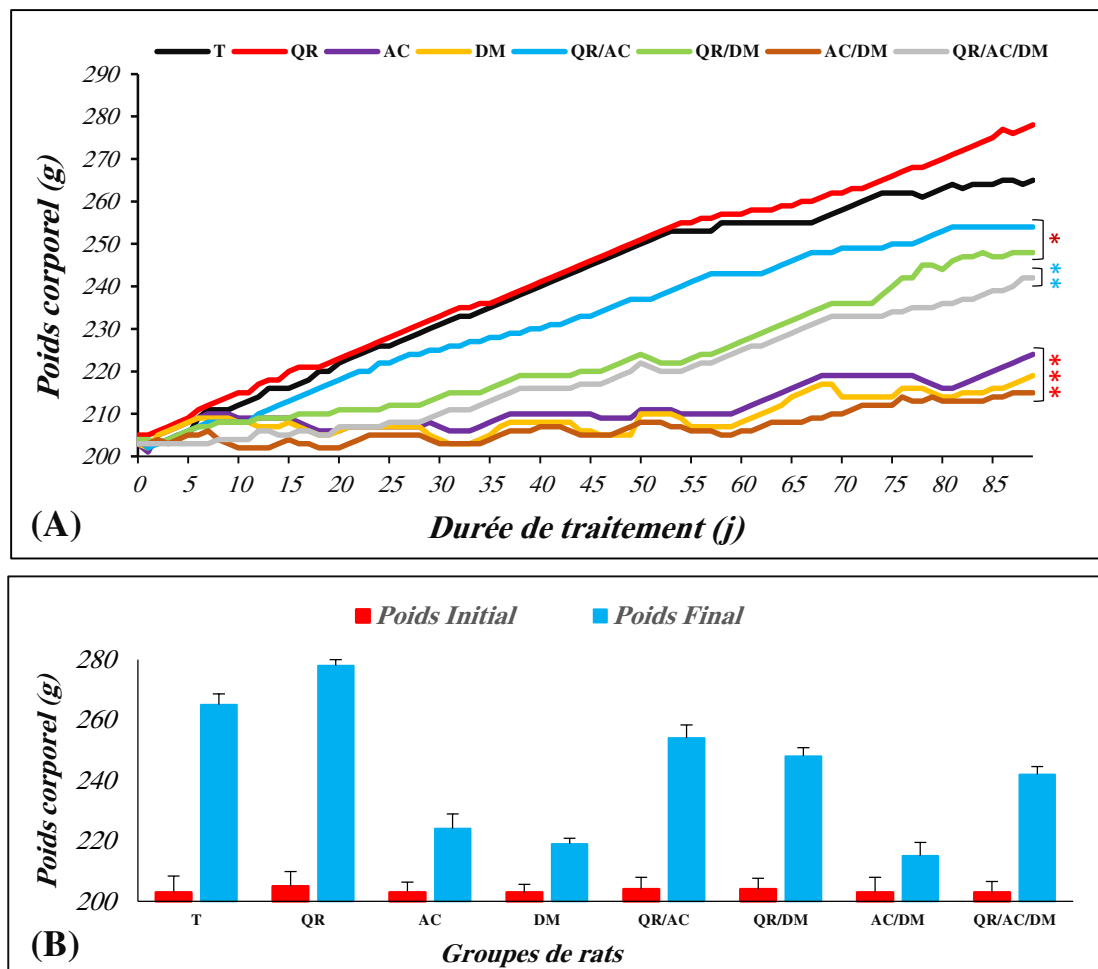


Figure 25. Evolution du poids corporel (PC) chez les différents groupes traités durant 3 mois par les pesticides et à la quercétine. (A) : changement cinétique du poids. (B) : Différence entre poids initial et final.

Ces mêmes résultats montrent également une perturbation et une diminution significative ($p \leq 0,01$) de poids corporel chez le groupe traité par la combinaison QR/AC/DM et une diminution aussi significative ($p \leq 0,05$) chez le groupe traité par la combinaison QR/DM par rapport au groupe témoin. Tandis que, on n'enregistre aucune augmentation du poids corporel chez le groupe traité chroniquement par la QR par rapport au groupe témoin (fig.25-B).

2.1.2. Gain de poids (GP)

Les résultats de l'évaluation du gain de poids (fig.26) présentent une diminution significative ($p \leq 0,001$) de gain de poids chez les lots traités par DM et AC/DM en comparaison avec le lot témoin. Ces résultats montrent aussi une diminution significative ($p \leq 0,01$; $p \leq 0,05$) de GP respectivement chez les rats traités par AC et ceux traités par QR/AC/DM par rapport au groupe témoin. En revanche, on observe une amélioration de gain de poids à chaque fois qu'on associe la quercétine aux pesticides.

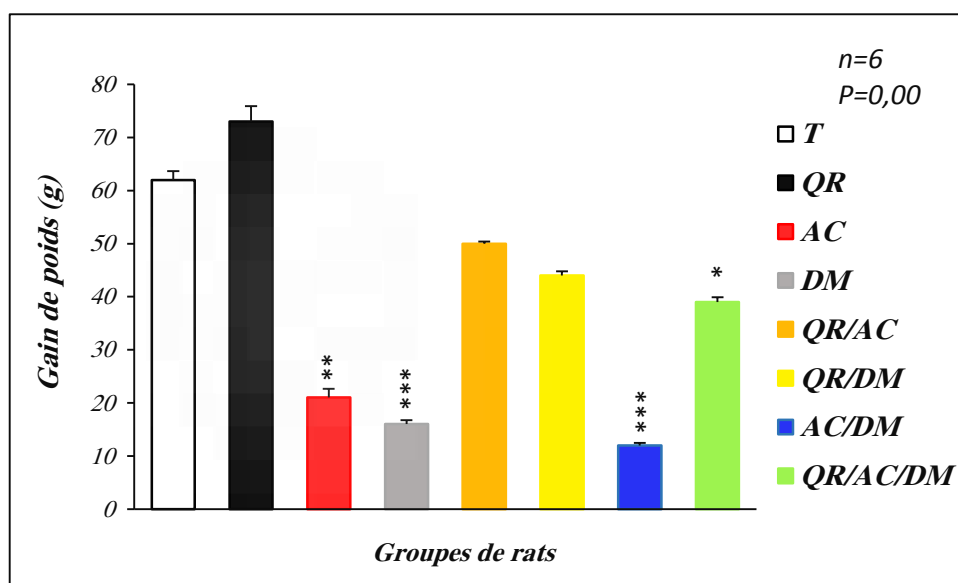


Figure 26. Evolution du gain de poids corporel (GP) chez les rats témoins et traités après 90 jours de traitement par les pesticides et la quercétine.

2.1.3. Poids relatif du cerveau (PRc)

Les résultats obtenus suite à l'évaluation du PR montrent une augmentation non significative ($P > 0,05$) du poids relatif du cerveau (-0,1%) chez le groupe traité par la DM, AC et DM/AC à 0,32 et 3,14mg/kg poids corporel en comparaison avec le groupe témoin, par contre le traitement des animaux par la QR seule ou associée aux pesticides à la dose de 10 mg/Kg a diminué cette augmentation d'une manière non significative par rapport au groupe témoin (fig.27).

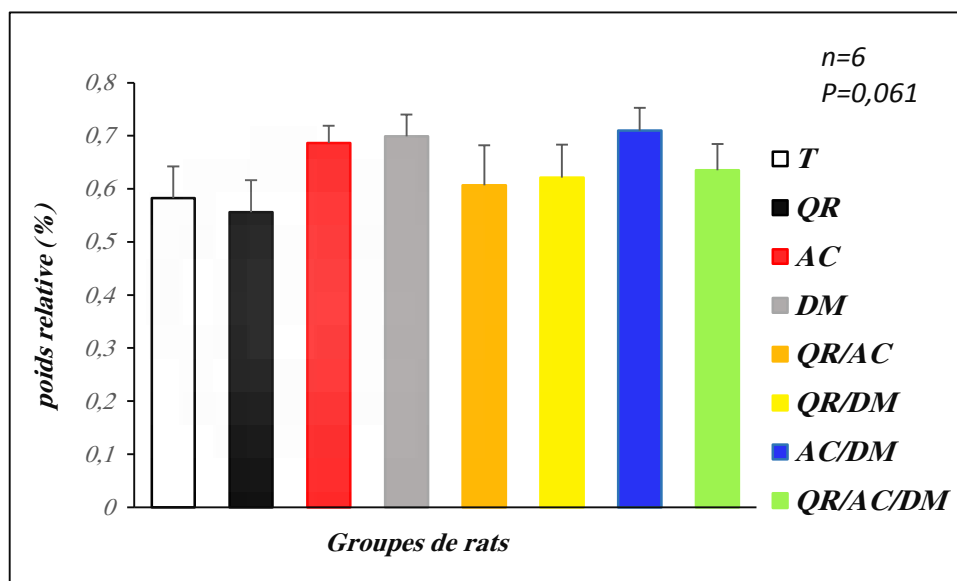


Figure 27. Evolution du poids relatif du cerveau (PRc) chez les rats traités durant 3 mois par les pesticides et la quercétine.

2.2. Effets des pesticides et la quercétine sur les paramètres biochimiques et le statut redox dans le cerveau total, hippocampe et striatum

2.2.1. Effets des pesticides et la quercétine sur les paramètres biochimiques mitochondriaux du cerveau

Dans cette étude, l'évaluation de ces paramètres est portée sur le cerveau total et régional (hippocampe et striatum). Les résultats obtenus montrent la variation de ces paramètres biochimiques mitochondriaux chez les différents groupes traités chroniquement par les pesticides et la quercétine dont ils sont récapitulés dans le tableau 05.

2.2.1.1. Effets des pesticides et la quercétine sur les paramètres biochimiques des mitochondries du cerveau total

A) Protéines mitochondriales

Les résultats obtenus montrent une augmentation significative ($p \leq 0,05$) du taux des protéines totales du cerveau chez le lot DM et le lot AC/DM comparés au témoin. Ces mêmes résultats montrent également un état de stabilité dans la teneur mitochondriale en protéines chez les lots traités par QR, QR/AC, QR/DM et QR/AC/DM, par rapport au groupe témoin (*tab.05*).

B) Lipides des mitochondries cérébrales

Les résultats obtenus de l'évaluation des lipides mitochondriaux montrent une diminution significative ($p \leq 0,001$) chez les groupes de rats traités par AC, DM et AC/DM par rapport aux témoins et un état de diminution non significative de ces substances est également enregistré chez les groupes traités par la quercétine associée aux pesticides par rapport au témoin (*tab.05*).

Tandis que le traitement des animaux par la QR seule a augmenté le taux de ces lipides mitochondriaux.

C) Glucides des mitochondries cérébrales

Les résultats de l'évaluation des glucides mitochondriaux du cerveau chez les rats traités chroniquement par les pesticides et la quercétine sont représentés dans le tableau 05. Une augmentation significative ($p \leq 0,001$) des glucides cérébraux est observée chez les groupes traités par AC, DM et AC/DM par rapport au groupe témoin, alors qu'aucune différence significative n'est observée chez le reste des groupes comparés au groupe témoin.

2.2.1.2. Effets des pesticides et la quercétine sur les paramètres biochimiques mitochondriaux de l'hippocampe

A) Protéines mitochondriales

Les résultats obtenus montrent une augmentation significative ($p \leq 0,001$) du taux des protéines mitochondriales de l'hippocampe chez les rats traités par AC, DM et AC/DM. On observe aussi une augmentation significative de ces protéines chez le lot QR/AC/DM comparé au témoin. Ces résultats montrent par contre un état de stabilité de la teneur mitochondriale en protéine chez les lots traités par QR, QR/AC et QR/DM comparés au groupe témoin (*tab.05*).

B) Lipides mitochondriaux

Une augmentation significative ($p \leq 0,05$) et hautement significative ($p \leq 0,01$) des taux des lipides mitochondriaux dans l'hippocampe est observée respectivement chez les rats traités par QR et QR/AC/DM. Par ailleurs, une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) est enregistrée chez les rats traités par DM et AC/DM par rapport au groupe témoin. Par contre, les résultats de la présente étude montrent également une diminution significative de ces lipides ($p \leq 0,01$) chez le groupe traité par AC comparé au témoin (*tab.05*).

C) Glucides mitochondriaux

Les résultats de l'évaluation des glucides dans les mitochondries de l'hippocampe sont récapitulés dans le tableau 05. Une augmentation significative ($p \leq 0,001$) du taux de ces glucides est enregistrée seulement chez les groupes traités par AC, DM et AC/DM comparés au groupe témoin.

2.2.1.3. Effets des pesticides et de la quercétine sur les paramètres biochimiques mitochondriaux du striatum

A) Protéines mitochondriales

Les résultats de l'évaluation des protéines mitochondriales du striatum sont récapitulés dans le tableau 05. Une augmentation significative ($p \leq 0,001$) du taux de ces protéines chez les lots traités par AC, DM et AC/DM. Une augmentation significative ($p \leq 0,001$; $p \leq 0,05$) est également constatée respectivement chez les lots AC/DM et QR/AC/DM comparés au groupe témoin.

B) Lipides mitochondriaux

Les résultats de l'évaluation du taux des lipides mitochondriaux du striatum sont représentés dans le tableau 05. Dans le striatum, on constate une augmentation significative des lipides ($p \leq 0,001$) chez les groupes traités par DM et AC/DM, et une élévation aussi significative ($p \leq 0,05$) de ces composés chez le groupe QR/AC par rapport au groupe témoin. Les autres groupes n'ont présenté aucune variation significative des lipides, comparés au témoin.

C) Glucides mitochondriaux

Les résultats de l'évaluation de la variation du taux des Glucides mitochondriaux dans le striatum sont représentés dans le tableau 05. L'analyse statistique de ces résultats montre que l'administration d'AC, DM et QR seule ou en association avec la quercétine provoque une élévation significative ($p \leq 0,001$) chez les groupes AC et AC/DM, et également une augmentation significative ($p \leq 0,01$) chez le groupe traité par DM en comparaison avec le groupe témoin.

Tableau 05 : Variation du taux des protéines mitochondriales, des glucides et des lipides dans le cerveau total, l'hippocampe et le striatum chez les rats traités durant 3 mois par Quercetine (QR), Deltaméthrine (DM), Acetamidpride (AC) et les combinaisons de (QR/DM), (QR/AC), (AC/DM) et de (QR/AC/DM).

Paramètres	Groupes de rats traités								
	T	QR	DM	QR/DM	AC	QR/AC	AC/DM	QR/AC/DM	
Protéines ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Cer	0,34±0,00	0,34±0,00	0,36±0,00*	0,34±0,00	0,34±0,00	0,36±0,00*	0,34±0,00	
	Hip	0,056±0,004	0,055±0,004	0,093±0,0137***	0,060±0,005	0,09±0,005***	0,061±0,005	0,106±0,003***	0,067±0,003*
	Str	0,054±0,005	0,053±0,009	0,093±0,0061***	0,072±0,012**	0,084±0,003***	0,056±0,007	0,101±0,002***	0,068±0,002*
Glucides ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Cer	36,62±0,66	35,19±0,60	56,80±2,32***	36,27±0,8	55,92±0,65***	36,26±0,82	55,94±0,65***	36,29±0,82
	Hip	17,87±2,634	17,66±2,175	27,38 ± 2.31***	17,870± 1,797	27,55±1,34***	18,03±1,24	27,56±0,50***	17,88±0,72
	Str	15,07±1,346	14,48±1,101	20,182±2,787**	14,928± 2,093	23,01±0,96***	14,92±0,92	23,02±1,84***	14,93±0,37
Lipides ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Cer	448,93±0,45	449,48±0,50	444,92±0,40***	447,66±0,29	444,91±0,40***	447,64±0,29	444,93±0,40***	447,66±0,29
	Hip	89,89±0,541	91,13±0,650*	95,181±1,118***	91,527± 0,558	87,67±0,52**	89,95±0,53	95,18±0,64***	91,64±0,77**
	Str	88,92±0,672	88,59±0,955	92,485±0,466***	90,927±0,362*	88,98±0,135	90,51±0,085*	93,06±0,11***	90,63±0,09

Hip: Hippocampe, **Str:** Striatum, **Cer:** Cerveau total. Chaque valeur est exprimée en moyenne ± écart type. Le test de student est appliqué pour une étude statistique comparative entre les différents groupes traités et le groupe témoin. ($p \leq 0.05$): significatif (*), ($p \leq 0.01$): hautement significatif (**), ($p \leq 0.001$): très hautement significatif (***), $P > 0.05$: non significatif (ns).

2.2.2. Effets des pesticides et la quercétine sur le statut redox dans le cerveau total, l'hippocampe et le striatum

Les résultats de l'évaluation des différents paramètres du stress oxydatif dans les cellules cérébrales chez les rats exposés durant 3 mois aux différents pesticides et la quercétine, sont récapitulés dans le tableau 06 et 07.

2.2.2.1. Effets des pesticides et de la quercétine sur le statut redox cytosolique et mitochondrial dans le cerveau total

2.2.2.1.1. Effet des pesticides et la quercétine sur le statut redox cytosolique dans le cerveau total

A) Glutathion (GSH)

Les résultats représentés dans le tableau 06 montrent une diminution significative ($p \leq 0,001$; $p \leq 0,01$; $p \leq 0,05$) du taux de GSH cytosolique dans le cerveau total respectivement chez les lots traités par AC/DM, DM et AC quand ils sont comparés au témoin. Le reste des groupes n'ont montré aucune variation significative du taux de GSH.

B) Glutathion-s-transférase (GST)

L'analyse statistique des résultats obtenus après l'évaluation de l'activité cytosolique de GST a montré une augmentation significative ($p \leq 0,05$) (*tab.06*) chez les groupes QR, QR/AC et QR/DM et très hautement significative ($p \leq 0,001$) chez les lots AC, DM et AC/DM, et aussi une augmentation hautement significative ($p \leq 0,01$) chez le lot traité par QR/AC/DM quand ils sont tous comparés au groupe témoin.

C) Glutathion peroxydase (GPx)

Une diminution hautement significative ($p \leq 0,01$) de l'activité de GPx cytosolique a été enregistrée dans le cytosol des cellules cérébrales chez les rats traités par AC, DM et AC/DM par rapport au groupe témoin. Par contre, ces mêmes résultats ne montrent pas une variation statistiquement significative chez les groupes traités par les pesticides associés à la quercétine (*tab.06*).

D) Catalase (CAT)

Les résultats de l'évaluation de l'activité de catalase dans le cytosol du cerveau total ont montré une diminution significative ($p \leq 0,001$) chez les groupes traités par AC, DM et AC/DM comparés au groupe témoin et une diminution significative ($p \leq 0,05$) chez les groupes de combinaison avec le groupe QR par rapport au groupe témoin. En revanche, aucune augmentation significative n'est observée chez les groupes traités par les combinaisons pesticides/QR comparés aux groupes traités par les pesticides seuls (*tab.06*).

Tableau 06 : Variation Cytosolique de glutathion (GSH), Malondialdéhyde (MDA), l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx), glutathion S transférase (GST), super-oxyde-dismutase (SOD) et la catalase (CAT) dans le cerveau total chez les rats témoins et traités par Quercetine (QR), Deltamethrine (DM), Acetamipride (AC) et les combinaisons de Quercetine/Deltamethrine (QR/DM), Quercetine/Acetamipride (QR/AC), Acetamipride/Deltamethrine (AC/DM), Quercetine/Acetamipride/Deltamethrine (QR/AC/DM) après 03 mois de traitement.

Paramètres	Groupes de rats traités							
	T	QR	DM	QR/DM	AC	QR/AC	AC/DM	QR/AC/DM
GSH(nmol/mg)	140,55±1,67	139,07±4,89	91,68±1,16**	129,54±1,5	110,04±4,15*	139,69±1,44	82,80±3,75***	126,89±1,89
GPx (µmol/min/mg)	0,24±0,01	0,24±0,01	0,18±0,01**	0,22±0,00	0,18±0,01**	0,22±0,00	0,18±0,01**	0,18±0,01
MDA(nmol/mg)	0,18±0,01	0,17±0,019	0,37±0,019***	0,23±0,026*	0,32±0,01***	0,20±0,02*	0,37±0,02***	0,24±0,02*
GST (nmol/min/mg)	0,87±0,003	0,85±0,00*	0,98±0,01***	0,89±0,00*	0,93±0,01***	0,88±0,00*	1,00±0,00***	0,89±0,00**
SOD(IU/mg)	240,69±8,34	242,6±26,59	687,1±14,62***	258±6,72	640,7±40,87***	256,4±8,84	550,6±10,8***	298,94±20,08*
CAT (µmol/min/mg)	17,45±1,19	18,71±1,01	9,79±1,15***	16,88±1,10	11,64±1,44***	16,89±1,13	7,25±1,15***	14,70±1,17*

Chaque valeur est exprimée en moyenne ± écart type. Le test de student est appliqué pour une étude statistique comparative entre les différents groupes traités et le groupe témoin. ($p \leq 0.05$): significatif (*), ($p \leq 0.01$): hautement significatif (**), ($p \leq 0.001$): très hautement significatif (***), $P > 0.05$: non significatif (ns)

E) Superoxyde dismutase (SOD)

On constate une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) chez les groupes traité par AC, DM et AC/DM, et une augmentation significative ($p \leq 0,05$) chez le groupe QR/AC/DM par rapport au groupe témoin. Or, aucune variation significative enregistrée chez les groupes Q, QR/AC et QR/DM (*tab.06*).

F) Malondialdéhyde (MDA)

Le tableau 06 montre une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) chez les groupes traités par AC, DM et AC/DM, et une augmentation significative ($p \leq 0,05$) chez le groupe QR/AC, QR/DM et QR/AC/DM par rapport au groupe témoin.

2.2.2.1.2. Effet des pesticides et la quercétine sur le statut redox mitochondrial dans le cerveau total

- **GSH**

Une diminution significative ($p \leq 0,01$; $p \leq 0,01$; $p \leq 0,001$) du taux de GSH mitochondrial dans le cerveau total est constatée respectivement chez les lots traités par AC ; DM ; AC/DM quand ils sont comparés au lot témoin (tableau 07).

- **GST**

Les résultats de l'évaluation de l'activité de GST mitochondriale sont représentés dans Le tableau 07. On constate qu'il existe une augmentation significative de cette activité chez les lots traités par AC ($p \leq 0,05$), DM ($p \leq 0,05$) et AC/DM ($p \leq 0,001$) quand ils sont comparés au groupe témoin. En revanche, ces résultats ne montrent aucune variation significative de l'activité de GST chez tous les groupes traités par les pesticides associés à la quercétine.

- **GPx**

L'analyse statistique des résultats obtenus lors de l'évaluation de l'activité de GPx mitochondriale a montré (*tab.07*) une diminution significative ($p \leq 0,01$; $p \leq 0,01$; $p \leq 0,001$) chez les rats traités respectivement par AC, DM et AC/DM quand ils sont comparés au groupe témoin.

- **Catalase**

L'analyse statistique des résultats obtenus lors de l'évaluation de l'activité de catalase mitochondriale dans le cerveau total a montré (*tab.07*) une diminution significative ($p \leq 0,001$) chez les rats traités respectivement par AC, DM et AC/DM quand ils sont comparés au groupe témoin. Par contre, cette analyse n'a montré aucune variation dans les valeurs de l'activité de cette enzyme chez les groupes traités par les pesticides associés à la quercétine.

- **SOD**

Dans le tableau 07, on constate une augmentation hautement significative ($p \leq 0,01$) chez les groupes traités par AC et AC/DM, et une augmentation très hautement significative chez le groupe DM ($p \leq 0,001$) par rapport au groupe témoin. Par contre, aucune variation significative n'a été enregistrée pour le reste des groupes comparés au témoin.

- **MDA**

Une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) est enregistrée chez les groupes traités par AC, DM et AC/DM. Tandis qu'on n'observe aucun changement significatif chez le reste des groupes traités par les pesticides associés à la quercétine par rapport au groupe témoin (*tab.07*).

2.2.2.2. Effets des pesticides et la quercétine sur le statut redox mitochondrial dans l'Hippocampe

A) Glutathion (GSH)

Les résultats affichés dans le tableau 07 montrent une diminution très hautement significative du taux de GSH mitochondrial dans l'hippocampe chez les groupes AC, DM et AC/DM et une diminution significative chez les lots traités par la QR/DM et QR/AC/DM comparés au groupe témoin. En revanche, ces résultats ne montrent pas une variation statistiquement significative du taux de GSH chez les rats traités par QR et QR/AC comparés aux rats témoins.

B) Glutathion-S-transférase (GST)

Au niveau de mitochondries de l'hippocampe, on a observé une augmentation hautement significative ($p \leq 0,01$) de l'activité de GST chez les groupes traités par AC et DM et une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) chez le lot (AC/DM), aussi une augmentation significative ($p \leq 0,05$) chez le groupe QR/DM et QR/AC/DM par rapport au groupe témoin (*tab.07*).

C) Glutathion peroxydase (GPx)

Dans l'hippocampe, on a constaté une diminution hautement significative ($p \leq 0,01$) chez les groupes traités par AC et DM, aussi une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) et significative ($p \leq 0,05$) respectivement chez le groupe traité par AC/DM et QR/DM par rapport au groupe témoin. Aucun changement significatif n'est observé chez le reste des groupes comparés au groupe témoin (*tab.07*).

D) Catalase (CAT)

Le tableau 07 montre une diminution hautement significative ($p \leq 0,01$) chez les groupes traités par DM et AC, et une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) chez le groupe AC/DM par rapport au groupe témoin. Aucun de changement significatif n'est observé chez les groupes exposés aux pesticides associés à la quercétine quand ils sont comparés au groupe témoin.

E) Super oxyde dismutase (SOD)

Le dosage de la SOD mitochondriale dans l'hippocampe a montré une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) de son activité enzymatique chez les groupes traités par AC, DM et AC/DM comparés au groupe témoin. En revanche, aucune différence significative n'est observée chez les autres groupes par rapport au groupe témoin (tab.07).

F) Malon dialdéhyde acide (MDA)

Le tableau 07 représente entre autres le taux de MDA mitochondrial dans l'hippocampe. Une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) du taux de MDA chez les groupes traités par DM et AC/DM et une augmentation hautement significative ($p \leq 0,01$) chez le lot AC comparés au groupe témoin. En revanche, aucune différence significative n'est observée chez les autres groupes quand ils sont comparés aux témoins.

2.2.2.3. Effets des pesticides et la quercétine sur le statut redox mitochondrial dans le striatum

Les variations du biomarqueurs de stress oxydant dans le striatum des rats exposés durant 3 mois aux pesticides et à la quercétine sont récapitulées aussi dans le tableau 07.

A) Glutathion (GSH)

Dans le striatum, on observe une diminution hautement significative ($p \leq 0,01$) du taux de GSH mitochondrial chez le groupe traité par AC et une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) chez les groupes traités par DM et AC/DM par rapport au groupe témoin. Tandis que, aucune différence significative n'est enregistrée chez le reste des groupes exposés aux pesticides associés à la quercétine, comparés aux témoins (tab.07).

B) Glutathion-S-Transférase (GST)

Le tableau 07 montre une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) du taux de GST mitochondriale dans le striatum chez les lots traités par AC, DM et AC/DM comparés aux

témoins. En revanche, dans tous les lots traités par (QR) soit seule où en association avec les pesticides, on n'a observé aucune différence significative par rapport au groupe témoin.

C) Glutathion peroxydase (GPx)

Les résultats de l'évaluation de l'activité du GPx mitochondriale dans le striatum chez les rats traités par les pesticides seuls ou en association avec la quercétine durant 3 mois sont représentés dans le tableau 07. Une diminution hautement significative ($p \leq 0,01$) de l'activité enzymatique de la GPx chez le groupe traité par AC et une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) chez les groupes traités par DM et AC/DM par rapport au groupe témoin. Chez les groupes recevant les pesticides associés à la quercétine n'ont présenté aucune différences significatives comparés aux témoins.

D) Catalase (CAT)

Le tableau 07 montre une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) de activité enzymatique de la CAT de mitochondriale dans le striatum chez les lots traités par AC, DM et AC/DM et une diminution significative ($p \leq 0,05$) chez les rats traités par QR/DM par rapport au groupe témoin.

E) Super oxyde dismutase (SOD)

L'évaluation de l'activité enzymatique de la SOD mitochondriale dans le striatum a montré une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) chez les groupes traités par AC et DM comparés aux témoins. Aussi une augmentation hautement significative ($p \leq 0,01$) et significative ($p \leq 0,05$) a été enregistrée respectivement chez les groupes traités par AC/DM et QR/DM par rapport aux témoins. En revanche, aucune différence significative n'est observée chez les autres groupes comparés au groupe témoin (*tab.07*).

F) Malondialdéhyde (MDA)

Le tableau 07 représente entre autres le taux de MDA mitochondrial dans le striatum. Il montre une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) du taux de MDA chez les groupes traités par DM et AC/DM et une augmentation hautement significative ($p \leq 0,01$) et significative ($p \leq 0,05$) respectivement chez le lot AC et QR/DM comparés aux témoins. En revanche, aucune différence significative n'est observée chez les autres groupes par rapport rats témoins.

Tableau 07 : Variation mitochondriale de glutathion (GSH), Malondialdéhyde (MDA), l'activité de la glutathion peroxydase (GPx), glutathion-S transférase (GST), super-oxyde-dismutase (SOD) et la catalase (CAT) dans le cerveau total, l'hippocampe et le striatum chez les rats traités durant 3 mois par Quercetine (QR) et les pesticides : Deltaméthrine (DM), Acetamipride (AC) et les combinaisons de (QR/DM), (QR/AC), (AC/DM) et de (QR/AC/DM).

Paramètres	Groupes de rats traités								
	T	QR	DM	QR/DM	AC	QR/AC	AC/DM	QR/AC/DM	
GSH (nmol/mg)	Cer	35,17±1,63	35,23±1,72	25,73 ±2,59**	35,05±3,23	26,89 ±3,21**	35,04±2,76	21,55±1,50***	35,05±2,57
	Hip	35,29 ± 1,24	35,35 ± 1,24	22,15 ± 1,697***	31,88±1,06*	22,89±0,9***	33,43±0,76	23,13±1,31***	31,97±1,18*
	Str	30,74±1,24	30,32±1,423	25,967±1,8730***	29,73±1,84	26,79±1,03***	29,73±1,24	26,92±1,82***	29,62±1,24
GPx nmol/min/mg	Cer	64,80±6,08	64,80±5,67	50,73±6,45**	64,83±6,65	51,10±8,81**	64,82±7,24	48,28±6,65***	64,84±6,65
	Hip	66,96±2,60	67,48 ± 3,14	52,465 ± 6,057**	63,45±3,50*	48,94±2,53**	64,09±0,81	43,93±0,91***	64,20±0,82
	Str	65,48±6,09	66,079±4,71	46,763±3,716***	64,786±5,94	50,59±3,71**	64,64±3,63	48,29±3,05***	65,05±2,03
MDA (nmol/mg)	Cer	0,59±0,034	0,59±0,043	0,98±0,039***	0,59±0,047	0,82±0,041***	0,59±0,046	1,66±0,048***	0,58±0,05
	Hip	0,56 ± 0,09	0,53±0,078	0,883±0,101***	0,582±0,09	0,82 ± 0,01**	0,57± 0,05	0,92± 0,019***	0,60± 0,045
	Str	1,65±0,06	1,598±0,06	3,133±0,0710***	1,659±0,11*	2,44±0,142**	1,57±0,024	3,85±0,02***	1,56±0,022
GST Pmol/min/mg	Cer	71,19±2,50	71,20±3,95	83,65±2,46*	71,36±2,42	81,48±6,80*	71,34±2,51	85,48±6,55***	71,37±2,59
	Hip	67,19 ± 1,48	67,36±1,76	77,75±1,4911**	71,666±1,48*	76,98±1,76**	68,61±2,48	82,62±1,48***	72,84±1,52*
	Str	65,66±1,94	65,48±1,60	76,296±1,903***	66,431±1,49	74,99±1,90	66,26±1,86	77,68±1,48***	66,57±1,49
SOD (IU/mg)	Cer	12,23±2,65	12,21±0,96	25,28±1,27***	12,36±1,41	23,44±0,96**	12,32±1,05	0,056±0,004**	0,056±0,004
	Hip	9,57 ± 0,80	9,88±1,131	27,32 ±0,812 ***	10,55±0,813	26,11 ± 1,66***	10,60±0,80	22,05±1,09***	11,08±1,67
	Str	13,86±1,17	13,98±1,56	25,38±1,1780***	16,77±1,786*	24,28±1,17***	14,32±1,18	19,08±1,51**	13,63±0,89
CAT nmol/min/mg	Cer	155,72±2,40	155,77±2,64	133,36±2,77***	155,85±2,36	135,48±1,95***	155,82±2,45	130,14±6,92***	155,86±2,46
	Hip	145,22±4,08	146,42±5,82	125,18±10,48 **	141,82±7,26	126,31±9,68**	143,16±5,68	119,80±1,38***	140,24±4,83
	Str	142,84±2,27	143,2±3,07	123,17±1,448***	140,76±2,64	124,43±1,63***	141,0±1,23	121,92±1,26***	140,97±0,86

Hip: Hippocampe, **Str:** Striatum, **Cer:** Cerveau total. Chaque valeur est exprimée en moyenne ± écart type. Le test de student est appliqué pour une étude statistique comparative entre les différents groupes traités et le groupe témoin. ($p \leq 0.05$): significatif (*), ($p \leq 0.01$): hautement significatif (**), ($p \leq 0.001$): très hautement significatif (***), $P > 0.05$: non significatif (ns).

2.3.Effets des pesticides et la quercétine sur les paramètres de respiration, perméabilité membranaire et gonflement mitochondriaux dans le cerveau total et régional chez le rat

2.3.1. Effet des pesticides et la quercétine sur la respiration mitochondriale

Les résultats concernant l'effet des pesticides et la quercétine (QR) sur la respiration mitochondriale dans le cerveau total, l'hippocampe et le striatum sont récapitulés dans le tableau 08 et illustrés dans les figures 28 à 30.

A) Effet sur le cerveau global

La figure 28 montre une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) de la concentration d'oxygène consommé dans le cerveau total chez les lots traités par AC, DM et AC/DM comparés aux témoins. Or, aucune différence significative n'est observée chez les autres lots par rapport au lot témoin.

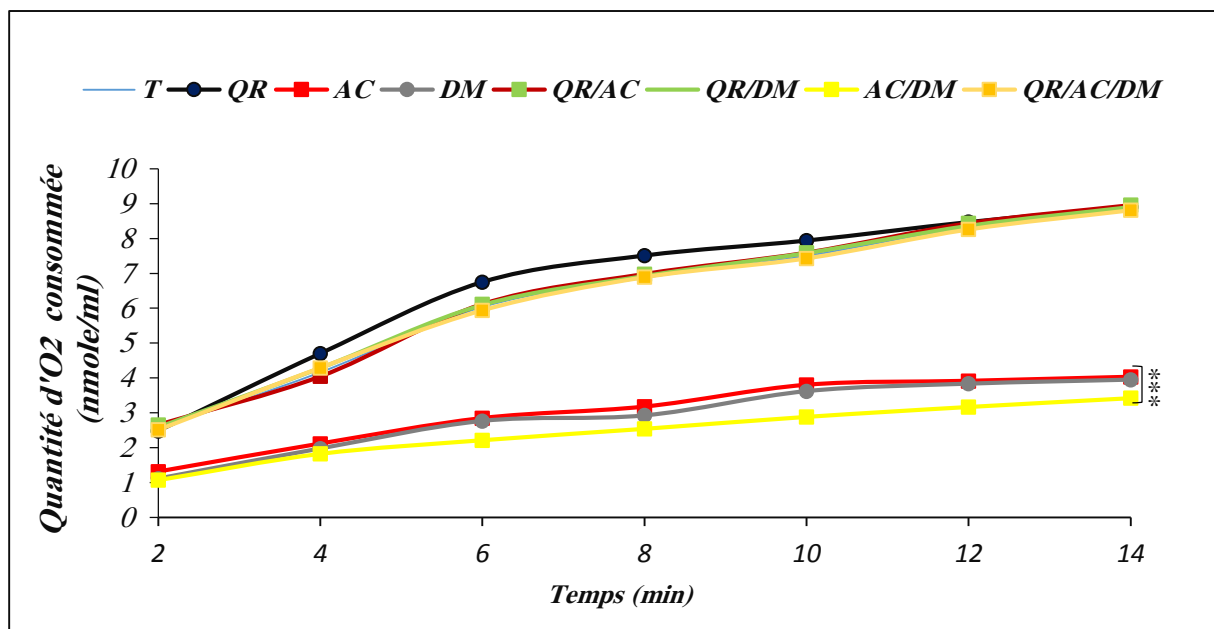


Figure 28. Variation de la respiration mitochondriale dans le cerveau total chez les rats traités durant 3 mois par les pesticides et la quercétine.

B) Effet sur l'Hippocampe

Les résultats de la figure 29 montrent une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) de la concentration d'oxygène consommée dans l'hippocampe chez les lots traités par DM et AC/DM comparés aux témoins. Cette figure illustre aussi une diminution hautement significative ($p \leq 0,01$) chez le groupe traité par AC et un état de stabilité chez les lots traités par la QR en association avec les pesticides par rapport au groupe témoin.

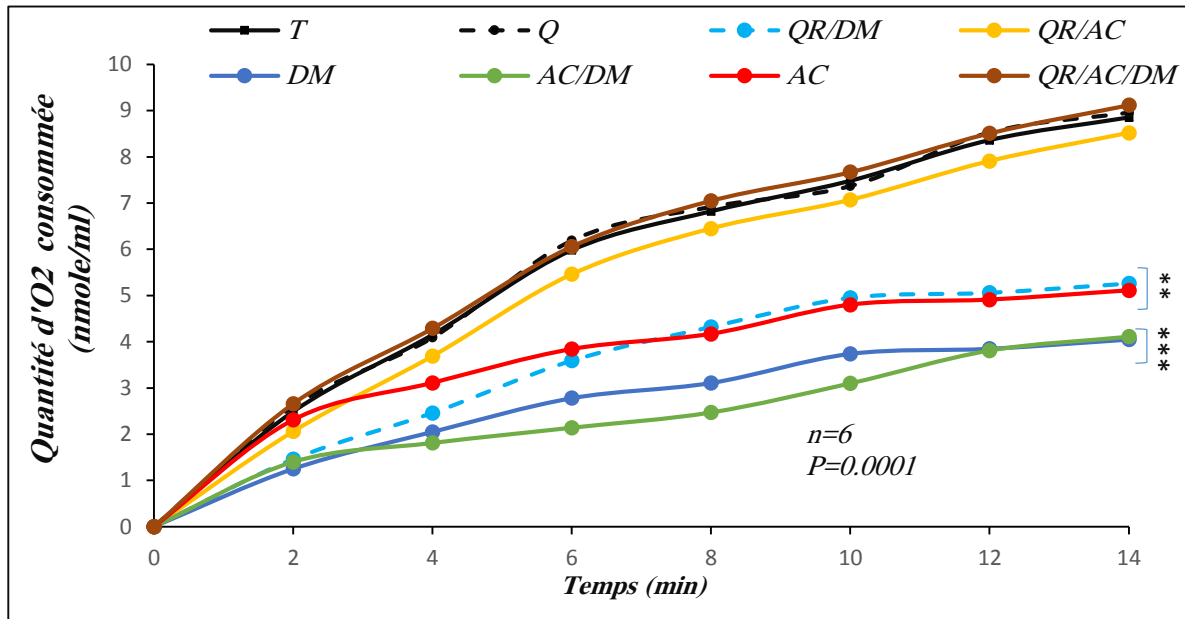


Figure 29. Variation de la respiration mitochondriale dans l'hippocampe chez les rats traités durant 3 mois par les pesticides et la quercétine.

C) Effet sur le striatum

Une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) de la concentration d'oxygène consommé dans le striatum a été observée chez les lots traités par DM et AC/DM comparés aux témoins. Aussi la figure 30 montre une diminution hautement significative ($p \leq 0,01$) et significative ($p \leq 0,05$) respectivement chez les lots traités par AC et QR/DM et QR/AC comparés aux témoins. En revanche, un état de stabilité est enregistré chez le lot traité par AC comparé au groupe témoin.

2.3.2. Effet des pesticides et la quercétine sur le gonflement mitochondrial

Les résultats concernant l'effet des pesticides et de la quercétine sur le gonflement mitochondrial dans le cerveau global, l'hippocampe et le striatum sont illustrés dans le tableau 08 et les figures 31 à 33.

A) Gonflement mitochondrial dans le cerveau total

Les résultats de l'évaluation du gonflement mitochondrial sont illustrés dans la figure 31, qui montre une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) du taux de gonflement mitochondrial dans le cerveau global chez les groupes traités par la DM et AC/DM comparés aux rats témoins. Une diminution hautement significative ($p \leq 0,01$) du taux de gonflement mitochondrial est également enregistrée chez le lot traité par AC comparé aux rats témoins.

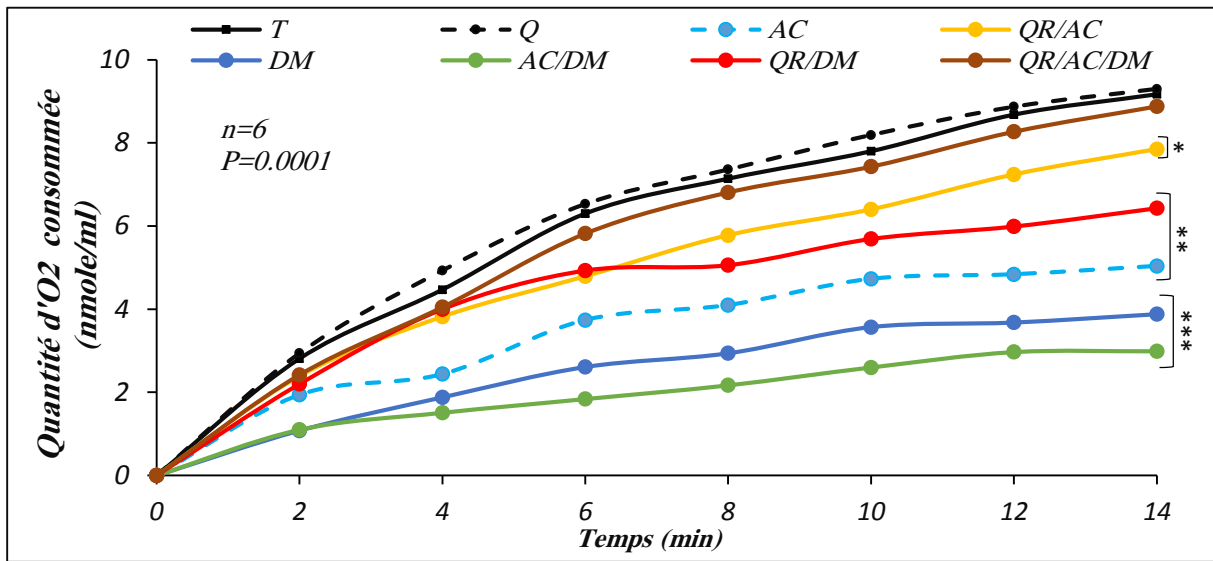


Figure 30. Variation de la respiration mitochondriale dans le striatum chez les rats traités durant 3 mois par les pesticides et la quercétine.

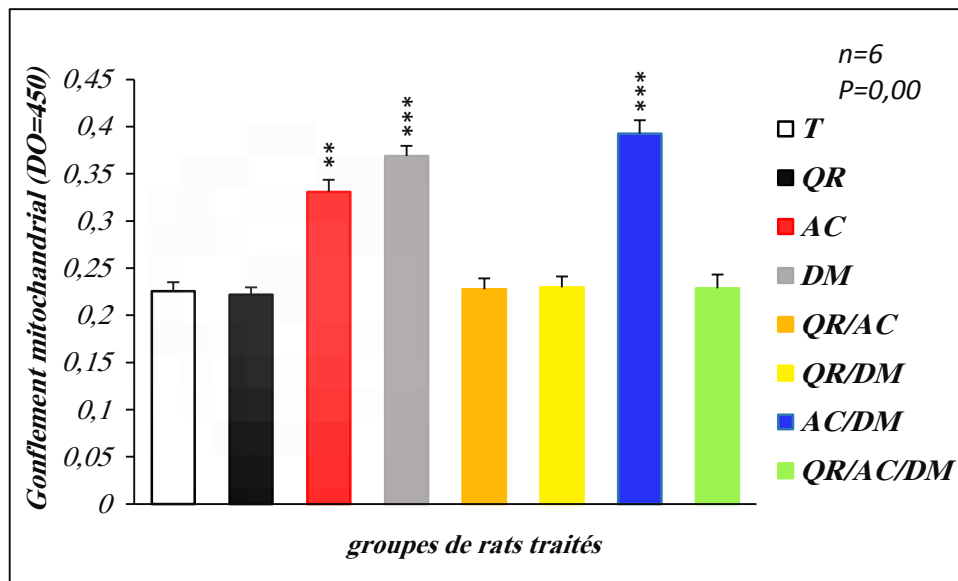


Figure 31. Variation du gonflement mitochondrial des cellules du cerveau total chez les rats traités durant 3 mois par les pesticides et la quercétine.

B) Gonflement mitochondrial dans l'Hippocampe

D'après les résultats obtenus (tab.08 ; fig.32) à la suite de l'évaluation du gonflement mitochondrial ont montré une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) chez les lots AC, DM et AC/DM par rapport au lot témoin.

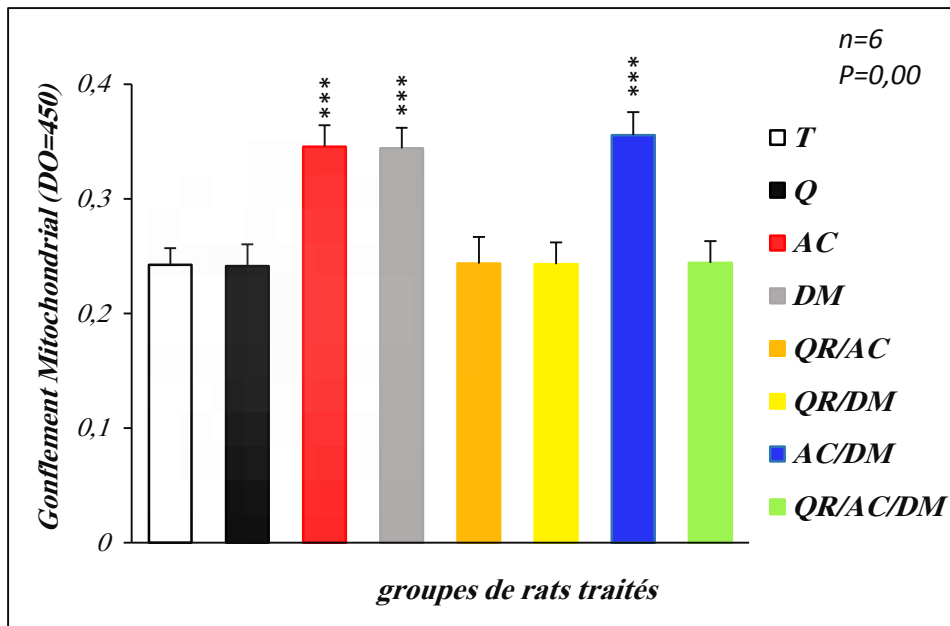


Figure 32. Variation du gonflement mitochondrial dans l’hippocampe chez les rats traités durant 3 mois par les pesticides et la quercétine.

C) Gonflement mitochondrial dans le striatum

L’évaluation du gonflement mitochondrial dans le striatum a montré une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) chez les lots AC, DM et AC/DM par rapport au lot témoin (*fig.33*). Par contre aucune variation significative n’a été enregistrée chez les lots traités par les pesticides associés à la quercétine.

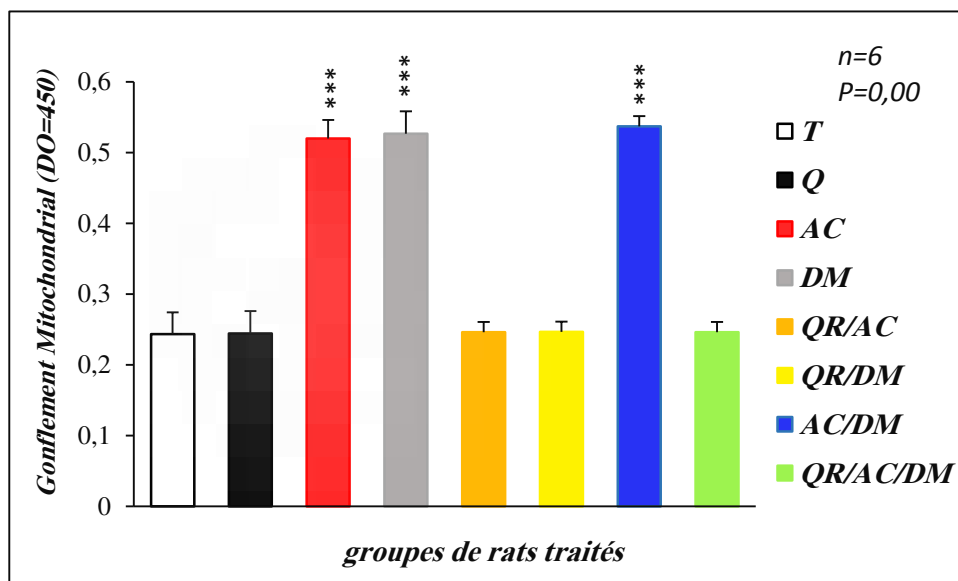


Figure 33. Variation du gonflement mitochondrial dans le striatum chez les rats traités durant 3 mois par les pesticides et la quercétine.

2.3.3. Effet des pesticides et la quercétine sur la perméabilité membranaire mitochondriale

Les résultats obtenus suite à l'évaluation de la perméabilité membranaire mitochondriale sous l'effet des pesticides et la quercétine dans le cerveau total, l'hippocampe et le striatum sont récapitulés dans le tableau 08 et illustrés par les figures 34 à 36.

A) Perméabilité membranaire mitochondriale dans le cerveau global

Une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) de la perméabilité mitochondriale est enregistrée dans le cerveau global chez les lots AC, DM et AC/DM comparés au groupe témoin (fig.34).

B) Perméabilité membranaire mitochondriale dans l'hippocampe

La figure 35 montre une augmentation non significative de la perméabilité mitochondriale dans l'hippocampe chez le lot QR et une diminution non significative également chez les lots traités par AC, DM et AC/DM comparés au groupe témoin.

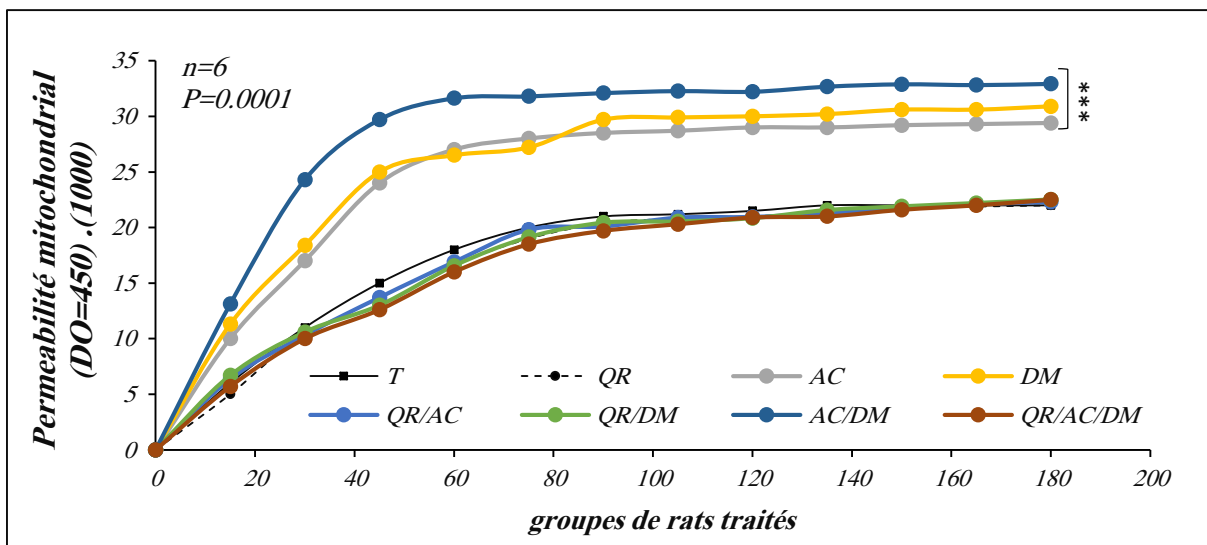


Figure 34. Variation de la perméabilité membranaire mitochondriale dans le cerveau total chez les rats traités durant 3 mois par les pesticides et la quercétine.

C) Perméabilité membranaire mitochondriale dans le striatum

Les résultats de l'évaluation de la perméabilité membranaire mitochondriale dans le striatum montrent une diminution non significative chez les lots AC, DM et AC/DM comparés au groupe témoin (fig.36).

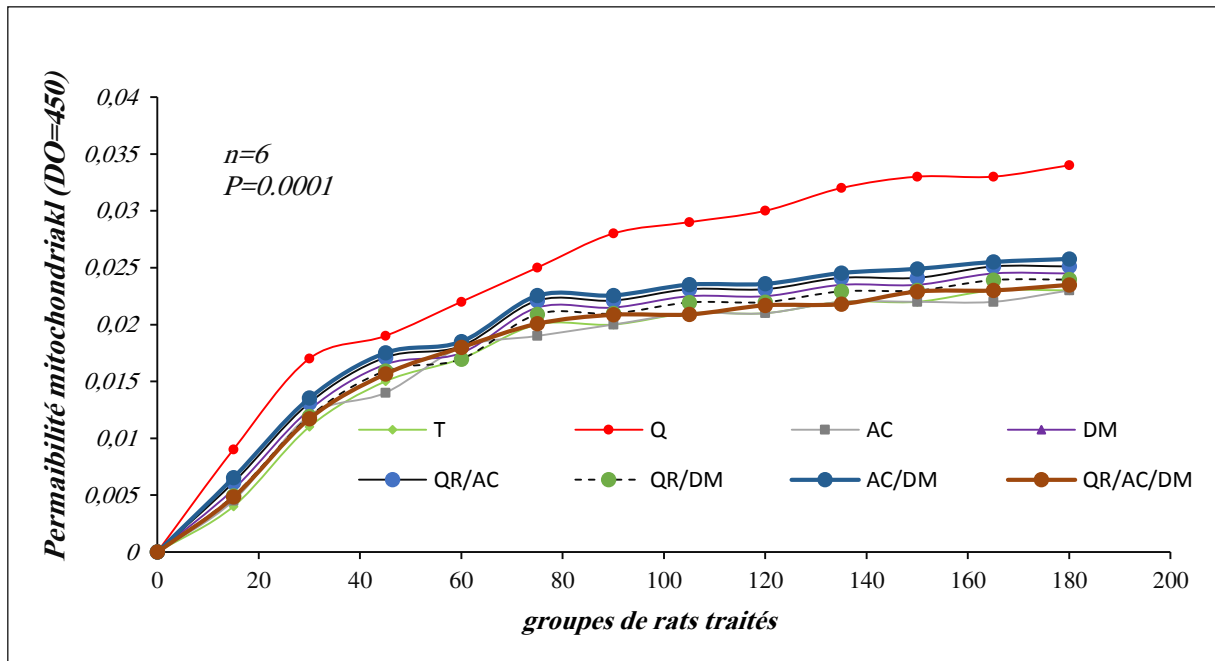


Figure 35. Variacion de la permeabilitat membranaire mitocondriale dans l'hippocampe chez les rats tractats durant 3 mois par les pesticides et la quercetina.

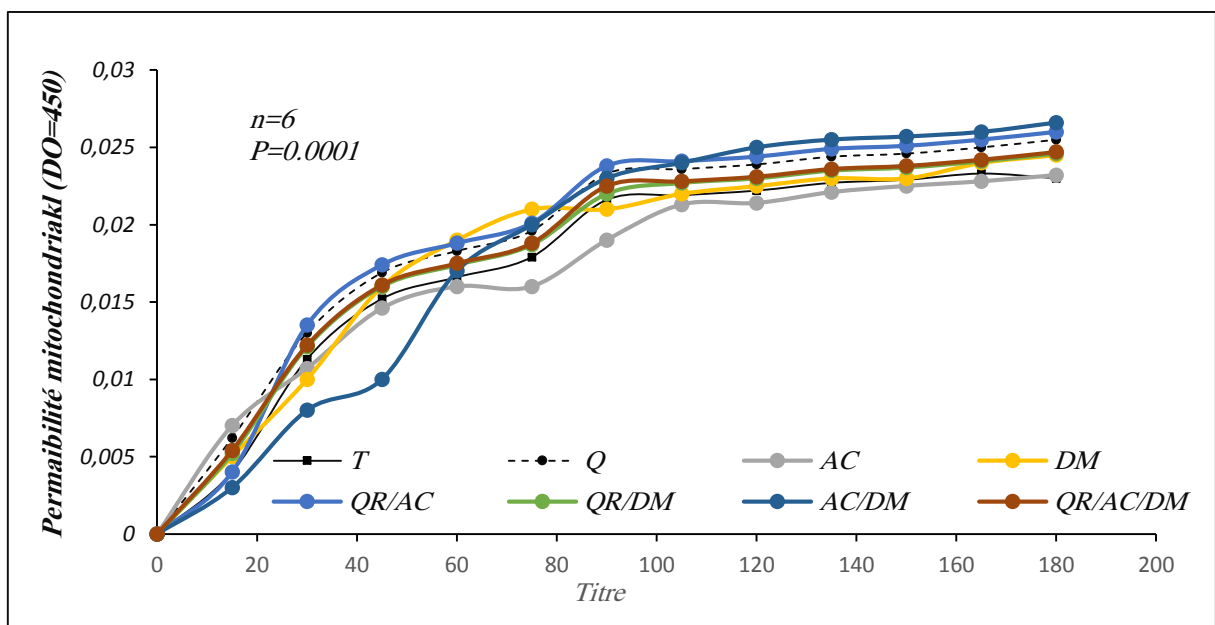


Figure 36. Variacion de la permeabilitat membranaire mitocondriale dans le striatum chez les rats tractats durant 3 mois par les pesticides et la quercetina.

2.3.4. Effets pro-apoptotique des pesticides et la quercétine dans le cerveau total, hippocampe et striatum chez le rat

Les résultats de l'évaluation des effets pro-apoptotiques des pesticides et l'effet anti-apoptotique de la quercétine dans le cerveau total, l'hippocampe et le striatum chez le rat, sont récapitulés dans le tableau 08 et illustrés par les figures 37 à 42.

2.3.4.1. Activité de la caspase-3

A) Activité de la caspase-3 dans le cerveau total

L'analyse statistique des résultats du dosage enzymatique de l'activité de la caspase-3 a montré une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) chez les groupes AC, DM et AC/DM comparés au témoin, par ailleurs ces mêmes résultats n'ont montrée aucune variation statistiquement significative chez les autres groupes restant par rapport au groupe témoin (fig.37).

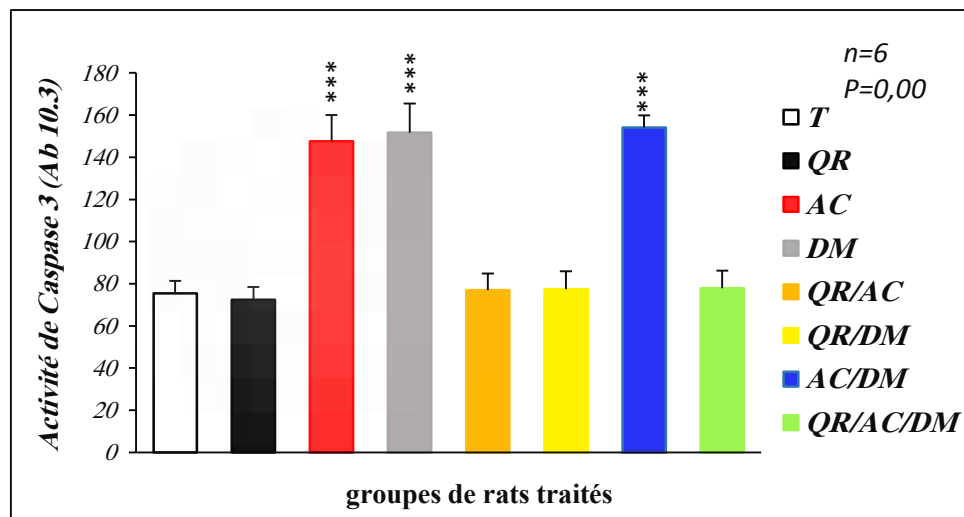


Figure 37. Variation de l'activité de la caspase-3 dans le cerveau total chez les rats traités durant 3 mois par les pesticides et la quercétine.

B) Activité de la caspase-3 dans l'hippocampe

On observe une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) de l'activité de la caspase3 chez les groupes DM et AC, comparés au groupe témoin, Tandis que, ces résultats montrent une variation hautement significative chez les groupes QR/DM par rapport aux témoins (fig.38).

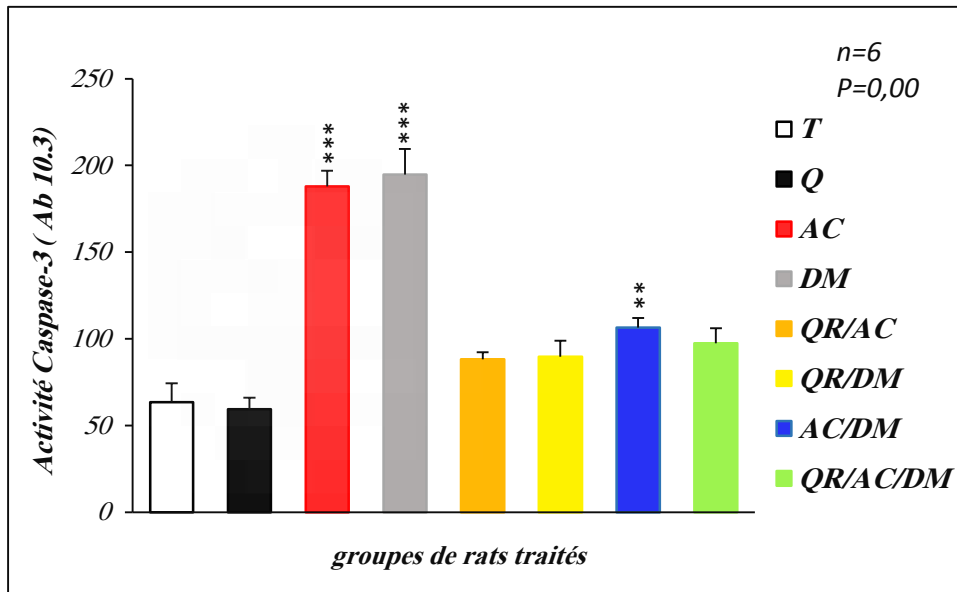


Figure 38. Variation de l'activité de la caspase-3 dans l'hippocampe chez les rats traités durant 3 mois par les pesticides et la quercétine.

C) Activité de la caspase-3 dans le striatum

On observe une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) de l'activité de la caspase-3 chez les groupes DM et AC/DM, et hautement significative ($p \leq 0,01$) chez le lot AC comparé au témoin. Ces résultats montrent également une variation significative chez les groupes QR/DM et QR/DM/AC comparés aux témoins (fig.39).

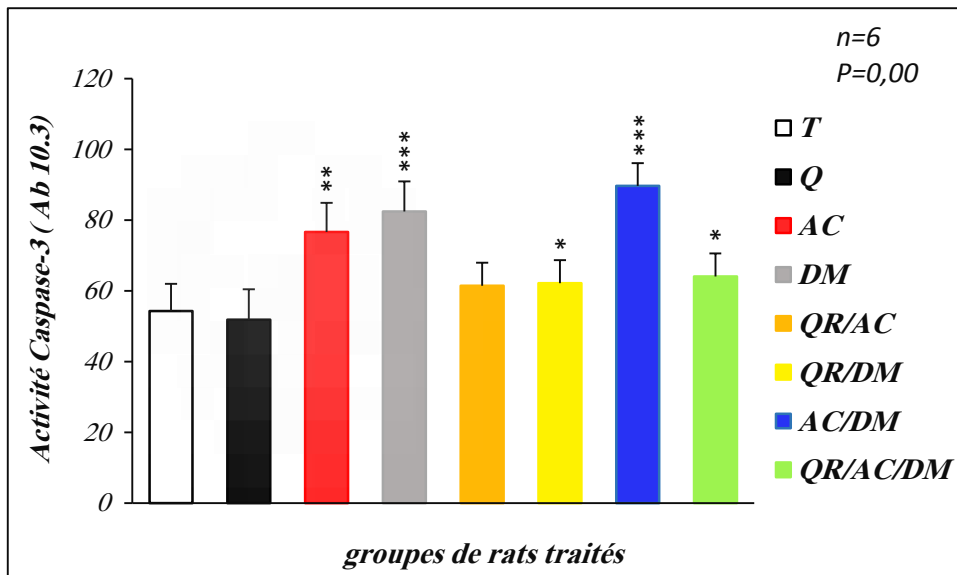


Figure 39. Variation de l'activité de la caspase-3 dans le striatum chez les rats traités durant 3 mois par les pesticides et la quercétine.

2.3.4.2. Effet des pesticides et la quercétine sur l'activité de Cytochrome-c cytosolique dans le cerveau total, l'hippocampe et le striatum

Les résultats concernant l'évaluation de l'activité de cytochrome-c dans le cytosol du cerveau total et régional sous l'effet des pesticides et la quercétine sont récapitulés dans le tableau 08 et illustrés dans les figures 40 à 42.

A) Effet sur le cytochrome-c cytosolique dans le cerveau total

L'analyse des résultats obtenus lors de l'évaluation de l'activité de cytochrome-c cytosolique dans le cerveau total a montré une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) chez les rats traités par AC, DM et AC/DM comparés aux rats témoins (*fig.40*).

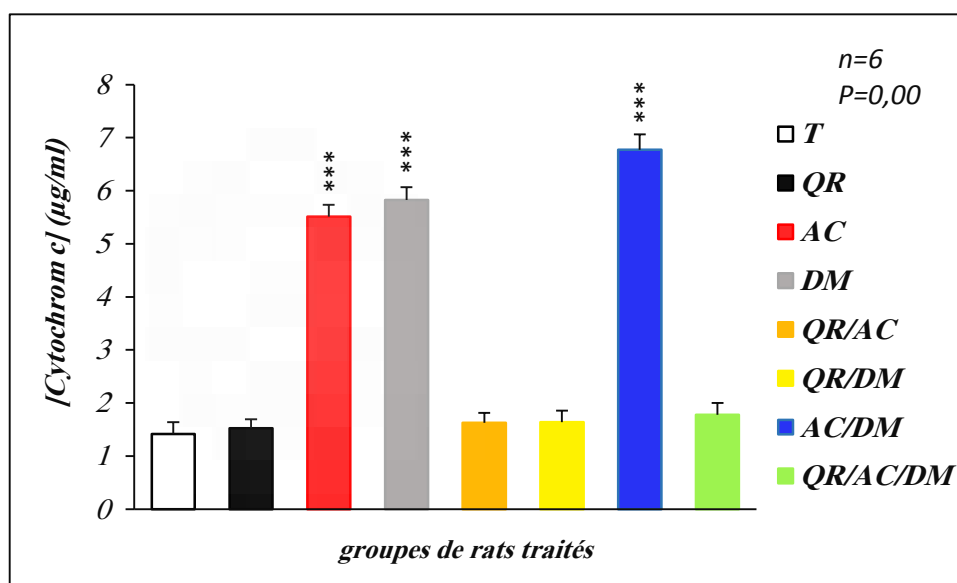


Figure 40. Variation de l'activité de cytochrome- c dans le cerveau total chez les rats traités durant 3 mois par les pesticides et la quercétine.

B) Effet sur le cytochrome-c cytosolique dans l'hippocampe

Aussi dans l'hippocampe, la figure 41 montre une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) de l'activité de cytochrome-c chez les rats traités par AC, DM et AC/DM comparés aux rats témoins.

C) Effet sur le cytochrome-c cytosolique dans le striatum

Dans le striatum, il est constaté qu'une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) de l'activité de cytochrome-c chez les groupes DM et AC/DM. Par ailleurs, une augmentation hautement significative ($p \leq 0,01$) et significative ($p \leq 0,05$) respectivement chez le lot AC et le lot QR/AC comparé au témoin (*fig.42*).

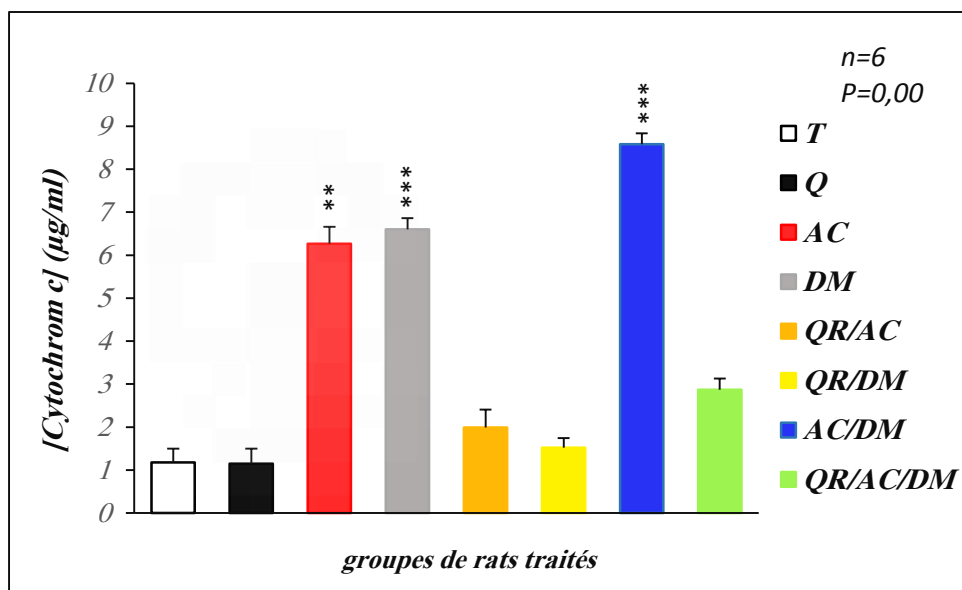


Figure 41. Variation de concentration de cytochrome-c cérébral dans l'hippocampe chez les rats traités durant 3 mois par les pesticides et la quercétine.

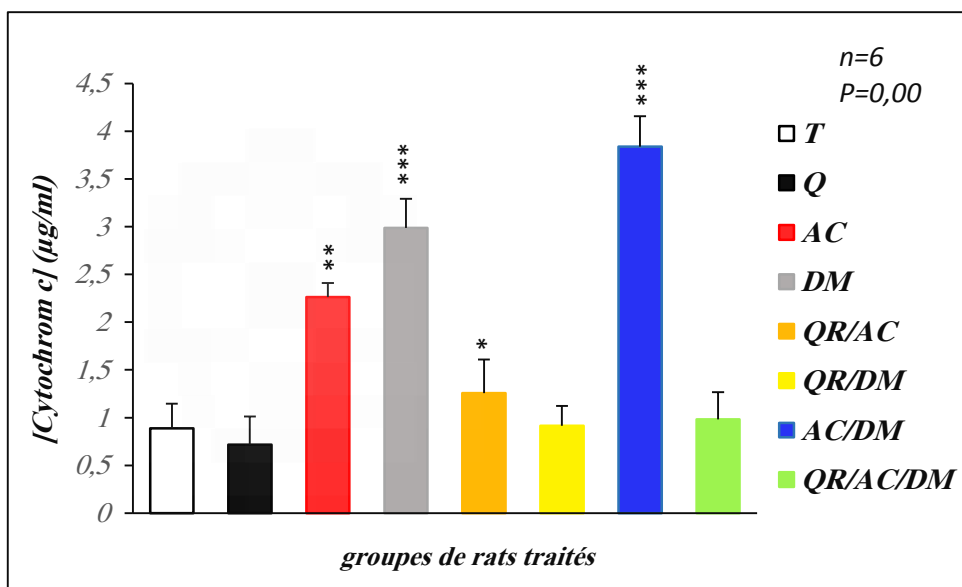


Figure 42. Variation de concentration de cytochrome c cérébral dans le striatum chez les rats traités durant 3 mois par les pesticides et la quercétine.

Tableau 08 : Variation cérébrale du gonflement, respiration et perméabilité mitochondriales, et l'activité de caspase-3 et cytochrome-c dans le cerveau total, l'hippocampe et le striatum chez les rats traités durant 3 mois par la Quercetine (QR) et les pesticides : Deltamethrine (DM), Acetamipride (AC) et les combinaisons de (QR/DM), (QR/AC), (AC/DM) et de (QR/AC/DM).

Paramètres	Groupes de rats traités								
	T	QR	DM	QR/DM	AC	QR/AC	AC/DM	QR/AC/DM	
Gonflement mitochondrial	Cer	0,225±0,009	0,221±0,007	0,36±0,01***	0,229±0,011	0,33±0,01**	0,227±0,011	0,39±0,014***	0,22±0,014
	Hip	0,242 ± 0,01	0,241 ±0,019	0,343 ± 0,017***	0,243 ± 0,018	0,345± 0,018***	0,243± 0,017	0,355± 0,017***	0,244± 0,018
	Str	0,243±0,03	0,244±0,031	0,526±0,031***	0,246±0,014	0,51±0,02***	0,245±0,014	0,01±0,014***	0,245±0,01
Respiration mitochondrial	Cer	++++	++++	++	++++	++	++++	+-	++++
	Hip	++++	++++	+++	++++	+++	++++	++	++++
	Str	++++	++++	+-	+++	++	++++	+-	++++
Perméabilité mitochondrial	Cer	++	++	++++	+++	++++	+++	+++	+++
	Hip	+++	+++	++++	+++	++++	+++	+++	+++
	Str	++	++	++++	++	++++	++	++	++
Caspase 3 Activité	Cer	75,45±5,85	72,36±6,12	151,6±7,82***	77,43±8,48	147,6±4,46***	76,97±7,87	154,12±5,69***	77,86±8,29
	Hip	63,45±10,9	59,437 ± 6,52	194,75 ± 14,79***	89,618 ± 9,21	187,93±8,93***	88,12±4,03	106,51±5,48**	97,49±8,66
	Str	54,23±7,67	51,82±8,24	82,37±6,56***	62,18±6,49*	82,37±8,20**	61,41±6,49	89,69±6,41***	64,04±6,54*
Cyt-c (µg/ml)	Cer	1,41±0,22	1,52±0,17	5,82±0,23***	1,64±0,21	5,51±0,21**	1,62±0,18	6,77±0,28***	1,77±0,22
	Hip	1,176±0,32	1,149±0,034	6,601±0,26***	1,521±0,000	6,26±0,39**	1,99±0,41*	8,58±0,25***	2,86±0,26
	Str	0,88 ±0,25	0,71±0,29	2,98±0,30***	0,91±0,20	2,26±0,14**	1,25±0,34	3,83±0,31***	0,98±,28

Hip: Hippocampe, **Str**: Striatum, **Cer**: Cerveau total. Chaque valeur est exprimée en moyenne ± écart type. Le test de student est appliqué pour une étude statistique comparative entre les différents groupes traités et le groupe témoin. ($p \leq 0.05$): significatif (*), ($p \leq 0.01$): hautement significatif (**), ($p \leq 0.001$): très hautement significatif (***), $P > 0.05$: non significatif (ns).

2.4. Effets des pesticides et de la quercétine sur les neurotransmetteurs dans le cerveau total et régional

Les résultats de l'évaluation des taux de différents neurotransmetteurs dans le cerveau total, l'hippocampe et le striatum chez les rats exposés chroniquement aux pesticides et à la quercétine, sont récapitulés dans le tableau 09.

2.4.1. Dopamine

A) Taux de la dopamine dans le cerveau total

Une diminution hautement significative ($p \leq 0,01$) du taux de dopamine cérébrale est observée dans le cerveau global chez les rats traités par AC et DM comparés au groupe témoin. On observe également une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) chez le groupe traité par la combinaison AC/DM comparé au témoin (*tab.09*).

B) Taux de la dopamine dans l'Hippocampe

L'évaluation du taux de la dopamine a montré une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) dans l'hippocampe chez les rats traités par AC, DM et AC/DM quand ils sont comparés au groupe témoin. Par ailleurs, aucune différence significative n'est observée chez les autres groupes comparés au témoin (*tab.09*).

C) Taux de la dopamine dans le striatum

Le dosage de la dopamine dans le striatum a montré une augmentation hautement significative ($p \leq 0,01$) chez les rats traités par AC et AC/DM comparés au groupe témoin. En revanche, le taux de dopamine a diminué de façon hautement significative chez le groupe traité par DM comparé au témoin. Par contre, aucune différences significative mentionnée chez le reste des groupes comparés au témoin (*tab.09*).

2.4.2. Adrénaline

Les données dans le tableau 09 représentent la variation de l'adrénaline sous l'effet des pesticides (AC et DM) et de la quercétine (QR) dans le cerveau global, l'hippocampe et le striatum.

A) Taux de l'adrénaline dans le cerveau global

Les résultats obtenus de l'évaluation du taux d'adrénaline dans le cerveau total montrent une augmentation hautement significative ($p \leq 0,01$) et très hautement significative ($p \leq 0,001$) du niveau de cet neurotransmetteur chez les lots traités par AC et DM et lot traité par AC/DM par rapport au groupe témoin (*tab.09*).

B) Taux de l'adrénaline dans l'Hippocampe

Une augmentation hautement significative ($p \leq 0,01$) du taux d'Adrénaline est observée dans l'hippocampe chez les lots traités par DM et AC/DM. Une augmentation est également significative ($p \leq 0,05$) chez le lot traité par AC par rapport au groupe témoin (*tab.09*).

C) Taux de l'adrénaline dans le striatum

Même dans le striatum, les résultats de l'évaluation de l'adrénaline ont montré une augmentation hautement significative ($p \leq 0,01$) et très hautement significative ($p \leq 0,001$) de taux d'Adrénaline respectivement chez les lots traités par AC, DM et AC/DM par rapport au groupe témoin (*tab.09*).

2.4.3. Sérotonine

Les résultats de l'évaluation de la sérotonine sous l'effet des pesticides (AC et DM) et de la quercétine (QR) dans le cerveau global, l'hippocampe et le striatum sont récapitulés dans le tableau 09.

A) Taux de la sérotonine dans le cerveau global

L'évaluation du taux la sérotonine a montré une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) du taux de la sérotonine dans le cerveau total chez les groupes AC, DM et AC/DM comparés au témoin.

B) Taux de la sérotonine dans l'Hippocampe

La quantification de la sérotonine dans l'Hippocampe a montré une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) chez les rats traités par AC, DM et AC/DM quand ils sont comparés au groupe témoin (*tab.09*).

C) Taux de l'adrénaline dans le striatum

Une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) du taux de la sérotonine dans le striatum a été observée chez les groupes traités par AC, DM et AC/DM comparés au témoin. Alor qu'on n'a enregistré aucun changement significatif de ce taux chez le reste des groupes comparés au témoin (*tab.09*).

2.4.4. Glutamate

Les résultats obtenus de l'évaluation de la teneur cérébrale en glutamate chez les rats traités chroniquement par les pesticides et la quercétine sont aussi récapitulés dans le tableau 09.

A) Taux de glutamate dans le cerveau global

Une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) du taux de glutamate a été enregistrée dans le cerveau total chez les rats traités par AC, DM et AC/DM par rapport au témoin. Or, aucun changement significatif du taux de Glutamate dans ce cerveau n'a été constaté chez le reste des groupes de rats comparés au lot témoin (*tab.09*).

B) Taux de glutamate dans l'Hippocampe

Après l'analyse statistique des valeurs obtenus lors de l'évaluation du taux de glutamate, une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) est observée dans hippocampe chez les groupes DM et AC/DM comparés au témoin, et aussi une augmentation hautement significative ($p \leq 0,01$) observée chez le lot traité par AC par rapport au témoin (*tab.09*).

C) Taux de glutamate dans le striatum

Les résultats de l'évaluation du taux glutamate dans le striatum ont montré une augmentation hautement significative ($p \leq 0,01$) chez les groupes DM et AC/DM comparés au témoin, et une augmentation significative ($p \leq 0,05$) est observée également chez le lot traité par AC par rapport au groupe témoin (*tab.09*).

2.4.5. Acétylcholine estérase

Les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'activité de l'acétylcholinestérase dans le cerveau total, hippocampe et striatum chez les rats traités chroniquement par les pesticides et la quercétine sont récapitulés dans le tableau 09.

A) Activité de l'acétylcholinestérase dans le cerveau total

Une diminution hautement significative ($p \leq 0,01$) de l'activité de l'AChE est enregistrée dans le cerveau global chez les groupes traités par AC, DM et une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) de l'activité de cette enzyme est également observée chez le lot traité par AC/DM comparés tous au lot témoin. En revanche, aucune différence significative n'est observée chez le reste des groupes en comparaison avec témoin (*tab.09*).

B) Activité de l'acétylcholinestérase dans l'Hippocampe

Le tableau 09 montre une augmentation statistiquement hautement significative ($p \leq 0,01$) de l'activité de l'AChE dans l'hippocampe chez les groupes traités par AC, DM par rapport au témoin. Par contre, une diminution hautement significative ($p \leq 0,001$) de l'activité de l'AChE est observée chez le lot traité par (AC/DM) comparé au lot témoin.

Tableau 09 : Variation cérébrale de Dopamine (DP), Sérotonine (SER), Adréraline, Glutamate et de l'activité d'acétylcholine estérase (AChE) dans le cerveau total, l'hippocampe et le striatum chez les rats traités durant 3 mois par la Quercetine (QR), Deltamethrine (DM), Acetamipride (AC) et les combinaisons de (QR/DM), (QR/AC), (AC/DM) et de (QR/AC/DM).

Paramètres	Groupes de rats traités								
	T	QR	DM	QR/DM	AC	QR/AC	AC/DM	QR/AC/DM	
Dopamine (P g/ml)	Cer	05,82±0,26	5,83±0,27	2,58±0,26**	5,61±0,19	2,93±0,25**	5,76±0,24	02,31±0,15***	5,60±0,17
	Hip	5,864±0,80	5,931±0,947	2,10±0,54***	5,396±0,594	2,633±0,14***	5,464±0,20	02,3 ±0,35***	5,125 ±0,29
	Str	7,52±0,684	7,516±0,644	5,83±0,60**	7,454±0,350	8,811±0,31**	7,81 ±0,29	09,38 ±0,30**	7,585 ±0,18
Serotonin (P g/ml)	Cer	10,93±1,24	11,00±1,12	5,04±0,98***	10,65±1,01	5,126±1,04***	10,74±1,02	04,15±1,02***	10,94±1,05
	Hip	11,96±0,86	11,905±0,89	7,10±0,54***	11,39±1,15	6,633±0,44***	11,99±0,26	08,3 ±0,35***	12,225±0,33
	Str	11,90±0,60	11,888±0,59	6,76±0,46***	11,60±1,21	6,147±0,24***	12,44±0,27	6,84±0,37***	12,52±0,33
AChE (nmol/min/mg)	Cer	45,86±2,42	48,89±2,75	31,13±3,45**	45,3±2,980	34,33±2,93**	45,54±2,26	30,12±3,09***	45,73±2,87
	Hip	48,6±5,090	47,9±4,3300	61,70±4,35**	49,1±4,435	32,35±1,91**	62,04±3,12	37,47±2,75***	47,21±2,96
	Str	60,0±2,768	59,9±3,1440	75,9±4,130**	61,3±2,846	38,75±2,73**	71,21±2,96	33,42±2,92**	57,25±2,39
Adrenaline (P g/mg)	Cer	26,66±0,75	26,65±0,42	31,48±1,53**	26,79±0,86	29,23±1,03**	26,74±0,86	35,06±0,62***	26,81±0,83
	Hip	27,32±1,71	26,90 ± 1,38	31,90±1,71**	27,36±1,66	30,06±0,44*	26,52±0,26	32,96±1,06**	26,75±1,00
	Str	26,66±1,18	26,56±1,227	33,81±1,84***	27,19±1,24	31,21±2,02***	27,03±0,61	34,68±0,37***	26,78±0,33
Glutamate (mmol/l)	Cer	1,69 ± 0,32	1,674±0,33	1,85 ± 0,42***	1,93±0,34	1,70 ± 0,29***	1,73 ± 0,32	01,98 ± 0,38***	1,75 ± 0,34
	Hip	0,890±0,07	0,87± 0,085	1,933± 0,13***	0,946±0,11	1,74±0,036**	0,99 ± 0,05	01,97±0,04***	1,42± 0,093
	Str	1,00 ± 0,12	0,979± 0,10	1,610± 0,11**	1,02 ± 0,13	1,43 ± 0,06*	0,97 ± 0,032	01,49 ± 0,04**	0,98 ± 0,03

Hip: Hippocampe, **Str**: Striatum, **Cer**: Cerveau total. Chaque valeur est exprimée en moyenne ± écart type. Le test de student est appliqué pour une étude statistique comparative entre les différents groupes traités et le groupe témoin. ($p \leq 0.05$): significatif (*), ($p \leq 0.01$): hautement significatif (**), ($p \leq 0.001$): très hautement significatif (***), $P > 0.05$: non significatif (ns).

C) Activité de l'acétylcholinestérase dans le striatum

L'analyse des valeurs obtenues suite à l'évaluation de l'activité de l'acétylcholinestérase a montré une diminution hautement significative ($p \leq 0,01$) de cette activité dans le striatum chez le lot traité par AC par rapport au témoin. Ainsi, une augmentation hautement significative ($p \leq 0,01$) de l'activité de cette enzyme a été observée chez les groupes DM et AC/DM quand ils sont tous comparés au lot témoin (*tab.09*).

2.5. Effets des pesticides et la quercétine sur le neurocomportemental chez le rat

2.6.1. Test de labyrinthe classique

Les résultats obtenus suite à l'examen de ce test sur les animaux sont illustrés par la figure 43. L'analyse statistique de ces résultats a montré une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) du temps d'arrivée (fig.43-A) et une diminution très hautement significative de temps d'exploration (fig.43-B) chez les lots AC, DM et AC/DM quand ils sont comparés aux témoins. Aussi, une augmentation significative de temps d'exploration est observée également chez les lots QR/AC, QR/DM et QR/AC/DM comparés aux témoins. Tandis que ces résultats n'ont montré aucune variation statistiquement significative chez les autres lots par rapport aux témoins.

2.6.1. Test de «Open field »

La figure 44 montre les résultats du test d'Open Field, où :

- La figure (44-A) présente une augmentation significative ($p \leq 0,05$) du mouvement des rats traités par les pesticides dans la zone intermédiaire par rapport aux témoins.
- La figure (44-B) nombre total de mouvement ; (C) Distance du mouvement total ; (D) Mouvement dans la zone périphérique ; (E) Mouvement dans la zone central, présentant une diminution significative des paramètres cités chez les rats traités par les pesticides DM et AC comparés aux rats témoins.

2.6.2. Test de la Piscine de Morris

Les résultats affichés dans de la figure 45 montrent une diminution significative ($p \leq 0,05$) de longueur de chemin et une diminution hautement significative ($p \leq 0,01$) du temps de latence chez les rats traités par AC et DM comparés aux témoins. Tandis que ces mêmes résultats n'ont montré aucune variation statistiquement significative chez les rats traités par DM/QR quand ils sont comparés aux témoins.

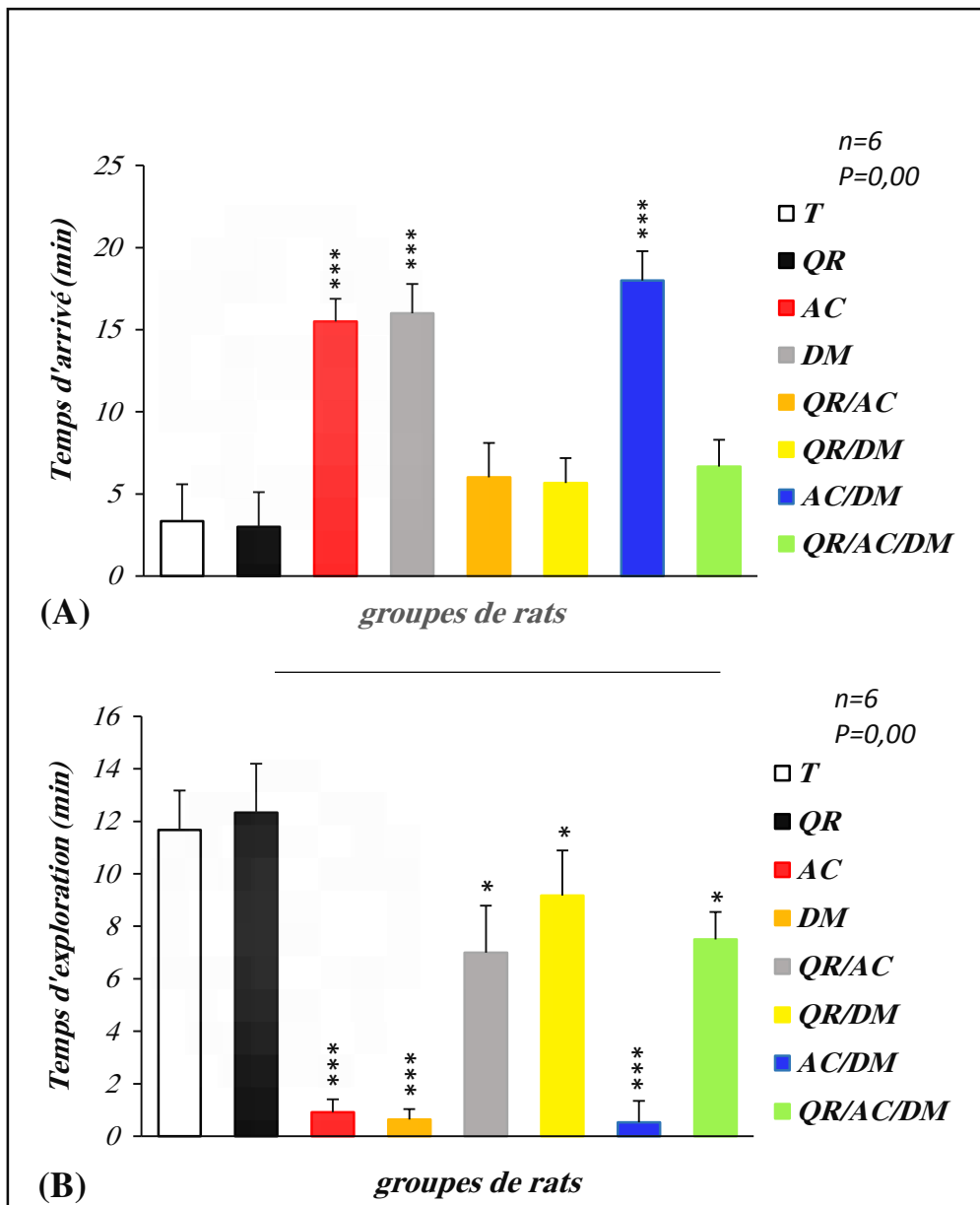


Figure 43. Variation des données de test de Labyrinthe Classique chez les groupes de rats traités par les pesticides et la quercétine durant 3 mois. (A) : Temps d'arrivée au point final dans labyrinthe (B) : Temps d'exploration du milieu de labyrinthe

2.6.3. Test de préférence au sucrose

Les résultats obtenus de ce test montrent une diminution significative de préférence au saccharose et une élongation très claire de la durée de consommation d'eau sucrée chez les rats traités par AC/DM comparé aux témoins, et aussi ces mêmes résultats ne montrent aucune différence significative chez les rats traités par DM/QR par rapport aux témoins (fig.46).

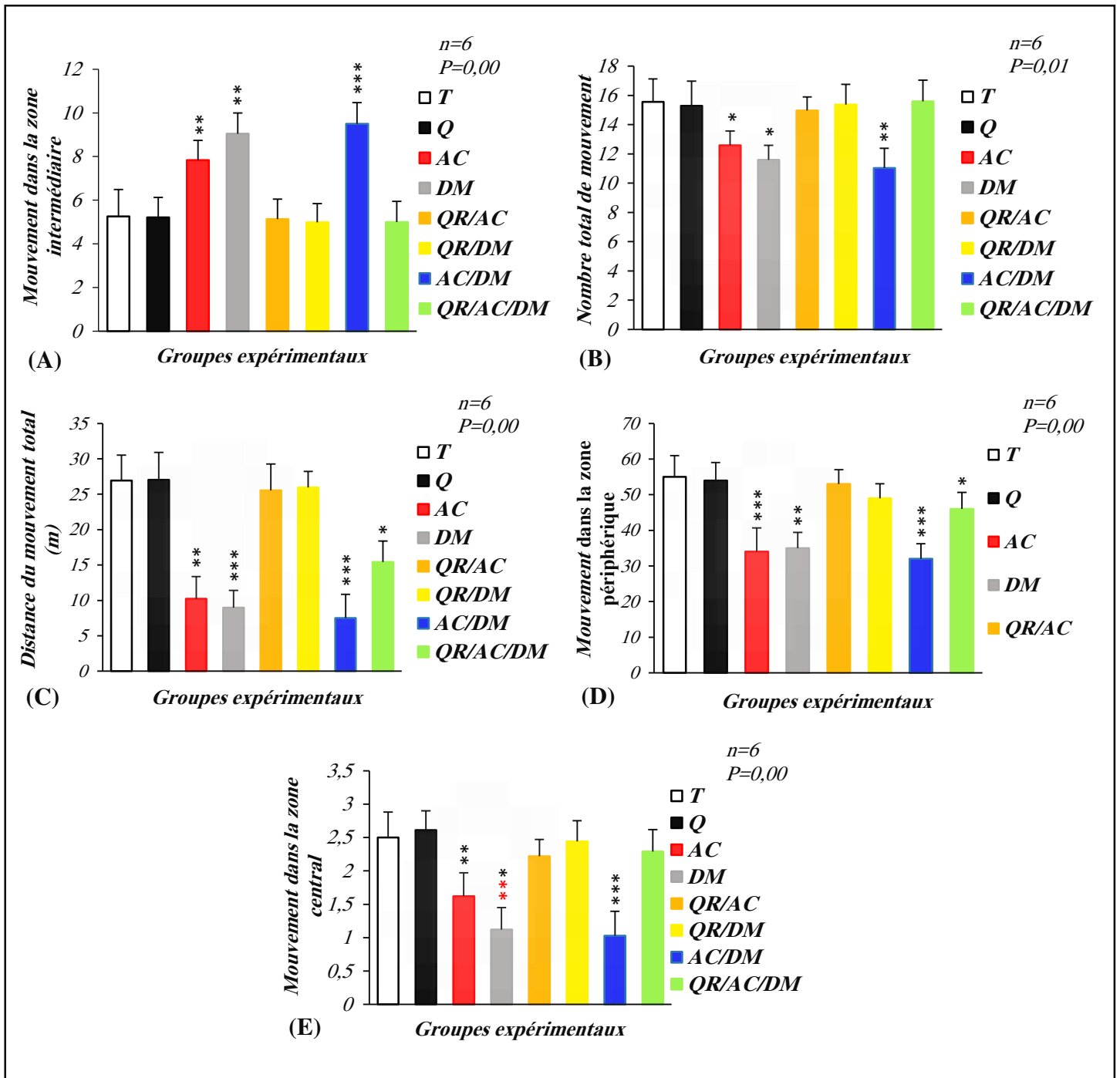


Figure 44. Variation des données du test Open Field chez les rats traités durant 3 mois par les pesticides et la quercétine. (A): *Mouvement dans la zone intermédiaire* ; (B): *Nombre total de mouvement* ; (C): *Distance du mouvement total* ; (D): *Mouvement dans la zone périphérique* ; (E): *Mouvement dans la zone central*.

2.7. Effets des pesticides et de la quercétine sur l’histologie globale et régionale du cerveau

2.7.1. Histologie du cerveau total (Topographie du cerveau)

L’observation des coupes histologiques du cerveau total des rats traités par la deltaméthrine à 0,32mg/kg/j et l’acetamipride à 3,14mg/kg/j pendant 90 jours (*fig.47 et 48*), révèle une modification morphologique des régions cérébrales (Hippocampe et Striatum) bien visible par rapport au groupe témoin, se traduisant par une hyperplasie, l’éclatement des cellule cérébrales et des lésions vasculaires. Ces altérations de la structure affectent la fonction des neurones et peuvent contribuer à un dysfonctionnement de cet organe. Alors que le traitement des animaux par la quercétine à la dose de 10mg/kg/j seule ou associée aux pesticides a diminué les altérations tissulaires induites par les pesticides.

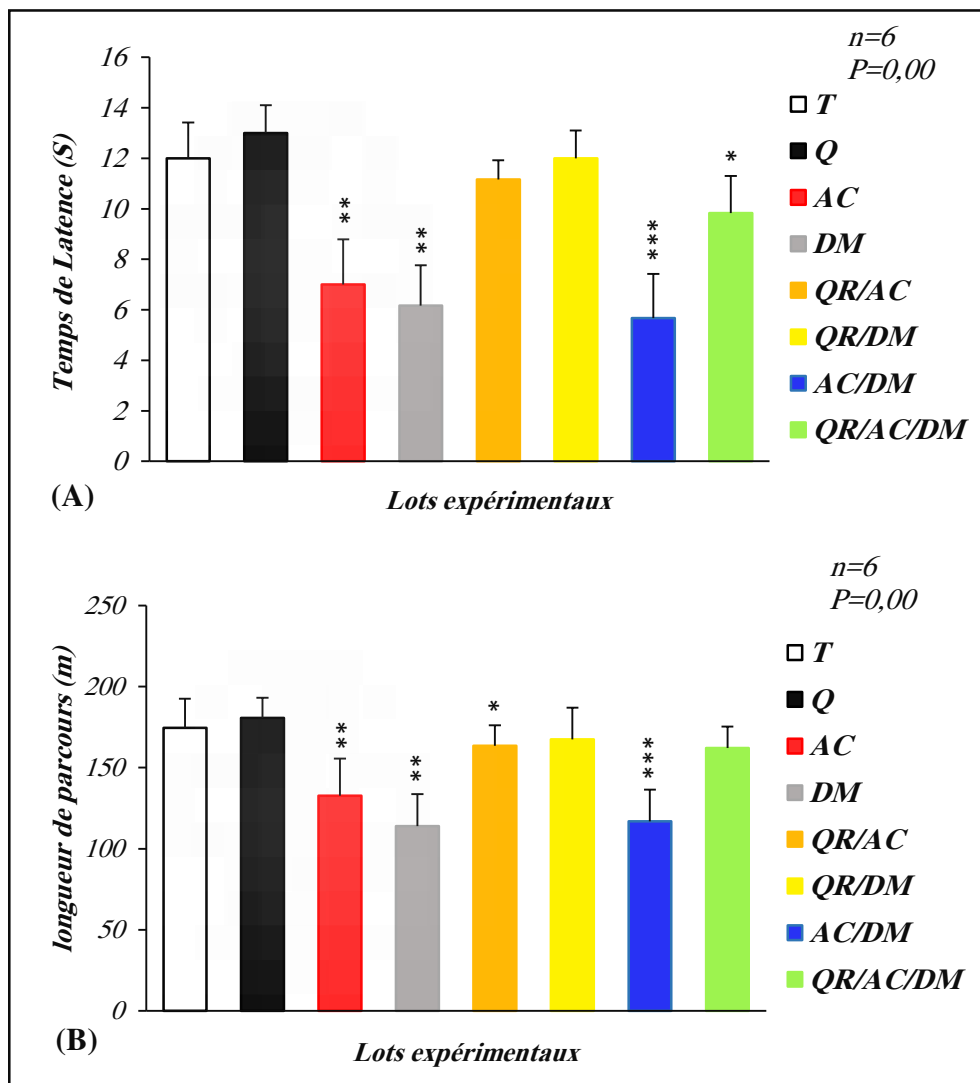


Figure 45. Variation des paramètres du test de piscine de Morris chez les rats traités durant 3 mois par les pesticides et la quercétine.

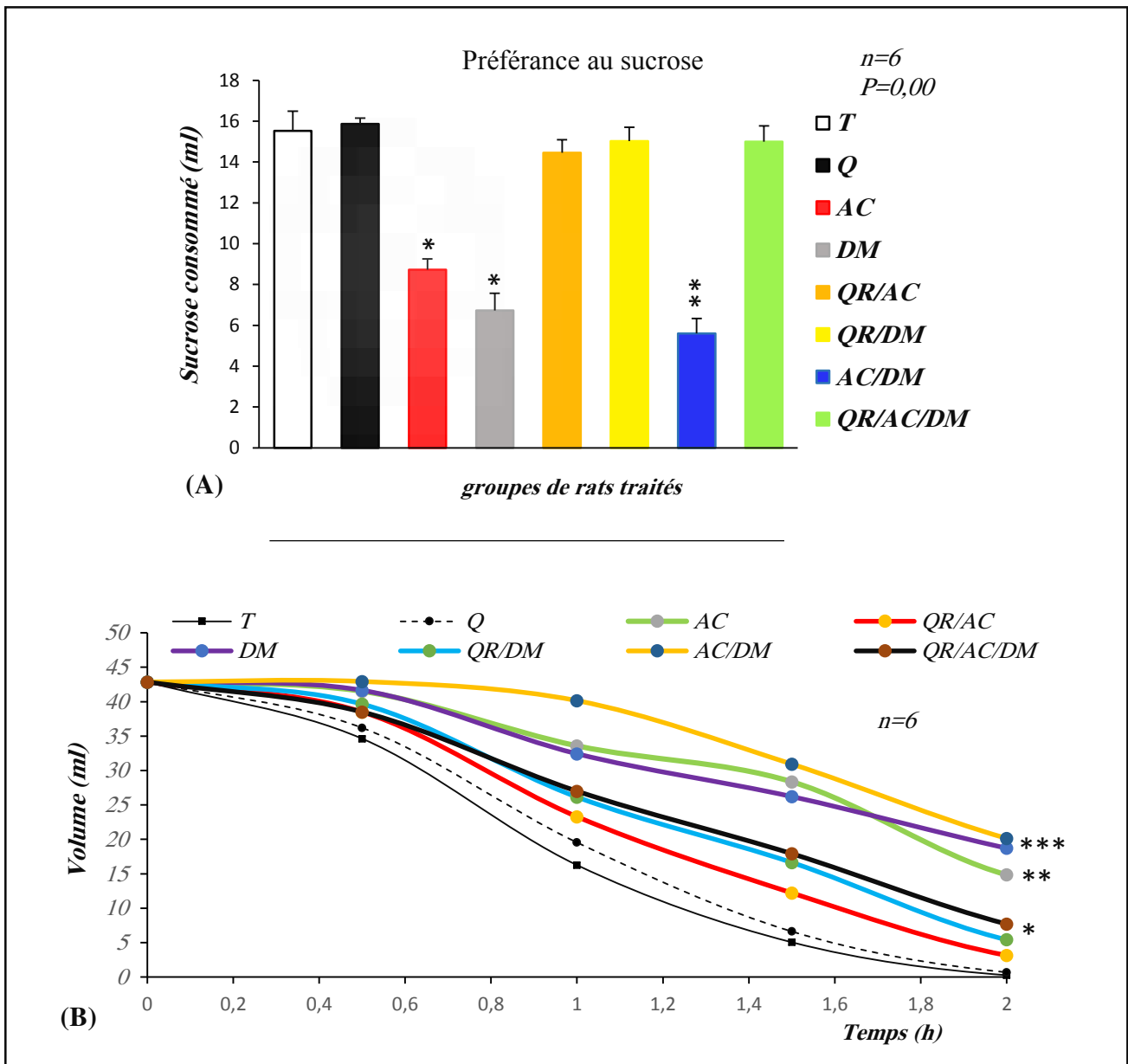


Figure 46. Variation du test de préférence au sucrose et de la consommation d'eau sucrée chez les rats traités durant 3 mois par les pesticides et la quercétine.

2.7.2. Histologie de l'hippocampe et le striatum

Des coupes histologiques dans l'hippocampe et le striatum des rats traités par la DM et l'AC (fig.49 et 50) montrent aussi une diminution très claire du nombre des cellules cérébrales par rapport aux rats témoins, cette diminution peut causer par des lésions et de mort cellulaire après l'exposition chronique aux ces pesticides. Ces altérations des cellules affectent la fonction des neurones et peuvent contribuer à un dysfonctionnement de ces régions et aussi de cet organe. Alors que le traitement des animaux par la quercétine seule ou associée aux pesticides a diminué les altérations induites par les pesticides.

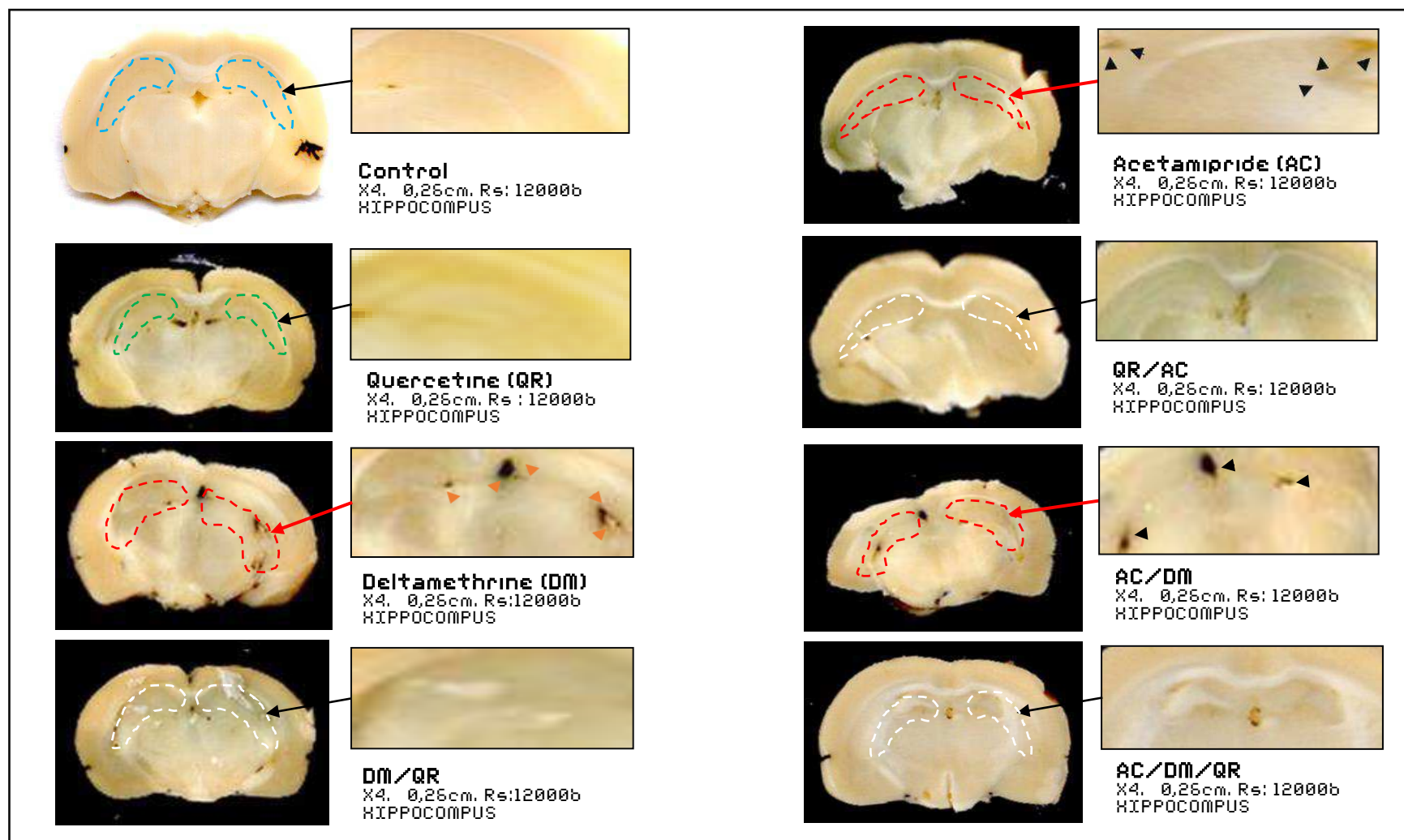


Figure 47. Coupes histologiques du cerveau montrant l'hippocampe chez les rats traités par la quercétine (QR) et les pesticides : la deltamethrine (DM), l'acetamipride (AC) et par les combinaisons (QR/DM, QR/AC, DM/AC et QR/DM/AC).

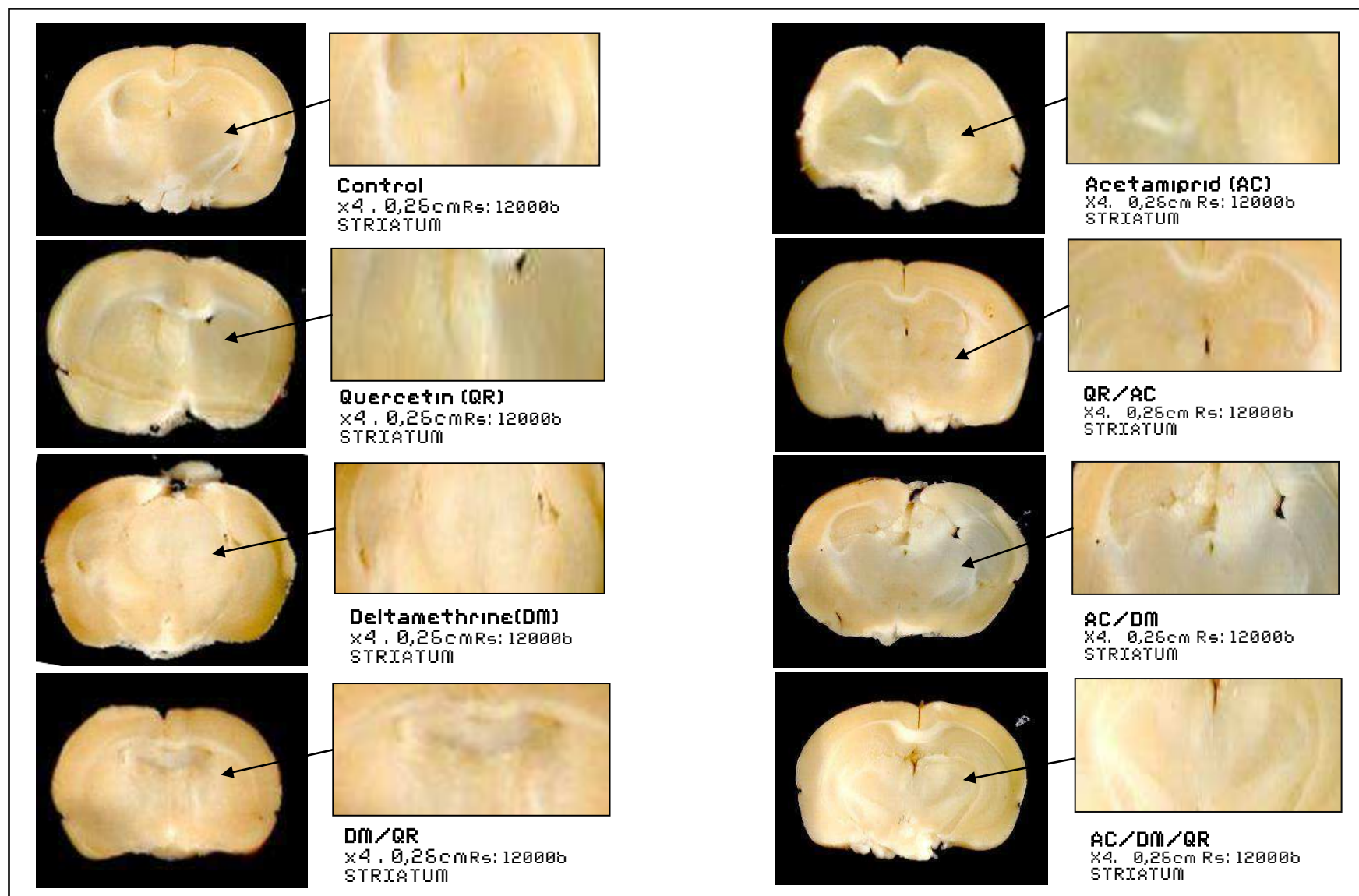


Figure 48. Coupes histologiques du cerveau montrant le striatum chez les rats témoins et traités par la quercétine (QR), la deltaméthrine (DM), l'acetamipride (AC) et par les combinaisons (QR/DM, QR/AC, DM/AC et QR/DM/AC).

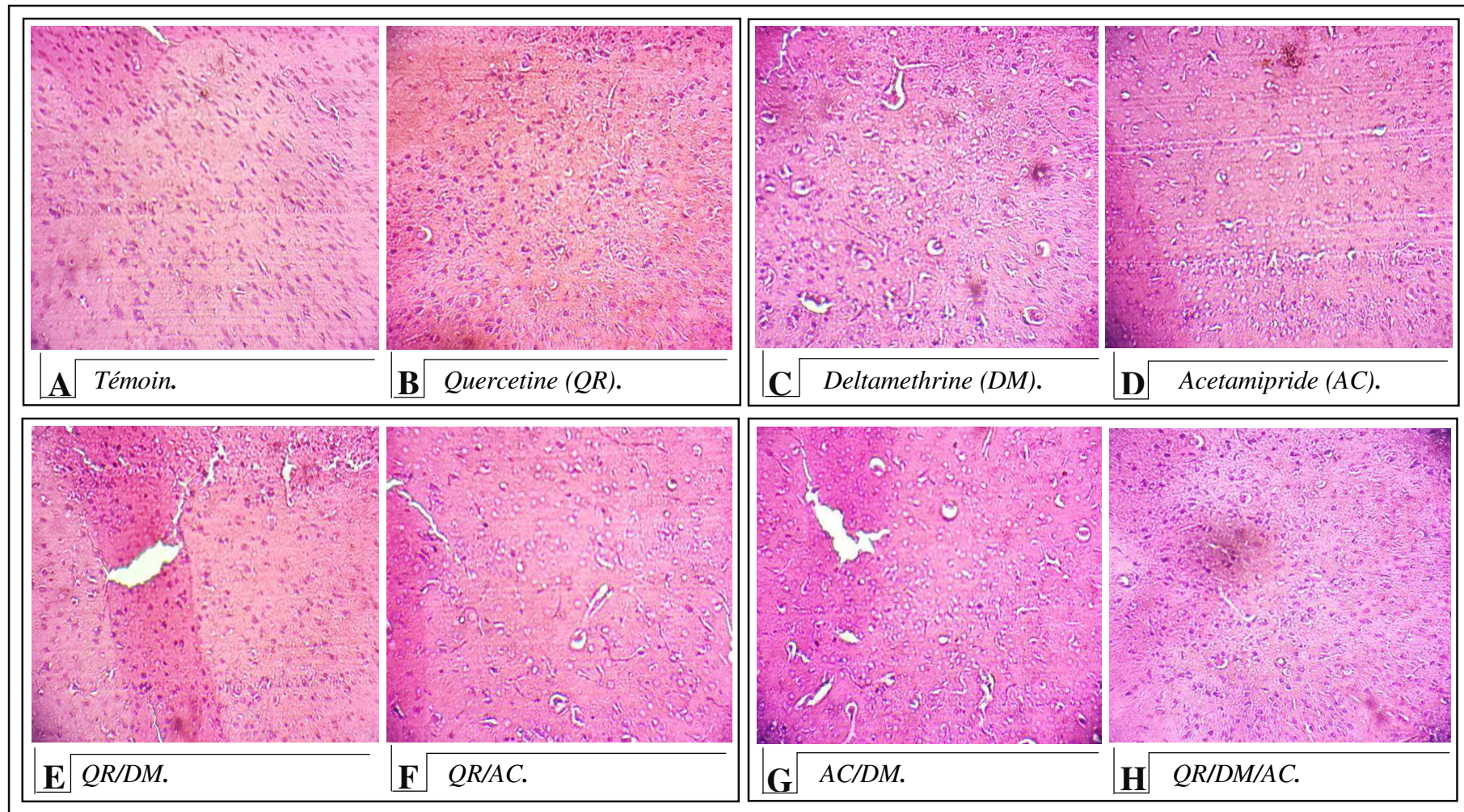


Figure 49. Coupes histologiques (×40) dans l'hippocampe des rats témoins et traités par la quercetine (QR), la deltamethrine (DM), l'acetamipride (AC) et leurs combinaisons après 90 jours de traitement.

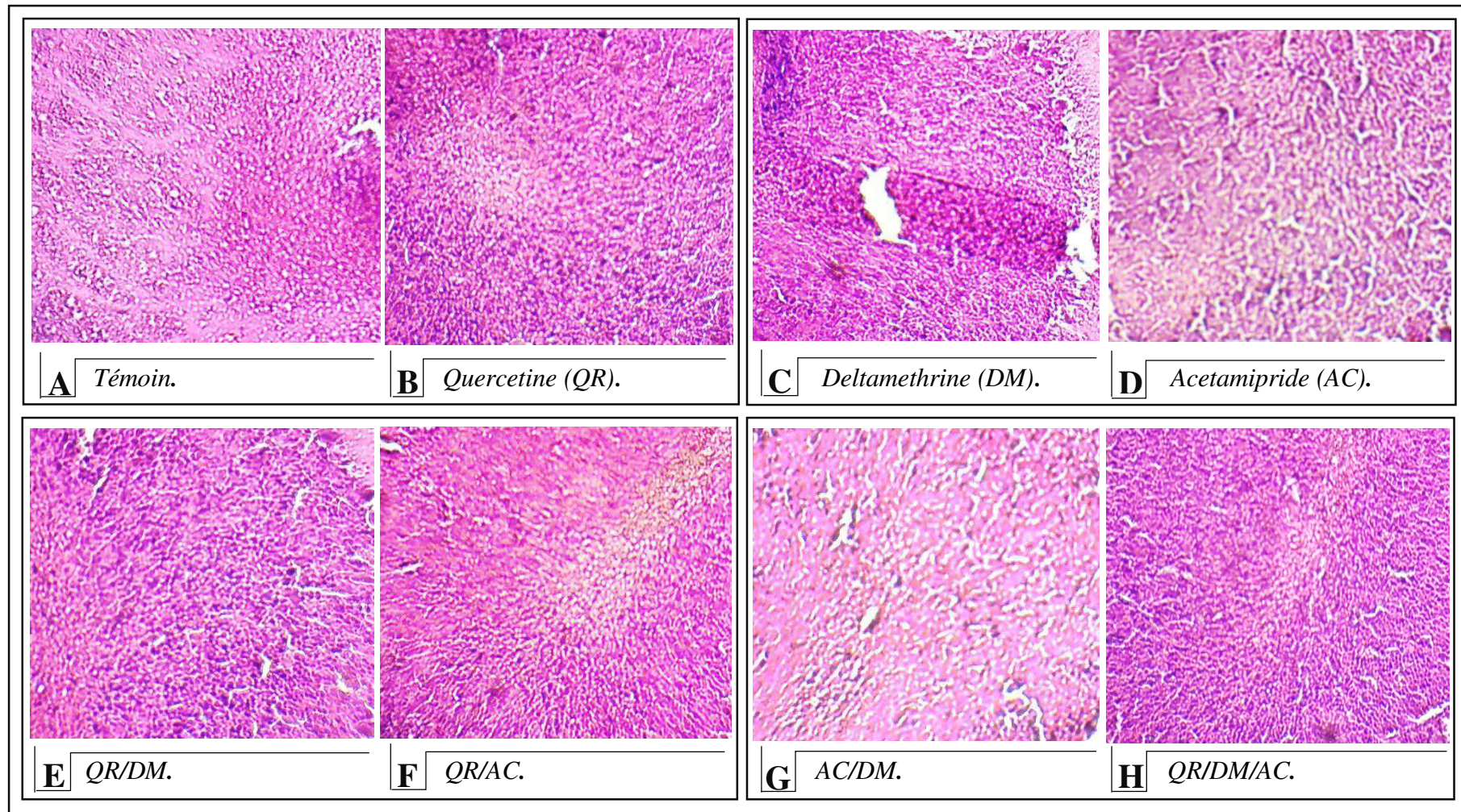


Figure 50. Coupes histologiques (×40) dans le striatum des rats témoins et traités par la quercetine (QR), la deltamethrine (DM), l'acetamipride (AC) et par leurs combinaisons après 90jours de traitement.

3. Discussion

Le stress oxydatif est l'un des principaux mécanismes de toxicité associés à une panoplie de xénobiotiques dans l'environnement, parmi lesquels, on retrouve les pesticides et les produits phytosanitaires (Lauvverys et al., 2007 ; Lukaszewicz, 2008 ; Michael et al., 2016). Dans cette présente étude, nous nous sommes intéressés, à priori à la mise en évidence d'un éventuel effet neurotoxique sur le cerveau total et régional chez le rat exposé chroniquement à des petites doses plus réalistes possibles de la deltaméthrine (DM), de l'acetamipride (AC) et de leur mixture et en second lieu à l'intérêt de la prévention de cette toxicité par la quercétine (QR), molécule de grande importance dans la cytoprotection contre les effets délétères du stress oxydant engendré très souvent par les xénobiotiques. Des travaux biochimique, biologique et neurocomportemental étaient plus qu'indispensables pour cerner, d'une manière scientifique satisfaisante, la question posée dans la problématique que l'on a posée dans l'introduction de cette étude.

3.1. Effets des pesticides et la quercétine sur les paramètres de la croissance globale

Les résultats de l'évaluation des paramètres pondéraux suggèrent que l'administration d'AC et de DM provoque une diminution significative de la croissance corporelle des différents groupes de rats. Cette diminution peut être traduite par la perturbation du métabolisme cellulaire sous l'effet du stress oxydatif engendré par les ROS constaté dans cette étude, ainsi que par d'autres médiateurs chimiques tels que certaines cytokines pro-inflammatoires que l'organisme puisse libérer après les effets toxiques des pesticides (Carole et Harve, 2011 ; Viviana, 2015). La réduction du poids corporel peut être le résultat également du phénomène anorexique que les animaux puissent subir avec le temps de l'exposition aux xénobiotiques et l'état de stress dans lequel vivent durant la période de cette exposition (Viviana, 2015 ; Chakroun et al., 2016). En effet, de nombreux mécanismes d'action ont été établis pour expliquer l'anxiété liée au stress, comme le stress oxydatif, la libération de glucocorticoïdes, l'altération du système GABAergique, la sécrétion de l'adrénaline et de la sérotonine (Jocelien et al., 2013; Guedri et al., 2017). Ces résultats sont en accord avec les travaux d'Anadn et al. (1991) et Bourbia (2013), qui ont signalé une réduction dans la consommation de la nourriture chez les rats mâles survenue à une toxicité subchronique. Par ailleurs, l'utilisation de la quercétine a montré une amélioration de ces paramètres pondéraux des animaux. Ceci pourrait être la conséquence de son pouvoir

antioxydant en normalisant l'homéostasie redox intracellulaire et le rétablissement de l'état psychique des animaux (Cliona et al., 2011 ; Toumi et al., 2016).

3.2. Effets des pesticides et la quercétine sur les paramètres biochimiques

D'après les résultats de ce travail, l'exposition des rats aux pesticides seuls ou en mixture a induit un effet perturbateur du métabolisme général des cellules cérébrales. Il faut savoir qu'au cours de la période de croissance cérébrale, le cerveau humain ne dépend que du glucose alors que le cerveau des rats utilise à la fois le glucose et les composés cétoniques pour couvrir ses besoins énergétiques et biosynthétiques (Nehlig, 1997 ; Sheline, 2000). Donc la résistance à l'hypoglycémie chez les rats est plus importante que chez l'être humain même sous l'inhibition des enzymes hydrogénases par les xénobiotiques. Par ailleurs, le cerveau utilise une stratégie de dominance pour garder et prolonger la demi vie des cellules nerveuses par plusieurs mécanismes, à l'inverse des autres cellules stomatiques, le métabolisme cérébral est hyperactif en cas de stress. Les pesticides administrés aux rats peuvent activer de manière indirecte la β -oxydation dans les cellules cérébrales de l'hippocampe, du striatum et du cerveau total suite à une insuffisance nutritive à cause de l'état anorexique des animaux. Cette β -oxydation active donc la lipolyse et la réserve lipidique est consommée (exceptionnellement chez le rat) afin de produire l'énergie nécessaire à la fonction cérébrale. Un tel état métabolique avancé peut arriver à dégrader les lipides membranaires ce qui augmente le taux de la nécrose et l'apoptose cellulaire (Canipe, 2016 ; Zhang et al., 2016). Il est avéré, par ailleurs, que le stress et la réduction de la sérotonine induits par les pesticides peuvent inhiber les enzymes du métabolisme et la consommation des glucides (Diepenbroek et al., 2017 ; Prichard et al., 2016) d'où l'accumulation des nutriments détectée dans les mitochondries des différentes régions cérébrales. Cette accumulation perturbe la fonction mitochondriale, conditions favorables pour un déséquilibre du statut redox mitochondrial engendrant au final une apoptose cellulaire (Seaton et al., 1996 ; Zhang et al., 2007). Ces résultats sont en accord avec ceux apportés par beaucoup de travaux des autres chercheurs (Adams et al., 1990 ; Nehlig, 1997 ; Pellerin et al., 2007 ; Sauer, 2014 ; Adegbesan et Adenuga, 2007 ; Pomierny et al., 2013). L'augmentation également du taux des protéines après l'exposition chronique des rats aux pesticides traduit la synthèse des enzymes et peptides de défense contre le déséquilibre homéostatique du stress oxydatif (Anadn et al., 1991 ; Benbouzib, 2012 ; Rouabhi et al., 2015). En revanche, selon les résultats obtenus lors de l'utilisation de la quercétine comme étant molécule cytoprotectrice il s'avère que ce composé phénolique a bien amélioré

l'homéostasie des paramètres biochimiques étudiés dans ce présent travail. Ce pouvoir préventif pourrait être attribué aux caractères moléculaires antioxydant de ce polyphénol à travers le groupement cathéchol, les liens insaturés du noyau C, la fonction 4-oxo et les groupes à affinité chélatrice des métaux qui caractérisent ce composé (Leclerc, 2012). Ces résultats sont en accord avec de nombreuses études sur ce polyphénol (Williams et al., 2004 ; Lahouel et al., 2016 ; Lee et al., 2016).

3.3. Effets des pesticides et la quercétine sur l'intégrité structurale et fonctionnelle des mitochondries

Les mitochondries sont indispensables pour la production d'énergie cellulaire nécessaire au maintien de la fonction cellulaire (Clayton et Doda, 2001 ; David et al., 2014 ; Lin et Beal, 2006). Les Dommages mitochondriaux contribuent à une diminution de la production d'ATP (Cassarino and Bennettjr, 1999 ; Datta and Kaviraj, 2003). Des altérations dans l'un des complexes mitochondriaux provoquent la production des radicaux libres, ce qui conduit à la dépolarisation de la membrane mitochondriale et une activation ultérieure des récepteurs voltage-dépendants, ce qui permet l'afflux de calcium dans la cellule et le déclenchement des voies de la mort cellulaire (Lin et Beal, 2006 ; Romero et al., 2012 ; Rodriguez et al., 2016). En effet, l'exposition des rats aux pesticides AC et DM seuls ou en mixture a montré une augmentation significative de la perméabilité ($\Delta\psi_m$) et le gonflement mitochondrial dans l'hippocampe, le striatum et le cerveau total. Cet état d'effets est le résultat de l'action des ROS produits par les pesticides étudiés. Il est bien admis que la surcharge calcique est responsable du gonflement mitochondrial pouvant provoquer la formation de monoxyde d'azote (NO), et permettre d'activer la xanthine oxydase dans le sens de générer l'anion superoxyde qui inactive la NADH-déshydrogénase, la NADH-oxydase et l'ATPase générant au final un état de stress oxydatif mitochondrial (Zhang et Darley, 2000). L'augmentation du gonflement mitochondrial est due à la perturbation des pores géants voltages dépendant sous l'effet des ROS entraînant l'entrée massive de l'eau et des ions de Ca^{2+} et de Na^+ via les membranes mitochondriales (Romero et al., 2012 ; Morris and Berk, 2015 ; Henine et al., 2016 ; Taib et al., 2016). Aussi, selon Johnson and Deckwerth (1993) & Kumar et al. (2014), les ROS altèrent les protéines et les enzymes, responsables sur la désintégration de la cytoarchitecture, et la dénaturation de l'ADN cellulaire et mitochondrial (Xudong, 2016). L'apoptose cellulaire est le résultat final d'une agression par les ROS, elle est caractérisée morphologiquement par une dilatation du réticulum endoplasmique puis, après augmentation du volume mitochondrial et gonflement de la cellule, on assiste à une rupture

des membranes (Ben-Haiand, 2014). Le gonflement mitochondrial permet ensuite l'externalisation de plusieurs protéines proapoptotiques, telle que le cytochrome-c, de la mitochondrie vers le cytosol permettant le déclenchement de la voie de signalisation apoptotique et la mort cellulaire (Zhang et Darley, 2000 ; Fethi et al., 2013). Selon les résultats de l'étude préventive de la quercétine, il y a eu une protection des animaux contre la toxicité mitochondriale dans le cerveau total, l'hippocampe et le striatum induite par les pesticides seuls ou en mixture, du moment que ce composé phénolique a pu maintenir l'intégrité mitochondriale et fonctionnelle de ces organelles. Ces résultats sont en accord avec plusieurs travaux récents ayant étudié le potentiel chémoprotecteur de la quercétine dans le cas de l'exposition aux pesticides (Lakroun et al., 2015; Beghoul et al., 2017).

3.4. Effets des pesticides et la quercétine sur le statut redox

Le cerveau consomme de 20 à 25% d'O₂ corporel, cette grande quantité d'O₂ est responsable sur la production modérée des ROS (~2% d'O₂ transformé en O₂[°]), mais avec les systèmes antioxydants cellulaires cette quantité ne présente aucun risque pour l'organisme (Rehman, 2006 ; Dinu et al., 2010 ; Chargui et al., 2012 ; Kamendra et al., 2013 ; Wang et Martínez, 2016). D'après les résultats obtenus de cette étude, l'exposition des animaux au pesticide seuls ou en mixture présente un déséquilibre du statut redox tant cytosolique que mitochondrial dans le cerveau, l'hippocampe et le striatum en faveur du stress oxydatif caractérisé par une chute significative du potentiel antioxydant. En effet, la peroxydation lipidique est accentuée et une perte énorme de la teneur cellulaire en GSH et l'activité antioxydases telles que la SOD, CAT, GPx et GST. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Dinu et al. (2010) évaluant l'impact des pesticides sur l'homéostasie redox chez le rat, sachant bien entendu qu'une surproduction de ROS favorise le risque de nécrose et/ou de l'apoptose cellulaire (Zou et al., 1999 ; Rjeibi, 2016). Le GSH est un tripeptide bien connu pour être un élément de la première ligne de défense contre le stress et considéré dès lors un composé essentiel qui maintient l'intégrité cellulaire grâce à sa propriété réductrice et sa participation active dans le métabolisme cellulaire (Sauer, 2014 ; Aoun et Tiranti, 2016). Certains des rôles importants de glutathion sont la réduction ou l'inactivation des ROS par la formation de glutathion disulfure (GSSG) et la conjugaison du glutathion réduit (GSH) pour l'élimination des xénobiotiques (Di-Monte et Lavasani, 2002 ; Arora et al., 2016 ; Rjeibi, 2016). Les résultats obtenus de l'évaluation de GSH tant dans le cytosol que dans la matrice mitochondriale après l'exposition chronique des animaux aux pesticides, ont présenté une diminution significative de sa teneur dans le cerveau. Ce constat expérimental est tout à fait

en adéquation avec les travaux réalisés par **Chakroun et al., (2016)** et **Beghoul et al., (2017)** qui ont rapporté une augmentation de MDA comme étant indicateur de la lipoperoxydation médiée par les ROS sous l'effet de ces pesticides. La GPx est une enzyme antioxydante clé qui règle le niveau des ROS dans les cellules (**Datta et Kaviraj, 2003 ; Henine et al., 2016**). Une séléno-enzyme unique dans les cellules de mammifères, qui catalyse les réactions de réduction des peroxydes organiques et inorganiques, en utilisant le glutathion réduit comme donneur de protons, ce qui provoque l'oxydation de glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG) et la production d'alcool primaire non toxique (**Cory et al., 2005 ; Kebieche et al., 2009**). Généralement, la GPx, la CAT et la SOD favorisent et accélèrent grandement le transfert de H₂O₂ en H₂O par des mécanismes différents. L'inhibition de CAT et GPx, et l'induction de GST expliquent les quantités élevées des ROS produites après l'intoxication par les pesticides DM et AC seuls ou en mixture. Les cellules nerveuses et particulièrement les astrocytes sont sensibles aux dommages induits par un excès de ROS comme l'O₂[°], H₂O₂, NO et HO[°]. Ces ROS responsables de dysfonction cellulaires, donc de la perturbation des fonctions nerveuses et la survenue des maladies neurodégénératives (**Laurie, 2013**). En effet, des recherches effectuées bien avant sont en faveur du rôle étiologique du stress oxydant dans l'apparition de la plupart de ces maladies (**Bashkatova, 2004 ; Franco, 2009**). Généralement, les résultats de ce travail montrent une diminution significative des activités enzymatiques de CAT et GPx tant dans les mitochondries que dans le cytosol du cerveau total, l'hippocampe et le striatum chez les rats exposés chroniquement aux DM et AC seuls ou en mixture, ce qui confirme l'état de stress oxydant induit par ces pesticides dans le tissu cérébral. Même résultats apportés par d'autres travaux sur l'impact des pyréthrinoïdes et néonicotinoïdes sur le cerveau de l'organisme animal (**Halliwell, 2006 ; Chakroun et al., 2016 ; Beghoul et al., 2017**). L'activité de la catalase est spécifiquement inféodée à la transformation du peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau (**Federico et al., 2012**). Elle est principalement située dans le peroxysome. Elle prévient donc des dommages oxydatifs au sein du peroxysome, et empêche sa propagation dans le reste de la cellule (**Fleming et al., 1999**). Généralement, l'AC et la DM seuls ou en mixture ont provoqué la diminution de l'activité catalasique dans l'hippocampe, le striatum et le cerveau total. Ce constat suggère que ces pesticides induisent indirectement une augmentation de H₂O₂ dans les mitochondries et le cytosol. En effet, la diminution des activités GPx et CAT augmentent les H₂O₂ et produisent une quantité massive de radical °OH via la réaction de Fenton (**Cory et al., 2005 ; Banerjee, 2001**). Cela est expliqué par un épuisement cervical de cette enzyme suite à l'exposition des animaux aux pesticides (**Bidlack, 1996 ; Icenogle, 2004**). En outre, la GST

est impliquée également dans la réduction des dommages des ROS dans différentes cellules. Elle représente une famille d'enzymes multifonctionnelles essentiellement cytosoliques, impliquées dans des opérations diverses de transports et de biosynthèses intracellulaires (**Bidlack, 1996 ; Sauer, 2014 ; Di-Monte et Lavasani, 2002**). Mais la fonction la plus étudiée des GST concerne la prévention contre les xénobiotiques en catalysant des réactions de conjugaison entre GSH et des molécules réactives comportant des sites électrophiles, capables de réagir dangereusement avec des macromolécules comme les acides nucléiques (**Sauer, 2014**). La catalyse de cette conjugaison du glutathion avec certains substrats représente une étape majeure dans la formation des composés qui seront moins toxiques et plus hydrosolubles que les molécules de départ, ce qui favorise leur élimination de l'organisme (**Di-Monte et Lavasani, 2002 ; Esterbauer et al., 1992**). La conjugaison des métabolites réactifs avec GSH par GST peut inactiver ces composés et prévenir la formation des adduits avec l'ADN. Généralement l'augmentation de l'expression de la GST est observée quand la cellule est stressée (**Di-Monte, 1992**). Aussi, les résultats obtenus de cette étude ont montré une augmentation de la SOD et du MDA. Ces résultats sont en accord avec beaucoup de travaux consultés dans la littérature (**Lin et Beal, 2006 ; Lahouel et al., 2016 ; Beghoul et al., 2017**). Il est admis maintenant que les dommages cellulaires peuvent être estimés par le taux de MDA, et est considéré comme l'un des indicateurs fondamentaux renseignant sur les dommages cellulaires causés par les ROS. Ces dernières peuvent attaquer les liaisons insaturées des lipides dans les membranes plasmiques par une peroxydation lipidique donnant une décomposition oxydante d'acides gras polyinsaturés composant les lipides de ces membranes (**Liu et al., 2002 ; Gadoth et Gobel, 2011 ; Amin et Hashem, 2012 ; Ahmad et al., 2013 ; Dubey et al., 2013**). Sachant que les peroxydes lipidiques peuvent causer des dommages graves non seulement dans la membrane cellulaire mais aussi pouvant inhiber plusieurs enzymes, et altérer également la fonction mitochondriale conduisant au final à la mort cellulaire (**Buege et al., 1984 ; Carole et al., 2011**). Il est évident donc que la peroxydation des lipides membranaires détruit la structure de la matrice lipidique des membranes des neurones (**DiMauro et Schon, 2008**). Et est associée à une perte rapide de l'ATP intracellulaire menant à une diminution de la viabilité des neurones menant à une dégénérescence cellulaire dans l'hippocampe, le striatum et le cerveau total, avec tout son impact négatif sur la physiologie et le neurocomportemental des rats intoxiqués par ces pesticides (**Ekaluo et al., 2013 ; Galal et al., 2014 ; Kumar et al., 2015 ; Wang et al., 2016**). L'utilisation de la quercétine comme molécule protectrice contre les effets délétères des pesticides a amélioré de façon très significative le statut redox tant dans le cytosol que

dans les mitochondries du cerveau total, de l'hippocampe ou le striatum, ce qui confirme ses vertus contre le stress oxydant en renforçant indirectement les systèmes oxydants cellulaires ou en scavengant directement les ROS.

3.5. Effets des pesticides et la quercétine sur la voie de la signalisation apoptotique

L'apoptose neuronale est un mécanisme de neurodégénérescence inductible par les différents stress cellulaires, ainsi que par les maladies d'Alzheimer, de Parkinson ou de Huntington (Ravagnan *et al.*, 2002 ; Masoumi, 2009). Une hypothèse générale actuelle concernant la cause des maladies neurodégénératives est la toxicité d'agrégats protéiques anormaux, qui déclencherait un processus apoptotique (Nicholson, 1999 ; Yuan & Yankner, 2016). Ce mécanisme de mort cellulaire est un moyen principal pour sauver l'organisme d'une altération génétique susceptible de donner des mutants allant vers une cancérisation cellulaire (Abdel-Daim *et al.*, 2015 ; Abdul et Salah, 2013). La mitochondrie est le 1^{er} lieu de déclenchement de ce phénomène par l'intermédiaire de plusieurs facteurs tels que les cytochromes et les caspases. La Caspase-3 est une protéine qui interagit avec la caspase-8 et caspase-9 (Fesik et Shi, 2001). L'entraînement successive d'eau et des ions dans la mitochondrie survenant après l'ouverture des pores géants voltage-dépendant sous l'effet des ROS conduit à une apoptose cellulaire par l'activation d'une cascade réactionnelle responsable impliquant la Cyt-c mitochondriale externalisée vers le cytosol (Kushnareva *et al.*, 2002 ; Morris et Berk, 2015), permettant 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 (Gao *et al.*, 2014). Dans ce contexte, les résultats de la présente étude ont fait constater que le traitement des animaux par la mixture des pesticides induit des taux élevés de Cyt-c et de la caspase-3 cytosoliques suggérant un phénomène apoptotique mitochondrie-dépendant après un fort gonflement et perméabilité membranaires de ces organelles sous l'effet des pesticides utilisés (Gu *et al.*, 2015). Différents mécanismes encore très controversés rendent compte du relargage des protéines apoptogènes de les mitochondries (Gordana *et al.*, 2016) vers le cytosol, les pores de transition de perméabilité seraient associés à la diminution du potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\psi_m$). En outre, la Cyt-c est synthétisé sous forme d'un précurseur l'apo-Cyt-c, celui-ci est ensuite transporté dans la mitochondrie, où il est transformé en protéine globulaire appelée holo-Cyt-c qui permet le transport d'électrons entre les complexes III et IV de la chaîne respiratoire mitochondriale (Zhao *et al.*, 2001 ; Kushnareva *et al.*, 2002 ; Ravagnan *et al.*, 2002). L'évaluation des paramètres apoptotiques

après l'administration chronique de DM et d'AC a montré une augmentation significative de la concentration de Cytochrome-c et de l'activité de Caspase-3 dans le cytosol, ce résultat est en accord avec de nombreuses études (**Henine et al., 2016 ; kumar et al., 2016 ; Kumar et al., 2016 ; Yang et al., 2017**). En revanche, on observe une amélioration du statut apoptotique après l'administration de la quercétine. En effet, selon des études récentes, la quercétine est capable d'agir au niveau de la voie intrinsèque et/ou extrinsèque de mort cellulaire en modulant des régulateurs clés de l'apoptose tels que les récepteurs de TRAIL, c-FLIP, les protéines des familles Bcl-2 ou IAP, divers facteurs de transcription, ou encore des voies de survie tels l'Akt ou les MAPK. Cette polyvalence explique le pouvoir de ce composé à bloquer les voies de l'apoptose (**Nguyen et al., 2004 ; Kim et al., 2016 ; Turner et al., 2016**).

3.6. Effets des pesticides et la quercétine sur la neurotransmission cérébrale

L'exposition chronique aux xénobiotiques à des doses bien déterminées est capable de modifier la fonction du cerveau et perturber l'apprentissage et la mémorisation de l'organisme animal (**Ikonomidou et al., 2001 ; Keow, 2016 ; Guedri et al., 2017**). Les neurotransmetteurs sont parmi les molécules neuronales susceptibles d'être affectées par le stress conduisant à une perturbation neurocomportementale. 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 dégénèrent dans la maladie d'Alzheimer (**Nasuti et al., 2007 ; Songlin et al., 2015**). La diminution 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 (**Akaike et al., 2009**). Les résultats de cette étude, présentent une augmentation significative de l'activité d'AChE dans le cerveau total, l'hippocampe et le Striatum chez les rats exposés aux pesticides. Cette augmentation implique la diminution 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 (**Williams and Kauer, 1997 ; Nasuti et al., 2007 ; Pernot, 2009 ; Bhutada et al., 2011 ; Valérie et al., 2015**). Dans ce travail, une diminution significative du taux de la sérotonine et de la dopamine a été enregistrée dans les deux régions étudiées chez les rats traités par les deux pesticides. Il est

admis que la dopamine affecte le mouvement musculaire, la croissance des tissus, le fonctionnement du système immunitaire et la sécrétion des hormones de croissance (Martínez-Larrañaga et al., 2003 ; Geoffroy et al., 2016 ; Loilier et al., 2016). Par ailleurs, les réseaux dopaminergiques du cerveau sont étroitement associés aux comportements d'exploration, à la vigilance, à la recherche du plaisir et l'évitement actif de la punition (Guedri, 2014). Les lésions des zones dopaminergiques se traduisent par un désintérêt pour les stimuli de l'environnement et par une diminution du comportement exploratoire (Couture et al., 2016). La baisse d'activité des neurones dopaminergiques du striatum entraîne une diminution du mouvement spontané, une rigidité musculaire et des tremblements, symptômes correspondant à la maladie de Parkinson (Ravagnan et al., 2002 ; Guedri, 2014). L'activité dopaminergique est fortement abaissée dans les dépressions de type mélancolique, caractérisée par une diminution de l'activité motrice et de l'initiative et une baisse de la motivation (Brodie et Opacka, 1985 ; Cameron et al., 1995). En outre, la sérotonine joue un rôle majeur dans la coagulation sanguine, la survenue du sommeil et la sensibilité aux migraines (Jonathan et Jeffrey, 2015 ; Akhmetshina, 2016). Dans la mesure où la sérotonine sert à inhiber de nombreuses régions du cerveau, les mêmes régions sont «désinhibées» lorsqu'il y a trop peu de sérotonine (Akhmetshina, 2016 ; Rodríguez, 2016). La destruction des régions du cerveau à forte densité de neurones sérotoninergiques entraîne une désinhibition du contrôle réfléchi sur le comportement : l'animal cède à des pulsions quelles que soient les conséquences de ses actes. En général, une augmentation significative d'Adrénaline et du glutamate chez les rats traités a été enregistrée dans le cerveau total, l'hippocampe et le striatum après l'exposition des animaux aux pesticides DM et AC seuls ou en mixture. Ces résultats sont en accord avec les résultats des travaux de plusieurs chercheurs rapportés dans la littérature (Ho et al., 2001 ; Jing and Hui, 2016 ; Geoffroy et al., 2016). L'adrénaline a un effet de stimulation (circulation sanguine, rythme cardiaque, l'attention...), pour préparer l'organisme en cas d'urgence ou le mettre en état de stress (Cattaneo et al., 2016). Elle agit sur le système nerveux sympathique et peut augmenter le pool, la pression sanguine, améliorer la mémoire de court terme, diminuer la réflexion, augmenter la force de contraction musculaire, accroître le flux sanguin et la capacité respiratoire (Meininge et al., 2017). Mais en cas de forte dose, l'adrénaline augmente la force et la fréquence de contraction cardiaque (Rc β -1) et aussi activer la lipolyse dans le tissu adipeux (Rc β -3). La fixation de l'adrénaline sur les récepteurs (Rc β -2) provoque une vasodilatation, une hypotension artérielle, une hypoglycémie, une dilatation des bronches, et une relaxation des muscles de l'intestin et de la vessie et de l'utérus (Mavoungou et al., 2016 ; Cattaneo et al.,

2016). Les précurseurs de ces neurotransmetteurs sont des acides aminés (protéines), donc ils sont très sensibles aux agressions des ROS (**Camerini et al., 1991**). Le traitement des animaux par les pesticides a causé des perturbations et des lésions cérébrales tant au niveau mitochondrial qu'au niveau de la voie apoptotique dans le cerveau total, l'hippocampe et le striatum. Ces perturbations bien entendu peuvent altérer l'intégrité des neurocytes et causer au final, leur dégénérescence, générant des carences, en l'occurrence, dans le niveau de performances de l'apprentissage et de la mémorisation.

3.7. Effets des pesticides et la quercétine sur le neuro-comportement des animaux

De nombreux rapports de recherche ont montré que l'exposition au stress a un effet complexe sur l'apprentissage, l'activité locomotive, la mémoire et le développement mental (**Rooszendalet et al., 2009 ; Cazakoff et al., 2010 ; Schwabe et al., 2012**). Une perturbation comportementale a été observée suite à l'évaluation des différents paramètres liés à la biologie neurocomportementale en appliquant les différents tests chez les rats exposés aux pesticides afin d'évaluer leur activité locomotrice, émotionnelle, exploratoire, mémorisation et apprentissage. Les résultats du test d'Open-field (OF), test labyrinthe classique (CL), test de piscine de Morris (MWM) et test de sucrose qui ont montré un changement comportemental telles que l'augmentation d'anxiété, la peur, la nervosité, la perte de mémoire à court terme, et l'incapacité à penser. Ces en raison de l'augmentation progressive des ROS mitochondriale (**Shuichi et al., 2012**). Ce résultat est conforme avec les résultats précédents aboutis par les travaux de plusieurs (**Griffith, 1991 ; Jürgensen and Mouritsen, 2000 ; Kelley et al., 2011 ; Kim et al., 2005 ; Morris, 1984 ; Tsai et al., 2010**). Dans cette étude, nous avons constaté que le temps d'immobilité et le temps de nage des rats traités aux DM et AC a changé par rapport aux rats témoins, en mettant en évidence une diminution aussi de manière hautement significative l'activité locomotrice de ces rats. Le test de labyrinthe est l'un des modèles de comportement les plus importants pour évaluer l'anxiété, la mémorisation et l'apprentissage. L'augmentation du nombre de tournés, le temps d'arrivée et le temps passé dans le milieu de cage sont considérés comme étant les indices les plus représentatifs de l'activité anxiolytique. L'augmentation de temps d'arrivée au point terminal dans le test de labyrinthe classique chez les rats traités par les deux insecticides seuls ou en mixture peut être le résultat d'une perte d'une masse tissulaire donc d'une neurodégénérescence touchant les zones principales de la mémorisation et d'apprentissage par ces pesticides (**Mani et al., 2014**). Cette neurodégénérescence cause un état d'insuffisance du mémoire et de la capacité de Learning chez les rats infectés par ces

toxiques. Dans ce dispositif, les rats préfèrent normalement passer moins de leur temps et moins de nombre de tournés. Il faut enregistrer que ces résultats sont en adéquation avec les résultats de plusieurs travaux précédents (**Walsh and Cumins, 1976 ; Belzing et Griebel, 2001 ; Bromley-Brits et al., 2011**). Les émotions négatives comme l'anxiété, la perte d'apprentissage, de mémorisation et la dépression, provoquent l'augmentation du risque des troubles avec une étiologie inflammatoire ou nécosique, et l'élévation de l'activité inflammatoire peut être un médiateur important des relations émotionnelles sous l'intoxication par les pesticides étudiés (**Kahloula et al., 2014**).

L'apprentissage et la mémoire sont grandement affectés par le stress généré par ces pesticides. Les expériences de stress aiguë ou chronique peuvent être plus sensibles aux déficits de la mémoire par rapport aux situations non stressantes. L'hippocampe semble également être un site anatomique en corrélation avec la dépression (**Zhang et al., 2007 ; Nasuti et al., 2013**). De plus, l'hippocampe, une structure sous corticale importante dans le cerveau des mammifères, semblerait impliqué dans plusieurs types de processus d'apprentissage et de mémorisation (**Redei et al., 2001 ; Shafer et al., 2005**). Il est également connu en tant que structure cible pour les différents types des stéroïdes neuroactifs, tels que les androgènes (**Nasuti et al., 2007 ; Guedri, 2014**).

Par ailleurs, les résultats du test MWM a montré que le mélange des pesticides cause un déficit dans la mémoire de références chez les rats, révélé par l'augmentation du temps de latence et une diminution du nombre d'entrées et le temps passé dans le quadrant cible. Dans la présente étude, en utilisant le test de sucrose pour approfondir de plus en plus et découvrir les changements psychologique des rats après l'exposition à des faibles doses de DM et d'AC. L'analyse des résultats de ce test a indiqué diminution de l'apprentissage et de la mémorisation chez ces animaux. Ce résultat est en accord avec des études récentes sur l'intoxication par les pesticides (**Guedri, 2014 ; Lahouel et al., 2016 ; Guedri et al., 2017**). En revanche, l'administration de la quercétine à la dose de 10mg/kg/j pendant 90 jours a amélioré amplement les troubles d'apprentissage et la rétention de la mémoire. Récemment, le rôle de la quercétine comme neuroprotecteur a été documentée dans plusieurs études (**Gindin et al., 1995 ; Benhammou, 2011 ; Lahouel et al., 2016 ; Begoule et al., 2017**). La quercétine augmente la production d'acétylcholine, soutient les mitochondries dans la production d'énergie, évite les lésions oxydatives, augmente la consommation d'oxygène du cerveau, favorise la synthèse de dopamine. D'une manière générale les vertus de ce composé phénolique sont grandioses allant jusqu'à réparer les neurones endommagés (**Mona et al., 2014 ; Gao et al., 2014**).

3.8. Effets des pesticides et la quercétine sur la topographie et l'histologie cérébrale

L'étude histologique menée sur le cerveau total et régional chez les rats exposés chroniquement aux pesticides et à la quercétine a montré des ruptures et des lésions entre les cellules cérébrales par rapport aux cerveaux témoins. Ces ruptures peuvent être le résultat de la mort cellulaire par nécrose ou apoptose mitochondrie-dépendant (Shafer et al., 2005 ; Mani et al., 2014 ; Syed, 2016).

En ce qui concerne l'observation histologiques du cerveau total chez les groupes traités par les deux pesticides, les coupes histologiques montrent une altération structurale des tissus marqués par la présence des taches noires qui sont des zones dilatées et comparés aux cerveaux témoins. Aussi, on a pu constater un changement morphologique dans la taille de régions cérébrales comparées au lot témoin. Ces changements sont le résultat d'une nécrose, inflammation ou d'une apoptose cellulaire massive dans le cerveau sous les effets délétères des ROS produits par les pesticides.

En conclusion, cette étude indique que l'intoxication par l'AC et la DM, seuls ou en mixture, pourrait endommager les cellules cérébrales du cerveau total, de l'hippocampe ou encore du striatum. La variation du métabolisme neuronal tant cytosolique que mitochondrial est suggérée à être le point de départ d'une altération structurale et fonctionnelle de ces cellules et ses organelles mitochondriales allant dans le sens d'induire les processus de mort nécrotique et/ou apoptotique donnant une insuffisante et une perturbation de la neurotransmission responsable sur les carences du potentiel d'apprentissage et de mémorisation que l'on a constatées en appliquant les différents tests neurocomportementaux sur les animaux. Dans cette même étude, il s'est avéré par ailleurs, que la quercétine a bien joué son rôle de cytoprotecteur au profit d'un statut redox équilibré tant au niveau cytosolique qu'au niveau mitochondrial. L'homéostasie redox conservée par le composé phénolique a pu mettre les cellules neuronales en conditions physiologique et biologique normales les protégeant ainsi contre les processus de mort nécrotique et/ou apoptotique que les pesticides ont pu déclencher chez les rats intoxiqués. La conservation de l'intégrité fonctionnelle et structurale des cellules sous l'effet protecteur de la quercétine a permis en conséquence une neurotransmission normale et responsable sur l'équilibre neurocomportemental chez le rat.

Conclusion

Et

Perspectives

Conclusion et Perspectives

L'objectif de la présente étude était d'évaluer la neurotoxicité chronique chez le rat de deux pesticides nouvellement introduit en Algérie à savoir la deltaméthrine et l'acetamipride et l'effet préventif d'un polyphénol (Quercétine) sur cette toxicité. A la lumière des résultats obtenus, on peut conclure que :

- Le gavage d'AC et DM respectivement à dose 3,14mg/kg/j et 0,32mg/kg/j du poids corporel chez les rats mâles adultes a induit des perturbations du comportement (test Open field, test de MWM, test de Labyrinthe, test de Sucrose) des rats.
- Aussi l'exposition au AC et DM pendant 90 jours altérer le métabolisme glucidique, lipidique et protéique, procès accompagné par un déficit pondéral remarquable (le poids, le poids relatif et le gain de poids).
- Les pesticides (AC et DM) ont provoquent également des altérations dans le bilan de stress oxydatif et d'apoptose cellulaire (cytochrome-c et caspase-3) qui traduit par une perturbation de taux de GSH et MDA, l'activité de CAT, SOD, GPx, GST, mitochondrial et cytosolique, la respiration, le gonflement et la perméabilité mitochondrial dans les deux régions (hippocampe et striatum) et le cerveau en globale.
- L'évaluation des paramètres de neurotransmutation (Adrénaline, Sérotonine, Dopamine, Glutamate, AchE) également montre une perturbation très claire après l'administration chronique de l'AC et la DM.
- En ce qui concerne les tests histologiques (topographie de cerveau et histologie de l'hippocampe et striatum), les pesticides (DM et AC) causent des altérations tissulaires révélées par la dégénérescence et la mort des cellules cérébrales.
- Le gavage de la quercétine à dose de 10mg/kg/j pendant 90 jours aux rats traités par la DM et l'AC a rétabli toutes les valeurs a la normal, ce qui traduit l'effet protecteur de la quercétine sur la fonction neuronale.

La quercétine à protégé le tissu cérébral contre les effets neurodégénératives des pesticides (DM et AC). Ces résultats confirmés que le traitement par la quercétine à dose de 10mg/kg/j protégé l'organisme contre les effets neurotoxiques des pesticides (DM et AC).

Sachant que l'utilisation massive de ces insecticides dans notre pays donc il faut rechercher bien sur les détails de ces molécules pour éviter tous les forme d'intoxication ou des

problèmes sanitaires liées avec ces pesticides, de cet effet, ce travail de thèse peut être complété par des études plus mécanistiques et comme perspectives on propose de :

- Déterminer les effets de métabolites finals de la DM et l'AC sur l'organisme après une exposition dans les mêmes conditions expérimentales.
- Développer une dose spécifique et plus efficace de la quercetine, capable d'utilisé comme antidotes spécifiques contre les différents types d'intoxication par ces pesticides (hépat, neuro. néphro et pneumotoxicité).
- De développer le but de cette étude par le dosage des autres biomarqueurs par des autres appareils sophistiqués (HPLC, ELISA, CPG...).

Hypothèse

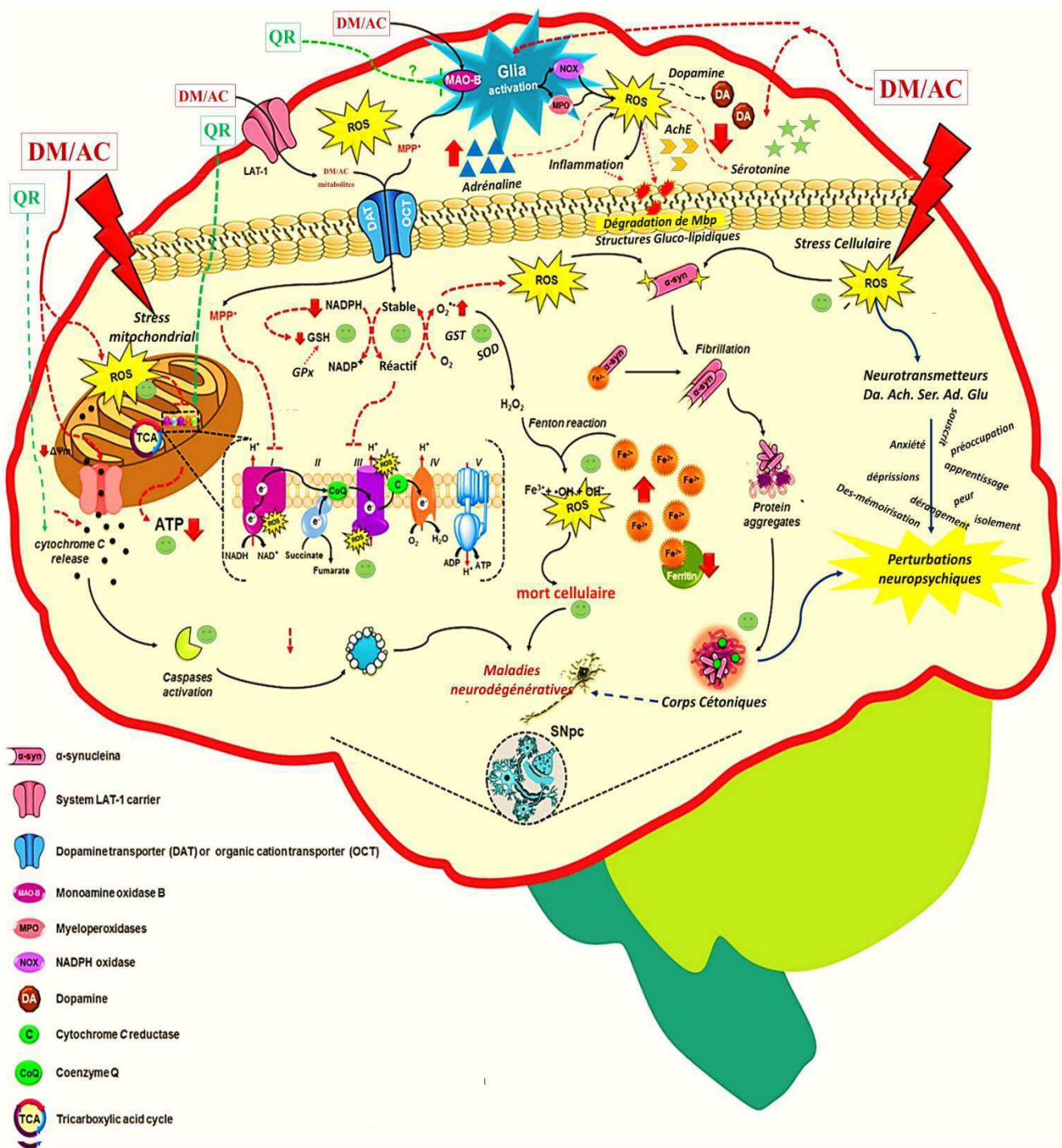


Figure 51. Présentation générale conclure les effets neurotoxiques de la deltaméthrine, l'acétamipride et leur mixture sur le cerveau de rat et l'effet préventive de la quercétine sur cette toxicité.

Références

Références

A

- Abdel Daim M, Abdelkhalek M, Hassan M (2015) Antagonistic activity of dietary allicin against deltamethrin-induced oxidative damage in freshwater Nile tilapia. *Ecotox & Environ Safety* 111:146-15
- Abdel Daim M, El-Bialy E, Haidy G, Abdel R, Abeer M, Radi A, Ahmed H (2016) Antagonistic effects of *Spirulina platensis* against sub-acute DM toxicity in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 77: 79-85
- Abdul HM, Salah M (2013) Lycopene reduces DLM effects induced thyroid toxicity and DNA damage in albino rats. *Basic & Applied Zoology* 66:155-163
- ACTA (2005) Index Phytosanitaire. 41ème éd. Paris. France. 820p.
- Adams J, Vorhees CV, Middaugh LD (1990) Developmental neurotoxicity of anticonvulsants: human and animal evidence on phenytoin. *Neurotoxicol Teratol* 12: 203-214
- Adegbesan B and Adenuga G (2007) Effect of lead exposure on liver lipid peroxidative and antioxidant defense systems of protein-undernourished rats. *Boil Trace Elem Res* 116: 219-225
- Ademe (2004) Polluants Organiques Persistants. <http://www.ademe.fr/entreprises/polluant.asp?ID=49/>
- Aebi (1984) Catalase. In L. Packer (Ed), *methods in enzymology*, Academic press Orlando 105: 121-126.
- AGRITOX (2015) <http://sevron.co.uk/msds/agritox-msds-download-2/>, Visited: 11/2015
- Ahmad M, Adil D, Khan M (2013) Effect of Repeated Oral Administration of Bifenthrin on Lipid Peroxidation and Anti-oxidant Parameters in Wistar Rats 125-128.
- Akaike A, Takada Y, Kume T, Izumi Y (2009) Mechanisms of Neuroprotective Effects of Nicotine and Acetylcholinesterase Inhibitors. *Neuro Sci* 09: 9236-1
- Akchiche N, (2009) Differentiation and neural integration of hippocampal neuronal progenitors: signaling pathways sequentially involved. *Hippocampus* 206: 90
- Akhmetshina D, Zakharov A, Vinokurova D, Nasretdinov A, Valeeva A, Khazipov R (2016) The 5-HT Reuptake Inhibitor Citalopram Suppresses Activity in the Neonatal Rat Barrel Cortex in vivo. 03: 11
- Amin KA, Hashem KS (2012) Deltamethrin-induced oxidative stress and biochemical changes in tissues and blood of catfish: antioxidant defense and role of alpha-tocopherol. *BMC* 6148-8-45
- Anadn A, Martinez L, Diaz M, Bringas P, Fernandez M (1991) Effect of deltamethrin on antipyrine pharmacokinetics and metabolism in rat. *Arch Toxicol* 65: 156-159
- Anderson JC, Dubetz C, Palace VP, (2015) Neonicotinoids in the Canadian aquatic environment: A literature review on current use products with a focus on fate, exposure, and biological effects, *Science of The Total Environment*, 505: 409-422
- Andra SS, Austin C, Patel D, Dolios G, Awawda M, Arora M (2017) Trends in the application of high-resolution mass spectrometry for human biomonitoring: An analytical primer to studying the environmental chemical space of the human exposome. *Environment International*. doi: 10.1016/j.envint.2016.11.026
- Andrezza AC, Cassini C, Rosa AR (2007) Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients. *Psychiatric Research* 41: 523-29
- Aoun M, Tiranti V (2016) Mitochondria: A crossroads for lipid metabolism defect in neurodegeneration with brain iron accumulation diseases. *Inter Journal Bioch & Cell Bio* 01-018
- Arias-Estévez M, López-Periago E, Martínez-Carballo E, Simal-Gándara J, Mejuto JC, García-Río L (2008) The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agriculture Ecosystems & Environment* 123(4): 247-260
- Arora D, Haris S, Kumar S, Pratap S, Tripathi A, Mandal A, Shankar S, Kumar SH, Shukla H (2016) Evaluation and physiological correlation of plasma proteomic fingerprints for Deltamethrin induced hepatotoxicity in Wistar rats. *LFS* 14866: 04-025
- Atessahin A, Yilmaz S, Karahan I, Pirincci I, Tasdemir B (2005) The effects of vitamine E and selenium on cypermethrin-induced oxidative stress in rats. *Turk Journal Vet Anim Sci* 29: 385-391
- Aydin B (2011) Effects of thiacloprid, deltamethrin and their combination on oxidative stress in lymphoid organs, polymorphonuclear leukocytes and plasma of rats. *Pesticide Biochem and Physiol.* 100:165-171

B

- Badary OA, AbdEI-Gawad HM, Taha RA (2003) Behavioral and neurochemical effects induced by subchronic exposure to 40 ppm toluene in rats. *Pharmacol Biochem Behavior* 74: 997-1003
- Bailey GW and White JL (1996) *Agricultural and Food Chemistry*. 12: 324-332

REFERENCES

- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T (2005) Mitochondria, Oxidants and Aging. *Cell* 120: 483-495
- Baldi I, Cordier S, Coumoul X, Elbaz A (2013) Pesticides, effets sur la santé. *Exp collect Inserm* 8-12
- Baltazar MT, Jorge Oliveira R, Bastos ML et al (2014) Pesticides exposure as etiological factors of PA disease and other neurodegenerative diseases-A mechanistic approach. *Toxicology Letters* 230: 85-103
- Banerjee BD, Seth V, Ahmed RS (2001) Pesticide-induced oxidative stress: perspectives and trends. *Rev Environ Health* 16: 1-40
- Barouki R (2006) Stress oxydant et vieillissement. *Medecine & Sciences* 22(3): 266-272
- Barriuso E., (2004) Estimation des risques environnementaux des pesticides. Editions INI 12-34pp
- Bashkatova V, Alam M, Vanin A, Schmidt WJ (2004) Chronic administration of rotenone increases levels of nitric oxide and lipid peroxidation products in rat brain. *Exp Neurol* 186: 235-241
- Baudin B (2006) Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *Mitoch Cardio* 2(1): 43-52
- Bear MF, Connors BW, Paradiso MA (2016) Neuroscience, Exploring the Brain. Fourth Edition. New York. ISBN 978-0-7817-7817-6. 612.8-dc23. 1019pp
- Beauchamp C and Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Biochem* 44: 276-287
- Beghoul A, Kebieche M, Gasmi S, Chouit Z, Amieur 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. *Environ Sci Pollut Res* Doi : 10.1007/s11356-017-9675-0
- Belhaouchet N (2014) Evaluation de la toxicité du Spinosad « insecticide nouvellement introduit en Algérie » sur un modèle expérimental bioindicateur de la pollution « *Helix aspersa* ». These Doctorat LMD. Université Badji Mokhtar-Annaba. 17-82
- Belzing C and Griebel G (2001) Measuring normal and pathological anxiety-like behavior in mice. *Behavior Brain* 141-149
- Benbouzib H (2012) Evaluation et étude de la toxicité d'une famille d'acaricide sur des protistes ciliés. Thèse de doctorat. Annaba University. 87pp
- Ben-Hai D and hoshan S (2014) Assays of Mitochondrial Ca²⁺ Transport and Ca²⁺ Efflux via the MPTP. *Cold Spring Harb Protocols*. doi : 10.1101/073163S45-7
- Benhammou N (2011) Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thèse doctorat. University of setif. 174pp
- Berger M (2006) Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition clinique et métabolisme* 20: 48-53
- Bernard G, Novel C and Vergnes R (2007) Neurologie et neurochirurgie. Estem, 260pp
- Bhutada P, Mundhada Y, Bansod K, Tawari S, Patil S, Dixit P, Umathe S, Mundhada D (2011) Protection of cholinergic and antioxidant system contributes to the effect of berberine ameliorating memory dysfunction in rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Behav Brain Res* 30-41
- Bidlack WR (1996) Interrelationships of food nutrition and health: the National Association of State Universities and Land Grant Colleges White Paper. *Journal Amerc Coll Nutr* 15: 422-33
- Block ML and Hong JS (2005) Microglia and inflammation mediated neurodegeneration: Multiple triggers with a common mechanism. *Prog in neurobiology* 11-22
- Bonda DJ, Bajic VP, Spremo-Potparevic B, Casadesus G, Zhu X, Smith M and Lee HG (2015) Cell cycle aberrations and neurodegeneration. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 36: 157-163
- Bonvallot N (2014) application de la metabolomique a l'etude du lien entre les expositions environnementales aux pesticides pendant la grossesse et le developpement de l'enfant. Thèse Doctorat. SEVAB. INRA 256pp
- Boots AW, Haenen GR and Bast A (2008) Health Effects of Quercetin: From Antioxidant to Nutraceutical. *European Journal of Pharmacology* 585: 325-337
- Bors W, Michel C and Stettmaier K (2001) Structure-activity relationship governing antioxidant capacities of plant polyphenols. *Methods in Enzymology* 335: 166-180
- Bossy-Wetzl E, Newmeyer D, Green D (1998) Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO Journal* 17:37-49
- Bouhaddouda N (2016) Activités antioxydante et antimicrobienne de deux plantes du sol local : *Origanum vulgare* et *Mentha pulegium*. These Doctorat. Univ Annaba. 205pp

- Bourbia S (2013) Évaluation de la toxicité de mélanges de pesticides sur un bio-indicateur de la pollution des sols *Helix aspersa*, These Doctorat. Univ Annaba. 177pp
 - Bradberry SM, Cage SA, Proudfoot AT and Allister-Vale J (2005) Poisoning due to Pyrethroids. *Toxicological Reviews* 24: 93-106
 - Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochemistry* 72: 248-254
 - Braillon G (2002) le système nerveux central à l'usage des étudiants en médecine. Ed: doin. 123pp
 - Brodie M and Aldridge J (1982) Dissociation between circling behaviour and striatal dopamine activity following unilateral DLM administration to rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 331: 341-346
 - Bromley-Brits K, Deng Y, Song W (2011) Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease Model Mice. *Journal Vis Exp* 53: 29-20
 - Brooker C and Langlois WI (2001) Lepresle E le corps humain : étude, structure et fonction : le rôle infirmier dans la pratique clinique, 2^{ème} édition, de boeck université. 562pp
 - Buckingham M, Meilhac S and Zaffran S (2005) Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nature Reviews Genetics* 6: 826-836
 - Buege JA and Aust SD (1984) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 105: 302-310
- C
- Cai J et al (1998) Mitochondrial Redox Signaling during Apoptosis. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 31(4): 09
 - Cakmak I and Horst WJ (1991) Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*) *Physiol. Plantarum*. 83: 463-468
 - Calabrò ML, Tommasini S, Donato P, Raneri D, Stancanelli R, Ficarra P, Ficarra R, Costa C Catania S, Rustichelli C, Gamberini MC (2004) Effects of α - and β -cyclodextrins complexation on the physico-chemical properties and antioxidant activity of some 3-hydroxyflavones. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35: 365-377
 - Cambier J, Masson M, Dehen H, Masson C (2008) Neurologie. 12^{ème} édition. Elsevier Masson. 540pp
 - Camerini D, Walz G, Loenen W, Borst J, Seed B (1991) The T cell activation antigen CD27 is a member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor gene family. *Journal of Immunol* 147: 3165-9
 - Cameron H, McEwen B, Gould E (1995) Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *Journal of Neurosci* 15: 4687-4692
 - Canipe A (2016) Enhancing blood brain barrier permeability of therapeutic agents for Alzheimer's disease by adding glucose. PhD Thesis. Texas Christian University. 44pp
 - Caramaschi D, de Boer S, Koolhaas JM (2007) Differential role of the 5-HT 1A receptor in aggressive and non-aggressive mice. *Physiology & Behavior*. Doi : 10.1016/j.physbeh.2006.11.010
 - Carole I and Harvé Q (2011) Désordres métaboliques et réanimation : de la physiopathologie au traitement. Berlin Heidelberg. New York. ISBN: 978-2-287-99026-7. 522pp
 - Casetta I, Govoni V, Granieri E (2005) Oxidative stress, antioxidants and neurodegenerative diseases. *Curr Pharm*, 11(52): 20-33
 - Cassarino D, Bennett Jr J (1999) An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology. Protective nuclear responses and cell death in neurodegeneration. *Brain Res Rev* 29: 1-25
 - Cattaneo A, Ferrari C, Uher R, Bocchio-Chiavetto L, Riva A (2016) Absolute Measurements of Macrophage Migration Inhibitory Factor and Interleukin-1- β mRNA Levels Accurately Predict Treatment Response in Depressed Patients. *International Journal of Neuro psychopharmacology* 1-10
 - Çavas TNÇ (2014) Effects of fullerene nanoparticles on acetaminophen induced cytotoxicity and genotoxicity in cultured human lung fibroblasts. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 114(7): 1-7
 - Cazakoff BN, Johnson KJ and Howland JG (2010) Con -verging effects of acute stress on spatial and recognition memory in rodents: a review of recent behavioral and pharmacological findings. *Prog Neuro Psycho-pharmacol Biol Psychiatry* 34: 733-741
 - Chakroun S, Ezzi L, Grissa I, Kerkeni E et al (2016) Hematological, biochemical, and toxicopathic effects of subchronic acetaminophen toxicity in Wistar rats. *Environ Sci Pollut Res*. Doi: 10.1007/s11356-016-9
 - Chan H, Tung C, O'kane C (2002) Rev-GFP transgenic lines for studies of nucleocytoplasmic transport in *Drosophila*. *Genesis* 34(1-2): 139-141

REFERENCES

- Chargui I, Grissa I, Bensassi F, Hrira M, Haouem S, Haouas Z, Bencheikh H (2012) Oxidative Stress, Biochemical and Histopathological Alterations in the Liver and Kidney of Female Rats Exposed to Low Doses of Deltamethrin (DM): A Molecular Assessment. *Biomed Environ Sci* 25(6): 672-683
 - Charreton M, Decourtye A, Henry M et al (2015) A locomotor deficit induced by sublethal doses of pyrethroid and neonicotinoid insecticides in the honeybee *Apis mellifera*. *Plos One* 10(12): 1-15
 - Chattopadhyay P, Barik A, Bahadur RP, Maiti MK (2015) A repressor activator protein1 homologue from an oleaginous strain of *Candida tropicalis* increases storage lipid production in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS yeast research* 1567-1356
 - Chen M, Tao L, McLean J, Lu C (2014) Quantitative analysis of neonicotinoid insecticide residues in foods: implication for dietary exposures. *Journal Agric Food Chem* 2;62(26): 82-90
 - Chin-Chan M, Navarro-Yepes J and Quintanilla-Vega B (2015) Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9(124): 22p doi: 10.3389/fncel.2015.00124
 - Christensen HL, Nguyen AT, Pedersen FD, Damkier HH (2013) Na⁺ dependent acid-base transporters in the choroid plexus; insights from *slc4* and *slc9* gene deletion studies. *Front Physiol* 4 (304)
 - Chuiko GM, Zhelnin YY, Gornaya PVA (1997) Seasonal fluctuations in brain acetylcholinesterase activity and soluble protein content in roach (*Rutilus rutilus* L) : a freshwater fish from Northwest Russia. *Comp. Biochem Physiol* 107: 251-257
 - Clarke R and Adermark E (2015) Relationship between psychological stress and semen quality among in-vitro fertilization patients. *Hum. Reprod.* 14: 753-758
 - Clayton DA and Doda JN (2001) Isolation of mitochondria from cells and tissues. *Press Beijing China* 356-361
 - Cliona M et al (2011) Strain differences in the neurochemical response to chronic restraint stress in the rat: relevance to depression. *Pharmacol Biochem Behav* 97: 690-699
 - Collins A (1997) Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation and applications. *Environ Mol Mutagen* 30: 139-46
 - Colombini M (2004) The channel at the interface between mitochondria and the cytosol. *Molecular and Cellular Biochemistry* 256/257: 107-115
 - Cory-Slechta Da, Thiruchelvam M, Richfield Ek, Barlow Bk, Brooks Ai (2005) Developmental pesticide exposures and the Parkinson's disease phenotype. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 73: 136-139
 - Costa LG (2006) Current issues in organophosphate toxicology. *Clin Chim Acta* 366: 1-13
 - Couteux A, Lejeune V (2012) Index phytosanitaire. Association de Coordination Technique Agricole p23
 - Couture G, Geniez C, Pugnet G, Sailler L, Astudillo L (2016) Deuxième cas de maladie sérique à la clarithromycine. *Presse Med.* doi :10.1016/j.lpm.2016.07.019
 - Crystal R, Saunders L, Salil K et al (2006) Benzo(a)pyrene-induced acute neurotoxicity in the F-344 rat: role of oxidative stress *Journal of Applied Toxicolog* 26: 427-438
- D**
- Datta M and Kaviraj A (2003) Acute Toxicity of the Synthetic Pyrethroid Deltamethrin to Freshwater Catfish *Clarias gariepinus* 296-299
 - David A, Clayton S, Gerald S (2014) Isolation of Mitochondria from Tissue Culture Cells, *Cold Spring Harb Protocols.* Doi : 10.1101/080002
 - David D, George IA, Peter JV (2007) Toxicology of the newer neonicotinoid insecticides: imidacloprid poisoning in a human. *Clin Toxicol* 45: 48-56
 - Decourtye A, Devillers J, Cluzeau S et al (2004) Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57(3): 410-419
 - Defebvre I and Vérin M (2006) *la maladie de parkinson.* Elsevier Masson. 220pp
 - Deneke SM, Fonburg BL (1988) Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol* 257(1): 63-73.
 - Di Mauro S et al (2006) Approaches to the treatment of mitochondrial diseases. *Muscle Nerve journal* 34: 265-283
 - Di Monte D and Lavasani M (2002) Manning-Bog Ab. Environmental factors in Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 23: 487-502
 - Di Monte D, Chan P, Sandy MS (1992) Glutathione in Parkinson's disease: a link between oxidative stress and mitochondrial damage. *Ann Neurol* 32(1): 111-115

- Di Prisco G, Cavaliere V, Annoscia D et al (2013) Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(46): 18466-18471
 - Dias BG and Ressler KJ (2014) Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations. *Nature Neuroscienc* 17(1): 89-99
 - Dinu D, Marinescu D, Cristina M, Andreea M, Staicu C (2010) Modulatory Effects of Deltamethrin on Antioxidant Defense Mechanisms & Lipid Peroxidation in *Carassius auratus gibelio* Liver and Intestine 757-764
 - Dively GP, Embrey MS, Kamel A et al (2015) Assessment of Chronic Sublethal Effects of Imidacloprid on Honey Bee Colony Health. *Plos One*. Doi: 10.1371/journal.pone.0118748
 - Djeflal A (2014) Evaluation de la toxicité d'un insecticide carbamate « méthomyl » chez le rat Wistar : Stress oxydant et exploration des effets protecteurs de la supplémentation en sélénium et/ou en vitamine C. These Doctorat. Université Badji Mokhtar-Annaba. 132pp
 - Dong Y, Wang J, Feng D et al (2014) Protective Effect of QR against Oxidative Stress and Brain Edema in an Experimental Rat Model of Subarachnoid Hemorrhage. *Inter Journal Med Sci* 11(3): 282-290.
 - DRIRE (2003) Direction Régionale de l'Industrie de la Recherche et de l'Environ dans l'actualité. p33
 - Dubey N, Mehraj A, Rajinder K (2013) Sub-acute Deltamethrin and Fluoride Toxicity Induced Hepatic Oxidative Stress and Biochemical Alterations 28: 13-19. 10.1007/s00128-013.1
 - Dubois M et al (1956) Colorimetric method for determination of sugars. *Pubs acs dioabs*. Doi: 10.1021/ac601111a017
 - Dulawa SC, Holick KA, Gundersen B, Hen R (2004) Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. *Neuro-psycho-pharmacology* 29(7): 21-30
- E**
- EFSA (2016) Pesticides and bees: EFSA to update neonicotinoid assessments [en ligne] Disponible à l'adresse : <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/160111>. Site consulté le 10 juillet 2016
 - EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues (2013) Scientific Opinion on the developmental neurotoxicity potential of acetamiprid and imidacloprid. *EFSA Journal* 11(12):34-71
 - Eiri DM and Nieh JC (2012) A nicotinic acetylcholine receptor agonist affects honey bee sucrose responsiveness and decreases waggle dancing. *The Journal of Experimental Biology* 215(12): 2022-2029
 - Ekaluo UB, Ibiang YB, Ikpeme EV, Ekanem BE (2013) Effect of Deltamethrin and Ridomil on Sperm Parameters and Reproductive Hormones of Male Rats. Doi : 10.1007/s13530-013-0149-6
 - El Hassani AK, Dacher M, Gary V et al (2008) Effects of Sublethal Doses of Acetamiprid and Thiamethoxam on the Behavior of the Honeybee. *Arch Environ Contam Toxicol* 54(653)
 - Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholine esterase activity. *Biochem Pharmacol* 7(88)
 - Elwan et al (2016) Synthesis of dopamine from L-3,4-dihydroxyphenylalanine by human amniotic epithelial cells. *European Journal of Pharmacology* 354: R1–R2
 - Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jungens G (1992) The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 13: 341
 - EuroCom (European Commission) (2002) Review report for the active substance Deltamethrine: EC-Health and consumer protection directorate general-E1 Plant health. p53
- F**
- Favier A (2003) Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique* 108-115
 - Federico A et al (2012) Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *Journal Neurol Sci* 05: 30
 - Fernandez-Vega C, Sancho E, Ferando MD, Andreu-Moliner E (2002) Thiobencarbinduced changes in acetylcho-linesterase activity of the fish *Anguilla*. *Pestic Biochem and Physiol* 72: 55-63
 - Fesik S and Shi Y (2001) Structural biology. Controlling the caspases. *Science* 294 1477 8
 - Fethi B and Issam C (2013) Effects of sub-chronic exposure to coinjection of Deltamethrin and Methyl Linoleate on gonads. Doi: 10.1007/s00580-012-1673-5
 - Ficarra R, Tommasini S, Raneri D, Calabrò ML, Di-Bella MR, Rustichelli C, Gamberini MC, Ficarra P (2002) Study of flavonoids/p cyclodextrins inclusion complexes by NMR, FT-IR, DSC, X-ray investigation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 29: 1005-1014
 - Fleming L, Mann JB, Bean J, Briggles T, Sanchez-Ramos JR (1999) Parkinson's disease and brain levels of organochlorine pesticides. *Ann Neurol* 4(36):100-103

- Flohe & Gunzler (1984) Analysis of glutathione peroxidase, *Methods Enzymol* 105: 114-121
 - Flora SJ, Mittal M, Mehta A (2008) Heavy metal induced oxidative stress and its possible reversal by chelation therapy. *Indian Journal Med Res* 128(4): 501-523
 - Fontaine E (2007) Radicaux libres et vieillissement. *Cah Nutr Diét* 42(2): 110-115
 - Franco R, Sanchez-Olea R, Reyes-Reyes EM, Panayiotidis MI (2009) Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis. *Mutation Research* 674: 3-22
 - Freeman BA and Crapo JD (1981) Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *J Biol Chem* 256: 10986-10992
- G**
- Gadoth N and Gobel H (2011) Oxidative Stress and Free Radical Damage in Neurology. *Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice*. Springer Science 514: 91
 - Galal MK, Khalaf A, Ogaly HA, Ibrahim MA (2014) Vit E attenuates neurotoxicity induced by deltamethrin in rats. *Neurotoxicity* 1-7
 - Gandhi S, Abramov AY (2012) Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration
 - Ganong W and Jobin M (2005) *physiologie médicale*. 2nd edition. de boeck university. 850pp
 - Gao C, Chen X, Juan LJ, Tang Y, Liu L, Chen S, Yu H, Liu L, Yao P (2014) Myocardial mitochondrial oxidative stress and dysfunction in intense exercise: regulatory effects of quercetin. *Eur J Appl Physiol* 114: 695-705
 - Garait B (2006) Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin®. These Doctorat. University of Joseph Fourier - Grenoble 1. 198pp
 - Gardès-Albert M (2006) Stress oxydant: Aspects physico-chimiques des espèces réactives de l'oxygène. *Ann Pharm Fr* 64: 365-372
 - Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z, Jore D (2003) Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique?. *L'actualité chimique* 91-95.
 - Geoffroy AP, Etain P, Lajnef M et al (2016) Circadian genes and lithium response in bipolar disorders: associations with PPARGC1A (PGC-1) and RORA. *Genes Brain and Behavior* 15: 660-668
 - Gerald M (2008) traduction : ana gerschenfeld *biologie de la conscience*, odile jacob. 368pp
 - Gerard T et Grabowski S (2002) *Principes d'anatomie et de physiologie*, traduction : france boudreault, marie-claude désorcy, 3^{ème} édition. de boeck university. 1256pp
 - Gindin J, Novikov M, Kedar D (1995) The effect of plant phosphatidylserine on age-associated memory impairment and mood in the functioning elderly. *Geriatric Institute for Education and Research and Dept of Geriatrics, Kaplan Hospital, Rehovot, Israel*. 124pp
 - Godefroid J (2008) *Psychologie : science humaine et science cognitive*, 2^{ème} Ed, de-boeck. 1120pp
 - Godoy JA, Lindsay C, Quintanilla RA, Carvajal FJ, Cerpa W, Inestrosa WC (2016) Quercetin Exerts Differential Neuroprotective Effects Against H₂O₂ and a β -Aggregates in Hippocampal Neurons: the Role of Mitochondria. *Mol Neurobiol*. Doi : 10.1007/s12035-016-0203-x
 - Gordana J, Tatjana N, Aleksandar M (2016) Mitochondrial impairment, apoptosis and autophagy in a rat brain as immediate and long-term effects of perinatal phencyclidine treatment in fluence of restraint stress. *PN-PBP* 66: 87-96
 - Griffith CA (1991) possible case of instinctive behavior. *Science* 50: 166-167
 - Grojean S (2002) Etude de la réponse neuronale dans un modèle d'asphyxie cérébrale chez le rat nouveau né. Influence d'une hyperbilirubinémie associée. These doctorat. 318pp
 - Grojean S, Lièvre V, Koziel V, Vert P, Daval JL (2001) Bilirubin exerts additional toxic effects in hypoxic cultured neurons from the developing rat brain by the recruitment of glutamate neurotoxicity. *Pediatric Research*.
 - Gu ZT, Li L, Wu F (2015) Heat stress induced apoptosis is triggered by transcription dyshomeostasis and the subsequent Bax mitochondrial translocation 1-15
 - Guedri K (2014) Etude des perturbations neuro-biologiques et comportementales chez un modèle animal, gonadectomisé. These doctorat. Annaba. 87pp
 - Guedri K, Frih H, Chettoum A, Rouabhi R (2017) Chronic Restraint Stress Induced: Neurobehavioral Alterations and Histological Changes in Rat. *ToxEHS* Doi: 10.1007/s13530-017-0312-6
 - Guéguen B, Chauvel P, Touchon J (2005) *Neurophysiologie des mémoires*. Elsevier Masson. 240pp
 - Guénard H (2001) *Physiologie humaine*. 3^{ème} Edition. Pradel. 606pp
 - Gugler R, Leschik M and Dengler HJ (1975) Disposition of Quercetin in Man after Single Oral and Intravenous Doses. *European Journal of Clinical Pharmacology* 9: 229-234

REFERENCES

- Guillaume J, Sarah S, Olivier Mh (2010) Combining naturally occurring polyphenols with TNF-related apoptosis-inducing ligand: a promising approach to kill resistant cancer cells? Cellular and Molecular Life Sciences Doi: 10.1007/s00018-010-0407-6
 - Guler GO, Cakmak YS, Dagli Z, Aktumsek A and Ozparlak H (2010) Organochlorine pesticide residues in wheat from Konya region, Turkey. Food and Chemical Toxicology 48: 1218-1221
- ¶
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione-S-transferase the first step in mercapturic acid formation. Journal of Biology and Chemistry 249: 7130-7139
 - Haddadi H, Shirani M (2014) Simultaneous Determination of Deltamethrin and Permethrin in Water Samples Using Homogeneous Liquid-Liquid Micro extraction via Flotation Assistance and GC FID. Doi :10.1007/s 10337 -014-2666-0
 - Halliwell B (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?. Journal of Neurochemistry 97(6): 1634–1658
 - Hatcher J, Kurt D, Pennelland G, Miller W (2008) Parkinson's disease and pesticides: atoxicological perspective. Trends in Pharmacological Sciences 29(6)
 - He F, Wang S, Liu L, Chen S, Zhang Z, Sun J (1989) Clinical manifestations and diagnosis of acute pyrethroid poisoning. Arch Toxicol 63: 54-58
 - He J, Liu Y, Fan M, and Liu X (2012) Isolation and Identification of the DNA Aptamer Target to Acetamiprid. Journal Agric Food Chem 59: 1582-1586
 - Henine S, Rouabhi R, Gasmi S, Amrouche A, Abide A, Salmi A, Toualbia N, Taib C, Bouteraa Z, Chenikher H, Boussekine S, Kebieche M, Aouimeur M (2016) Oxidative stress status, caspase-3, stromal enzymes and mitochondrial respiration and swelling of Paramecium caudatum in responding to the toxicity of Fe₃O₄ nanoparticles. Environ Health Sci 8(2): 161-167
 - Ho P, Collins S, Dhitavat S, Ortiz D, Ashline D, Rogers E, Shea TB (2001) Homocysteine potentiates beta-amyloid neurotoxicity. Journal of Neurochem. 78: 249-253
 - Hossain MM, Suzuki T, Jason R, Richardson RJ, Kobayashi H (2015) Acute effects of pyrethroids on serotonin release in the striatum of awake rats: an in vivo microdialysis study. Biochem Mol Toxicol 27(2): 150-156
 - Hoyer D, Hannon JP, Martin GR (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. Pharma Biochem and Behavior 71: 533-554
 - HSDB (2001) Deltamethrin. Hamilton : Centre canadien d'Hygiène et de Sécurité. Consultable sur le site www.toxnet.nlm.nih.gov/. Last revision date 2001-10-10
 - Hung YM and Meier KH (2005) Acute Confidor® (imidacloprid- N-methyl pyrrolidone) insecticides intoxication with mimicking cholinergic syndrome. Toxicol Ind Health 21(1): 37-40
- ¶
- Icenogle Lm et al (2004) Behavioral alterations in adolescent and adult rats caused by a brief subtoxic exposure to chlorpyrifos during neurulation. Neurotoxicol Teratol 26: 95-101
 - Ikonomidou C, Bittigau P, Koch C, Genz K, Hoerster F, Felderhoff-Mueser U, Tenkova T, Dikranian K, Olney JW (2001) Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. Biochem Pharma 62: 401-405
 - Imbert M (2006) Traité du cerveau. Odile Jacob. 532pp
 - INERIS (2005) Détermination des pesticides à surveiller dans le compartiment aérien : approche par hiérarchisation. Institut national de l'environnement industriel et des risques. [consulté le : 04/05/2011]
 - INRS (2007) Deltaméthrine. Institut National de Recherché et de Sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles. établie par les services techniques et médicaux de l'INRS. Paris. Fiche toxicologique 193. 11pp
 - INRS (2016) Deltamethrine. Base de données fiches toxicologiques. 07pp. [http: www.inrs.fr/fichetox](http://www.inrs.fr/fichetox).
 - IPCS INCHEM (1990) Deltamethrin. Environmental health criteria EHC 97. WHO. Consultable sur le site www.inchem.org/docu- ments/ehc/ehc/ehc97.htm/
- ¶
- Jaako K, Tamara Z, Romantchik O, Monika J, Eda M, Lenne TH, Alexander Z (2005) Developmental lead exposure impairs contextual fear conditioning and reduces adult hippocampal neurogenesis in the rat brain. Neuro journal 18(1): 1-11
 - Jean-françois V, Alain S, Marie-Claude LR, François B (2005) Neurophysiologie de la physiologie à l'exploration fonctionnelle. Neuro 1(1): 03-25
 - Jeschke P, Nauen R, Schindler M, Elbert A (2011) Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. Journal of Agric Food Chem 59(2): 897-908

- Jing Y and Hui J (2016) Agomelatine affects rat suprachiasmatic nucleus neurons via melatonin and serotonin receptors. *Life Sciences* 155: 147-154
 - Jocelien DA, Christiaan HV and Berend O (2013) The role of the serotonergic and GABA system in translational approaches in drug discovery for anxiety disorders. *Front Pharmacol* 4: 74
 - Johnson E and Deckwerth T (1993) Molecular mechanisms of developmental neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 16: 31-46
 - Jonathan S and Jeffrey G T (2015) Anxiety Behavior Induced in Mice by Acute Stress. *Tula Underg Res Journal* 14-19
 - Jürgensen K and Mouritsen M (2000) Effects of the insecticides malathion and deltamethrin on the phase behaviour of dimyristoylphosphatidylcholine multilamellar lipid bilayers 1-8
- K
- Kahloula K, Houari D, Slimani M, Terras H, Achour S (2014) Effet de l'exposition chronique au nickel sur les fonctions neurocomportementales chez les rats Wistar pendant la période de développement. *Toxicologie Analytique & Clinique* 186-192
 - Kanthasamy A, Jin H, Anantharam V, Sondarva G, Rangasamy V, Rana A (2012) Emerging neurotoxic mechanisms in environmental factors-induced neurodegeneration. *Neurotoxicology* 33(7): 824-833
 - Kazushige M et al (2000) Chronic Stress Induces Impairment of Spatial Working Memory Because of Prefrontal Dopaminergic Dysfunction. *Journal Neurosci* 20: 1568-1574
 - Kebieche M, Lakroun Z, Lahouel M, Bouayed J, Meraihi Z, Souliman R (2009) Evaluation of epirubicin-induced acute oxidative stress toxicity in rat liver cells and mitochondria, and the prevention of toxicity through quercetin administration. *Experimental and Toxicologic Pathology* 61: 161-167
 - Kelley B, Yu D, Weihong S (2011) Morris Water Maze Test for Learning and Memory Deficits in Alzheimer's disease. *Columbia University*. Dio: 10. 3791/2920-23-Z4345
 - Keow S (2016) Physiological and changes in a rotenone model of Dopamine neurotoxicity and neurodegeneration in zebrafish. *Jonathan*. Dio: 10. 10075/024-08-0921-1
 - Khalatbari S and Hadi T Inflammation and L-carnitine therapy in hemodialysis patients. *Clin Exp Nephrol*. Doi:10.1007/s10157-014-1061-3
 - Kim D, Heo HJ, Kim YJ, Yang HS, Lee CY (2005) Sweet and sour cherry phenolics and their protective effects on neuronal cells. *Journal of Agric Food Chem* 53(26): 9921-9937
 - Kim JC, So BH, Kim HJ et al (2016) Clinical characteristics of patients with neonicotinoid insecticide poisoning. *Journal Korean Soc Clin Toxicol* 8: 24-39
 - Kim JH, Kim M, Choi K, Son J (2016) Quercetin sensitizes pancreatic cancer cells to TRAIL-induced apoptosis through JNK-mediated cFLIP turnover. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* doi:10.1016/j.biocel.2016.07.033
 - Kimura KJ, Komuta Y, Kuroda Y, Hayashi M, Kawano H (2012) Nicotine-Like Effects of the Neonicotinoid Insecticides Acetamiprid and Imidacloprid on Cerebellar Neurons from Neonatal Rats 7(2) 32-43
 - Koistinaho M, Lin S, Wu X (2004) Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-beta peptides. *Nature Medicine* 10: 719-726
 - Kolb B and Whishaw IQ (2002) *Cerveau et comportement*. de boeck university. 672pp
 - Kumar A, Sasmal D, Sharma N (2015) An Insight into Deltamethrin Induced Apoptotic Calcium, p53 and Oxidative Stress Signalling Pathways. Doi : 10.1007/s13530-0217-1
 - Kummer MP, Hermes M, Delekarte A (2011) Nitration of tyrosine 10 critically enhances amyloid beta aggregation and pla-que formation. *Neuron* 71: 833-844
 - Kuo PC, Liu HF, Chao JI (2004) Survivin and p53 modulate quercetin-induced cell growth inhibition and apoptosis in human lung carcinoma cells. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 55875-55885
 - Kushnareva Y, Murphy AN, Andreyev A (2002) Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NADP⁺ oxidation-reduction state. *Biochem Journal* 368: 545-553
- L
- Lacombe M (2006) *abrégé d'anatomie et de physiologie humaine*. 6^{ème} édition. de boock. 229pp
 - Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve P (2007) Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Prog Lipid Res* 46: 244-282
 - Lahouel A, Kebieche M, Lakroun Z, Rouabhi R, Fetoui H, Chtourou Y, Zama D, Soulimani R (2016) Neurobehavioral deficits and brain oxidative stress induced by chronic low dose exposure of persistent organic pollutants mixture in adult female rat. *Environmental Science and Pollution Research*. Doi: 10.1007/s11356-016-6913-9

- Lakroun Z, Kebieche M, Lahouel A, Zama D, Soulimani R (2015) Oxidative stress and brain mitochondria swelling induced by Endosulfan and protective role of quercetin in rat. *Environmental Science and Pollution Research*. Doi: 10.1007/s11356-014-3885-5
- Latash M, Delamarche P, Delamarche A (2002) bases neurophysiologiques du mouvement, traduction : paul delamarche, arlette delamarche. de boeck university. 296pp
- Laurie P (2013) la maladie d'alzheimer, interet des molecules d'origine naturelle, these doctorat en pharmacie. Université de toulouse III. paul sabatier. p120
- Lauvverys R, Vincent H, Dominique L (2007) Toxicologie industrielle et intoxication professionnelles. Masson 31-288pp
- Leclerc PL (2012) Elaboration de nanoparticules de protéines de lactosérum comme système d'administration de quercétine en système gastro-intestinal. Thèse doctorat en Sciences et technologie des aliments (Ph.D.) Université Laval Québec. 12-44, 57-110
- Lee J, Koo N, Min DB (2004) Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Food Science and Food Safety* 3: 21-33
- Lee Y, Bemstock JD, Nagaraja N, Ko B, Hallenbeck JM (2016) Neuroprotection afforded by quercetin against the deleterious effects of oxygen/glucose deprivation and the restoration of oxygen/glucose. *Journal of Neurochemistry* 38: 101-116
- Leopoldini M, Russo N, Toscano M (2011) The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem* 125(2): 288-306
- Li J, Galley M, Brockett C, Gao J, Dolan BA (2016) Diversity-Promoting Objective Function for Neural Conversation Models.
- Lin C, Lin J, Liao Y, Guo R, Chen KT (2013) Acute poisoning with neonicotinoid insecticides: a case report and literature review. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 112(6): 282-290
- Lin MT and Beal MF (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nat* 787-95
- Liu GP and Shi N (2006) The inhibitory effects of Deltamethrin on dopamine biosynthesis in rat PC12 cells. *Toxicolgy Letter* 161: 195-199
- Liu R, Zhou D, Xiaoyu Bai and Guanhua Du (2016a) Quercetin protects against the A β -induced amnesic injury through inhibiting RAGE-mediated pathway and preserving the neurovascular unit. *FASEB journal*. Doi : 10.1043/1338-901.56
- Liu T, Ying Li, Liang J, Zhu W, Xu J, Su R, Yuan L, Sun C (2016b) Aptamer contained triple-helix molecular switch for rapid fluorescent sensing of acetamiprid. *Circ Res* 103: 279-288
- Liu Y, Fiskum G and Schubert D (2002) Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal Neurochem* 80: 780-787
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Darnell J, Kaiser CA, Masson PL (2005) biologie moléculaire de la cellule. Masson. 3ème édition. de-boeck university. 1096pp
- Loilier M, Le Boisselier R, Fradin S et al (2016) Syndrome sérotoninergique après intoxication à la MDMA, une drogue de synthèse toujours d'actualité. Doi : 10.1016/j.toxac.2016.03.071
- Lü J, Lin PH, Yao Q, Chen C (2010) Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems. *Journal Cell Mod Med* 14: 840-860
- Lu X, Zhao C, Yao X, Han Z (2016) Quercetin attenuates high fructose feeding-induced atherosclerosis by suppressing inflammation and apoptosis via ROS-regulated PI3K/AK T signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. Doi :10.1016/j.biopha.2016.11.077
- Lucio G C, Jacqueline MG, Pamela JR and Pellacani CL (2016) Mechanisms of Neuroprotection by Quercetin: Counteracting Oxidative Stress and More. Hindawi Publishing Corporation. doi : 10.1155/2016/2986796
- Lukaszewicz-Hussain A (2008) Subchronic intoxication with chlorfenvinphos, an organophosphate insecticide, affects rat brain antioxidative enzymes and glutathione level. *Food Chem Toxicol* 46(1): 82-96

M

- Maalik A, Khan F, Mumtaz A et al (2014) Pharmacological Applications of Quercetin and its Derivatives: A Short Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* September 13(9): 1561-1566
- Maghzal GJ, Krause KH, Roland SR, Jaquet V (2012) Detection of reactive oxygen species derived from the family of NOX NADPH oxidases. *Free Radical Biology and Medicine* 53: 1903-1918

- Mani MV, Asha S, Sadiq MMA (2014) Pyrethroid deltamethrin-induced developmental neurodegenerative cerebral injury and ameliorating effect of dietary glycoside naringin in male wistar rats. *Biomed Aging Pathol* 4: 1-9
 - Manouchehri MJ, Kalafatis M and Lindner D (2016) Evaluation of the efficacy of TRAIL plus quercetin as a potential breast carcinoma therapeutic. Doi : 10.1158/1538-7445
 - Margaret M and Brossard A (2001) *La cognition : une introduction à la psychologie cognitive*, editeur : de boeck université. 790pp
 - Marieb E (2008) *Biologie humaine. Principes d'anatomie et de physiologie*. Huitième édition. Canada : pearson education. 631pp
 - Martfnez-Cayuela M (1995) Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie* 77: 147-161
 - Martin C, Riou B, Vallet B (2006) *physiologie humaine appliquée*. Editions Arnette 1098pp
 - Martínez-Larrañaga MR, Anadón A, Martínez MA et al (2003) 5-HT loss in rat brain by type II pyrethroid insecticides. *Toxicol. Ind. Health* 19: 147-155
 - Masoumi A (2009) *Journal of Alzheimer's Disease* 703-717
 - Mavoungou S, Razurel A, Bloch V, Oliary J, Barreteau H (2016) Utilisation hors AMM de l'adré´naline en aerosol dans les services d'ORL d'Ile-de-France : audit telephonique. *Le Pharmacien Hospitalier et Clinicien*. 51: 63-93
 - McKelvey TG, Hollwarth ME, Granger DN, Engerson TD, Landler U and Jones HP (1988) Mechanisms of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in ischemic rat liver and kidney. *Amerc Journal Physiol* 254: 753-760
 - Meininger C (2017) Traitement des allergies graves : l'adrénaline dans l'urgence. *Revue française d'allergologie* Doi : 10.1016/j.reval.2017.02.024
 - Meiser J, Weindl D, Hiller K, Meiser et al (2013) Complexity of dopamine metabolism. *Cell Communication and Signaling*, 11:34
 - Meneses A and Perez-Garcia G (2007) 5-HT1A receptors and memory. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 31: 705-727
 - Meyer EK (1999) Toxicosis in cats erroneously treated with 45 to 65% permethrin products. *Journal of Amerc Vet Med Assoc* 2: 198-203
 - Michael F and Hughes EA (2016) Environmentally relevant pyrethroid mixtures: A study on the correlation of blood and brain concentrations of a mixture of pyrethroid insecticides to motor activity in the rat. *Toxicology* 359-360(10): 19-29
 - Mnif W, Hassine AI, Bouaziz A, Bartegi A, Thomas O, Roig B (2011) Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. *Int Journal Environ Res Public Health* 2265-2303
 - Mohajeri SA (2011) Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: A systematic review. *Hum Exp Toxicol* 30(9): 1119-1140
 - Mona K, Abdel A, Hanan A, Marwa A (2014) Vitamin E attenuates neurotoxicity induced by deltamethrin in rats. *BMC CAIM*. 1(1): 44-58
 - Morris G and Berk M (2015) The many roads to mitochondria dysfunction in neuroimmune and neuropsychiatric disorders. *BMC medicine* 13: 68
 - Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Neurosci* 47-60
- N
- Nasuti C, Carloni M, Fedeli D et al (2013) Effects of early life permethrin exposure on spatial working memory and on monoamine levels in different brain areas of presenescent rats. *Toxicology* 303: 162-168
 - Nasuti C, Gabbianelli R, Falcioni M, Stefano A, Sozio P, Cantalamessa F (2007) Dopaminergic system modulation behavioral changes and oxidative stress after neonatal administration of pyrethroids. *Toxicology* 229: 194-205
 - Nawaza A, Abid N, Muhammad I, Syed S, Hussain S, Muhammad RA, Zahid A (2015) Determination and Extraction of Acetamidiprid Residues in Fruits and Vegetables *IJFAAS* 1(2): 63-66
 - Nehlig A (1997) cerebral energy metabolism, glucose transport and blood flow: changes with maturation and adaptation to hypoglycaemia, *Diabetes & Metabolism* 23: 18-29
 - Nguyen T, Tran E, Nguyen H et al (2004) The role of activated MEK-ERK pathway in QR-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells. *Carcinogenesis* 25: 647-659

- Nicholson DW (1999) Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 10: 28-42
 - Nieuwenhuys R, Voogd J, Huijzen CV (2008) *The human central nervous system*. 4^{ème} édition illustrée. Springer. 967pp
 - Nijveldt RJ, Nood VE, Van Hoom DE, Boelens PG, Van Norren K, Van Leeuwen PA (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition* 74: 418-425
- O*
- Obata T, Kubota S, Yamanaka Y (2001) Allopurinol suppresses paronylphenol and 1methyl-4-phenyl-pyridinium ion (MPP+)-induced hydroxyl radical generation in rat striatum. *Neuroscience Letters* 3069(2): 9-12
 - Ono K, Yoshiike Y, Takashima A, Hasegawa K, Naiki H and Yamada M (2003) Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* 87: 172-181
- P*
- Packer L, Tritschler HJ and Wessel K (1997) Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med* 22: 359-378
 - Pandey SP and Mohanty B (2015) The neonicotinoid pesticide IMD and the DTC fungicide mancozeb disrupt the pituitary-thyroid axis of a wildlife bird *Chemosphere*. MAR 122(2): 27-34
 - Parks DA, Williams TK and Beckman JS (1988) Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *Am Journal Physiol* 254: 768-774
 - Pascal H (2010) *Le système nerveux*. 2^{ème} édition. 44-62pp
 - Patro N (1997) Neurotoxicological effects of deltamethrin on the postnatal development of cerebellum of rat. *Journal of Biosci* 22(2): 117-131
 - Pellerin L and Magistretti PJ (1994) Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis. *Proc Nat Acad Sei* 91: 10625-10629
 - Pellerin L et al (2007) Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia* 55(12): 51-62
 - Pernot F (2009) *Événements moléculaires et cellulaires associés à l'épileptogénèse dans deux modèles murins d'injection intrahippocampique de toxiques. Implication des mécanismes neuro-inflammatoires*, These doctorat, université Jouseph fourier. 239pp
 - Peterson BS et al (2015) Effects of prenatal exposure to air pollutants (polycyclic aromatic hydrocarbons) on the development of brain white matter, cognition, and behavior in later childhood. *Jama psychiatry* 72(6): 531-540
 - Philbert MA, Billingsley ML, Reuhl KR (2000) Mechanisms of injury in the central nervous system. *Toxicol Pathol* 28: 43-53
 - Pihlaja R, Koistinaho J, Kauppinen R, Sandholm J, Tanila H, Koistinaho M (2011) Multiple cellular and molecular mechanisms are involved in human Abeta clearance by transplanted adult as-trocytes. *Glia* 59: 1643-1657
 - Pimentel D (1995) Amounts of pesticides reaching target pest: environmental impacts and ethics. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics* 8: 17-29
 - Polster BM and Fiskum G (2004) Mitochondrial mechanisms of neural cell apoptosis. *Journal of Neurochemistry* 90: 1281-1289
 - Pomierny CL et al (2013) Oxidative Stress Biomarkers in Some Rat Brain Structures and Peripheral Organs Underwent Cocaine. *Neurotox Res* 23: 92-102
 - Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D, Coquery JM (2004) *Neurosciences*. 2^{ème} Ed. de boeck university. 752pp
 - Pyabalo aklesso kadala (2015) Action des pyrethrinoides sur le canal sodique active par le potentiel des neurones du systeme olfactif de l'abeille domestique *apis mellifera*. Doi :10.3389/fncel.2015.00124
- R*
- Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G (2002) Mitochondria the killer organelles and their weapons. *Journal Cell Physiol* 131-137
 - Ray KR and Hazra D (2003) Central inhibitory effect of Moringa oleifera root extract: possible role of neuro-transmitters. *Ind. J. Exp. Biol* 41: 1279-1284
 - Raymond-Delpech V, Matsuda K, Sattelle BM, Rauh JJ, Sattelle DB (2005) Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. *Invert Neurosci* 5: 119-133

REFERENCES

- Redei E, Ahmadiyeh N, Baum A, Sasso D, Slone J, Solberg L (2001) Novel animal models of affective disorders. *Semin Clin Neuropsychiatry* 43-67
 - Rehman H. 2006. The modulatory effect of DLM on antioxidants in mice. *Journal of Elementol Toxicol* 371-377
 - Rjeibi I (2016) Oxidative damage and hepatotoxicity associated with deltamethrin in rats: The protective effects of *Amaranthus spinosus* seed extract. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 84(8): 853-860
 - Rodríguez JL, Ares IV, Castellano M, Martínez MR, Martínez A, Anadónn MA (2016) Effects of exposure to pyrethroid cyfluthrin on serotonin and dopamine levels in brain regions of male rats. *Envi Research Environmental Research* 146(7): 388-394
 - Rodriguez ME, Martinez F, Espinosa M, Maldonado S (2016) Mitochondrial Dysfunction in the Hippocampus of Rats Caused by Chronic Oxidative Stress. *Neuroscience* 08-018
 - Romero A, Ramos E, Castellano V, Martínez MA, Ares I, Martínez M, Martínez-Larrañaga MR, Anadón A (2012) Cytotoxicity induced by deltamethrin and its metabolites in SH-SY5Y cells can be differentially prevented by selected antioxidants. *Toxicol In Vitro* 26: 823-830
 - Roozendaal B, McEwen BS, Chattarji S (2009) Stress, memory and the amygdala. *Nat Rev Neurosci* 10: 423-433
 - Rouabhi R, Djebar H, Djebar MR (2006) Toxicity evaluation of flucycloxuron and diflubenzuron on the cellular model, *Paramecium* sp. *African Journal of Biotechnology* 045-048
 - Rouabhi R, Djebar H, Djebar MR (2009) Toxic Effects of Combined Molecule from Novaluron and Diflubenzuron on *Paramecium*. *Am-Euras. Journal of Toxicol Sci* 74-80
 - Rouabhi R, Gasmi S, Boussekine S, Kebieche M (2015) Hepatic oxidative stress induced by zinc and opposite effect of selenium in *oryctolagus cuniculus*. *Journal Environ Anal Toxicol* 5: 289-298
 - Rouvière H and Delmas A (2002) Anatomie humaine : descriptive, topographique et fonctionnelle, volume : 4, système nerveux central, voies et centres nerveux, 15ème Edition. Elsevier Masson. 411pp
 - Rustin P, Chrétien D, Bourgeron T, Gérard B, Rotig A, Munnich A (1994) Biochemical & mol investigation in respiratory chain deficiencies. *Clin Chem Acta* 35-51
- S**
- Sakao K, Fujii M, Hou DX (2009) Clarification of the role of quercetin hydroxyl groups in superoxide generation and cell apoptosis by chemical modification. *Biosci Biotechnol Biochem* 73: 2048-2053
 - Sandro N, Marta H, Kato LP, Elizabeth V, Minelli L (1998) Gas-chromatographic determination of deltamethrin in crops. *Fresenius J Anal Chem* 360: 252-255
 - Sashindran R, Balasundaram M, Jegathambigai R and Kumar P (2015) Evaluation of Neuroprotective effect of Quercetin and coenzyme q10 in ethanol induced neurotoxicity in mice. *IJABPT* 67-71pp
 - Sauer E (2014) Liver delta aminolevulinatase activity is inhibited by neonicotinoids and restored by antioxidants agents *Int J Environ Res Public Health* 11(11): 11676-11690
 - Scassellati SG, Moretti M, Villarini M, Angeli G, Pasquini R, Monarca S, Scarselli R, Crea MG and Leonardis C (1994) An evaluation of toxic and genotoxic risk from work-related exposure to chemical compounds. *Prevenzione Oggi* 6: 125-138
 - Schinzel AC, Takeuchi O, Huang Z et al (2005) Cyclophilin-D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia 102(34) 12005-12010
 - Schon EA, DiMauro S and Hirano M (2012) Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Trends in Molecular Medicine* 13: 878-891
 - Schon EA, DiMauro S, Hirano M and Gilkerson RW (2010) Therapeutic prospects for mitochondrial disease. *Trends in Molecular Medicine* 16: 268-276
 - Schwabe L, Joëls M, Roozendaal B, Wolf OT, Oitzl MS (2012) Stress effects on memory. *Neurosci Biobehav Rev* 36: 1740-1749
 - Seaton T, Jenner P, Mursdenf C, King S (1996) Mitochondrial Respiratory Enzyme Function and Superoxide Dismutase Activity following Brain Glutathione Depletion in the Rat. 52: 1657-1663
 - Seifert J (2005) Neonicotinoids. In: Wexler P, editor. *Encyclopedia of toxicology*. Elsevier 196-200
 - Serchov et al (2016) Signaling pathways regulating homer1A expression. *Boil Chem* 397 (3) 207-214
 - Shafer TJ, Meyer DA, Crofton KM (2005) Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. *Environ Health Perspect* 113: 123-136
 - Sheets LP (2010) Imidacloprid: a neonicotinoid insecticide. In: *Hayes handbook of pesticide toxicology*. Paris: Elsevier. 20: 55-64

- Sheline YI, 3D MRI (2000) Studies of neuroanatomic changes in unipolar major depression: the role of stress and medical comorbidity. *Biol. Psych.* 48: 791-800
 - Sherwood L and Lockhart A (2006) *Physiologie humaine*. 2ème édition. de boeck university. 629pp
 - Shi H, Hudson LG, Liu KJ (2010) Oxidative stress and apoptosis in metal ion induced carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 37: 582-593
 - Shi HJ, Zhao GH, Liu MC, Fan LF, Cao TC, Hazard J (2011) *Mater* 260: 754-761
 - Shirani et al (2016) Synthesis and application of magnetic NaY zeolite composite immobilized with ionic liquid for adsorption desulfurization of fuel using response surface methodology, *Porous materials*. Doi: 10.1007/s10934-016-0125-z
 - Shivanoor SM, David M (2014) Protective role of turmeric against deltamethrin induced renal oxidative damage in rats. *Biomedicine & Preventive Nutrition* 4: 543-553
 - Shuichi C et al (2012) Chronic restraint stress causes anxiety-and depression-like behaviors, down regulates gluco -corticoid receptor expression and attenuates glutamate release induced by brain derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. *Prog Neuro Psychopharmacol Biol Psychiatry* 39: 112-119
 - Siegel A and Sapru N (2005) *Essential neuroscience*, édition illustrée, lippincott williams & wilkins. 576pp
 - Songlin C, Xiaoli Y, Yinying L, Weiyi M, Xiaoyun L, Changran Z (2015) Alzheimer's disease treated with combined therapy based on nour-ishing marrow and reinforcing Qi. *Journal Tradit Chin Med* June 255: 25
 - Soprano AM and Narbona J (2009) *La mémoire de l'enfant : développement normal et pathologique*, traduction : léonard vannelzel, isalaure lemaine. Elsevier Masson. 200pp
 - Stachowski-Haberkorn S (2008) *Méthodes d'évaluation de l'impact de pesticides sur le phytoplancton marin et le naissain d'huître creuse* Université de Bretagne Occidentale. 187pp
 - Stoytcheva M (2011) *Pesticides in the Modern World-Risks and Benefits*. InTech. ISBN 978-953. 560p
 - Syed F (2016) Beta-cyfluthrin induced neurobehavioral impairments in adult rats. *Chemico-Biological Interactions* 243: 19-28
- T**
- Taib C, Rouabhi R, Gasmi S, Bakhouch L, Zarai G, Toualbia N, Salmi A, Henine S, Chenikher H, Boussekine S, Kebieche M, Aouimeur M, Djabri B (2016) Toxicity of Fe₃O₄ Nanoparticles. *ToxEHS* 8(5): 349-355
 - Teixeira S (2002) Bioflavonoids: Proanthocyanidins, quercetin, and their potential roles in treating musculoskeletal conditions. *Journal Orthop Sports Physther* 32(7): 357-63
 - Terayama H, Endo H, Tsukamoto H et al (2016) Acetamidiprid Accumulates in Different Amounts in Murine Brain Regions. *Inter Journal Environ Res Public Health*. Doi : 10.3390/ijerph13100937
 - Testud F (2014) *Insecticides néonicotinoïdes*. EMC-Pathologie professionnelle et de l'environnement. EMC-Toxicologie-Pathologie. doi: 10.1016/S1877-7856(13)62786-5
 - Testud F and Grillet JP (2007) *Insecticides organophosphorés, carbamates, pyréthriinoïdes de synthèse et divers*. EMC. Toxicologie-Pathologie Professionnelle. 16-059-C-15
 - Thannickal VJ and Fanburg BL (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am Journal Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: 1005-1028
 - Tian Y, Yuan Wang, Zhi Sheng, Tingting Li, Xu Li (2016) A colorimetric detection method of pesticide acetamidiprid by fine-tuning aptamer length, *Analytical Biochemistry* 513: 87-92
 - Tian YW (2016) A colorimetric detection method of pesticide acetamidiprid by fine-tuning aptamer length. *Analytical Biochemistry* 513: 87-92
 - Timbrell JA, Draper R, Waterfield CJ, (1994) Biomarkers in toxicology: new uses for some old molecules? *Toxicology and Ecotoxicology News* 1(1): 4-14
 - Toumi H (2013) *Ecotoxicité de la deltaméthrine et du malathion sur différentes souches de Daphnia magna*. These doctrtat. 208p
 - Tritsch d, chesnoy-marchais d, feltz a, *physiologie du neurone*, 2ème Ed, éditions doin, 1999, 715 p.
 - Tsai F, Cheng H, Hsieh M, Wu C, Lin Y, Peng W (2010) The ameliorating effects of luteolin on beta-amyloid-induced impairment of water maze performance and passive avoidance in rats. *Am Journal Chin Med* 279-91
 - Turner K, Lindner D and Kalafatis M (2016) Sensitization of malignant melanomas to TRAIL-induced apoptosis by quercetin. Doi: 10.1158/1538-7445

- Turner KJ and Sharpe RM (1997) Environmental oestrogenesis-present understanding. *Rev Reprod* 2(2): 69-73
- U**
- Uno K and Nicholls SJ (2010) Biomarkers of inflammation and oxidative stress in atherosclerosis. *Biomark Med* 4: 361-373
 - US EPA (1998) Deltamethrin; pesticide tolerance. Environmental Protection Agency 53pp
 - Utip B, Young B, Ibiang E, Victor I, Bassey E, Francis A (2013) Effect of Deltamethrin and Ridomil on Sperm Parameters and Reproductive Hormones of Male Rats. *Toxicol Environ Health* 9-14
- V**
- Valérie P, Sylvain M, Virginie G, Edwin P, Mathieu D, Patrick K (2015) Effects of low dose endosulfan exposure on brain neurotransmitter levels in the African clawed frog *Xenopus laevis*. *Chemosphere* 357-364
 - Vamecq J, Vallée L, Storme L, Gelé P, Bordet R (2004) Les acteurs immédiats du stress oxydatif : Key players in oxidative stress. *La lettre de Pharmacologie* 18(1) :11
 - Vergely C and Rochette L (2005) Le stress oxydatif : Les radicaux libres, des composés à fonction biologique méconnue : à côté de leur action physiopathologique, ce sont des régulateurs avant d'être des destructeurs. *Affections Métaboliques AMC pratique* 114: 28-30
 - Verkhatsky A and Butt A (2007) *Glial neurobiology : a textbook*, edition : illustrée, editeur : John Wiley and Sons. 215pp
 - Vibes J (2001) *Guide de la douleur : le syndrome douloureux chronique*. Estem. 518pp
 - Viviana VL, Angélica TB, Lina GM, Alejandro M, Marisol RL (2015) Acute restraint stress and corticosterone transiently disrupts novelty preference in an object recognition task. *Behav Brain Res* 291: 60-66
- W**
- Walsh N and Cumins A (1976) The OF-test a critical. *Psychol Bull* 83: 482-504
 - Walther C and Gielen S (2004) Rainer the effect of exercise training on endothelial function in cardiovascular disease in humans. *Exerc Sport Sci Rev* 32(4)
 - Wang X, Martínez MA, Dai M, Chen D, Ares I, Romero A, Castellano V, Martínez M, Rodríguez J, Martínez-Larrañaga RM, Anadón A, Yuan Z (2016) Permethrin-induced oxidative stress and toxicity and metabolism. *Environmental Research* 149: 86-104
 - Wang XF, Li S, Chou AP, Bronstein JM (2006) Inhibitory effects of pesticides on proteasome activity: implication in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 23(1): 198-205
 - Wang Xu and Martínez MA (2016) Permethrin-induced oxidative stress and toxicity and metabolism. *Environmental Research* 86: 10-23
 - Wang Y, Fang J, Leonard SS, Rao KMK (2004) Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 36: 1434-1443
 - Warnsmann V, Meyer N, Hamann A, Kögel D, Osiewacz DA (2017) Novel role of the mitochondrial permeability transition pore in (-)-gossypol-induced mitochondrial dysfunction. *Mechanisms of Ageing and Development*
 - Wauchope RD, Yeh S, Linders J *et al* (2002) Pesticide soil sorption parameters: theory, measurement, uses, limitations and reliability. *Pest Management Science* 58(5): 419-445
 - Weckbercker G and Cory JG (1988) Ribonucleotide reductase activity and growth of Glutathione-dependent mouse Leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer Letter* 40: 257-264
 - William P (1981) *Anatomie et physiologie in organisation générale et physiologie humaine* 209-214
 - Williams JH and Kauer JA (1997) Properties of carbachol-induced oscillatory activity in rat hippocampus. *Journal of Neurophysiology* 2631-2640
 - Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C (2004) Serial review: Flavonoids and isoflavones: Absorption, metabolism and bioactivity. *Free Radical Biology and Medicine* 36: 838-849
 - Wilson B (2010) Cholinesterase, Section X: organophosphorous insecticides. In: *Handbook of pesticide toxicology*. Third Edition. Robert Krieger 1457-1478
 - Woodcock BA, Isaac NJB, Bullock JM, Roy DB, Garthwaite DG, Crowe A, Pywell RF (2016) Impacts of neonicotinoid use on long-term population changes in wild bees in England. *Nature* doi: 10.1038/ncomms12459
 - Wozniak D, Olney JW, Kettinger L, Priece M, Miller JP (1990) Behavioral of the rat. *Psychopharmacology* 47-56

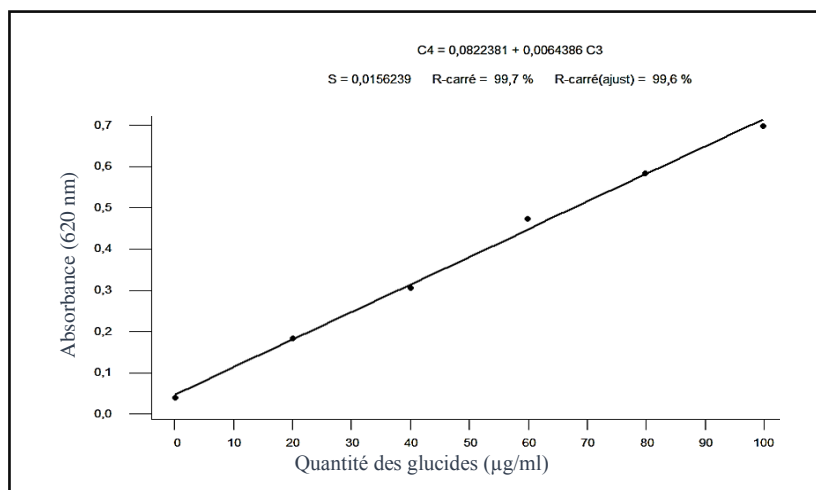
- \mathcal{X}
- Xudong T (2016) DGE analysis of changes in gene expression in response to temperature and deltamethrin stress in the silkworm. *Journal of Asia-Pacific Entomology* x(x) xxx-xxx
- \mathcal{Y}
- Yang D, Wang X, Chen Y, Deng R, Yan B (2009) Pyrethroid insecticides: isoform dependent hydrolysis, induction of cytochrome P450 3A4 and evidence on the involvement of the pregnancy X receptor. *Toxicol Appl Pharm* 45: 497-504
 - Yang M, Kim S, Lee E, Cheong HK, Chang SS, Kang D, Choi Y, Lee SM, Zenzes MT () Immunodetection of benzo[a]pyrene adducts in ovarian cells of women exposed to cigarette smoke. *Mol Hum Reprod* 4(2): 159-165
 - Yousef M, Awad T, Mohamed E (2001) DLM-induced oxidative damage and biochemical alterations in rat and its attenuation by vitamin E. *Toxicol.* 227 , 240-247
 - Yuan J and Yankner A (2016) Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407: 802-809
- \mathcal{Z}
- Zahran WE, Elsonbaty SM, Moawed FSM Selenium nanoparticles with low-level ionizing radiation exposure ameliorate nicotine-induced inflammatory impairment in rat kidney. *Environ Sci Pollut Res.* Doi : 10.1007/s11356-017-9558-4
 - Zhang HT, Huang Y, Masood A, Stolinski LR, Li YF, Zhang L, Dlaboga D, Jin SLC, Conti M, O'Donnell JM (2007) Anxiogenic-like behavioral phenotype of mice deficient in phosphodiesterase 4B. *Neuro-psycho-pharmacology* 33: 1611-1623
 - Zhang J and Darley V (2000) *Neurodegenerative Disease and Oxidative Stress* 95-111
 - Zhang W, Caleb WH, James B, Daniel C, Robert ML, My-Hanh TT, Kenneth AH, George PL, Thomas FP, Ming X, Twyla AB, Stephen FM, Yewande TH, Yuzhong C (2017) Mesoionicpyridopyrimidinones: Discovery of dicloromezotiaz as a lepidoptera insecticide acting on nicotinic acetylcholine receptors. doi: 10.1021/jf060151
 - Zhao X, Bausano B, Pike BR et al (2001) TNF-alpha stimulates caspase-3 activation and apoptotic cell death in primary septo-hippoca cultures. *Journal Neurosci Res* 64(2):121-31
 - Zou H, Li Y, Liu X, Wang X (1999) An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *Journal Biol Chem* 274(11): 549-562

Annexes

ANNEXES

1. Courbe d'étalonnage pour dosage des glucides

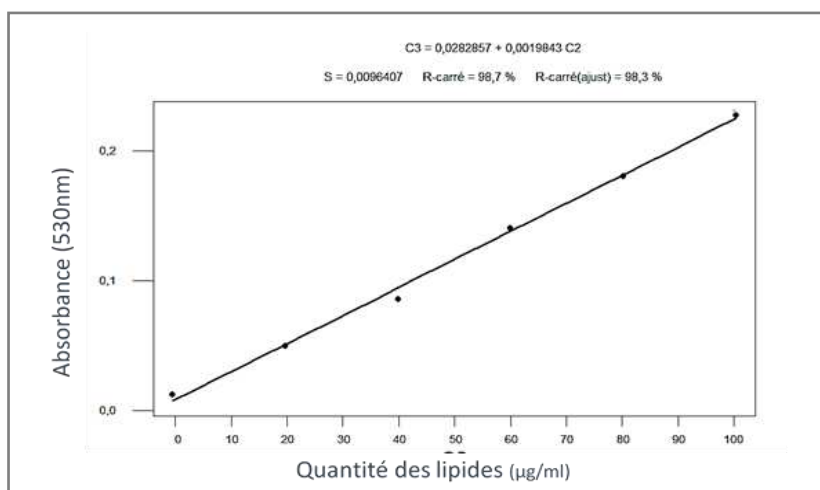
Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution mère (glucose) (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillé (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif d'anthrone (ml)	4	4	4	4	4	4



Tableau/Figure (A). Réalisation de courbe d'étalonnage pour le dosage des glucides

2. Courbe d'étalonnage pour dosage des lipides

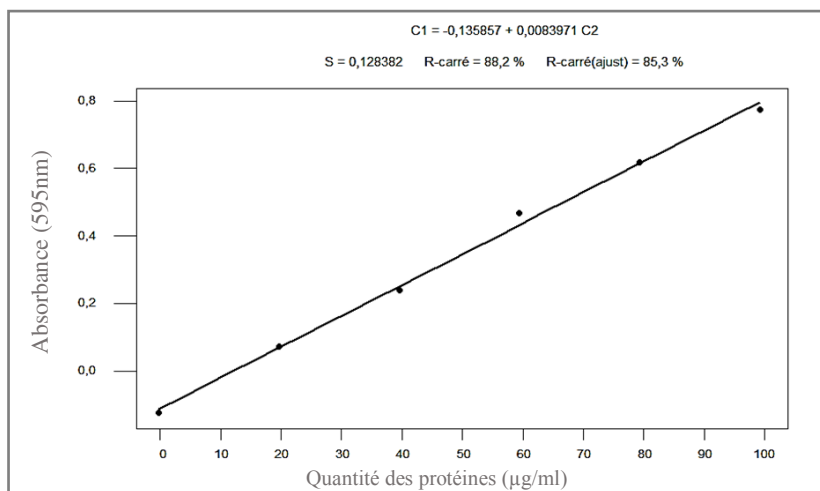
Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution mère de lipide (µl)	0	20	40	60	80	100
Solvant éther/chloroforme (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif SPV (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5



Tableau/Figure (B). Réalisation de courbe d'étalonnage pour le dosage des lipides

3. Courbe d'étalonnage pour dosage des protéines

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution mère de l'Albumine (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillé (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif BBC (ml)	4	4	4	4	4	4



Tableau/Figure (C). Réalisation de courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines

4. Matériels et appareils utilisée

- ~ Eau distillée.
- ~ TCA (Trichloro acétique).
- ~ Anthrone.
- ~ Acide sulfurique.
- ~ Acide orthophosphorique (à 85%).
- ~ Vanilline.
- ~ BBC (Bleu Brillant de Coomassie).
- ~ Ether.
- ~ Chloroforme.
- ~ Ethanol (à 95%).
- ~ BSA (Albumine sérum de bœuf).
- ~ Glucose.
- ~ Huile de tournesol.
- ~ Sodium phosphate dibasique.
- ~ ASS (Acide sulfosalicylique).
- ~ Sodium phosphate monobasique.
- ~ Tris.
- ~ HCl.
- ~ NaOH.
- ~ Méthanol absolu.
- ~ EDTA (Acide éthylène diamine tétracétique).
- ~ DTNB (l'acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobénoïque).
- ~ Centrifugeuse (SELECTA).
- ~ Balance analytique
- ~ Balance de précision (KERN).
- ~ Etuve (HERAEUS).
- ~ pH mètre.
- ~ Agitateur magnétique (WITEG).
- ~ Matériel de dissection.
- ~ Centrifugeuse sigma 1-15.

- ~ Réfrigérateur.
- ~ Bain marie (MEMMERT).
- ~ Agitateur Vortex (THERMOS).
- ~ Spectrophotomètre (UV mini 1240, SHIMADZU).
- ~ Mortier + Pilon (Broyeur manuel).
- ~ Pissette.
- ~ Verre de montre.
- ~ Spatule.
- ~ Baromagnétique.
- ~ Micropipettes (10µl à 5000µl).
- ~ Pipettes graduées.
- ~ Portoirs.
- ~ Tubes à essai.
- ~ Tubes secs en verre et en plastique.
- ~ Tubes eppendorf pour les centrifugeuses sigma.
- ~ Cuves pour la spectrophotométrie (en plastique et en quartz).
- ~ Papier d'aluminium.
- ~ Papier Wattman N° 01.
- ~ Becher.
- ~ Erlenmeyers.
- ~ Entonnoirs.
- ~ Eprouvettes graduées.

5. Equations

Sucrose preference = $V(\text{sucrose solution}) / [V(\text{sucrose solution}) + V(\text{water})] \times 100\%$

Convection entre g et rpm : $\mathbf{RCF (g) = 1.118 \cdot 10^{E-5} \cdot r. (rpm)^2}$

Article 1: Effects of Deltamethrin on striatum and hippocampus mitochondrial integrity and the protective role of Quercetin in rats

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/317166954>

Effects of Deltamethrin on striatum and hippocampus mitochondrial integrity and the protective role of Quercetin in rats

Article in *Environmental Science and Pollution Research* · May 2017

DOI: 10.1007/s11356-017-9218-8

CITATIONS

0

READS

82

11 authors, including:



Gasmi Salim

Université de Tébessa

22 PUBLICATIONS 9 CITATIONS

SEE PROFILE



Rachid Rouabhi

Université de Tébessa

116 PUBLICATIONS 165 CITATIONS

SEE PROFILE



Mohammed KEBIECHE

University of Jijel

43 PUBLICATIONS 120 CITATIONS

SEE PROFILE



Djabri Belgacem

Université de Tébessa

12 PUBLICATIONS 169 CITATIONS

SEE PROFILE

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Mitochondrial dysfunctions: origin of all diseases. [View project](#)



Oxidative Stress & Environmental Pollution [View project](#)

Effects of Deltamethrin on striatum and hippocampus mitochondrial integrity and the protective role of Quercetin in rats

Salim Gasmi¹ · Rachid Rouabhi¹ · Mohamed Kebieche² · Samira Boussekine¹ · Aya Salmi¹ · Nadjiba Toualbia¹ · Chahinez Taib¹ · Zina Bouteraa¹ · Hajer Chenikher¹ · Sara Henine¹ · Belgacem Djabri¹

Received: 14 November 2016 / Accepted: 8 May 2017
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

Abstract The present work is to evaluate the neurotoxicity induced by pyrethroid insecticide “Deltamethrin” at 0.32 mg/kg/day in two main regions of the Wistar rat brain (hippocampus and striatum) and the protective effects of Quercetin at 10 mg/kg/day on this toxicity after 90 days of exposure. The assay of brain parameters showed that Deltamethrin caused a significant increase of mitochondrial metabolite level (proteins, lipids, and carbohydrates) and enzyme activity (glutathione *S*-transferase and superoxide dismutase); a decreased amount of mitochondrial glutathione level and catalase and glutathione peroxidase activities; and an increase of malondialdehyde (MDA) acid levels of the two regions. Furthermore, mitochondrial functional testing in the brains of treated rats exhibited a significant increase in permeability followed by a mitochondrial swelling. Instead, a statistically significant decrease in mitochondrial respiration (O₂ consumption) was recorded in the striatum and hippocampus. Our study showed that the pesticide caused a significant increase of the cytochrome *c* amount correlated with activation of neuronal apoptosis mechanisms by the significant increase of caspase-3 of hippocampus and striatum. In particular, the results of behavioral tests (open field, classic maze tests of sucrose, and Morris water maze) have significant

changes, namely bad behavior of the treated rats, affecting the level of anxiety, learning, and memory, and general motor activity has mainly been shown in treated rats. In addition, the histological cuts clearly confirm cerebral necrosis in the hippocampus and the striatum caused by the pesticide. They allow us to consider the necrotic areas, black spots, reduction, and denaturation of these brain regions in the treated rats. On the other hand, we have studied the protective effects against the neurotoxicity of Deltamethrin (DLM). In this context, after the gavage of Quercetin at the dose of 10 mg/kg/day, we have noticed an improvement in the entire parameters: mitochondrial enzyme, metabolic, histological, and behavioral parameters. This confirmed the improvement of preventive and curative effect of Quercetin against free radicals induced by the DLM.

Keywords Deltamethrin · Neurotoxicity · Mitochondria · Quercetin · Caspase-3 · Apoptosis · Cytochrome-c

Introduction

Environmental health research can be defined as the study of the consequences and determinants of exposures related to contamination of the environment, including air, water, soil, dust, and food inside and outside, at home and at work. Pesticide poisoning by small doses induces harmful effects on health and environment (Mnif et al. 2011; Bonvallot 2014). This action has more breadth over the past centuries with the peak of the industry and progress in science and technology whether industrial, agricultural, or domestic. Industrial decline has uncovered many polluted sites by past

Responsible editor: Philippe Garrigues

✉ Rachid Rouabhi
r_rouabhi@yahoo.fr

¹ Applied Biology Department, Tebessa University, 12000 Tebessa, Algeria

² Applied Biology Department, University of Jijel, Jijel, Algeria

Table 1 Change in mitochondrial of brain proteins, carbohydrates, and lipids in the hippocampus and striatum in control rats and treated after 3 months of treatment

		Groups			
		Control	Quercetin	Deltamethrin	Combinaition
Proteins (µg/mg tissue)	Hip	0.05 ± 0.004	0.05 ± 0.004 ^{ns}	0.093 ± 0.01**	0.06 ± 0.005 ^{ns}
	Str	0.05 ± 0.005	0.05 ± 0.009 ^{ns}	0.09 ± 0.006**	0.07 ± 0.01*
Carbohydrates (µg/mg)	Hip	17.87 ± 2.63	17.66 ± 2.17 ^{ns}	27.38 ± 2.31**	17.87 ± 1.79 ^{ns}
	Str	15.07 ± 1.34	14.48 ± 1.10 ^{ns}	20.18 ± 2.78*	14.92 ± 2.09 ^{ns}
Lipids (µg/mg)	Hip	89.89 ± 0.54	91.13 ± 0.65 ^{ns}	95.18 ± 1.11**	91.52 ± 0.55 ^{ns}
	Str	88.92 ± 0.67	88.59 ± 0.95 ^{ns}	92.48 ± 0.46**	90.92 ± 0.36*

Each value is expressed as mean ± standard deviation; we use Student’s *t* test. Batch compare treated with Quercetin and Deltamethrin, and the combination compared to control group

Hip hippocampus, *Str* striatum

p* ≤ 0.01: highly significant; *p* ≤ 0.001: very highly significant; ^{ns}*p* > 0.05: not significant

activities (Drire 2003). This active or inactive pollution presents health risks through direct exposure to pollutants or indirectly via water, air, sediment, and floor. The awareness of these risks leads to the need for diagnosis of pollution and implement means to address them (Seddik 2014).

Of all the organs, the brain is the largest consumer of energy. While only 12% of body weight, it consumes 70% of basal metabolism in neonates and 20% O₂ in the body. This fact explains the importance of the brain in the body, at the same time, the large against sensitivity xenobiotics and inhibitors of energy metabolism or mitochondria.

Deltamethrin (DLM) is one of several pesticides in Algeria. It is the next-generation family of pyrethroids. These are highly lipophilic compounds that readily cross the blood-brain barrier used as pesticides and its widespread presence in the environment, and they can reach the central nervous system at concentrations that are potentially neurotoxic, particularly when exposure to these chemical agents occurs early in life when the brain is in a very active phase of the neurodevelopmental as synaptogenesis (Wozniak et al. 1990). The use of DLM could cause several demonstrations by primary action on neurotransmitters and the generation of free radicals (Masoumi et al. 2009; Rodríguez et al. 2016).

Currently, the scientific society, biologist and chemist, highlights the tragic role of uncontrolled oxidative processes induced by reactive oxygen species (ROS) in a lot of kinds of mainly neurodegenerative diseases (Parkinson’s disease). Indeed, the natural antioxidants are the subject of much research and a new breath to the exploitation of secondary metabolites generally and particularly polyphenols both in health and in industry (Benhammou 2011). The food antioxidant compounds are the subject of numerous studies since, in addition to their use as preservatives in foods by replacing synthetic antioxidants, they are involved in the treatment of many diseases. The Quercetin (QE) is a member of a group of natural antioxidant compounds found in various plants (Gao et al. 2014), food, and dye natural origin; it is a family of flavonoids, which has a nucleus common flavone compound of two benzene rings connected by a ring heterocyclic pyrone (Abdel-Daim et al. 2016; Lakroun et al. 2014; Wilson 2010). Based on these finding, we hypothesized that DLM induced neurotoxicity. Therefore, the aim of this work was to investigate the potential toxicity effect of DLM in special regions (hippocampus and Striatum) and to show the link between molecular mechanisms in terms of oxidative stress and apoptotic mediators, also, the protective role of Quercetin as an antioxidant substance.

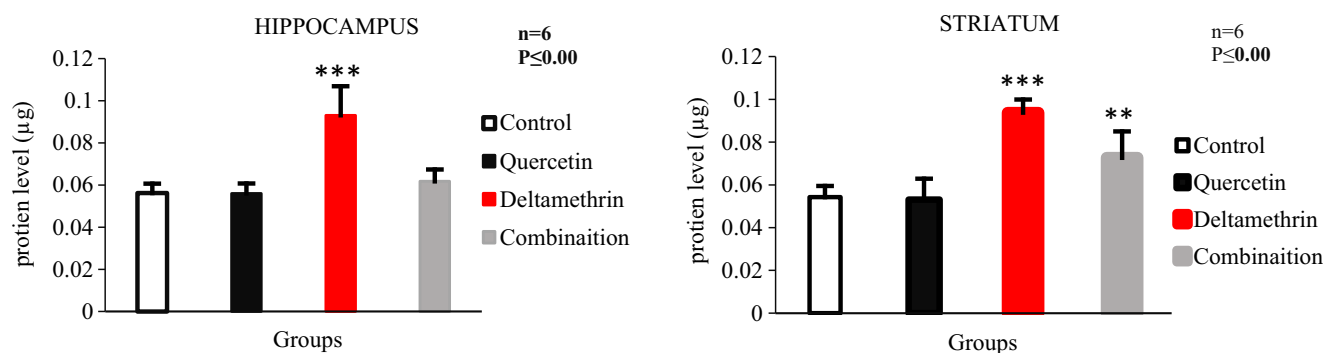


Fig. 1 Change in brain mitochondrial proteins in the hippocampus and striatum in the control and treated groups lot

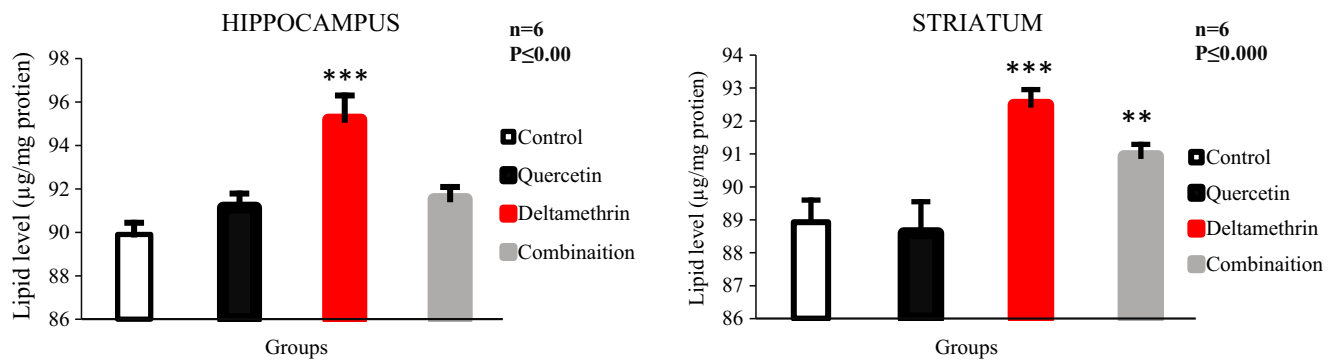


Fig. 2 Change in brain mitochondrial lipids in the hippocampus and striatum in the control group and the treated groups

Material and methods

Animals

This study was conducted toxicology laboratory, University of Tebessa on male albino Wistar rats, from the Institute Pasteur of Algiers, weighing about 240–260 g. Animals are divided into a control group and three treaties. They have good control to water and food. The temperature of the pet store is maintained at 23 °C, with a humidity of moderate and a 12/12 h photoperiod.

Chemical and exposure protocol

For Deltamethrin (C₂₂H₁₉Br₂NO₃, CAS: 52918-63-5) and Quercetin (C₁₅H₁₀O₇, CAS: 117-39-5), the dose that was selected is 0.32 mg/kg/day for 90 days, by referring to results of recent works (Elizabeth et al. 1998; Navickiene et al. 1998; Rehman 2006; Aydin 2011; Haddadi and Shirani 2014). In the end, doses have been adjusted to meet the daily exposure rate. Rats were randomly divided into four groups of six males each. The first group was served as the control who received only 0.5 ml of distilled water; the two other groups were gavage with freshly prepared Quercetin solution with a single dose of 10 mg/kg/day for 90 days (Gao et al. 2014; Lakrou et al. 2014; Lakroun et al. 2015). The third group was treated with Deltamethrin at 0.32 mg/kg body weight/day. Final group was treated with combination (DLM at 0.32 mg/kg/day and Quercetin 10 mg/kg/day),

Each group received the treatment by gavage every day for 90 days between 9:00 and 10:00 p.m.

Behavioral testing

The study was focused on assessing the neurotoxicity of Deltamethrin on memorization, learning, locomotor activity, anxiety states, and resignation by different tests (open field, classic maze test sucrose and Morris water maze). These tests are conducted at the end of treatment.

Open field

This test was performed to assess the locomotor activity of rats; it is characterized by horizontal and vertical activity of the animals in the experimental cage. The open field is a stressful environment for rats. Indeed, this nocturnal animal prefers confined spaces, enclosed and poorly lit, and is frightened by the great outdoors, where it goes slightly in the center and along the walls. The used open field was a transparent glass box, square, and open with demonsions (50 cm × 50 cm × 40 cm). The observation of animals begins seconds after the introduction of animals in the observation cage. This test analyzes the exploratory behavior of rats in an enclosed space. Above all, it is used not only to measure their motor functions but also to assess its degree of anxiety. An anxious animal avoids the middle that is open, and remains the device. Each rat was initially placed in one corner of the open

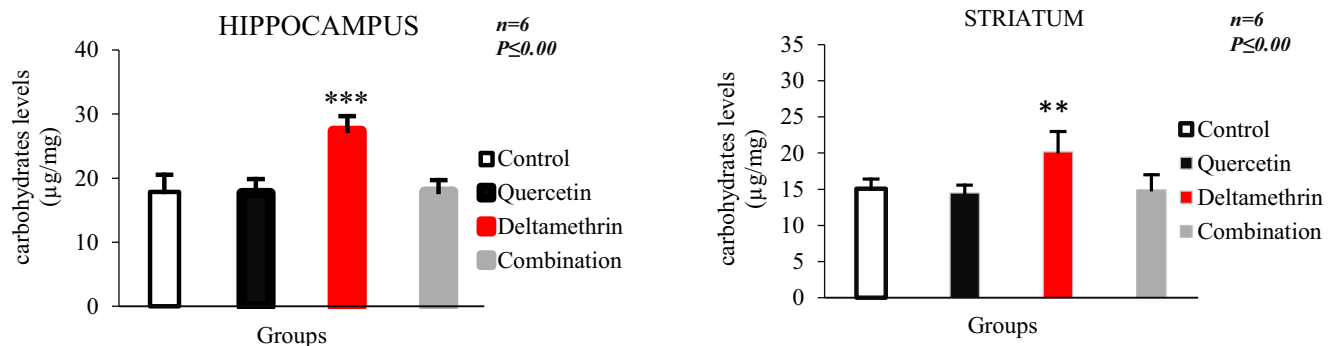


Fig. 3 Change in brain mitochondrial carbohydrates in the hippocampus and striatum in the control group and the treated groups

Table 2 Variation of glutathione (mitGSH), malondialdehyde (mitMDA), the enzymatic activity of glutathione peroxidase (mitGPx), glutathione S-transferase (mitGST), superoxide dismutase (mitSOD), and catalase (mitCAT) in hippocampus and striatum mitochondria of control and treated rats after 3 months of treatment

		Groups			
		Control	Quercetin	Deltamethrin	Combination
mitGSH nmol/mg	Hip	35.29 ± 1.24	35.35 ± 1.24 ^{ns}	22.15 ± 1.69 ^{***}	31.88 ± 1.06*
	Str	30.74 ± 1.24	30.32 ± 1.42 ^{ns}	25.967 ± 1.87 ^{**}	29.73 ± 1.84 ^{ns}
mitGPx nmol/min/mg	Hip	66.96 ± 2.60	67.48 ± 3.14 ^{ns}	52.46 ± 6.05 ^{**}	63.45 ± 3.50*
	Str	65.48 ± 6.09	66.07 ± 4.71 ^{ns}	46.76 ± 3.71 ^{***}	64.78 ± 5.94 ^{ns}
mitMDA nmol/mg	Hip	0.56 ± 0.09	0.53 ± 0.07 ^{ns}	0.88 ± 0.10 ^{***}	0.58 ± 0.09
	Str	1.65 ± 0.06	1.59 ± 0.06 ^{ns}	3.133 ± 0.071 ^{***}	1.65 ± 0.11*
mitGST Pmol/min/mg	Hip	67.19 ± 1.48	67.36 ± 1.76 ^{ns}	77.75 ± 1.49 ^{**}	71.66 ± 1.48*
	Str	65.66 ± 1.94	65.48 ± 1.60 ^{ns}	76.29 ± 1.90 ^{***}	66.43 ± 1.49 ^{**}
mitSOD U/mg	Hip	9.57 ± 0.80	9.88 ± 1.13 ^{ns}	27.32 ± 0.81 ^{***}	10.55 ± 0.81
	Str	13.86 ± 1.17	13.98 ± 1.56 ^{ns}	25.38 ± 1.17 ^{***}	16.77 ± 1.78*
mitCAT nmol/min/mg	Hip	145.22 ± 4.08	146.42 ± 5.82 ^{ns}	125.18 ± 10.48 ^{**}	141.82 ± 7.26 ^{ns}
	Str	142.84 ± 2.27	143.25 ± 3.07 ^{ns}	123.17 ± 1.44 ^{***}	140.76 ± 2.64*

Each value is expressed as mean ± standard deviation; we use Student's *t* test. Batch compare treated with Quercetin and Deltamethrin, and the combination compared to control group

Hip hippocampus, *Str* striatum

p* ≤ 0.05: significant; *p* ≤ 0.01: highly significant; ****p* ≤ 0.001: very highly significant; ^{ns} *p* > 0.05: not significant

field, the head facing the corner. His behavior has been observed for a few minutes to measure the area covered by rats; between each test, we clean the cage with 10% ethanol (Zhang et al. 2007).

Classical labyrinth test

To elucidate the memory behavior of the stressed animal, we proceeded to the realization of an anxiety experimentation (classic maze test). This test in a square-shaped enclosure (120 × 120 × 35 cm) has a plurality of identical size roads (25 × 35 cm) of variable length according to the crossing, which also comprises a start zone and another happens, located on table raised to 50 cm from the ground. Healthy behavior will result in a shorter time in the route between the two points of departure-arrive; this suggests that the exploration behavior will result in a greater time spent in the roads

centers, which will be considered aversive or anxiety for the animal, while the escape behavior will be observed when the animal will spend more time in the starting point or corners that are associated with a refuge. Thus, the test principle is based on an animal exploring the corners or only place is described as “anxious.” The test time is 20 min; between each test, we clean the board with 10% ethanol (Jaako et al. 2005).

Sucrose test (anhedonia test)

In this test, we measure the amount of consumed sugar water (sucrose) (Redei et al. 2001). The effects of the DLM on sucrose consumption were examined in a test preferably two bottle (sucrose or water). The rats had free access to bottles (150 ml) sucrose and water bottles. We alternate the consecutive 5 days bottle position and measure their volume in the heavy each morning.

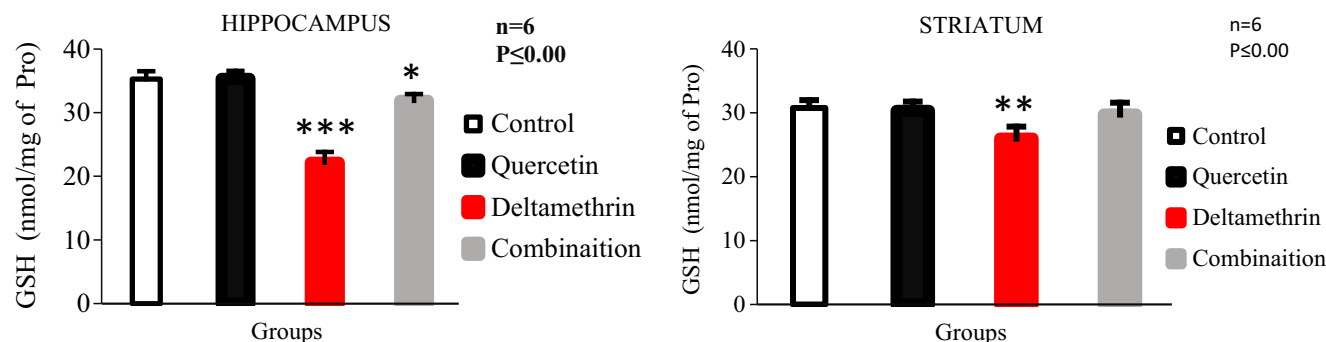


Fig. 4 The mitochondrial GSH rate of change of the brain mitochondria in the hippocampus and striatum in the control and treated groups lot

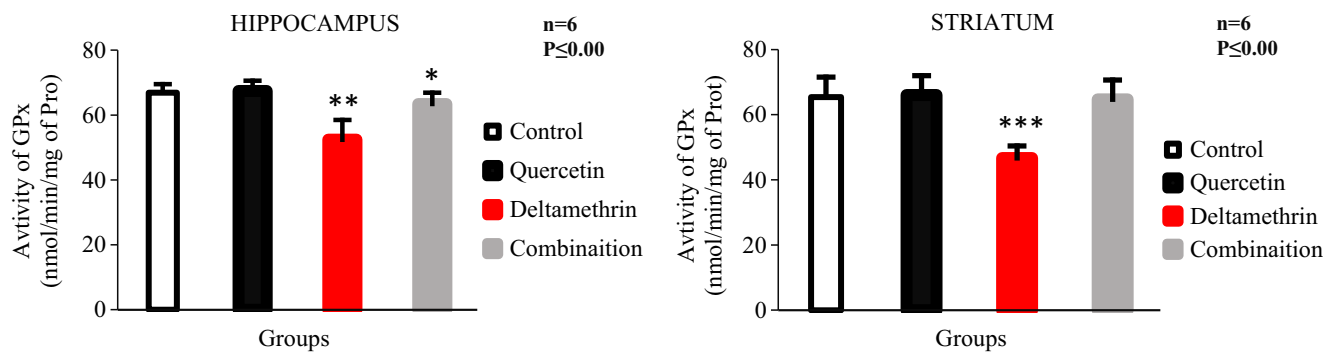


Fig. 5 GPx activity changes in brain mitochondria in the hippocampus and striatum ($p < 0.001$)

MWM

The objective of this test is the evaluation of the rats ability to store and manage spatial information to escape an aversive situation (pool water) reaching a refuge as quickly as possible (Morris 1984; Wilson 2010). The experimental device consists of a circular enclosure (150 cm diameter and 70 cm in height) filled with water made opaque by the addition of white and non-toxic dye. The water is changed daily. The relatively low temperature water (22 °C) gives the test aversive nature for the animal. A platform (15 cm in diameter) is disposed inside the enclosure and is invisible to the animal, because it is located 1 cm below the water surface. In the room, several distal cues (cabinet, sink, chair, and tables) are arranged that may allow the animal to locate in space. Thus, the animal can detect the position of the platform relative to a frame of reference with the various all-centric distal indices. In this task, the animal tries to find refuge on the earliest possible platform.

The three tests performed (OF, Maze, and Morris water maze (MWM)) were filmed with a video camera that transmits the image to a computer that digitalizes and stores them. From this recording, the computer calculates the required parameters using the program (Ethovision video tracking system, version 10, active for 15 days, Noldus Information Technology France).

Sacrifice of animals and brain removal

At the end of the treatment period (90 days), rats were sacrificed by decapitation; the brain is rapidly collected and the following areas are micro-dissected: hippocampus and striatum, each region used for the analysis of mitochondrial metabolites parameters, mitochondrial stress, and parameters of apoptosis. The brain of each batch is stored for histology study.

Tissue and regional cytosolic fraction preparation

One gram of brain was homogenized in 2 ml of buffer solution of phosphate buffered saline 1:2 (w/v: 1 g tissue with 2 ml PBS, pH 7.4). Homogenates were centrifuged at 10,000×g for 15 min at 4 °C, and the resultant supernatant was used for the mitochondrial isolation, microsomal density, mitochondrial glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) and catalase (CAT) activities, cytochrome c, caspase 3, and acetylcholinesterase (AChE).

Dissection of brain regions (cerebellum, hippocampus, striatum, and cortex) was performed according to the simple method. Regions were stored at -20 °C until their later use. For the preparation of the regional cytosolic fraction, with some modifications, briefly, each region of the left hemisphere is cut and homogenized with three volumes of phosphate

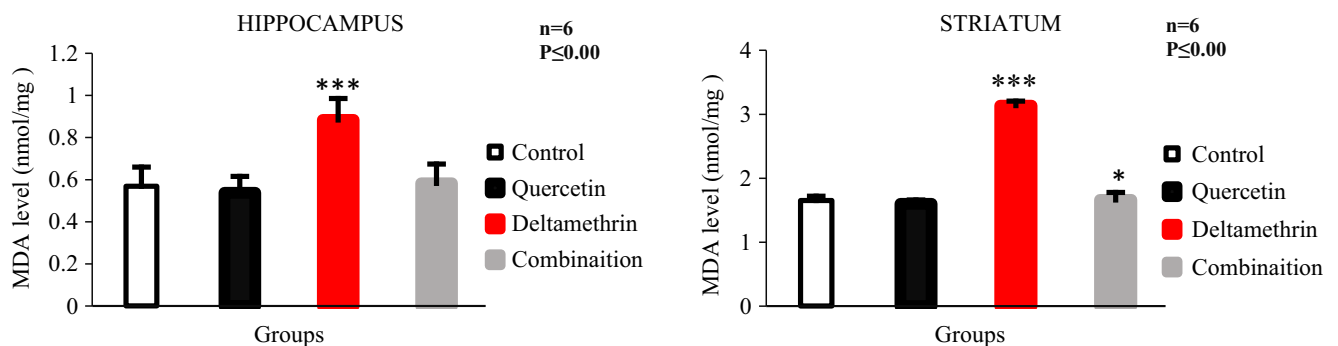


Fig. 6 Variation of MDA levels in mitochondrial brain in the hippocampus and striatum of the control and treated groups ($p < 0.001$)

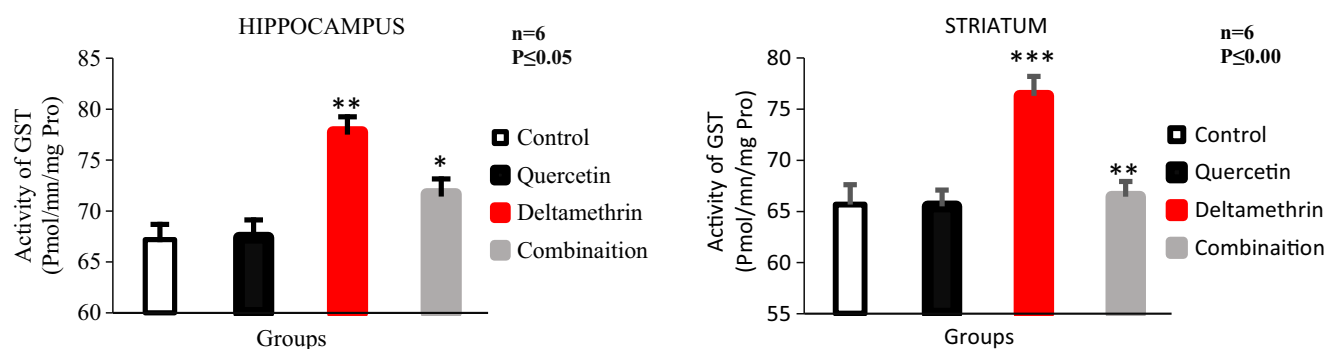


Fig. 7 GST activity changes in mitochondrial hippocampus and striatum of treated and control groups

buffer (0.1 M, pH 7.4) containing KCl (1.17%). The homogenate is then centrifuged at 2000 rpm for 15 min to separate the nuclear debris.

Isolation of brain mitochondria and matrix preparation

The extraction of the mitochondria is done according to the method described by David et al. (2014) and Rustin et al. (1994) by a differential centrifugation. Briefly, after decapitation, the brains are rapidly removed and immersed in TSE buffer (250 mM sucrose, 10 mM Tris, 0.1 mm EDTA, and pH 7.2 at 4 °C). Mitochondrial suspension is frozen thawed six to eight times, with increased and repeated manner, to break the mitochondria. After centrifugation for 10 min at 9600 rpm, the supernatant was used as an enzyme source.

Evaluation of swelling, permeability, and mitochondrial respiration

According to the method of Kristal et al. (1996), we carried out the estimation of the mitochondrial permeability based on the rate of Ca⁺⁺ traversing followed by an increase in mitochondrial size detected at 540 nm wavelength for 3 min and each 30 s. Respiration was estimated using an Oxygraph (HANSATECH) according to the method described by (Rouabhi et al. 2015; Henine et al. 2016).

Determination of carbohydrate, protein, and lipid levels

The determination of total soluble carbohydrates was done in brain tissue of rats according to the method of Dubois (1956). The calculation of the actual concentrations was estimated by the equation derived from the standard curve prepared from a glucose stock solution. The protein contents of various samples were determined according to the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as a standard. The brain lipids are assayed by the method of Goldsworthy (1984) using calibration range made from a sunflower oil stock solution.

Determination of glutathione and malondialdehyde acid levels

Glutathione concentration was measured in mitochondrial brain according to Franco and Cidlowski (2009): 0.2 ml of a sulfosalicylic acid, centrifuged for 5 min at 1000 t/min, add 1 ml of Tris-HCl buffer + EDTA, pH 9.6, mix and add 0.025 ml DTNB dissolved in absolute methanol, and then measure the absorbance at 412 nm. The MDA in brain homogenate was measured as the product of lipid peroxidation and reacts with thiobarbituric acid (TBA) reactive substance to produce a red colored complex with a peak absorbance at 530 nm (Warso and Lands 1983).

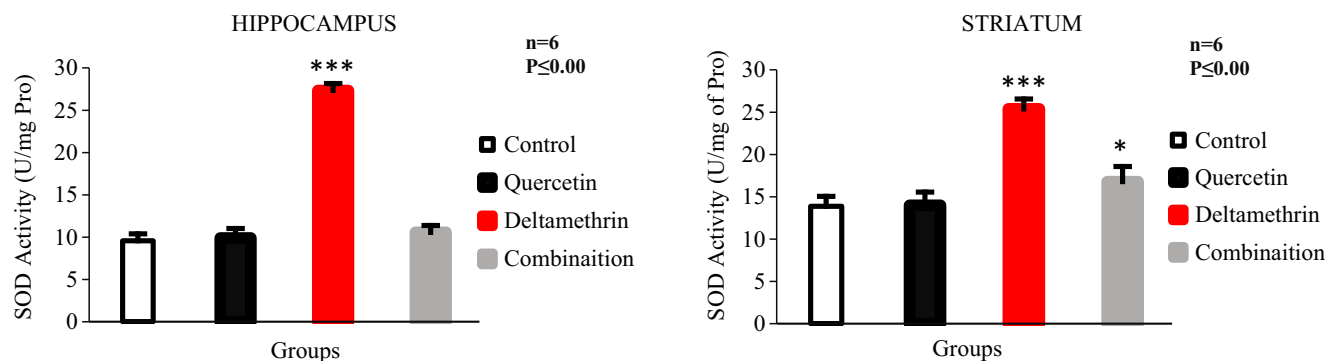


Fig. 8 Variation in SOD activity in hippocampus and striatum mitochondria of control and treated groups after 90 days of treatment

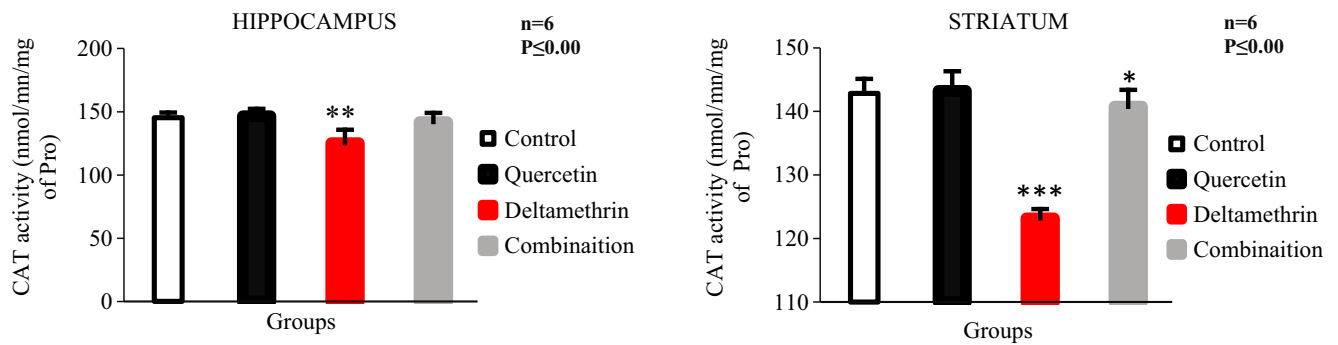


Fig. 9 CAT activity variation in brain mitochondria of the treated and control groups

Determination of GST, GPx, CAT, and SOD activities

GST catalyzes the conjugation reaction with glutathione in the first step of mercapturic acid synthesis. The activity of GST was measured according to the method of Habig et al. (1974) at absorbance of 340 nm at 30-s intervals for 3 min. The GPx activity was measured by the procedure of Flohe (1984); the absorbance was recorded at 420 nm. A catalase activity was determined according to the method of Aebi (1984). The H₂O₂ decomposition rate was followed by monitoring absorption at 240 nm. The enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD) (IU/ml) was assessed by the method of Beauchamp and Fridovich (1971). For the assay of SOD, a reaction mixture is prepared containing sodium cyanide, NBT, EDTA, riboflavin, and phosphate buffer at pH 7.2, with 5 ml of sample. The mixture is subjected to radiation by a 15-W lamp for 10 min, and the absorbance is measured at 560 nm in quartz cuvettes.

Determination of cytochrome c and caspase 3 activities

Determination of cytochrome c and caspases-3 activity in brain tissue was performed using commercial kit (Caspase-3 Colorimetric Activity Assay Kits, part no. 90079, (Sigma®). The Cytochrome c Assay Kit (CYTOCOX1) uses an optimized colorimetric assay based on observation of the decrease in absorbance of ferrocytochrome-c measured at 550 nm (Sigma®).

AchE activity

The activity of AchE was determined after 90 days of exposure to DLM and/or Quercetin, using standard Ellman et al. (1961), which is to provide an enzyme substrate acetylthiocholine (Ach) whose hydrolysis releases the thiocholine (SCh) and acetic acid. The thiocholine in the presence of 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) form a yellow colored complex whose intensity is read at a wavelength of 412 nm. All samples were run in

Table 3 Mitochondrial swelling, respiration, permeability and caspase3 activity, and cytochrome c in the hippocampus and striatum of control rats and treated after 3 months of treatment

		Groups			
		Control	Quercetin	Deltamethrin	Combination
Mitochondrial swelling	Hip	0.24 ± 0.01	0.24 ± 0.01 ^{ns}	0.34 ± 0.01*	0.24 ± 0.01 ^{ns}
	Str	0.24 ± 0.030	0.24 ± 0.03 ^{ns}	0.52 ± 0.03*	0.24 ± 0.01 ^{ns}
Mitochondrial respiration	Hip	+++++	+++++	+++	++++
	Str	+++++	+++	+–	+++
Mitochondrial permeability	Hip	+++	+++	+++++	+++
	Str	++	++	++++	++
Caspase 3 activity	Hip	63.45 ± 10.94	59.43 ± 6.5 ^{ns}	194.75 ± 14.79*	89.61 ± 9.21 ^{ns}
	Str	54.23 ± 7.67	51.82 ± 8.24 ^{ns}	82.37 ± 6.56*	62.18 ± 6.49 ^{ns}
Cytochrome c (µg/ml)	Hip	1.17 ± 0.00065	1.14 ± 0.0006 ^{ns}	6.60 ± 0.0005*	1.52 ± 0.0009 ^{ns}
	Str	1.1 ± 0.0006	0.001 ± 0.0007 ^{ns}	0.006 ± 0.0005*	0.001 ± 0.0004 ^{ns}

Each value is expressed as mean ± standard deviation; we use Student's *t* test. Batch compare treated with Quercetin and Deltamethrin, and the combination compared to control group

Hip hippocampus, *Str* striatum

**p* ≤ 0.001: very highly significant; ^{ns} *p* > 0.05: not significant

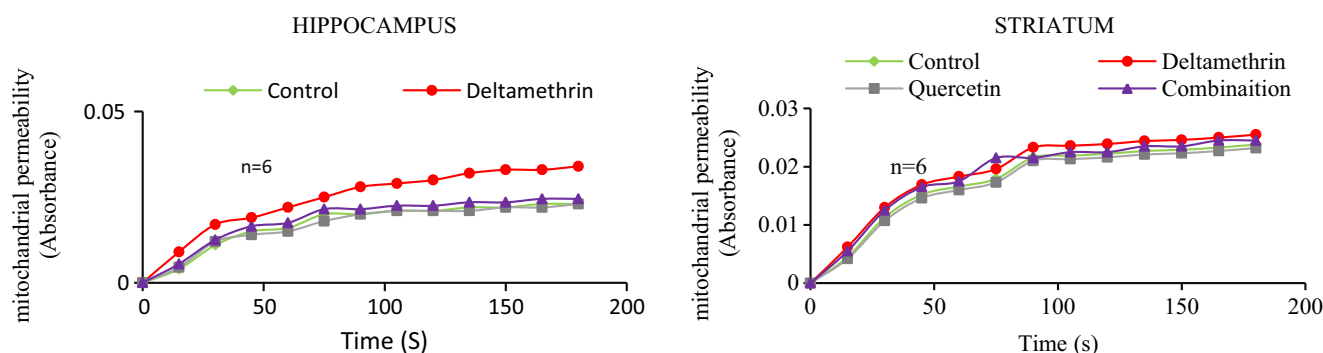


Fig. 10 Change in permeability of hippocampus and striatum mitochondria in the control and treated groups

triplicate. AchE activity was calculated as nanomole per minute per milligram protein and presented as percent-untreated control.

Histological study

The used technique according to Jang et al. (2010) method comprises the following steps: fixing the brain in formalin, then implementation of these tissue samples in special cassettes, facing walls to allow the passage of liquids. Progressive dehydration and samples in increasing concentration of ethanol baths (70, 95 and 100%). Inclusion and achievement of block parts are then immersed in baths of liquid paraffin. The tissues are maintained and soaked in paraffin, then come the stage of coating, which is to include a cloth soaked in paraffin block that, solidifying, will allow its cut. The realization of thin sections of a few microns is possible through microtomes. These sections are photographed using a camera (Epson scanner BX305F).

Data processing and statistical test

The experiments data were analyzed using statistical software MINITAB (MINITAB 17.1 for Windows Ins. USA), and all statistical comparisons were made by means of *t* test (post hoc) and values of *p* < 0.05 were considered significant,

p > 0.05 = the difference is not significant (ns); 0.05 > *p* > 0.01: the difference is significant (*), 0.05 > *p* > 0.001: the difference was highly significant (**), *p* < 0.001: the difference was very highly significant (***). Results are expressed as means ± SEM, and to better visualize the results, the selected graph is the histogram using the office Excel 2016.

Results

Study of mitochondrial metabolic parameters

The results of this study on changes in mitochondrial metabolites of the hippocampus and striatum in Wistar rat brains are shown in Table 1 and Figs. 1, 2, and 3.

The obtained results show a very highly significant increase in brain protein levels in the hippocampus and striatum in the batch treated with Deltamethrin (DLM) compared to control, and shows a steady state in the treated group by the combination Deltamethrin-Quercetin (DLM-QE) compared to control (Fig. 1).

Highly significant (*p* ≤ 0.001) increase of brain lipids was observed in the hippocampus and striatum in the group treated with DLM according to the controls (Fig. 2). Figure 3 shows

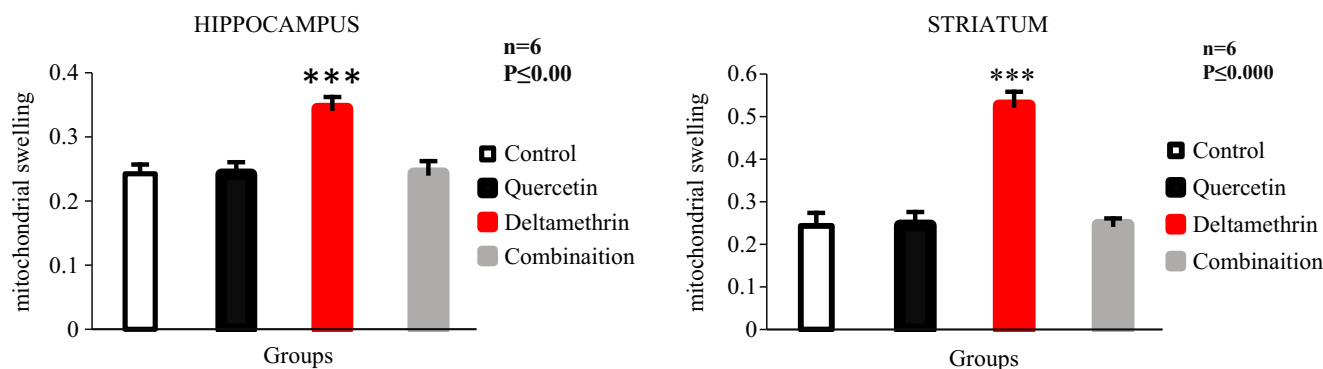


Fig. 11 Changes in mitochondrial swelling in the hippocampus and striatum of control and treated rats

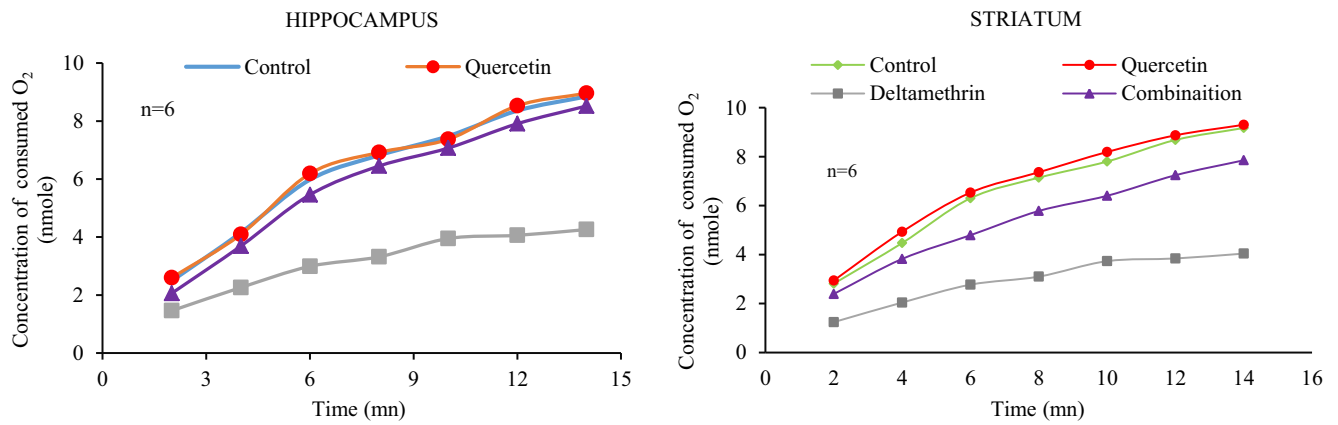


Fig. 12 Change in the brain mitochondria respiration after treatment with DLM

that DLM increases brain carbohydrates in highly significant ($p \leq 0.001$) according to the controls. The addition of Quercetin neutralizes these two augmentations.

Mitochondrial stress parameter testing

The results of this study on the changes of mitochondrial stress parameters in the hippocampus and striatum of Wistar rat brains are given bellow (Table 2; Figs. 4, 5, 6, 7, 8, and 9).

The results in Fig. 4 show a highly significant reduction of GSH levels in the hippocampus and striatum treated with Deltamethrin compared to the control. However, these results are returned to normal in DLM-QE group.

Treatment with DLM shows a highly significant decrease in hippocampus and striatum GPx activity compared to control. However, these results do not show any statistically significant after the addition of Quercetin (Fig. 5).

Very highly significant increase of MDA levels is recorded in the hippocampus and striatum of treated rats compared to control, while these results do not show any statistically significance after the addition of Quercetin according to the control (Fig. 6).

A highly significant ($p \leq 0.01$) in the GST enzyme activity was observed in the hippocampus and striatum of the group treated by DLM according to the controls (Fig. 7).

Exposure to Deltamethrin causes a highly significant increase in hippocampus and striatum SOD activity compared to the control, while this perturbation is corrected in combination group (Fig. 8).

Figure 9 shows a decrease of the hippocampus and striatum catalase activity in the treated group compared to control. Supplementation of Quercetin corrects this amount ($p < 0.05$).

Study of mitochondrial apoptosis parameters

The results of this study on the changes of mitochondrial hippocampus and striatum apoptosis parameters of Wistar rats are given in Table 3 and Figs. 10, 11, 12, 13, and 14.

A clear increase in the mitochondrial permeability is recorded in the hippocampus and striatum mitochondria in the treated group with DLM compared to the control, while these results do not show any significance variation in rats treated with combination (DLM-QE) (Fig. 10).

The results in Fig. 11 show a very highly significant increase in hippocampus and striatum mitochondrial swelling after treatment with Deltamethrin compared to the control,

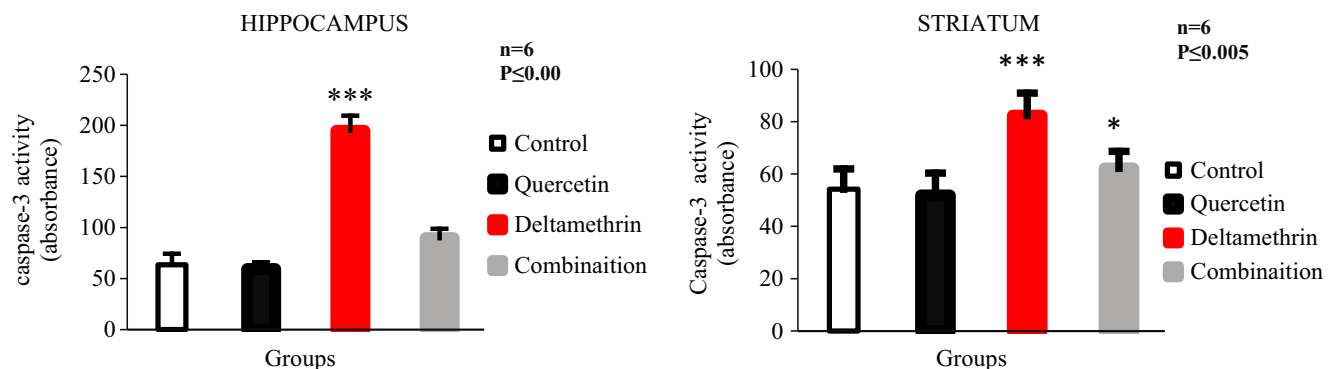


Fig. 13 Variation in activity of hippocampus and striatum caspase-3 after treatment of rats with DLM and Quercetin supplementation

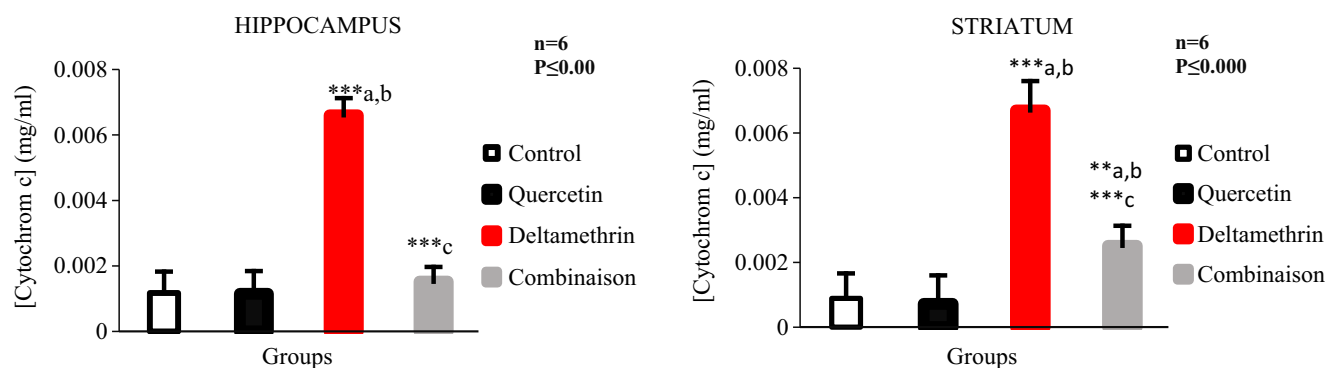


Fig. 14 Hippocampus and striatum cytochrome c concentration in control and treated group; *a* control, *b* treated with Quercetin, and *c* processed by DLM

while this result is neutralized after supplementation of Quercetin.

Treatment of rats by DLM decreases mitochondrial respiration (Fig. 12); this decrease is normalized after Quercetin addition.

Concerning caspase-3 activity in the hippocampus and striatum of rats, treatment with DLM causes a very highly significant increase in the activity compared to the control, while these results do not show any statistical significance in DLM-QE group (Fig. 13).

Cytochrome c is an important biomarker of apoptosis; treatment with DLM seems to increase the amount of cytochrome c (Cyt-c) in the hippocampus and striatum cells compared to control, this results is corrected in the group with Quercetin supplementation (Fig. 14).

Behavioral study

The results of this study on the behavior of Wistar rats are shown in the Table 4 and Figs. 15, 16, 17, 18, and 19.

A highly significant ($p \leq 0.01$) activity of AchE is recorded in the hippocampus and very highly significant ($p \leq 0.001$) in the striatum of rats treat with DLM according to the controls; however, there is not any significant change in the two areas after addition of Quercetin compared to control (Fig. 15).

The results show a very highly significant increase in access time and a very highly significant decrease in exploration time in rats treated with Deltamethrin compared to controls (Fig. 16).

Figure 17 shows a significant decrease ($p \leq 0.05$) of the number of rats moving in empty space, and a highly

Table 4 Changes in behavioral tests (open field, classic maze, Morris water, and sweet water test) in control and treated rats after 3 months of treatment

		Groups			
		Control	Quercetin	Deltamethrin	Combinaison
Open field	IPA	55 ± 6.01	54 ± 5.01	35 ± 4.41**	49 ± 4.09 ^{ns}
	IIA	5.25 ± 1.24	5.21 ± 0.91	9.04 ± 0.95**	4.98 ± 0.85 ^{ns}
	ICA	2.5 ± 0.38	2.61 ± 0.29	1.12 ± 0.33*	2.44 ± 0.31 ^{ns}
	TDM	26.93 ± 3.61	27.03 ± 3.88	8.99 ± 2.43*	25.95 ± 2.26 ^{ns}
	TNR	15.55 ± 1.58	15.29 ± 1.68	11.59 ± 0.99*	15.37 ± 1.38 ^{ns}
Labyrinth	FT	3.33 ± 2.25	3.00 ± 2.09	16 ± 1.78***	5.66 ± 1.50 ^{ns}
	ET	11.66 ± 2.87	12.33 ± 1.86	0.63 ± 0.40***	9.16 ± 1.72*
Piscine Morris	LT	12 ± 1.41	13 ± 1.09	6.16 ± 1.60**	12 ± 1.09 ^{ns}
	PL	174.53 ± 18.04	180.61 ± 12.55	113.86 ± 19.78*	167.48 ± 19.40
Test eau Sucre	PS	15.53 ± 1.36	15.86 ± 0.99	6.73 ± 1.16*	15.02 ± 0.67 ^{ns}
		+++	+++	+	++

Each value is expressed as mean ± standard deviation; we use Student's *t* test. Batch compare treated with Quercetin and Deltamethrin, and the combination compared to control group

IPA in peripheral area, *IIA* in intermediate area, *ICA* in central area, *TDM* total distance moved (m), *TNR* total number of rearing, *FT* finishing time, *ET* exploration time, *LT* latency time (S), *PL* path length (m), *PAS* preferably sucrose (ml)

* $p \leq 0.05$: significant; ** $p \leq 0.01$: highly significant; *** $p \leq 0.001$: very highly significant; ^{ns} $p > 0.05$: not significant

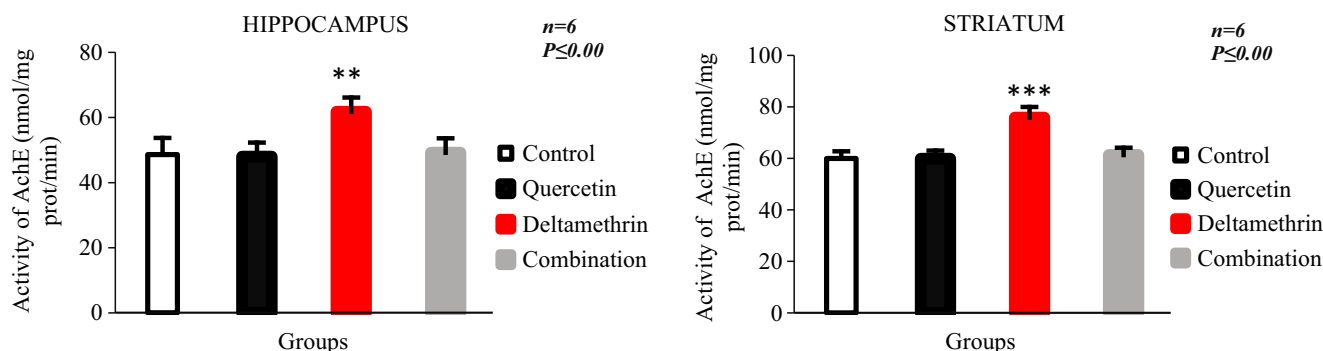


Fig. 15 Variation of AchE activity in the hippocampus and striatum after treatment with DLM during 90 days

significant increase ($p \leq 0.01$) in intermediate movement between the center and the device is observed in the treated group by DLM according to the controls supplementation of Quercetin that correct this result.

The results show a significant decrease in preference to sucrose and a clear increase of sugar water consumption duration in rats treated with DLM; according to the control, DLM-QE-treated rats shows a status similar to controls (Fig. 18). MWM results show a significant decrease in path length and a highly significant decrease in latency time in rats treated with Deltamethrin compared to controls (Fig. 19).

Histological study

Observation of histological sections of the total brains of rats treated with Deltamethrin at 0.32 mg/kg/day for 90 days (Fig. 20) reveals a morphological change in the brain regions (hippocampus and striatum) visible in compare with witnesses, which result in hyperplasia, brain cell burst, and vascular lesions; these serious changes to the structure affect the function of neurons and may contribute to dysfunction of this body, while the histological study of the brain of the rats treated by QE (10 mg/kg/day) and the combination (DLM to 0.32 mg/kg/day and QE in dose of 10 mg/kg/day) have no abnormality and have a structure similar to that of control.

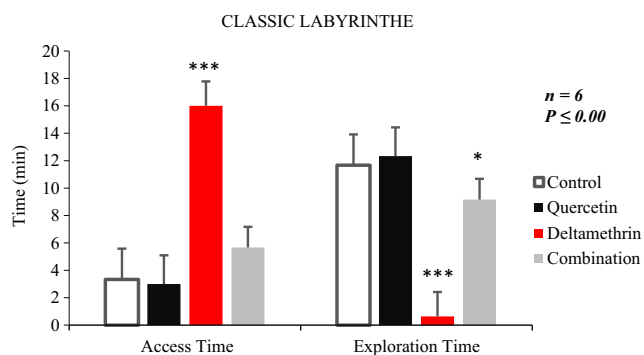


Fig. 16 Changes in access time and exploration time of control and treated groups (classic labyrinth test)

Discussion

After treatment by 0.32 mg/kg/day of DLM for 90 days, we recorded a significant increase in permeability and mitochondrial swelling in the hippocampus and striatum; this status is the result of free radicals trained batches after poisoning by the DLM (Fethi et al. 2014). Calcium overload is responsible for mitochondrial swelling; it will cause nitric oxide formation (NO), and will help to activate xanthine oxidase and superoxide anion generator, self-inactivating the NADH dehydrogenase of NADH oxidase and ATPase, and which are at the origin of the formation of other radicals (Zhang et al. 2007). In addition, it will lead to an activation of enzyme systems to autolytic properties for the cell, in particular generating process of lipolysis, proteolysis, protein phosphorylation, and participating in the disintegration of cellular architecture (Weigt et al. 2015). The Ca^{+2} prominently recognized in the mechanisms responsible for neuronal degeneration, nerve interfering with the transport of electrons in the oxidative phosphorylation process as well as the synthesis of deoxyribonucleic acid. ROS alter proteins and enzymes responsible for disintegration of the cyto-architecture of the cell (Johnson and Deckwerth 1993; Kumar et al. 2015). They also have a denaturing action on DNA (Xudong et al. 2016). It is morphologically characterized by a dilation of the ER and after increase in the volume and mitochondrial swelling of the cell following a massive influx of calcium and water; there is a rupture of the membrane (Ben-Hai and hoshan 2014). The cell contents will then be released into the extracellular medium where it will cause inflammation. A fibrous scarring usually follows this by cell destruction. These results are consistent with recent research (Johnson and Deckwerth 1993). The permeabilization of the mitochondria leads to the loss of mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\psi_m$) and the output of multiple pro-apoptotic proteins of mitochondrial intermembrane space to the cytosol to trigger cell death. However, a decrease in mitochondrial respiration and a small amount of O_2 is consumed. Other tests confirm that.

The brain consumes 20 to 25% of body O_2 ; this large amount of O_2 produces moderate responsible way ROS with

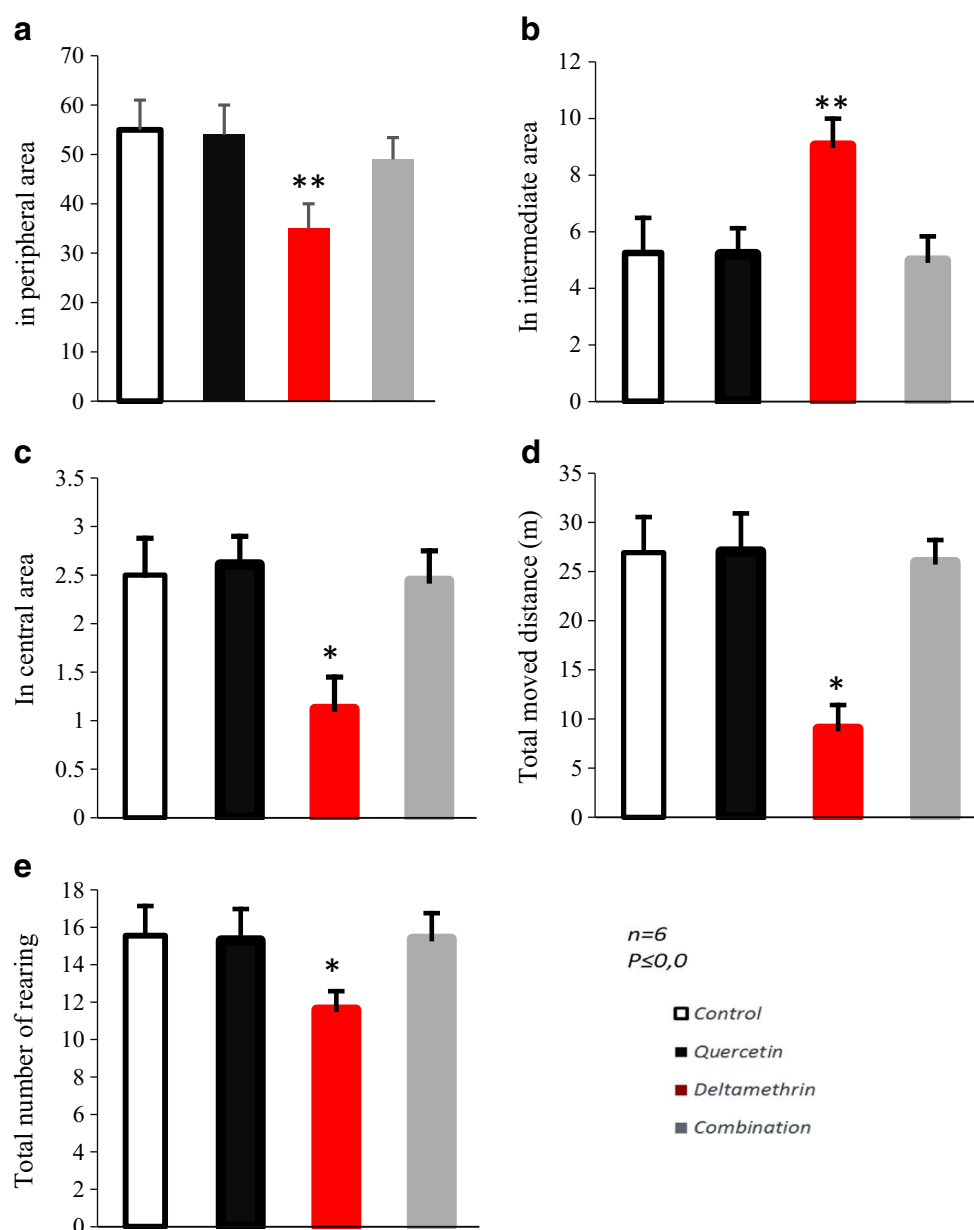
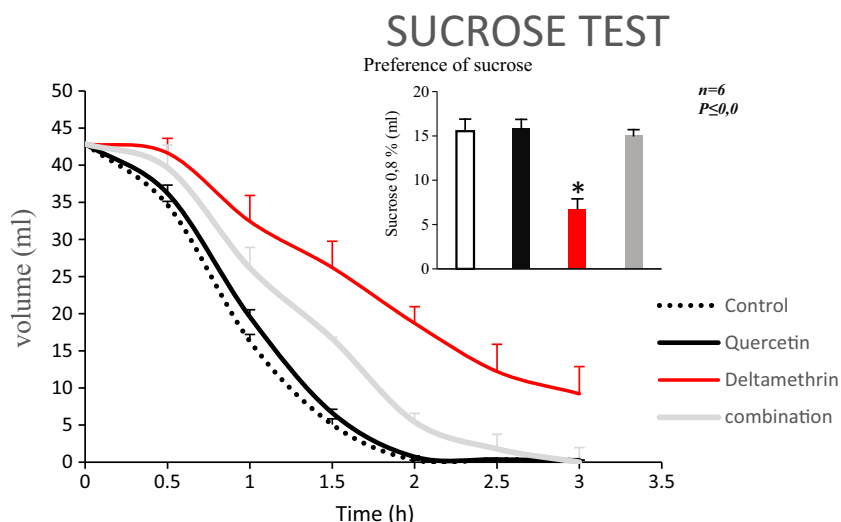


Fig. 17 Changes in open field test data in the control and the treated groups after 90 days of treatment. **a** IPA. **b** IIA. **c** ICA. **d** TDM. **e** TNR

the antioxidant system; this amount is safe for the body. According to some studies (Chargui et al. 2012; Kamendra et al. 2013; Patro et al. 1997; Dinu et al. 2010; Wang and Martínez 2016), after poisoning with DLM imbalance touch the body, ROS are increased and the antioxidation system (GSH, MDA, SOD, CAT, GPx, GST ...) is activated (Dinu et al. 2010). Another time, this activation is responsible for increased levels of these ROS and promotes risk necrosis or apoptosis (Zou et al. 1999). The amount of GSH in concordant results of Henine et al. (2016) increased the level of MDA (Rouabhi et al. 2009); according to the controls, this is because of the increased use of GSH to scavenge ROS and therefore increase oxidative stress (Aoun and Tiranti 2016; Aydin 2011). These results are in agreement with the results of many

researchers (Boussckine 2014; Rodriguez et al. 2013; Rouabhi et al. 2006, 2015). They found that the DLM influences the general metabolism by inhibition of several energy or structural reactions, such as β -oxidation (Aoun and Tiranti 2016), glycolysis, and Kreps cycle reactions. The assay of mitochondrial metabolites in both brain regions confirmed these effects. Indeed, there was a significant increase in lipid levels of carbohydrates (Kaplan 1984). This increasing is the result of inhibition of catabolic reactions, decreased serotonin, and weakens energy consumption and accumulation of these metabolites in the mitochondria; this accumulation caused by the dysfunction problems of these energetic units can be loss hemostasis and trigger cell apoptosis (Seaton et al. 1996; Zhao et al. 2001).

Fig. 18 Variation of preferably sucrose test and sugar water intake in the control and the treated groups



However, there are increased levels of proteins translated by enzymatic induction against the consequences of DLM (Anadn et al. 1991). So logically, training of a chemical xenobiotic detoxification is thereby the answer. These results were confirmed by several researchers (Blaise et al. 2007; Franco and Cidlowski 2009). In this work, the GSH and enzyme activities of CAT and GPx were significantly decreased in the mitochondria of the hippocampus and striatum of treated rats. GSH represents reduced form (GSH) and oxidized (GSSG) for removal function ROS (Catinot 1989; Franco and Cidlowski 2009; Daubié 2011). These can attack the unsaturated bonds of the lipids of the membrane (Gadoth and Gobel 2011; Amin and Hashem 2012). Thus, the increase of ROS can induce lipid peroxidation by oxidative degradation of polyunsaturated fatty acids in the membranes of cells (Ahmad et al. 2013; Arora et al. 2016). Obviously, the membrane lipid peroxidation destroys the structure of the lipid matrix of the membranes of neurons (DiMauro and Schon 2008), and it is associated with rapid loss of intracellular ATP leading to a decrease in the viability of neurons and also increased cell degeneration in hippocampus and striatum caused physiological and behavioral disturbance in rats treated with DLM (Dulawa et al. 2004; Galal et al. 2014; Ekaluo et al. 2013; Kumar et al. 2015; Utip et al. 2013).

Generally, GPx, CAT, and SOD greatly facilitate and accelerate the transfer of H₂O₂ H₂O by different mechanisms. Inhibition of CAT and GPx and the induction of GST and SOD confirmed the very high amount of ROS (Gaume et al. 2014). These results agree with many works (Flohe 1984; Lin and Beal 2006; Boussckine 2014). Nerve cells and particularly astrocytes are susceptible to damage induced by excessive ROS as O₂^{•-}, H₂O₂, NO, and HO[•] (Lauvverys et al. 2007). A decrease in antioxidant system has also been reported in patients with neurodegenerative disease. Mitochondria are essential in the production of energy needed to maintain cell function (Flohe 1984). Mitochondrial damage contributes to a decrease in ATP production (Cassarino and Bennettjr 1999; Datta and Kaviraj 2003). Alterations in mitochondrial a complex result in a decrease of ATP synthesis, which leads to depolarization of the mitochondrial membrane and subsequent activation of voltage-gated receptor, allowing calcium influx in the cell and trigger the paths of cell death (Pellerin and Magistretti 1994; Rodriguez et al. 2013).

Neuronal apoptosis is a neurodegenerative mechanism involved in response to various cellular stress (neurotrauma, asphyxia) and during Alzheimer's, Parkinson's, or Huntington (Masoumi et al. 2009; Ravagnan et al. 2002). A current general hypothesis

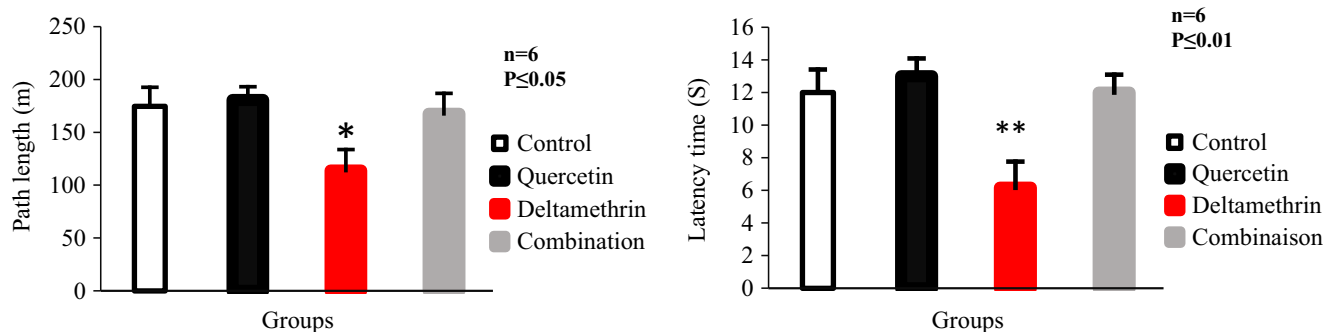


Fig. 19 Change in Morris water maze test in the control and the treated groups

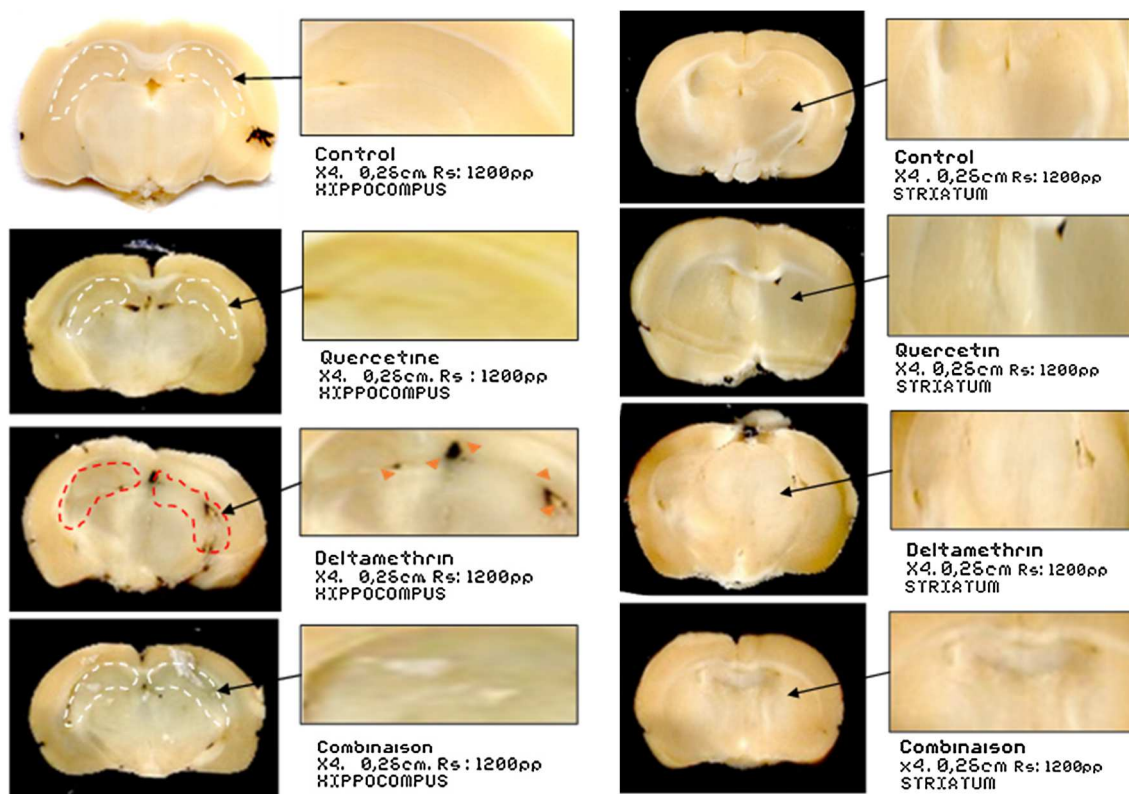


Fig. 20 Histological sections of the brains of control, treated with the Quercetin, treated with the Deltamethrin, and treated with the combining (DLM/QE) rats, showing the hippocampus and striatum

about the cause of neurodegenerative diseases is the toxicity of abnormal protein aggregates, which would trigger an apoptotic process (Nicholson 1999; Yuan and Yankner 2016). This mechanism is the key to avoid the risks and multiplication after an attack by ROS; these risks were mainly related to genetic material (Abdel-Daim et al. 2015; Abdul and Salah 2013). The mitochondrion is the first place to trigger this phenomenon through several factors such as the cytochromes and the Cas. The caspase-3 is a caspase protein that interacts with Cas-8 and Cas-9. The Cas-3 protein is an acid protease member (caspase) cysteine aspartic family (Fesik and Shi 2001). The sequential activation of Cas plays a central role in the execution phase of apoptosis (Kumar et al. 2015; Jevtić et al. 2016). Our results confirmed that treatment with DLM induced high levels of Cyt-c and Cas-3 followed by apoptosis confirmed by a high swelling and mitochondrial permeability. Upon exposure to a pesticide, the induction path of the predominant apoptosis is dependent on mitochondria (Gu et al. 2015). This scheme requires the release into the cytosol of apoptogenic proteins contained in the intermembrane space of mitochondria such the AIF or Cyt-c. The latter, once expanded in the cytoplasm, results in the Apaf-1 recruitment and proCas-9. This trimer, named apoptosome, leads to activation of Cas-9,

the initiator of the mitochondrial pathway. The latter leads to the activation of Cas-3 (Zou et al. 1999). Different mechanisms that are controversial still realize the release of apoptogenic proteins of the mitochondrion to the cytosol (Jevtić et al. 2016); the permeability transition pore (PT) would be associated with the reduction in potential mitochondrial membrane ($\Delta\psi_m$). The fall of potential leads to a massive entry of water and ions causing swelling and ultimately a physical disruption of mitochondrial outer membrane responsible for the release of apoptogenic proteins (Fromenty 2010; Marg and Brecken 2001; Xu et al. 2015).

In addition, the Cyt-c is synthesized as a precursor Apo-Cyt-c, and then it is transported into the mitochondria, where it is converted into globular protein called HoloCyt-c that allows the transport of electrons between the complexes III and IV of the mitochondrial respiratory chain (Ravagnan et al. 2002). In response to a stimulus, the Cyt-c can be translocated from the mitochondria into the cell cytoplasm. In most cases, the release of Cyt-c is dependent on Cas activity but its release mechanism raises controversy (Dayal et al. 2001; Yousef et al. 2001; DiMauro and Schon 2008). Heiskanen et al. (1999) have shown that Cyt-c release and $\Delta\psi_m$ fall took place at the same time.

On the other hand, acetylcholine was the only neurotransmitter in the control of movement that is not made from an

amino acid. Brain regions that offer the highest density of neurons using choline are those that degenerate in Alzheimer's disease (Songlin et al. 2015). The decrease in the production of acetylcholine is causing impaired memory, poor concentration, and oversights. The excess neurotransmitters are degraded by an enzyme AchE in the synaptic (Akaike et al. 2010). Also, acetylcholine reduces the production of TNF α . The hippocampus contained nicotinic receptors in the principal cells of this structure (Welsby et al. 2009). Our results show a significant increase in activity of brain AchE in the hippocampus and the striatum, in rat deal by DLM. This increase caused a decrease in Ach, translated into clear change in behavior, disruption of the movement, and storage; these results agree with a lot of work (Bhutada et al. 2011; Pernet 2009; Williams and Kauer 1997).

A clear behavioral disturbance was observed in this study in rats treated with 0.32 mg/kg/day of DLM on locomotor activity, emotional, exploratory, memory and learning, test results fields (open field), classic maze test (*labyrinth*), Morris water maze test (MWM), and sucrose test with behavioral change such as increased anxiety, the fear, nervousness, short-term memory loss, and the inability to think because of the gradual increase in mitochondrial ROS. This result confirms the health of all previous results (Griffith 1991; Tsai et al. 2010).

In our study, we found that the time of immobility and swimming time of rats treated with DLM is changed compared to control rats. Those who rather activate 5-HT reduce immobility by increasing swimming (Tsai et al. 2010) and behaviors related to anxiety to a new environment (Walsh and Cumins 1976). In our study, treatment of male Wistar rats by the DLM decreased highly significantly locomotor activity of rats. This effect may be due to alteration in the cytokine profile induced. The maze test is one of the most important models for anxiety, memory, and learning. Increasing the number of shot, the time coming, and the time spent in the cage environment are considered to be the most representative indices of the anxiolytic activity. In this device, rats normally prefer to spend less time and less number of turned (Belzing and Griebel 2001; Bromley-Brits et al. 2011; Walsh and Cumins 1976).

Negative emotions like anxiety, loss of learning, memory, and depression cause increased risk of disorders with an inflammatory or necrotic etiology, and the elevation of inflammatory activity may be an important mediator of relations emotion poisoning DLM (Kahloula et al. 2014). In addition, a higher level of pro-inflammatory cytokines has been reported to be increased behavioral, neurochemical, and endocrine (Kim et al. 2005; Sabra et al. 2000).

Learning and memory are greatly affected by stress and depression. Acute or chronic stress experiences can be more sensitive to memory deficits compared to non-stressful situations. The hippocampus seems to be an anatomical site

correlates with depression (Zhang et al. 2007). Furthermore, the hippocampus, an important sub cortical structure in the mammalian brain, seems involved in several types of learning and memory processes (Redei et al. 2001). It is also known as a target structure for the various types of neuroactive steroids such as androgens (Guedri 2014).

The results of the MWM test confirm that the DLM caused a deficit in the reference memory in rats, revealed by increased latency, and reduced the number of entries and time spent in the target quadrant. Recent studies conducted to explain the mechanism by which corticosterone acts on memory processes (Kemble et al. 1997; Kelley et al. 2011; Guedri 2014); corticosterone rapidly and transiently affects the contextual recall of information, the hippocampus modulating activity by mechanism that is quick and probably non-genomic (Johnson and Deckwerth 1993), although the short-term memory is impaired by adrenalectomy (Guedri 2014).

At the other hand, the administration of QE improves learning disabilities and memory retention. Recently, the role of the neuroprotective QE has been documented in several studies (Gao et al. 2014; Habig et al. 1974; Lakroun et al. 2015; Henine et al. 2016).

In this study, also using sucrose test, we demonstrated a decrease of learning, which also indicated that the booster DLM resulted in a decrease of the storage process in rats (Guedri 2014).

The lysosome contains some important enzymes such as lipase, glycoside hydrolases, and proteases. The increase in amount of lysosomes in our study was confirmed by the very high amounts of cellular metabolites on the one hand and on the other hand the necrosis and apoptosis caused by the DLM.

Another part of our work, after the supplementation of Quercetin at the dose of 10 mg/kg/day for 90 days, there is an improvement and neutralization of neurotoxicity caused by 0.32 mg/kg/day of DLM. Our results were in accordance with new work (Lakroun et al. 2015). This polyphenol has many benefic and curative characters, mainly against oxidative stress and free radicals (Benhammou 2011; Gindin et al. 1995). The QE increases production of AchE (memory and learning), supports the mitochondria in energy production, prevents oxidative damage, increases brain O₂ consumption, promotes the synthesis of dopamine, and recycles Vit E for its ability to neutralize free radicals involved in brain aging, which inhibits the activity of AchE, enhances nerve impulses in the brain, and helps repair damaged neurons (Gao et al. 2014; Lakroun et al. 2015; Mona et al. 2014). The histological sections of striatum and hippocampus confirm these findings.

In conclusion, our study has indicated that the DLM poisoning can damage the brain cells in the hippocampus and striatum by altering mitochondrial metabolism, energy, and neurotransmitters. This will cause many neurodegenerative diseases such as Alzheimer's. The supplementation of

Quercetin orally neutralized the neurodegeneration status and improved the health of animals.

AchE, acetylcholinesterase; *AIF*, apoptosis-inducing factor; *Apaf*, apoptosis-activating factor; *ATP*, adenosine triphosphate; *Cas*, caspase; *Cyt*, cytochrome; *DA*, dopamine; *DLM*, Deltamethrin; *Glu*, glutamate; $\Delta\psi_m$, mitochondrial transmembrane potential; *Rc*, receptor; *RE*, endoplasmic reticulum; *ROS*, reactive oxygen space; *5-HT*, serotonin; *TNF*, tumor necrosis factors; *Vit*, vitamin

Acknowledgements First, my thanks are addressed to DGRSDT of Algeria and Prof. Said Fekra the rector of Tebessa University for their support. This work was achieved in the Laboratory of Toxicology at Applied Biology Department, Tebessa University which I address my gratitude to all personnel; my appreciation goes also to the personnel of Sfax Biotechnology Center, Tunisia for the help in caspase quantification.

References

- Abdel-Daim M, Abdelkhalik M, Hassan M (2015) Antagonistic activity of dietary allicin against deltamethrin-induced oxidative damage in freshwater Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicol Environ Saf* 111:146–115
- Abdel-Daim M, El-Bialy E, Haidy G, Abdel R, Abeer M, Radi A, Ahmed H (2016) Antagonistic effects of *Spirulina platensis* against sub-acute Deltamethrin toxicity in mice. *Biomed Pharmacother* 77:79–85
- Abdul HM, Salah M (2013) Lycopene reduces deltamethrin effects induced thyroid toxicity and DNA damage in albino rats. *J Basic Appl Zool* 66:155–163
- Aebi (1984) Catalase in vivo, methods in enzymology, vol 105. Academic Press, Orlando, pp 121–126
- Ahmad M, Adil D, Khan M (2013) Effect of repeated oral administration of bifenthrin on lipid peroxidation and anti-oxidant parameters in Wistar rats 125–128
- Akaike A, Takada Y, Kume T, Izumi Y (2010) Mechanisms of neuroprotective effects of nicotine and acetylcholinesterase inhibitors. *J Mol Neurosci*. 40(1–2):211–6. doi:10.1007/s12031-009-9236-1
- Amin KA, Hashem KS (2012) Deltamethrin-induced oxidative stress and biochemical changes in tissues and blood of catfish (*Clarias gariepinus*): antioxidant defense and role of alpha-tocopherol *BMC* 8:45. doi:10.1186/1746-6148-8-45
- Anadn A, Martinez L, Diaz M, Bringas P, Fernandez M (1991) Effect of deltamethrin on antipyrine pharmacokinetics and metabolism in rat. *Arch Toxicol* 65:156–159
- Aoun M, Tiranti V (2016) Mitochondria: a crossroads for lipid metabolism defect in neurodegeneration with brain iron accumulation diseases. *J Biochem Cell Biol*:01–018
- Arora D, Haris S, Kumar S, Pratap S, Tripathi A, Mandal A, Shankar S, Kumar SH, Shukla H (2016) Evaluation and physiological correlation of plasma proteomic fingerprints for Deltamethrin induced hepatotoxicity in Wistar rats. *LFS* 14866:04–025
- Aydin B (2011) Effects of thiacloprid, deltamethrin and their combination on oxidative stress in lymphoid organs, polymorphonuclear leukocytes and plasma of rats. *Pestic Biochem Physiol*:165–171
- Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Biochemist* 44:276–287
- Belzing C, Griebel G (2001) Measuring normal and pathological anxiety-like behavior in mice. *Behav Brain* 141–149
- Ben-Hai D, Hoshan S (2014) Assays of mitochondrial Ca^{2+} transport and Ca^{2+} efflux via the MPTP. *Cold Spring Harb Protoc*. doi:10.1101/073163
- Benhammou N (2011) Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thèse doctorat P 174
- Bhutada P, Mundhada Y, Bansod K, Tawari S, Patil S, Dixit P, Umathe S, Mundhada, D (2011). Protection of cholinergic and antioxidant system contributes to the effect of berberine ameliorating memory dysfunction in rat model of streptozotocin-induced diabetes *Behav Brain. Res Jun* 220(1):30–41
- Blaise SA, Nedelec E, Schroeder H, Alberto JM, Bossenmeyer-Pourie C, Gueant JL, Daval JL (2007) Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats. *Am J Pathol* 170:667–679
- Bonvallot N (2014) application de la metabolomique à l'étude du lien entre les expositions environnementales aux pesticides pendant la grossesse et le developpement de l'enfant. thèse doctorat SEVAB INRA p 256
- Boussckine S (2014) Contribution à l'étude de l'effet du sélénium sur le mécanisme biochimique chez le diabète expérimental. thèse Doctorat en Biochimie Université Annaba p 132
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Bromley-Brits K, Deng Y, Song W (2011) Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice. *J Vis Exp*. (53) e29 20
- Cassarino D, Bennettjr J (1999) An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology. Protective nuclear responses and cell death in neurodegeneration. *Brain Res Rev* 29:1–25
- Catinot R (1989) In vitro covalent binding of the pyrethroids cismethrin, cypermethrin and deltamethrin to rat liver homogenate and microsomes. *Arch Toxicol* 63:214–220
- Chargui I, Grissa I, Bensassi F, Hrira M, Haouem S, Haouas Z, Bencheikh H (2012) Oxidative stress, biochemical and histopathological alterations in the liver and kidney of female rats exposed to low doses of deltamethrin (DM): a molecular assessment. *Biomed Environ Sci* 25(6):672–683
- Datta M, Kaviraj A (2003) Acute toxicity of the synthetic pyrethroid deltamethrin to freshwater catfish *Clarias gariepinus*. *Bull Environ Contam Toxicol* 70: 296–299
- Daubié S (2011) Neurobehavioral and physiological effects of low doses of polybrominated diphenyl ether (PBDE)-99 in male adult rats. Thesis of doctorat, pp 201
- David A, Clayton S, Gerald S (2014) Isolation of mitochondria from tissue culture cells. *Cold Spring Harb Protoc*. doi:10.1101/080 002
- Dayal M, Devendra P, Mohd A, Alok D, Uppendra D, Prahlad S (2001) Induction of rat brain cytochrome P450s by deltamethrin: regional specificity and correlation with neurobehavioral toxicity *Neurotoxicity Res*. 351–357
- DiMauro S, Schon EA (2008) Mitochondrial disorders in the nervous system. *Ann Rev Neurosci* 31:91–123
- Dinu D, Marinescu D, Cristina M, Andreea M, Staicu C (2010) Modulatory effects of deltamethrin on antioxidant defense mechanisms and lipid peroxidation in *Carassius auratus* gibelio liver and intestine. *Archives Environ Contam & Toxicol* 58:757–764
- DRIRE (2003) Direction Régionale de l'Industrie de la Recherche et de l'Environnement dans l'actualité
- Dubois M (1956) Colorimetric method for determination of sugars. *Pubs acs*. doi: 10.1021/ac60111a017
- Dulawa SC, Holick KA, Gundersen B, Hen R (2004) Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. *Neuropsychopharmacology* 29(7):21–30

- Ekaluo UB, Ibiang YB, Ikpeme EV, Ekanem BE (2013) Effect of deltamethrin and ridomil on sperm parameters and reproductive hormones of male rats. doi:10.1007/s13530-013-0149-6
- Elizabeth V, Minelli M, Ribeiro L (1998) Gas-chromatographic determination of deltamethrin in crops. *Fresenius J Anal Chem* 360:252–255
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholine esterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88–97
- Fesik S, Shi Y (2001) Structural biology controlling the caspases. *Science* 294:1477–1486
- Fethi, B.K., Issam, C., Ali, M.M. et al. (2014) Effects of sub-chronic exposure to coinjection of deltamethrin and methyl linoleate on gonads. *Comp Clin Pathol* 23(3):695–701. doi: 10.1007/s00580-012-1673-5
- Flohe G (1984) Analysis of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 105:114–121
- Franco R, Cidlowski J (2009) Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ* 16:1303–1314
- Fromenty B (2010) Toxicité mitochondriale et métabolique des médicaments. *Réanimation* 19:552–567
- Gadoth N, Gobel H (2011) Oxidative stress and free radical damage in neurology. *Oxidative Stress Appl Basic Res Clin Pract Springer Sci* 514:1–9
- Galal MK, Khalaf A, Ogaly HA, Ibrahim MA (2014) Vitamin E attenuates neurotoxicity induced by deltamethrin in rats. *BMC Complement Altern Med* 2;14:458. doi: 10.1186/1472-6882-14-458
- Gao C, Chen X, Li J, Li Y (2014) Myocardial mitochondrial oxidative stress and dysfunction in intense exercise: regulatory effects of effects of quercetin. *Eur J Appl Physiol* 114(4):695–705
- Gaume, B., Dodet, N., Thomé, JP. et al. (2015) Expression of biotransformation and oxidative stress genes in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* exposed to chlordecone. *Environ Sci Pollut Res* 22:7991
- Gandin J, Novikov M, Kedar D (1995) The effect of plant phosphatidylserine on age-associated memory impairment and mood in the functioning elderly. Geriatric Institute for Education and Research, and Dept of Geriatrics, Kaplan Hospital. Rehovot; Israel
- Gordana J, Tatjana N, Aleksandar M (2016) Mitochondrial impairment, apoptosis and autophagy in a rat brain as immediate and long-term effects of perinatal phencyclidine treatment influence of restraint stress PN-PBP 66 87–96
- Griffith C (1991) A possible case of instinctive behavior. *Science* 50:166–167
- Gu ZT, Li L, Wu F (2015) Heat stress induced apoptosis is triggered by transcription dyshomeostasis and the subsequent Bax mitochondrial translocation. *Sci Rep.* 5:11497. doi:10.1038/srep11497
- Guedri K (2014) Etude des perturbations neuro-biologiques et comportementales chez un modèle animal gonadectomisé These doctorat Annaba Algerie pp 87
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249: 7130–7139
- Haddadi H, Shirani M (2014) Simultaneous determination of deltamethrin and permethrin in water samples using homogeneous liquid-liquid micro extraction via flotation assistance and GC-FID 10. 1007/s10337-014-2666-0
- Heiskanen K, Bhat M, Wang H, Ma J, Nieminen AL (1999) Mitochondrial depolarization accompanies cytochrome c release during apoptosis. *Biol Chem* 274:5654–5658
- Henine S, Rouabhi R, Gasmi S, Amrouche A, Abide A, Salmi A, Toualbia N, Taib C, Bouteraa Z, Chenikher H, Boussekine S, Kebieche M, Aouimeur M (2016) Oxidative stress status caspase-3 stromal enzymes and mitochondrial respiration and swelling of *Paramecium caudatum* in responding to the toxicity of Fe₃O₄ nanoparticles. *Environ Health Sci* 8:161
- Jaako K, Tamara Z, Romantchik O, Monika J, Eda M, Lenne TH, Alexander Z (2005) Developmental lead exposure impairs contextual fear conditioning and reduces adult hippocampal neurogenesis in the rat brain. *Int JDev Neurosci* 23(7):627–35
- Jang S, Dilger R, Johnson R (2010) Luteolin inhibits microglia and alters hippocampal-dependent spatial working memory in aged mice. *J Nutr* 140(10):1892
- Jevtić G, Nikolić T, Mirčić A, Stojković T, Velimirović M, Trajković V, Marković I, Trbovič AM, Radonjić NV, Petronijević ND. (2016) Mitochondrial impairment, apoptosis and autophagy in a rat brain as immediate and long-term effects of perinatal phencyclidine treatment influence of restraint stress. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 3;66:87–96
- Johnson E, Deckwerth T (1993) Molecular mechanisms of developmental neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 16:31–46
- Jürgensen K, Mouritsen M (2000) Effects of the insecticides malathion and deltamethrin on the phase behaviour of dimyristoylphosphatidylcholine multilamellar lipid bilayers 1–8
- Kahloula K, Houari D, Slimani M, Terras H, Achour S (2014) Effet de l'exposition chronique au nickel sur les fonctions neurocomportementales chez les rats Wistar pendant la période de développement. *Toxicologie Analytique & Clinique*:186–192
- Kamendra K, Nisha P, Ishan P (2013) Impaired structural and functional development of cerebellum following gestational exposure of deltamethrin in rats: role of reelin. *Cell Mol Neurobiol* 33:731–746
- Kaplan A (1984) Lipids. *Clin Chem*:918–919
- Kelley B, Yu D, Weihong S (2011) Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease. Columbia University. doi:10.3791/2920
- Kemble ED, Whitehall ME, Angstrom AM, Goblirsch MJ (1997) Effects of non-contact exposure to rodents on defensive behavior in mice. *Behav Processes* 41(1):11–17
- Kim D, Heo HJ, Kim YJ, Yang HS, Lee CY (2005) Sweet and sour cherry phenolics and their protective effects on neuronal cells. *J Agric Food Chem* 53(26):9921–9927
- Kristal BS, Park BK, Yu BP (1996) 4-Hydroxynonénal est un puissant inducteur de la transition de perméabilité mitochondriale. *Biol Chem*:6033–6038
- Kumar A, Sasmal D, Sharma N (2015) An insight into deltamethrin induced apoptotic calcium, p53 and oxidative stress signalling pathways. *Toxicol Environ Health Sci* 7:25. doi:10.1007/s13530-015-0217-1
- Lakroun Z, Kebieche M, Lahouel A (2015) Oxidative stress and brain mitochondria swelling induced by endosulfan and protective role of quercetin in rat. doi:10.1007/s11356-014-3885-5
- Lauvverys R, Vincent H, Dominique L (2007) Toxicologie industrielle et intoxication professionnelles Ed Masson 31–288
- Lin MT, Beal MF (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443:787–795. doi:10.1038/nature05292
- Marg MG, Brecken VD (2001) Induction of rat brain cytochrome P450s by DLM: regional specificity and correlation with neurobehavioral toxicity 351–357
- Masoumi A, Goldenson B, Ghirmai S et al. (2009) 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 interacts with curcuminoids to stimulate amyloid-beta clearance by macrophages of Alzheimer's disease patients. *J Alzheimers Dis* 17(3):703–17. doi:10.3233/JAD-2009-1080
- Mnif W, Hassine AI, Bouaziz A, Bartegi A, Thomas O, Roig B (2011) Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. *Int J Environ Res Public Health*:2265–2303
- Mona K, Abdel A, Hanan A, Marwa A (2014) Vitamin E attenuates neurotoxicity induced by deltamethrin in rats *BMC*

- Complementary and Alternative Med 14:458. doi:10.1186/1472-6882-14-458
- Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Neuroscience*:47–60
- Navickiene S, Marta H, Kato L, Elizabeth V, Minelli M (1998) Gas-chromatographic determination of DLM in crops. *Fresenius J Anal Chem* 360:252–255
- Nicholson DW (1999) Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*:1028–1042
- Patro N (1997) Neurotoxicological effects of deltamethrin on the postnatal development of cerebellum of rat. *J Biosci* 22(2):117–130. doi:10.1007/BF02704726
- Pellerin L, Magistretti PJ (1994) Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis. *Proc Nat Acad Sci* 91:10625–10629
- Pernot F (2009) Événements moléculaires et cellulaires associés à l'épileptogénèse dans deux modèles murins d'injection intrahippocampique de toxiques Implication des mécanismes neuro-inflammatoires, These doctorat, université Jouseph fourier pp 239
- Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G (2002) Mitochondria the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol*:131–137
- Redei E, Ahmadiyah N, Baum A, Sasso D, Slone J, Solberg L (2001) Novel animal models of affective disorders. *Semin Clin Neuropsychiatry*:43–67
- Rehman H (2006) The modulatory effect of DLM on antioxidants in mice. *J Elementol Toxicol*:371–377
- Rodriguez E, Martinez F, Espinosa M, Maldonado S (2013) Mitochondrial dysfunction in the hippocampus of rats caused by chronic oxidative stress. *Neuroscience* 252:384–95. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.08.018
- Rodríguez JL, Ares IV, Castellano M, Martínez MR, Martínez A, Anadónn MA (2016) Effects of exposure to pyrethroid cyfluthrin on serotonin and dopamine levels in brain regions of male rats. *Environ Res* 146:388–94. doi:10.1016/j.envres.2016.01.023
- Rouabhi R, Djebbar H, Djebbar MR (2006) Toxicity evaluation of flucyclozuron and diflubenzuron on the cellular model, *Paramecium* sp. *Afr J Biotechnol*:045–048
- Rouabhi R, Djebbar H, Djebbar MR (2009) Toxic effects of combined molecule from novaluron and diflubenzuron on *Paramecium*. *Am-Euras J Toxicol Sci* 1(2):74–80
- Rouabhi R, Gasmis S, Boussekine S, Kebieche M (2015) Hepatic oxidative stress induced by Zn and opposite effect of Se in *Oryctolagus cuniculus*. *J Environ Anal Toxicol* 5:289. doi:10.4172/2161-0525.1000289
- Rustin P, Chrétien D, Bourgeron T, Gérard B, Rotig A, Munnich A (1994) Biochemical & mol investigation in respiratory chain deficiencies. *Clin Chem Acta*:35–51
- Sabra MC, Jørgensen K, Mouritsen OG (2000) Effects of the insecticides malathion and deltamethrin on the phase behaviour of dimyristoylphosphatidylcholine multilamellar lipid bilayers. In: Razumas V, Lindman B, Nylander T (eds) *Surface and Colloid Science. Progress in Colloid and Polymer Science*, vol 116. Springer, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/3-540-44941-8_1
- Seaton T, Jenner P, Mursdenf C, King S (1996) Mitochondrial respiratory enzyme function and superoxide dismutase activity following brain glutathione depletion in the rat. *Biochem Pharmacol* 52(11):1657–1663. doi:10.1016/S0006-2952(96)00452-2
- Seddik L (2014) Evaluation de l'effet protecteur de l'extrait de feuilles d'olive (*Olea europaeu*) chez les rats intoxiqués à l'acétate de plomb au niveau cérébral et du cartilage osseux. Approche neurocomportementale, biochimique et immunohistoch. Thèse. Oran université pp 131
- Songlin C, Xiaoli Y, Yinying L, Weiyi M, Xiaoyun L, Changran Z (2015) Alzheimer's disease treated with combined therapy based on nourishing marrow and reinforcing Qi. *J Tradit Chin Med* 35(3):255–9. doi:10.1016/S0254-6272(15)30094-7
- Tsai F, Cheng H, Hsieh M, Wu C, Lin Y, Peng W (2010) The ameliorating effects of luteolin on beta-amyloid-induced impairment of water maze performance and passive avoidance in rats. *Am J Chin Med* 38(2):279–91. doi:10.1142/S0192415X10007841
- Utup B, Young B, Ibiang E, Victor I, Bassey E, Francis A (2013) Effect of deltamethrin and ridomil on sperm parameters and reproductive hormones of male rats. *Toxicol Environ Health* 5(1):9–14. doi:10.1007/s13530-013-0149-6
- Walsh N, Cumins A (1976) The OF-test a critical. *Psychol Bull* 83:482–504
- Wang X, Martínez MA (2016) Permethrin-induced oxidative stress and toxicity and metabolism, a review. *Environ Res* 86:10–14
- Warso MA, Lands WE (1983) Lipid peroxidation in relation to prostacyclin and thromboxane physiology and pathophysiology. *British Medical Bulletin*, 39(3):277–280
- Weigt C, Hertrampf T (2015) Effects of estradiol estrogen receptor subtype-selective agonists and genistein on glucose metabolism in leptin resistant female Zucker diabetic fatty rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 154:12–22. doi:10.1016/j.jsbmb.2015.06.002
- Welsby PJ, Rowan MJ, Anwyl R (2009) Intracellular mechanisms underlying the nicotinic enhancement of LTP in the rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 29(1):65–75. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06562.x
- Williams JH, Kauer JA (1997) Properties of carbachol-induced oscillatory activity in rat hippocampus. *J Neurophysiol* 78(5):2631–40
- Wilson B (2010) Cholinesterase, Section X: organophosphorus insecticides In *Handbook of pesticide toxicology*. Third Edition Robert Krieger 1457–1478
- Wozniak D, Olney JW, Kettinger L, Priece M, Miller JP (1990) Behavioral of the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 101(1):47–56
- Xu MY, Wang P, Sun YJ et al. (2015) Redox status in liver of rats following subchronic exposure to the combination of low dose dichlorvos and deltamethrin. *Pestic Biochem Physiol* 124:60–5. doi:10.1016/j.pestbp.2015.04.005
- Xudong T (2016) DGE analysis of changes in gene expression in response to temperature and deltamethrin stress in the silkworm. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 19(1):45–50. doi:10.1016/j.aspen.2015.11.001
- Yousef M, Awad T, Mohamed E (2001) DLM induced oxidative damage and biochemical alterations in rat and its attenuation by vitamin E. *Toxicology* 227(3):240–7. doi:10.1016/j.tox.2006.08.008
- Yuan J, Yankner A (2016) Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407:802–809
- Zhang HT, Huang Y, Masood A, Stolinski LR, Li YF, Zhang L, Dlaboga D, Jin SLC, Conti M, O'Donnell JM (2007) Anxiogenic-like behavioral phenotype of mice deficient in phosphodiesterase 4B. *Neuropsychopharmacology* 33:1611–1623
- Zhao X, Bausano B, Pike BR, Newcomb-FJ K, Wang KK, Shohami E, Ringger NC, DeFord SM, Anderson DK, Hayes RL (2001) TNF- α stimulates caspase-3 activation and apoptotic cell death in primary septo-hippocampal cultures. *J Neurosci Res* 64(2):121–131
- Zou H, Li Y, Liu X, Wang X (1999) An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274:11549–11556

Neurotoxicity of Acetamidrid in Male Albino Rats and the Opposite Effect of Quercetin

Gasmi S¹, Rouabhi R*¹, Kebieche M², Salmi A¹, Boussekine S¹, Toualbia N¹, Taib C¹, Henine S¹, Bouteraa Z¹ and Djabri B¹

¹Department of Applied Biology, Tebessa University, Tebessa, Algeria

²Laboratory of pharmacology and photochemistry, University of Jijel, Algeria

*Corresponding author: Rachid R, Department of Applied Biology, Tebessa University, 12000, Tebessa, Algeria, Tel: +213661259899; E-mail: r_rouabhi@yahoo.fr

Received: September 17, 2016; Accepted: November 15, 2016; Published: November 26, 2016

Abstract

The main aim of this work is to study the opposite effects of Quercetin against neurotoxicity induced by an environmental pollutant in albino rats; after administration of Acetamidrid at (3.14 mg/kg/day) of body weight orally during 90 days we have found that Acetamidrid has caused a neurotoxic effect (a decrease in relative brain weight, a decrease in lipids (0.54 ± 0.01), an increase of carbohydrates (1.43 ± 0.05) and total proteins (6.97 ± 0.02) of the brain), Acetamidrid has also an overall pro-oxidant effect, this is revealed by the significant reduction in the level of reduced Glutathione (5.01 ± 0.31), and activity of Glutathione peroxidase (0.042 ± 0.002) and catalase (1.26 ± 0.04) in the brain and on the other hand, we recorded an increase in enzyme activity of glutathione s-transferase (0.018 ± 0.002), the rate of MDA (0.08 ± 0.009) and Adversely affect the behavior and lifestyle. Our results have showed that supplementation of the Quercetin at (10 mg/kg of body weight/day) by oral way in rats treated with Acetamidrid, improved some biochemical parameters, and declined other adverse effects of Acetamidrid, and that the Quercetin appears to be a simple and effective antioxidant to reduce the imbalance between the formation of free radicals and antioxidant systems of the body and consequently reduced the intensity of oxidative stress induced by Acetamidrid.

Keywords: Quercetin; Neurotoxicity; Acetamidrid pollutant; Albino rats; GSH; GST; CAT; Brain

Introduction

After the second world war, pesticides have allowed the development of agriculture and contributed to the increasing and regulation of the agricultural production. The use of plant protection products has also limited or eradicated the number of very deadly parasitic diseases [1]. However, today, pesticides are believed to pose a risk for human health and the environment. They are indeed frequently implicated in the degradation of the quality of fresh groundwater and coastal waters, in the reduction of terrestrial biodiversity, found in agricultural areas and in natural contaminated environments or in cases of

excess mortality of bees and decline in hives production. In addition, many epidemiological studies have suggested a correlation between the professional use of pesticides and the appearance of some pathologies in the concerned populations [2]. Carcinogenic effects, neurotoxic or endocrine disruption-type of pesticides have been highlighted in animals. The risk to humans is therefore issue both at the professional level or during consumption [3].

The brain is particularly vulnerable to oxidative damage because of its richness in peroxidable fatty acid, its high-energy demands, and its relatively low antioxidant power [1]. This irreversible molecular damage is the leading cause of neurodegenerative diseases [4].

In this context, the present study opted for the study of the pro-oxidant effects and neurobehavioral changes that can be induced following individually chronic exposure to an organochlorine incorporated 'Acetamiprid' which is a pesticide with the formula ($C_{10}H_{11}ClN_4$) [5,6]. According to the toxicological information on the boxes of this last, they are hazardous and there is no specific antidote, that is why we applied a treatment of this toxicity by Quercetin as a pure polyphenol and synthetic organic substance [7].

Materials and Methods

Animals

The study was conducted on rats (Wister) albino males, from the Pasteur Institute of Algiers, weighing about 240 g to 260 g. Animals are divided into a control group and three treated lots. They have free access to water and food. The temperature of the pet store is maintained at 23°C, with a moderate humidity and a 12/12 photoperiod.

Choice of doses

Substances that will be used in this study are (Acetamiprid and Quercetin), the doses were selected by referring to results of recent work [5,7-10]; doses have been adjusted to meet the daily exposure rate. Rats were randomly divided into four groups of six (6) males each. The first group was served as the control who received only 0.5 ml of distilled water; the two other groups were treated *PerOs* with freshly prepared Quercetin solution with a single dose of 10 mg/Kg body weight for 90 days [9-11]. The third groups were treated with Acetamiprid at 3.14 mg/kg body weight per day for 90 days. The final groups were treated with Combination (Acetamiprid at 3.14 mg/kg/day and Quercetin 10 mg/Kg/day) for 90 days, each group received the treatment *PerOs* every day for 90 days between 9:00 am and 10:00 am.

Sacrifice of animals and brain removal

After 03 months of treatment, the animals were sacrificed by decapitation, the brain is removed and divided into five parts, one part used for the measurement of metabolites and stress parameters in the cytosol, and other parts kept in -80 for further studies.

Tissue preparation

Brain (1 g) was homogenized in 2 ml of buffer solution of phosphate buffered Saline 1:2 (w/v: 1g tissue with 2 ml PBS, pH 7.4). Homogenates were centrifuged at 10000xg for 15 min at 4°C and the resultant supernatant was used for the determination of glutathione, malondialdehyde, and glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase and catalase activity.

Weight measurement

The weight measurement is performed on rats, day to day on a regular basis during the adaptation period and three months of treatment, using a sensitive balance (Aston®).

Determination of carbohydrates

The determination of total soluble carbohydrates was done in brain tissue of rats according to the Dubois method [12]. The calculation of the actual concentrations is done by the equation derived from the standard curve prepared from a stock solution of glucose.

Protein estimation

The total protein contents of various samples were determined according to the method of Bradford [13] using a bovine serum albumin as a standard.

Determination of lipids

Brain lipids are assayed according to the method of Goldsworthy [14], the spectrophotometric reading is performed at 530 nm wavelength. The calculation of the actual concentrations is performed from the calibration curve made from a stock solution prepared using sunflower oil.

Determination of reduced glutathione (GSH)

Brain glutathione level (GSH) was measured utilizing the method described by [15]. 0.2 ml of a sulfosalicylic acid (SSA) at 0.25%, centrifuged for 5 min A1000 t/min, add 1 ml of Tris HCl buffer + EDTA (0.02M), pH 9.6, mix and add 0.025 ml the 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoic acid (DTNB) 0.01M was dissolved in absolute methanol, measure the absorbance (A) at 412 nm.

Determination of glutathione-S-transferase (GST)

Glutathione-S-transferase (GST) catalyzes the conjugation reaction with glutathione in the first step of mercapturic acid synthesis. The activity of GST was measured according to the method of Habig [2]. The P-nitro benzyl chloride was used as substrate. The absorbance was measured at 340 nm at 30 s intervals for 3 min.

Determination of glutathione peroxidase (GPX)

Glutathione peroxidase (GPx) activity was measured by the procedure of Flohe and Gunzler [16]. The obtained supernatant after centrifuging of 5% liver homogenate at 1500×g during 10 min followed by 10000×g for 30 min at 4°C was used for GPx assay. 1 ml of reaction mixture was prepared which contained 0.3 ml of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4), 0.2 ml of GSH (2 mM), 0.1 ml of sodium azide (10 mM), 0.1 ml of H₂O₂ (1 mM) and 0.3 ml of liver supernatant. The reaction was terminated by addition of 0.5 ml 5% TCA after 15 min of incubation at 37°C. Tubes were centrifuged at 1500×g for 5 min and the supernatant was collected. 0.2 ml of phosphate buffer (0.1 M, pH7.4) and 0.7 ml of DTNB (0.4 mg/ml) were added to 0.1 ml of reaction supernatant. After mixing, absorbance was recorded at 420 nm.

Determination of catalase activity (CAT)

The catalase (CAT) activity was determined according to the method of Aebi [17]. The H₂O₂ decomposition rate was followed by monitoring absorption at 240 nm. One unit of CAT activity is defined as the amount of enzymes required to decompose 1 μmol of hydrogen peroxide in 1 min. the enzyme activity was expressed as μmol H₂O₂ consumed /min/mg protein.

Determination of malondialdehyde (MDA)

The lipid peroxidation level in brain homogenate was measured as malondialdehyde (MDA) which is the product of lipid peroxidation and reacts with Thiobarbituric acid (TBA) as a reactive substance (TBARS) to produce a red complex with an absorbance peak at 532 nm [18]. Thus, 125 μl of supernatant were homogenized by sonication with 50 μl of PBS, 125 μl of TCA–BHT (trichloroacetic acid-butylhydroxytoluene) in order to precipitate proteins, and then centrifuged (1000×g, 10 min, and 4°C). After wards, 200 μl of supernatant were mixed with 40 μl of HCl (0.6 M) and 160 ml of TBA dissolved in Tris, and then the mixture was heated at 80°C for 10 min. The absorbance of the resultant supernatant was obtained at 530 nm.

Data processing

The experiments data were analyzed using statistical software MINITAB (MINITAB 17.0 for windows 7, 8 and 10. MINITAB Ins. USA), and all statistical comparisons were made by means of t-test and values of P<0.05 were considered significant. Results are expressed as means ± SEM, and to better visualize the results the selected graph is the histogram using the Microsoft Excel 2016.

Results and Discussion

The question of the impact of neonicotinoids on health is necessary in view of the widespread contamination of the environment, water and impregnation of food. Although the state of science does not provide overall synthesis that these health impacts and studies continue on the subject, several publications are appearing risk of chronic effects of these products on human health.

Action of Quercetin, Acetamiprid and combination (Quercetin/Acetamiprid) on settings growths in rats for 90 days

The parameters of growth (total weight, weight gain, relative weight and tissue metabolites) in the brains of treated rats and control rats after 90 days of treatment are shown on the TABLES 1 and 2 (FIG. 1-4).

TABLE 1. Body weight change (g) and relative weight (%) of the brain in control rats and rats treated with the Quercetin, the Acetamiprid and the combination (Q/Ac) after 90 days of treatment.

Variable group				
Parameters	control	Quercetin	Acetamiprid	Combination
weight (g)	246 ± 13.374	265 ± 17.098	224 ± 5.050***	254 ± 15.984
weight Gain (g)	42 ± 5.012	59 ± 7.016	21 ± 8.011***	53 ± 7.13
Relative weight of brain (%)	0.628 ± 0.012	0.63 ± 0.014	0.681 ± 0.019***	0.625 ± 0.013
Results are expressed as mean ± SE (n=6) t-test was used for multiple comparisons.				

Action on relative weight of brain

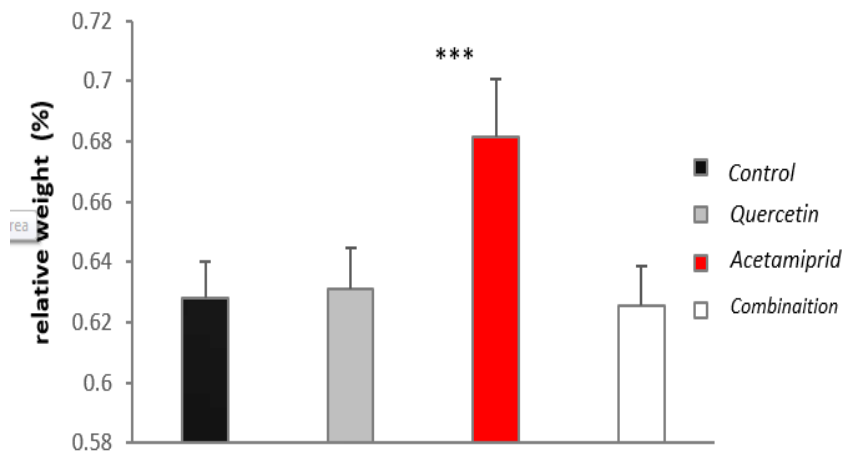


FIG. 1. Variation in the relative weight of control and treated rats brains by Quercetin, Acetamidrid and combining (Quercetin/Acetamidrid) after 90 days of treatment. Each value is expressed as mean ± standard deviation, we use Student test.

Action on cytosolic metabolites

TABLE 2. Change of some biochemical parameters (Proteins, carbohydrates and fats) in the brain in control rats and rats treated with Quercetin, the Acetamidrid and combining Quercetin/Acetamidrid after 90 days of treatment.

Variable group				
Parameters	Control	Quercetin	Acetamidrid	Combination
Proteins (mg)	0.348 ± 0.0092	0.3489 ± 0.006	0.3502 ± 0.008	0.349 ± 0.008
Carbohydrates (µg)	36.627 ± 0.664	35.191 ± 0.606	55.927 ± 0.659***	36.265 ± 0.8214
lipids (µg)	448.936 ± 0.153	449.484 ± 0.169	444.911 ± 0.134**	447.649 ± 0.096
Results are expressed as mean ± SE (n=6) t-test was used for multiple comparisons. ****P<0.0001, ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05 statistical significant as compared to control				

Action on the level of cytosolic carbohydrates

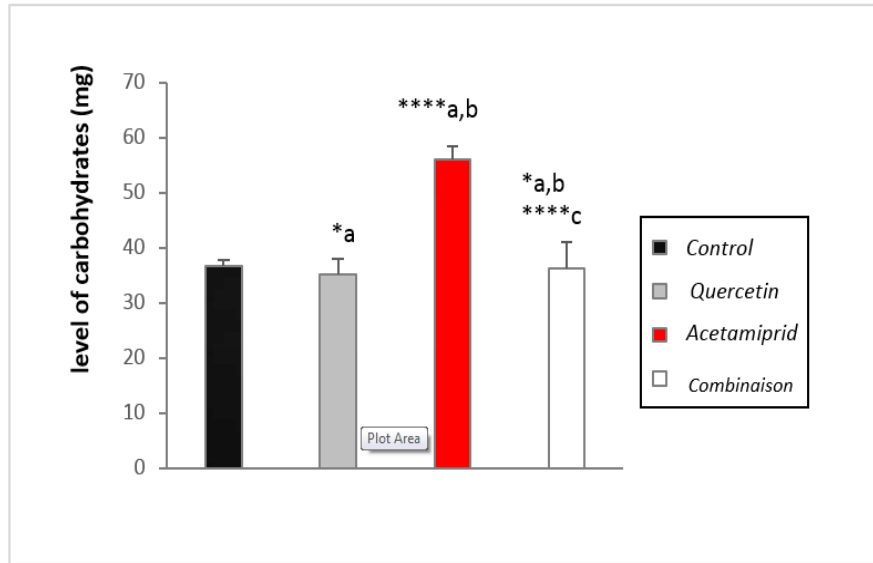


FIG. 2. Changes in carbohydrate levels of the brain of control rats and rats treated with Quercetin, the Acetamiprid and combining (Quercetin/Acetamiprid) after 90 days of treatment. Each value is expressed as mean \pm standard deviation, we use Student test. Batch compare treated with Quercetin (b) Acetamiprid (c) and the combination (d) compared to control group (a), $p < 0.05$: significant (*), $p < 0.01$: very significant (**), $p < 0.001$: highly significant (***), $p < 0.0001$: very highly significant (****), $P > 0.05$: not significant (ns).

Action on the tissue proteins level

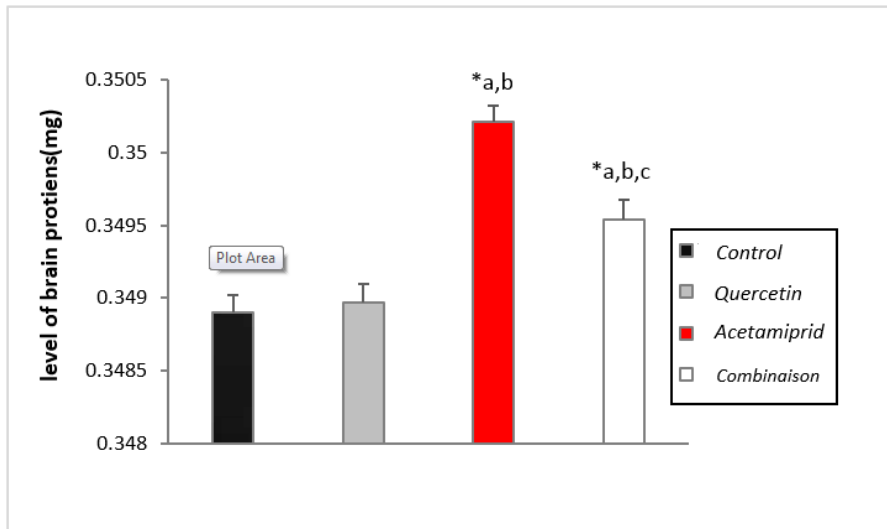


FIG. 3. Change in the protein levels in the brain of control rats and rats treated with Quercetin, the Acetamiprid and combining (Quercetin/Acetamiprid) after 90 days of treatment. Each value is expressed as mean \pm standard deviation, we use Student test. Batch compare treated with Quercetin (b) Acetamiprid (c) and the combination (d) compared to control group (a), $p < 0.05$: significant (*).

Action on the level of total lipids

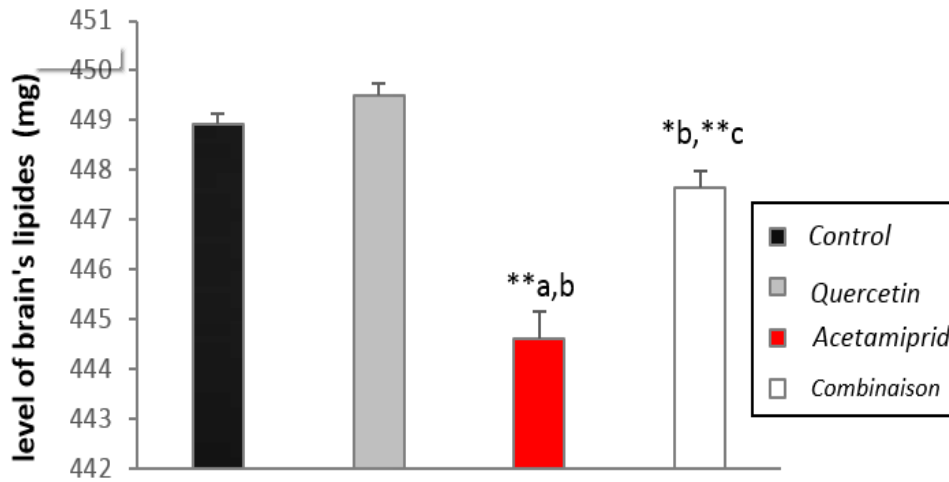


FIG. 4. Change of lipids levels in the brain of control rats and rats treated with Quercetin, the Acetamidrid and combining (Quercetin/Acetamidrid) after 90 days of treatment. Each value is expressed as mean \pm standard deviation, we use Student test. Batch Compare treated with Quercetin (b) Acetamidrid (c) and the combination (d) compared to control group (a). $p < 0.05$: significant (*), $p < 0.01$: very significant (**), $P > 0.05$: not significant (ns).

Our study is conducted by an experiment in albino rats to see the effect of a dose of (10 mg/kg/day) of Quercetin [8,9,19,20] on a dose of (3.14 mg/kg/j) Acetamidrid [5,6,9].

The results of experiment suggest that the administration of Acetamidrid as stressor by what an insecticide reduces body growth compared to controls (FIG. 1-4).

Disturbance of metabolism, which corresponds to the stress response, is observed very frequently and translates the systemic effects of the release of pro-inflammatory cytokines and myoactives as modifications endocrine characteristics [1].

During the period of brain growth, the human brain depends on glucose as rat brain uses both glucose and ketone compounds to cover its energy and biosynthetic requirements [21].

Logically, Acetamidrid malnutrition caused by their psychic effects regarding the reduction of appetite [1], the latter produces a cellular stress disorder by the contribution in decreasing of physiological antioxidant system cofactors (vitamins, trace elements...) after the gavage dose of 3.14 mg/kg/day of Acetamidrid the total weight of the rats is reduced because low food intake this causes a malnutrition.

In contrast, the brain dominance used a strategy to keep and increase the half-life of nervous cells by several mechanisms unlike other guard cells, brain metabolism is overactive in case of stress, specifically, Acetamidrid has activated indirectly the β -oxidation in the brain, so the brain cytosolic lipid rate is decreased, the cell energy needs are recovering, this latest action confirmed by the rate of increase in cytosolic carbohydrates [4,21,22].

Because the nervous cells use fat as a primary source of energy on the one hand, and on the other hand, many stress disorder catalysis of enzymes and mechanism are enable to decrease or neutralize the damage [23-25], it is also translated into an increase of protein levels. The increase in relative weight (0.05%) is the result of total decrease in body weight and the increase of brain weight. after gavage of combination (Quercetin 10 mg/kg/day and Acetamidrid of 3.14 mg/kg/day), the antioxidant effect of the polyphenol is clearly present by the neutralization of the harmful effects of Acetamidrid due mainly by the increasing of appetite and setting cofactors and essential nutrients to the antioxidant system.

Our results are consistent with historical data [20,26,27] which showed that administration of Quercetin in rats treated with Acetamidrid which leads to the reduction of toxic effects.

All of these results shows that Quercetin appears to protect the brain against harmful or toxic effects of Acetamidrid. This weight gain gradually decreases from one week to the next throughout the period of taking Acetamidrid orally. The results clearly showed that Acetamidrid caused a marked decrease in food intake that is the cause of an anorectic effect. These results are consistent with the work of [26,27] who observed a reduction in food consumption in male rats in a sub-chronic accessed.

The results showed an impregnation of Acetamidrid in the brain, so the ability of crossing the blood brain barrier and act on the brain directly. These results justify the action of Acetamidrid on the cerebral antioxidant system in Wistar rats.

Action of Quercetin, of Acetamidrid and combination Quercetin/Acetamidrid on cytosolic parameters of oxidative stress in the brain after 90 days

Oxidative stress parameters (GSH, GPx, GST, CAT and MDA) in the brains of treated rats and control rats after 90 days of treatment are shown in the TABLE 3.

Evaluation of GSH level

GSH is a tripeptide play as the first defense against stress and thus considered as an essential compound that maintain cellular integrity due to its reducing property and its active participation in cellular metabolism [24,28].

Some of the important roles of glutathione are reduction or inactivation of ROS in the formation of glutathione disulfide (GSSG) and the conjugation of reduced glutathione (GSH) for the elimination of xenobiotics [29]. The results of our study are shown in FIG. 5.

The study of oxidative stress parameters in tissues shows a very highly significant decrease of reduced glutathione (GSH) in the brain of the control group compared to the other groups.

TABLE 3. Change in oxidative stress parameters GSH, MDA, GPx, GST and catalase in the brain in control rats and rats treated with the Quercetin, the Acetamidrid and the combination (Q/Ac) after 90 days of treatment.

Variable group				
Parameters	control	Quercetin	Acetamidrid	combination
GSH (nmol/mg proteins)	140.55 ± 1.676	145.56 ± 1.366 ^{*a}	91.37 ± 1.160 ^{****a,b}	132.86 ± 1.58 ^{***a, b****c}
GPx (μmol/mg proteins)	0.243 ± 0.014	0.248 ± 0.017	0.188 ± 0.012 ^{**a***b}	0.229 ± 0.006 ^{*a**b****c}
GST (nmol/min/mg prot)	0.872 ± 0.0038	0.854 ± 0.0016 ^{*a}	0.995 ± 0.0007 ^{****a,b}	0.883 ± 0.0006 ^{*a**b****c}
CAT (nmol/min/mg prot)	17.453 ± 0.130	18.719 ± 0.086 ^{*a}	11.641 ± 0.089 ^{****a,b}	16.893 ± 0.071 ^{**a,b****c}
MDA (nmol/mg prot)	0.181 ± 0.010	0.173 ± 0.019	0.370 ± 0.016 ^{****a,b}	0.205 ± 0.023 ^{*a, b****c}

Results are expressed as mean ± SE (n=6) t-test was used for multiple comparisons. ****P<0.0001, ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05 statistical significant as compared to control.

Furthermore, the GSH level is decreased due to the high level of superoxide and free radicals GSH is converted to GSSG (oxidized glutathione) [15,30]. Treatment with Quercetin has restores significantly the GSH level compared to treated rats this is in accordance with the work of [20,26,27] on different pesticides. The Acetamidrid causes a decrease of GSH in the brain tissue leading to oxidative stress, while Quercetin increases this concentration [8,19]. These results are consistent with the work [2,20,31], they suggest that the reactive metabolites of a xenobiotic cause an increase in the levels of intracellular Ca⁺².

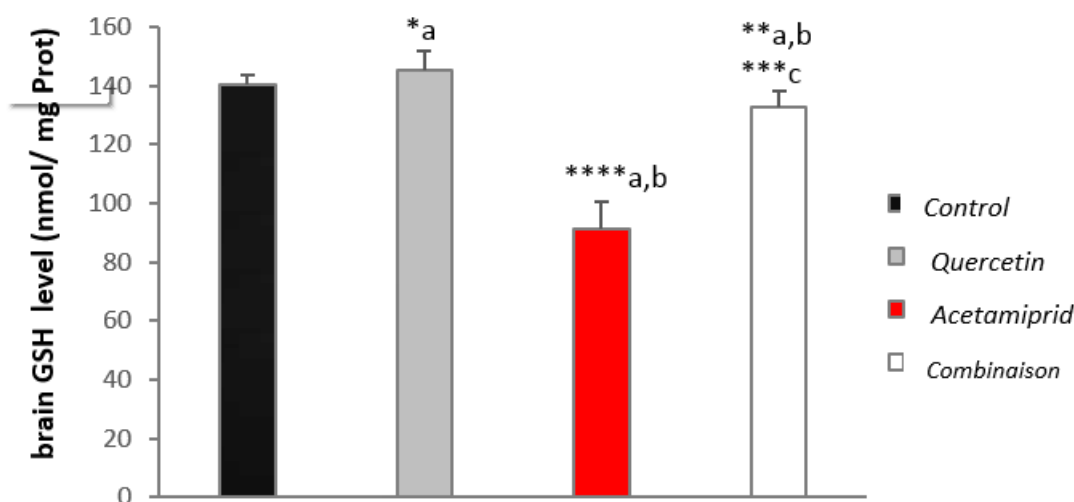


FIG. 5. Change of GSH levels in the brain of control rats and rats treated with Quercetin, the Acetamidrid and combining (Quercetin/Acetamidrid) after 90 days of treatment. Each value is expressed as mean ± standard deviation, we use Student test. Batch compare treated with Quercetin (b) Acetamidrid (c) and the combination (d) compared to control group (a). p<0.05: significant (*), p<0.01: very significant (), p<0.001: highly significant (***), p<0.0001: very highly significant (****), P> 0.05: not significant (ns).**

that is accompanied with a decrease in GSH levels, it is mentioned that the alteration of calcium homeostasis generates mitochondrial oxidative stress which causes the formation of ROS, these last are depleting the cytosolic GSH [32,33]. results of a study on the kidneys treated with diesel, showed a significant increase of GSH, which is induced by the high levels of ROS generated by diesel constituents including PAHs [2,19,34], these results are confirmed the enzyme inhibition power Acetamiprid in the brain at doses of 0.34 mg/kg/d.

According to Kumar et al. found a decrease in glutathione levels in rats treated with B(a)P, which may be due to the extensive use of glutathione by enzymes, and a reduction in the activity of glutathione synthesis enzymes such as the enzyme glucose-6-phosphate, and glutathione peroxidase, and the neutralization of the hydroxyl radicals and singlet oxygen.

Although mitochondria produces continuous ROS during oxidative phosphorylation, leaking from superoxide in the electron transport chain is scanned by mitochondrial and cytoplasmic superoxide dismutase (SOD) and peroxidases GSH by reducing the rate of GSH [3,26,27]. The smoked cigarette continent many electrophiles and ROS also depletes GSH levels in the alveolar epithelial cytosolic cells *in vitro* and *in vivo* in the lung [24].

Evaluation of the enzymatic activity of GPx

The antioxidant enzymes are considered the first bodyline defense against free radicals, where they prevent the oxidation of biological macromolecules [16].

According to the TABLE 3 and FIG. 6 the treatment of rats by Acetamiprid caused a highly significant ($P>0.001$) decrease of the enzymatic activity of glutathione peroxidase (GPx) activity in the brain compared to controls. However, there has been a highly significant increase of glutathione peroxidase (GPx) in rats treated with the combination compared to the treated with Acetamiprid [30,35].

GPx is an antioxidant key enzyme which regulates the level of ROS (GPx is capable of not only reducing the hydrogen peroxide in water, but also the oxidation of unsaturated fatty acids hydroperoxides) and thus protects the cells against damage generated by the toxic dose of Acetamiprid. Moreover, according to our results there is a decrease in brain GPx activity in rats treated with Acetamiprid. This decrease is mainly due to an overproduction of hydrogen peroxide and depletion of Quercetin and GSH in detoxification of Acetamiprid [27]. Resulting in a decrease of GPx activity [1].

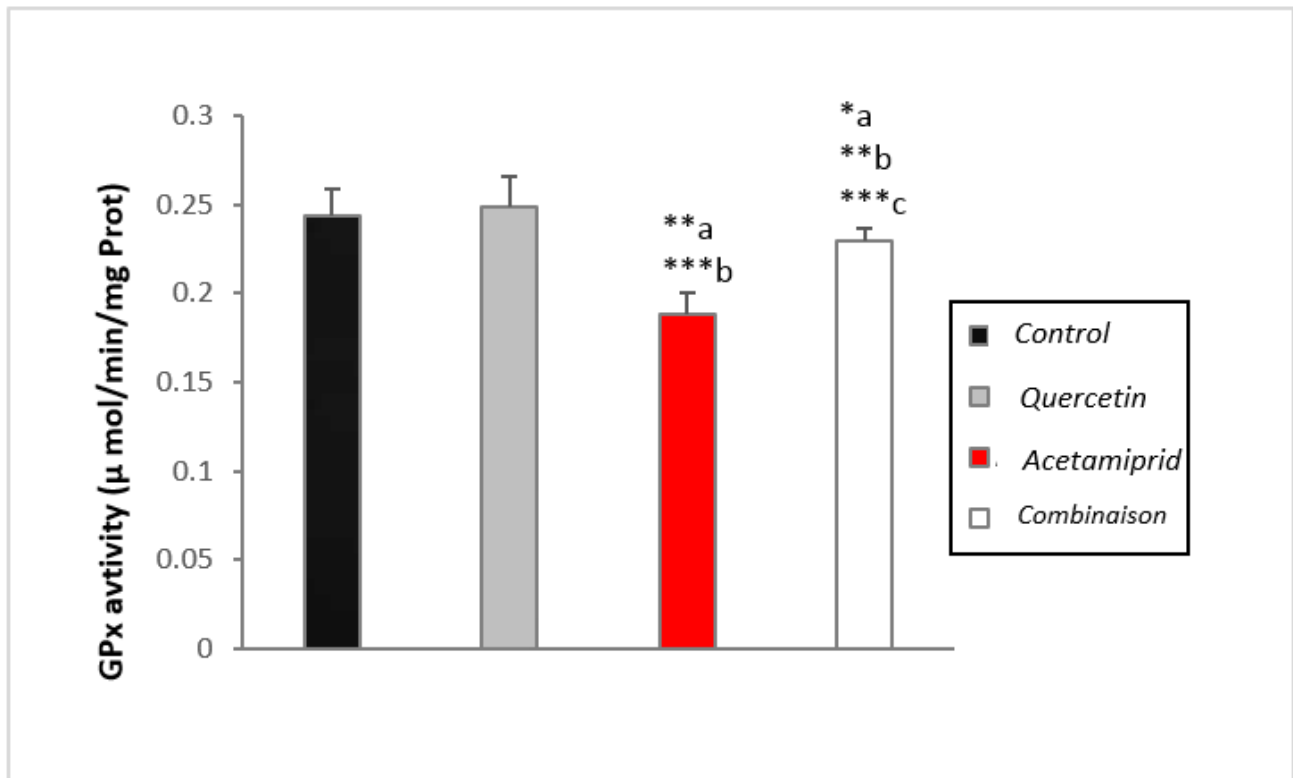


FIG. 6. cytosolic GPx activity in the brain of control rats and rats treated with Quercetin, the Acetamiprid and combination (Quercetin/Acetamiprid) after 90 days of treatment. Each value is expressed as mean \pm standard deviation, we use Student test. Batch Compare treated with Quercetin (b) Acetamiprid (c) and the combination (d) compared to control group (a). $p < 0.05$: significant (*), $p < 0.01$: very significant (**), $p < 0.001$: highly significant (***), $P > 0.05$: not significant (ns).

Evaluation of the enzymatic activity of GST

The GST are essentially cytosolic family of multifunctional enzymes, involved in various operations of transport and intracellular biosynthesis [24,30,35]. However, the most studied function of GST as regards the prevention of environmental xenobiotic, their dwelling activity of catalyzing conjugation reactions between a peptide, GSH and reactive molecules containing electrophilic sites capable of reacting dangerously with macromolecules such as nucleic acids. Catalyzing the conjugation of glutathione with certain substrates represents a step in the formation of compounds that are less toxic and more water soluble than the starting molecules which promotes their elimination from the body [24,29,36]. GST is also involved in the reduction of ROS damages in different cells.

Our study allowed us to measure the activity of this enzyme in the brain cells after a stress-induced by Acetamiprid. FIG. 7 showed the variation of the enzymatic activity of cytosolic GST following an Acetamiprid administration.

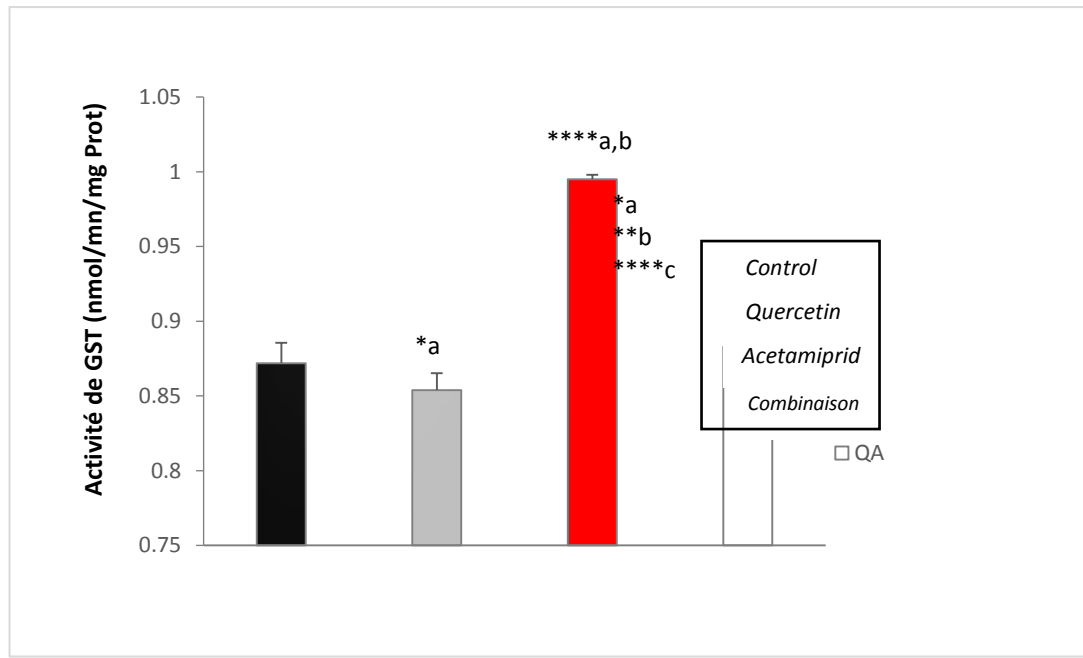


FIG. 7. Change of the GST activity in the brain of control rats and rats treated with Quercetin, the Acetamidrid and combination (Quercetin/Acetamidrid) after 90 days of treatment. Each value is expressed as mean ± standard deviation, we use Student test. Batch Compare treated with Quercetin (b) Acetamidrid (c) and the combination (d) compared to control group (a). p<0.05: significant (*), p<0.01: very significant (), p<0.001: highly significant (***), p<0.0001: very highly significant (****), P>0.05: not significant (ns).**

A very highly significant ($p < 0.000$) of enzyme activity was observed in the group treated by Acetamidrid to (3.14 mg/kg/day).

The results of our study are consistent with previous studies that have shown that exposure to family of xenobiotics can induce GST activity [20,27]. The combination of their reactive metabolites with GSH in the GST may inactivate the compound and prevent the formation of adducts with DNA and mutagenicity. Therefore, the increase in the expression of GST is generally observed when the cells are under stress [30].

Evaluation of the enzymatic activity of catalase

The activity of catalase is specifically subservient to the conversion of the hydrogen peroxide into oxygen and water [37]. It is mainly located in the peroxisome. It thus prevents oxidative damages within the peroxisome, and prevents its propagation in the rest of the cell [18].

In this study, we intend to assess the opposite effect of Quercetin on the toxicity of Acetamidrid on enzymatic activity of catalase.

FIG. 8 shows the variation of the enzymatic activity of cytosolic catalase between the control group, and other groups.

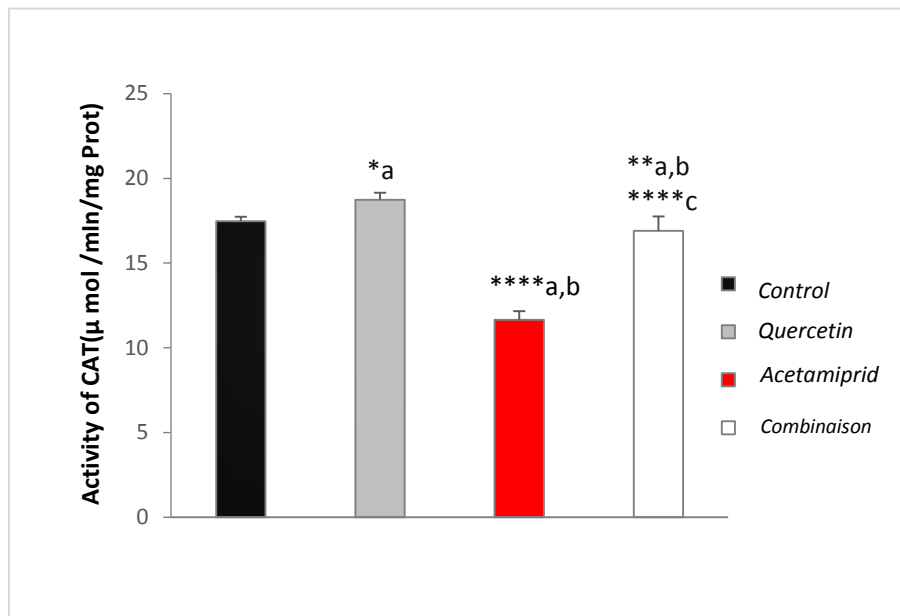


FIG. 8. Change of cytosolic catalase activity in the brain of control rats and rats treated with Quercetin, the Acetamiprid and combination (Quercetin/Acetamiprid) after 90 days of treatment. Each value is expressed as mean \pm standard deviation, we use Student test. Batch compare treated with Quercetin (b) Acetamiprid (c) and the combination (d) compared to control group (a). $p < 0.05$: significant (*), $p < 0.01$: very significant (**), $p < 0.001$: highly significant (***), $p < 0.0001$: very highly significant (****), $P > 0.05$: not significant (ns).

The results of this study showed a very highly significant decrease in cytosolic catalase of the brain in rats treated with Acetamiprid. This result suggests that Acetamiprid indirectly induces an increase in H_2O_2 , so it is a case of causing oxidative stress. However, treatment with the (pesticide/Quercetin) presented an improvement on treatment with the pesticide only by the radical OH° is a possible candidate. Indeed, the decrease in CAT and GPx activity causes an increase in H_2O_2 that can produce OH° radical [38,39]. This is explained by a depletion of this enzyme following repeated exposure of Acetamiprid which generates of ROS during its metabolism including derivatives Quinones, an increase of SOD, a parameter that is not considered here, leads to an increase of H_2O_2 production, it also causes reduction of catalase [9,37]. These results disagree with several authors have tested the effect of some types of pesticides leading to the increase in catalase activity in animals, because of the existence of these pesticides in the body and subsequently boosting antioxidant defense [26,27,32].

All of these results showed that the dose of (10 mg/Kg/day) of Quercetin seems to protect the brain by increasing the antioxidants enzymatic activities in this experiment.

Evaluation of MDA levels

Because of the difficulty of measuring free radicals (reactive intense, extremely short half-life, low concentration); indirect markers are determined [23]. thiobarbituric acid is a powerful alkylating agent capable of reacting with biological macromolecules [40]. MDA levels is proportional to the extent of lipid peroxidation [41], it is considered as one of the fundamental mechanisms of cell damage caused by free radicals. Indeed, the lipid peroxidation resulting in the denaturation of polyunsaturated fatty acids component membranes. Thus, when a stress caused by the introduction of a contaminant such

as pesticides, when the antioxidant systems become ineffective, cell damage can be estimated by the MDA levels. Therefore, it is a good biomarker for the measurement of oxidative stress.

During our work, we recorded a very highly significant increase in MDA levels in the brain of treated rats compared with controls FIG. 9. This result is consistent with other studies [20,23,27,28,32,36].

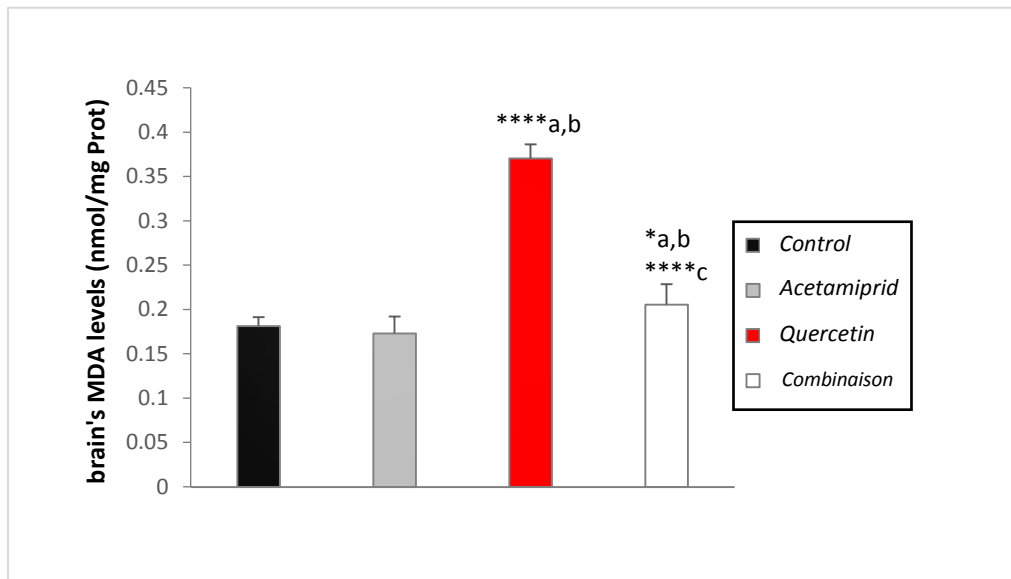


FIG. 9. Change of cytosolic MDA levels in the brain of control rats and rats treated with Quercetin, the Acetamidrid and combination (Quercetin/Acetamidrid) after 90 days of treatment. Each value is expressed as mean \pm standard deviation, we use Student test. Batch Compare treated with Quercetin (b) Acetamidrid (c) and the combination (d) compared to control group (a). $p < 0.05$: significant (*), $p < 0.01$: very significant (), $p < 0.001$: highly significant (***), $p < 0.0001$: very highly significant (****), $P > 0.05$: not significant (ns).**

An increase in lipid peroxides indicate serious damage to the cell membrane, inhibition of several enzymes, cell function and cell death [1,41-43].

In the end after Quercetin feeding at a dose of 10 mg/kg/day in rats treated with Acetamidrid for a period of 90 days, a recovery state on the different stress parameters was observed, knowing that Quercetin is one of several active herbal extract play an important role in the prevention of various diseases related to oxidative stress [11,43] and regulates the activity of a variety of enzymes and cellular receptors, the work of [9,38] showed that the quercetin extract induced changes on the composition of lipids of cells, antioxidant status and enzymes attached to the membrane, which is a direct or indirect consequence of oxidative stress.

Conclusion

The study clearly demonstrated the subchronic exposure to Acetamidrid used in this study was able to induce neurotoxicity by abnormalities and a state of oxidative stress in total brain areas in adult male rats. Furthermore, the feeding of Quercetin to treated rats showed improvements affected all parameters.

Acknowledgement

Many thanks and acknowledgement are sent to Professor Said Fekra rector of Tebessa university for his help and facilities to work in the laboratories, also to all toxicology laboratory members of Tebessa university.

REFERENCES

1. Rouabhi R. Fungicides. Carisse O, editor. In Tech, Publishing. 15, ISBN: 978-953-307-266-1, 2010.
2. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione-S-transferase the first step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 1974;36(249):71309.
3. Calderón-Segura ME. Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects in human peripheral blood lymphocytes exposed in vitro to neonicotinoid insecticides news. *J Toxicol.* 2012;14:17.
4. Adams J, Vorhees CV, Middaugh LD. Developmental neurotoxicity of anticonvulsants: human and animal evidence on phenytoin. *Neurotoxicol Teratol.* 1990;1(12):203-14.
5. Scientific Opinion on the developmental neurotoxicity potential of acetamiprid and imidacloprid. *EFSA J.* 2013;11(12):3471.
6. Ghersi-Egea JF, Livertoux MH, Minn A, et al. Enzyme mediated superoxide radical formation initiated by exogenous molecules in rat brain preparations. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1991;32(110):107-17.
7. Joint FAO/WHO meeting on pesticide residues. Acceptable daily intakes, short-term and long-term dietary intakes, FAO/WHO, 2015;39:09-33.
8. Gregory S, Kelly ND. Quercetin. *Alt Med Rev.* 2011;16(2):172-94.
9. John C, Quindry, MCAulty RS, et al. Oral quercetin supplementation and blood oxidative capacity in response to ultramarathon competition. *Int J Sport Nutr Exer Met.* 2008;38(18):601-16.
10. Junko KK, Yukari K, Yoichiro K, et al. Nicotine-like effects of the neonicotinoid insecticides acetamiprid and imidacloprid on cerebellar neurons from neonatal rats. *PLoS ONE.* 2012;7(2):e32432.
11. Nakamura Y, Ishimitsu S, Tonogai Y. Effects of quercetin and rutin on serum and hepatic lipid concentrations, fecal steroid excretion and serum antioxidant properties. *J Health Sci.* 2000;46(4):229-40.
12. Dubois M, Gilles K, Hamiltona JK, et al. Colorimetric method for determination of sugars. *Nature.* 1956;168(4265):167.
13. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann Biochem.* 1976;11(72):248-54.
14. Kaplan A. Lipids. *Clin Chem.* 1984;41:918-9.
15. Weckbercker G, Cory JG. Ribonucleotide reductase activity and growth of Glutathione-depended mouse Leukemia L1210 cells in vitro. *Can Letter.* 1988;40(3):257-64.
16. Flohe, Gunzler. Analysis of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1984;29(105):114-121.
17. Aebi. Catalase. *Methods in enzymology.* Academic press, Orlando, 1984;3(105):121-6.
18. Fleming L, Mann JB, Bean J, et al. Parkinson's disease and brain levels of organochlorinepesticides. *Ann Neurol.* 1999;4(36):100-3.
19. Buening MK, Chang RL, Huang MT, et al. Activation and inhibition of benzo(a)pyrene and aflatoxin B1 metabolism in human liver microsomes by naturally occurring flavonoids. *Cancer Res.* 1981;13:67-72.

20. Chen X, Ahn DU. Antioxidant activities of six natural phenolics against lipid oxidation induced by Fe²⁺ or ultraviolet light. *JAOCS*. 1998;75(12):1717-21.
21. Nehlig A. Cerebral energy metabolism, glucose transport and blood flow: changes with maturation and adaptation to hypoglycaemia. *Diabetes Met*. 1997;44(23):18-29.
22. Pellerin L. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia*. 2007;46(55):1251-62.
23. Adegbesan B, Adenuga G. Effect of lead exposure on liver lipid peroxidative and antioxidant defense systems of protein-undernourished rats. *Biol Trace Elem Res*. 2007;2(116):219-25.
24. Sauer E. Liver delta-aminolevulinate dehydratase activity is inhibited by neonicotinoids and restored by antioxidants agents. *Int J Environ Res Public Health*. 2014;11(11):11676-90.
25. Pomierny CL. Oxidative stress biomarkers in some rat brain structures and peripheral organs underwent cocaine. *Neurotox Res*. 2013;23:92-102.
26. Benzidane C. Effets toxiques des pesticides, these magister. *Univ sétif*. 2012;8:73.
27. Bourbia S. Evaluation of toxicity of pesticide mixtures on soil contamination bioindicator *Helix aspersa*, These PhD. Annaba University. 2013;10:177.
28. Deneke SM, Fonburg BL. Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol*. 1988;257: L16373.
29. Di-Monte DA, Lavasani M. Environmental factors in Parkinson's disease. *Neurotoxicology*. 2002;23:487-502.
30. Di-Monte DA, Chan P, Sandy MS. Glutathione in Parkinson's disease: A link between oxidative stress and mitochondrial damage. *Ann Neurol*. 1992;22(S1):S111-5.
31. Chen M1, Tao L, McLean J, et al. Quantitative analysis of neonicotinoid insecticide residues in foods: implication for dietary exposures. *J Agric Food Chem*. 2014;2:62(26):6082-90.
32. Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. *Neuroscience: Exploring the Brain*. 4th ed. New York; 2016;7(612.8-dc23):1019.
33. Gibbons D, Morrissey C, Mineau P. Examination of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate fauna. *About Sci Pollut Res*. Springer. 2014;33.
34. Icenogle LM. Behavioral alterations in adolescent and adult rats caused by a brief subtoxic exposure to chlorpyrifos during neurulation. *Neurotoxicol Teratol*. 2004;26:95-101.
35. Bidlack WR. Interrelationships of food nutrition and health: the National Association of State Universities and Land Grant Colleges White Paper. *J Am Coll Nutr*. 1996;15:422-33.
36. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, et al. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med*. 1992;13:341-90.
37. Federico A, Cardaioli E, da Pozzo Mitochondria P. oxidative stress and neurodegeneration. *Neurol Sci*. 2012;322:254-62.
38. Cory-Slechta DA, Thiruchelvam M, Richfield EK, et al. Developmental pesticide exposures and the Parkinson's disease phenotype. *Birth Defects Res Clin Mol Teratol*. 2005;73:136-9.
39. Banerjee BD, Seth V, Ahmed RS. Pesticide-induced oxidative stress: perspectives and trends. *Rev Environ Health*. 2001;16:1-40.
40. Bashkatova V, Alam M, Vanin A, et al. Chronic administration of rotenone increases levels of nitric oxide and lipid peroxidation products in rat brain. *Exp Neurol*. 2004;186:235-241.

41. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1984;105:302-10.
42. Rouabhi R, Djebbar H, Djebbar MR. Toxic effects of combined molecule from novaluron and diflubenzuron on paramecium. *Am-Euras J Toxicol Sci.* 2009;1(1):74-80.
43. Rouabhi R, Djebbar-Berrebah H, Djebbar MR. Impact of flufenoxuron, an IGR pesticide on *Gallus domesticus* embryonic development in ovo. *J Cell Anim Biol.* 2008;2(3):87-91.

Article 3: Deltamethrin induced Neurodegeneration and Behavioral Effect by Dysfunction Cytosolic Antioxidant System in Rats Brain

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/311847391>

Deltamethrin induced Neurodegeneration and Behavioral Effect by Dysfunction Cytosolic Antioxidant System in...

Article · December 2016

CITATION

1

READS

52

3 authors:



Gasmi Salim

Université de Tébessa

17 PUBLICATIONS 5 CITATIONS

SEE PROFILE



Rachid Rouabhi

Université de Tébessa

107 PUBLICATIONS 142 CITATIONS

SEE PROFILE



Mohammed KEBIECHE

University of Jijel

34 PUBLICATIONS 96 CITATIONS

SEE PROFILE

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



The impact of persistent organic chemicals (POPs) on human health and animals” [View project](#)



Oxidative Stress & Environmental Pollution [View project](#)

Deltamethrin induced Neurodegeneration and Behavioral Effect by Dysfunction Cytosolic Antioxidant System in Rats Brain

Gasmi Salim^{1*}, Rouabhi Rachid¹ and Kebieche Mohamed²

¹Laboratory of Toxicology, Applied Biology Department, University of Tébessa. Tébessa, 12002. Algeria.

²Biology Department, University of Jijel. Jijel. 18000. Algeria.
*s.gasmi@univ-tebessa.dz

Received 10 November 2016; accepted 10 December 2016
Available online 20 December 2016

Abstract

Deltamethrin (DM) is one of the most widely used pyrethroids. This study investigates toxic effects of repeated oral administration of dose of DM (0.32 mg/kg) during 90 days. Eleven male *Wistar* rats were divided into two different groups (control and treatment group). Behavioral, cytological, biochemical and histological effects of DM were evaluated. According to the results, the behavioral constituents were affected, a significant increase in the arrival time [$+12.66 \pm 0.42$] in the Labyrinth at the DM-group was noticed (A significant decrease in the memorization, and locomotive in rats treated with higher doses of DM. However, a significant increase in Anxiety at the same group). Furthermore, DM induced brain toxicity measured by the increased enzymatic activities of GST [$+110.86 \pm 10.1$] and SOD [$+121.29 \pm 14.86$]. In addition, exposure to DM resulted in a significant decrease in the levels of GSH [32.70 ± 4.27] and the enzymatic activities of CAT [-6.73 ± 1.1] and GPx [-41.29 ± 4.41], with concomitant increase in MDA [$+174.8 \pm 19.5$] in rat brain. In addition, the histological study clearly confirm cerebral necrosis in the total brain, which may be due to the loss of cerebral membrane architecture and brain cells damage, caused by the DM. These findings highlight the chronic neurotoxicity of DM.

Keywords: Deltamethrin. Pyrethroids. Behavioral. Brain. Neurotoxicity. Rats.

1. Introduction

Pesticides are one of the most common pollutant groups in the world, and they have a major drawback such as toxicity. The continuous use of pesticide imposes hazardous effect on the physiological function of various body systems. Thus, long-term exposure can be harmful to human life and can disturb the functioning of different organs in the body (Hamadache et al., 2016; Chakroun et al., 2016). Pyrethroids are presently the most widely used class of pesticides, being used in agriculture, forest, textile industry and public health programs worldwide. The basic pyrethroid structure was

modified to increase its insecticidal potency and photostability but this also resulted in changes in pyrethroid activity in non-target species (Syed et al., 2016). Human exposure to multiple pyrethroid insecticides may occur because of their broad use on crops and for residential pest control. To address the potential health risk from co-exposure to pyrethroids, it is important to understand their disposition and toxicity in target organs such as the brain, when administered as a pesticide (Hughes, 2016). The use of pyrethroids has increased dramatically over the past decade and will likely increase further as they are replacing other pesticides that are considered to have higher mammalian

toxicity (Dayal et al., 2001). Pyrethroid insecticides are synthetic analogs of the natural pyrethrins. Pyrethrins are components of extracts from the flowers of *Chrysanthemum* spp. Pyrethroids are more stable in light and air than natural pyrethrins. Today, they are one of the most widely used domestic and agricultural pesticides (Rodríguez et al., 2016). The neurotoxic effects of pyrethroids are primarily mediated through their interaction with the voltage-sensitive channels in neurons, leading to depolarization and hyperexcitation of the nervous system. The cholinergic system is another potential target for the action of pyrethroids (Harrill et al., 2008; Syed et al., 2016). However, the effect of pyrethroids on neurotransmitter release may be dual stimulatory or inhibitory or both (Rodríguez et al., 2016). According to the clinical symptoms in animals receiving acute toxic doses, the pyrethroids form two groups. Type I pyrethroids cause hyper-excitation, ataxia, tremors and paralysis. Type II pyrethroids, such as Deltamethrin, have an α -cyano-group insecticide substituent, and caused hypersensitivity and salivation. Although voltage-gated calcium channels and interaction with the GABA receptor-ionophore (Mani et al., 2014; Rodríguez et al., 2016). In rodents, it is known that early exposure to pyrethroids can lead to permanent changes in cholinergic and behavioral variables. Several epidemiologic al studies have identified pesticide exposure as a significant risk factor for neurodegenerative diseases. The increasing use of pyrethroid insecticides both in agriculture and in the residential setting and their diverse toxicological endpoints require regulatory assessment reviews to safeguard public health (Rodríguez et al., 2016). Chronic exposure leads to behavioral and molecular alterations leads to neurodegenerative disorders, developmental deficits, birth defects, and learning disabilities.

Deltamethrin (DM) has been accepted to be 10,000 times less toxic to man than to insects. While toxicity of DM in adult animals has been studied using biochemical and electrophysiological tools, reports on its developmental neurotoxicity are rather scanty (Patro et al., 1997).

2. Material and methods

2.1. Chemical product

Deltamethrin (C₂₂H₁₉Br₂NO₃, CAS:52918-63-5) commercial formulation Decis, Deltamethrin 97.3% EC (denotes 97.3% of technical grade deltamethrin [W/W] in emulsifiable concentrate)

2.2. Animals

Adult male Wistar rats aged of 04 months weighing around 120±5g were procured from API (Algeria Pasteur institute). Animals were divided into two groups of six animals each, one control group, and one DLM-treated group. They were acclimatized a week before the onset of experiment and were maintained under controlled conditions of temperature 24±2°C and humidity (50 %) with a 12-h light/dark cycle under standard hygienic conditions. Rats were housed in an air-cooled vivarium. Animals had a free access to pellet diet procured from Bejaia Industries, Chandigarh and tap water. Animals were maintained during the experimental period in accordance with the guidelines for animal care of the Faculty of applied biology (laboratory of toxicology) of Tébessa University, Algeria.

2.3. Experimental design

Deltamethrin (purity >97%), dissolved in corn oil was administered orally for the group one, at doses of 0.32 mg/kg body weight (1/40 of LD 50) (Harrill et al., 2008; Galal et al., 2014) in one group of rats daily for a period of 90 days. The second group was administered mineral water similarly and it served as control. After the experimental period (30 days of adaptation and 90 days of DM-gavage), the animals were fasted overnight, anaesthetized and sacrificed by cervical decapitation. The brain tissue was excised immediately and a portion of the tissue was homogenized in 0.1M Tris buffer, pH 7.4 was used for determination of GSH and MDA level, GPx, GST, SOD and CAT activity (conserved in -80°C).

2.3.1. Behavioral studies

The study conducted at the end of treatment on the treated and control rats, and focused on assessing the neurotoxicity of Deltamethrin on memorization, learning, locomotors activity, anxiety states and resignation by Classical labyrinth test; To elucidate if the memory behavior of the stressed animal, we proceeded to

the realization of an anxiety experimentation (classic maze test). This test in a square shaped enclosure (120x120x35 cm) has a plurality of identical size roads (25x35 cm) of variable length according to the crossing, also comprises a start zone and another happens, located on table raised to 50 cm from the ground. Healthy behavior will result in a shorter time in the route between the two points of departure-Arrive, This suggests that the exploration behavior will result in a greater time spent in the roads centers, which will be considered aversive or anxiety for the animal; while the escape behavior will be observed when the animal will spend more time in the starting point or corners that are associated with a refuge. Measuring the time spent in the different parts of the device. Thus, the test principle is based on an animal exploring the corners or only place is described as "anxious". The test time is 20 minutes between each test we clean the board with 10% ethanol (Jaako et al., 2005).

2.3.2. Cytological and Biochemical studies

- SOD, CAT, GST and GPx activity in brain

Activity of antioxidant enzymes GST, CAT and GPx in brain was assessed according to (Habig et al., 1974; Aebi et al., 1984; Flohe., 1984) respectively, Protein estimation Protein content was measured following the method of (Bradford et al., 1976) using bovine serum albumin as a reference standard, The enzymatic activity of SOD (IU/ml) was assessed by the method of (Beauchamp., 1971).

- GSH and MDA level in brain

GSH concentration was measured in brain tissue was measured following the method of (Weckbercker et al., 1988). Measure the absorbance at 412 nm. The MDA in brain homogenate was measured by method of (Warso et al., 1983) to produce a red colored complex with a peak absorbance at 530 nm.

2.3.3. Histological studies

The technique used that comprises the following steps: fixing the brain in formalin, then implementation of these tissue samples in special cassettes facing walls to allow the passage of liquids. Progressive dehydration and samples in increasing concentration of ethanol baths (70 %, 95% and 100%). Inclusion and achievement of blocks, parts are then immersed

in baths of liquid paraffin. The tissues are maintained and soaked in paraffin, then come the stage of coating, which is to include a cloth soaked in paraffin block that, solidifying, will allow its cut. The realization of thin sections of a few microns is possible through Microtomes. These sections are photographed using a camera (Epson scanner BX305F) (Jang et al., 2010).

2.3.4. Data and statistical test

The experiments data were analyzed using statistical software MINITAB (MINITAB 17.0 for windows 10 Ins. USA), and all statistical comparisons were made by means of t-test and values of $P < 0.05$ were considered significant, [$P > 0.05$: the difference is not significant ns; $0.05 > p > 0.01$: the difference is significant (*), $0.05 > p > 0.001$: the difference was highly significant (**), $p < 0.001$: the difference was very highly significant (***)]. Results are expressed as means \pm SEM, and to better visualize the results the selected graph is the histogram using the office Excel 2013.

3. Results

3.1. Study of antioxidant Enzymatic and non-enzymatic parameters

The results of this study on changes in tissue of brains of Wistar rats are shown in Table 01 and Figures 01.

Table 01: Change in cervical antioxidant parameters (GSH. GPx. MDA. GST. SOD and CAT) in control rats and treated after 03 months of treatment.

	Groups	
	Control	Deltamethrin
GSH	135.55 \pm 07.78	102.85 \pm 12.05
nmol/mg	24 %	**
GPx	243.97 \pm 13.45	202.68 \pm 17.87
nmol/min/mg	16 %	**
MDA	179.46 \pm 13.17	354.26 \pm 32.68
nmol/mg	97 %	***
GST	872.00 \pm 03.51	982.86 \pm 13.61
Pmol/min/mg	12 %	***
SOD	134.61 \pm 29.17	255.90 \pm 44.04
U/mg	90 %	**
CAT	17.360 \pm 00.98	10.620 \pm 02.090
μ mol/min/mg	38%	***

Each value is expressed as mean \pm standard deviation, we use Student test. Batch Compare treated with Deltamethrin to control group. ($p \leq 0.01$): highly significant (**), ($p \leq 0.001$): very highly significant (***), $P > 0.05$: not significant (ns).

The results obtained show a highly significant ($p \leq 0.01$) decrease of cerebral GSH levels and GPx activity in the group treated with DM compared to control (**fig. 01**). Moreover, a very highly significant ($p \leq 0.0001$) decrease of cerebral CAT activity observed in the group treated with DM compared to control.

In addition, Exposure to DM at 0.32 mg/kg body weight very highly significantly raising the activity of SOD and GST ($p \leq 0.001$) in the brain cells by 90 & 12 % of the controls successively. MDA level was found to be decreased by the test compound in all the brain in the DM-group compared to control rats (**fig. 01**).

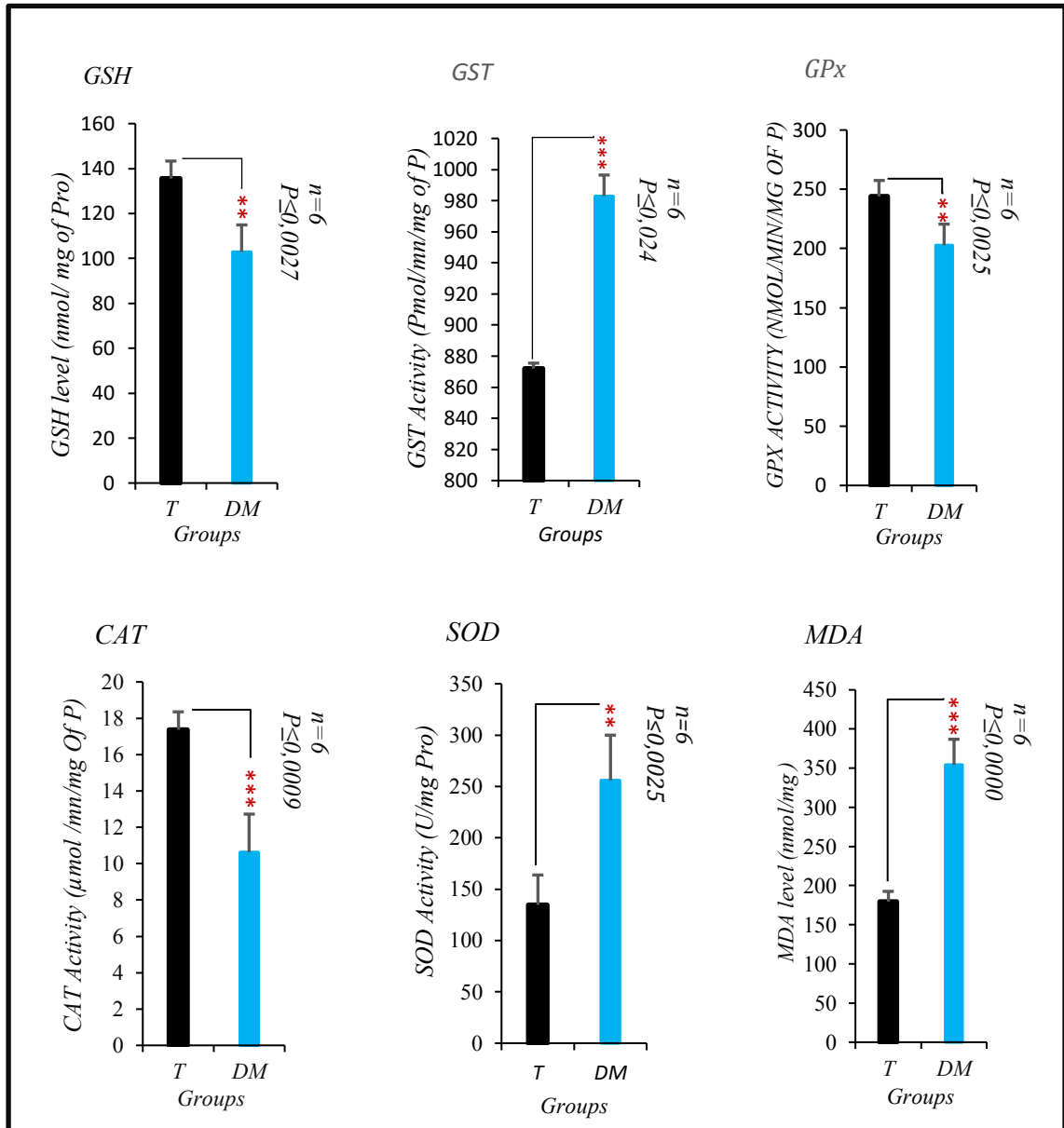


Figure 01: Effect on antioxidants parameters (GSH. GST. GPx. SOD. CAT and MDA) of rats following exposure to Deltamethrin (0.32 mg/kg body weight/day) for 90 days. T: Control group, DM: rats treated by Deltamethrin. Each value is expressed as mean \pm SEM of 6 rats in each group, we use Student test. Batch Compare treated with DM to control group. ($p \leq 0.01$): highly significant (**), ($p \leq 0.0001$): very highly significant (***), $P > 0.05$: not significant (ns).

3.2. Behavioral study

The variation in arrival time at the point of exit in labyrinth and the control rats treated after 90 days of treatment by DM a dose of 0.32 mg/kg/day are shown in the Table 02.

Table 02: Change in arrivals times in control rats and treated after 03 months of treatment by DM.

	Groups	
	Control	Deltamethrin
Arrival Time (m)	3.33±2.05	16±1.63 ***

Each value is expressed as mean ± SEM of 6 rats in each group, we use Student test. Batch Compare treated with Deltamethrin to control group. Very highly significant (***), P> 0.05: not significant (ns).

The administration of the DM 90 days in rats induces an increase very highly significant (P≤0.001) time of coming of the in long (4 times) maze compared to control rats Figure 02.

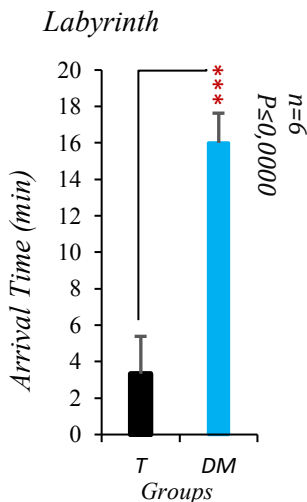


Figure 02: Change Classic labyrinth test data in the control group and the treated groups. **T:** Control group, **DM:** rats treated by Deltamethrin. Each value is expressed as mean ± SEM of 6 rats in each group, we use Student test. Batch Compare treated with Deltamethrin to control group. Very highly significant (***), P> 0.05: not significant (ns).

3.3. Histological study

The histology of the brain of a rat from the control shows normal and clearly visible brain regions Figure 03.

As for the batch of rats contaminated by the DM

there is a severe alteration of the architecture of the brain with areas dilated in some regions of the brain, irregular size and several black spots Figure 03.

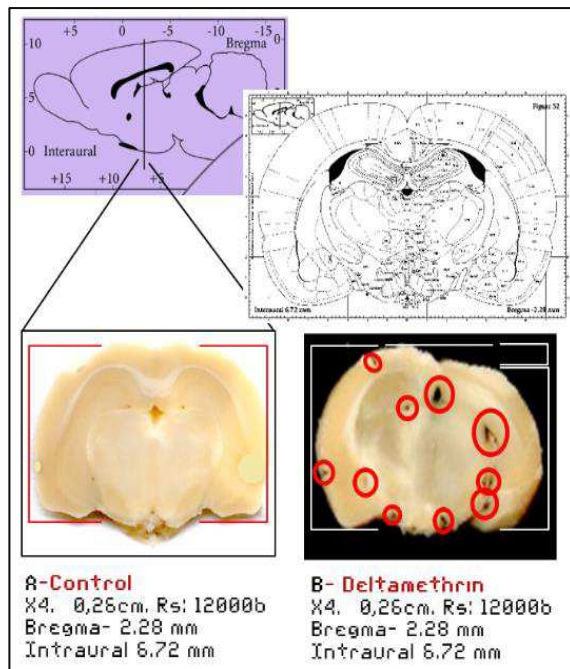


Figure 03: Histological sections of the control rats brains and treated with the Deltamethrin

○ : Necrosis

4. Discussion

Pesticides, widely used by farmers around the world. They have been detected in water, foods, plants and etc. Even in very low concentrations, they interfere with the basal metabolism (Fleming et al., 1999). Exposure to the pyrethroids can induce oxidative stress by increased production of free radicals that accumulate in the cell, by alteration of antioxidant defence mechanisms; including detoxification and enzymes scan, or by peroxidation increase lipid interaction between the ROS and jorex or cell membranes (Amamra., 2015; AbdelDaim et al., 2015) Generally, the ROS may cause reversible or irreversible changes on sensitive enzymes and proteins. Various research reported that oxidative stress is the major responsible for toxicity of pesticides (Amamra., 2015). The GSH, a tripeptide antioxidant, represents 90% of the non-protein thiols intracellular and neutralizes the cellular H2O2, O2*, and lipid hydroperoxides by its functional group - SH (Franco et al., 2009). The cell has to

its protection to the bearer GSH to a thiol function which is an antioxidant system of the first defense by binding through its SH function to the toxic metabolites (Aydin, 2011). He plays its antioxidant role also in synergy with the antioxidant enzymes Glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, catalase and the superoxide dismutase (Chandra et al., 2013; Yousef et al., 2001). Indeed, the reduction in GSH content in brain cells of rats in the presence of DM could be explained by the GSH use for the conjugation of GSH participation as an antioxidant by neutralizing free radicals. also, another explanation is that this depletion is due to an increase of degeneration of GSH during oxidative stress caused by DM. These results were correlated with reports previous to (Rouabhi et al., 2015; Henine et al., 2016), who suggested that the metabolism of the pyrethroids can generate of ROS, which in turn could lead to an increased lipid peroxidation. There is a decrease in GSH rate linked to an increase in MDA, because the increase in lipid peroxidation is a consequence of the depletion of the reserves in GSH (Gadoth et al., 2011). The reduction in the level of GSH increases the toxic effect, because GSH plays an important role in the detoxification of Xenobiotics as a cofacteur for the family of the GST and an antioxidant important for the elimination of the ERO (Yuan et al., 2016).

The MDA (as final product of LPO) levels were measured to indicate the generation of the ROS and damage induced by tissue LPO in the toxicity of pesticides (Dinu et al., 2010). In this study, exposure of rats to the DM caused a significant increase of lipid peroxidation, indicated by the significant increase of the MDA in brain, prove that the DM has enabled the formation of free radicals in brain tissue.

Organic peroxides are one of several types of ROS. They can be detoxified by the activity of the GST. The GST is a family of enzymes in the phase II biotransformation which detoxify Xenobiotics through substrates of conjugation with the GSH to produce less toxic soluble compounds (Mnif et al., 2011). The increase of GST activity observed in this study might further contribute to the massive production of ROS and increased lipid peroxidation (MDA) this result is the opposite of a few studies (Ahmad et al., 2013; Atif et al., 2005).

The administration of DM to dose of 0.32 mg / kg of body weight orally, 90 days in male wistar rats caused a disturbance at the level of oxidative stress parameters. The analysis of our results shows a highly significant increase in the activity of SOD in the treated rats. showed an increase in SOD activity after poisoning by DM. SOD, the GPx and CAT are enzymes that control cellular levels of ROS (Yousef et al., 2001). They are acting together to convert O_2^* , NO° , HO° and H_2O_2 into H_2O and O_2 , which leads to the reduction of free radicals in the cell content (Galal et al., 2013). Specifically, the SOD catalyzes the dismutation of the radical anion superoxide O_2^* reaction to form less reactive molecular oxygen, and CAT converts H_2O_2 into H_2O and O_2 to prevent oxidative stress and to maintain the homeostasis of the cell (Abdul et al., 2013; Kumar et al., 2015). Indeed, the decline of CAT and GPx activities in brain cells of rats treated by the DM could be explained by the massive rate of free radicals and the case of saturation in side and inhibition related with degradation by another side, these results confirmed by recent works (Rouabhi et al., 2015; Henine et al., 2016; Rehman 2006; Gadoth et al., 2011).

Reactive species of oxygen (ROS) and the resulting oxidative stress are responsible for severe disruption cell targeting particularly macromolecules such as DNA, proteins, (Xudong, 2016; AbdelDaim et al., 2016) and that can lead to cell death by apoptosis or necrosis (Dubey et al., 2013; Chargui et al., 2012).

Observation of histological cuts of total brain at the groups treated by DM dose of 0.32 mg/kg/day, shows a structural alteration of brain which is marked by the presence of black spots they are dilated areas and degraded in many areas compared to control rats (Ming-Yuan et al., 2015). Also, we mark a morphological change in the size of brain regions comparing to the witness lot. These changes are the result of necrosis, inflammation or a massive cell apoptosis (Yuan et al., 2016) in the brain caused by ROS after a contamination by the DM. These results confirmed the oxidative stress tests.

In our study, treatment of male Wistar rats by the DM decreased very highly significantly the memorization, and locomotive (Redei et al., 2001). However, a significant increase in Anxiety at the same rats. This effect may be due to alteration in

the cytokine profile induced by DM (Belzing *et al.*, 2001; [Blaise *et al.*, 2007](#)). The classical labyrinth test is one of the most important models for anxiety, memory and learning (Wozniak *et al.*, 1990; Jürgensen *et al.*, 2000). Increasing the arrival, the time coming and the time spent in the labyrinth cage are considered the most representative indices of the memorization activity. The classical labyrinth test confirmed toxic effect of DM (Masoumi, 2009).

5. Conclusion

Deltamethrin are chemicals toxic used all over the world to fight against parasites in agricultural and domestic environments. The intensive use of these products can cause damage for human health and animal following inhalation of air or by their presence as residue in agricultural product (Rjeibi *et al.*, 2016). DM are responsible for the generation of reactive oxygen species in the organism which resulting to a condition of oxidative stress. Reactive oxygen species can cause an imbalance between oxidant that may generate various pathologies in the human body essentially neurobehavioral and neurodegenerat-ion.

Acknowledgements

Our thanks to all Toxicology laboratory technicians in Tebessa university.

6. References

1. AbdelDaim M., Abdelkhalek M., Hassan M. 2015. Antagonistic activity of dietary allicin against deltamethrin-induced oxidative damage in freshwater Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 111 146 – 15.
2. AbdelDaim M., El-Bialy E., Haidy G., Abdel R., Abeer M., Radi A., Ahmed H. 2016. Antagonistic effects of *Spirulina platensis* against sub-acute Deltamethrin toxicity in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 77 79 85.
3. Abdul H M., Salah M., 2013. Lycopene reduces deltamethrin effects induced thyroid toxicity and DNA damage in albino rats, *Journal of Basic & Applied Zoology*. 66, 155-163.
4. Aebi. 1984. Catalase. In L. Packer (Ed), *methods in enzymology*, Academic press, Orlando. 105: 121-126.
5. Ahmad M., Adil D., Khan M. 2013. Effect of Repeated Oral Administration of Bifenthrin on Lipid Peroxidation and Anti-oxidant Parameters in Wistar Rats. 125-128.
6. Amamra W. 2015. Etude des effets protecteurs de la supplementation en curcumin et en vitamine E sur la cytotoxicité induite par le diazinon chez le rat de la souche wistar : impacts biochimique et histopathologique. These doctorat. 205pp
7. Atif F., Parvez S., Pandey S. 2005. [Modulatory Effect of Cadmium Exposure on Deltamethrin-Induced Oxidative Stress in *Channa punctate*](#). *Bloch*. 371-377.
8. Aydin B. 2011. Effects of thiacloprid, deltamethrin and their combination on oxidative stress in lymphoid organs, polymorphonuclear leukocytes and plasma of rats. *Pesticide Biochem and Physiol*. 165-171.
9. [Beauchamp C., Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Biochem*. 44: 276-287.](#)
10. Belzing C., Griebel G. 2001. Measuring normal and pathological anxiety-like behavior in mice. *Behav Brain*. 141-149.
11. [Blaise SA., Nedelec E., Schroeder H., Alberto JM., Bossenmeyer-Pourie C., Gueant JL., Daval JL. 2007. Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats. *Am J Pathol*. 170:667-679.](#)
12. [Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochemistry*, 72:248-54.](#)
13. Chandra, N., Shobha, N. 2013. Deltamethrin Induced Toxicity and Ameliorative Effect of Alpha-Tocopherol in Broilers. 673-678.
14. [Chargui I., Grissa I., Bensassi F., Hrira M., Haouem S., Haouas Z., Bencheikh H. 2012. Oxidative Stress, Biochemical and Histopathological Alterations in the Liver and Kidney of Female Rats Exposed to Low Doses of Deltamethrin \(DM\): A Molecular Assessment. *Biomed Environ Sci*. 25\(6\): 672-683.](#)
15. Dinu D., Marinescu D., Cristina M., Andreea M., Staicu C. 2010. [Modulatory Effects of Deltamethrin on Antioxidant Defense Mechanisms and Lipid Peroxidation in *Carassius auratus gibelio* Liver and Intestine](#). 757-764.
16. [Dubey N., Mehraj A., Rajinder K. 2013. Sub-acute Deltamethrin and Fluoride Toxicity Induced Hepatic Oxidative Stress and Biochemical Alterations](#). 28 13-1.
17. Fleming L, Mann J.B., Bean J., Briggles T., Sanchez-Ramos J.R., 1999. Parkinson's disease and brain levels of organochlorine pesticides. *Ann Neurol*. 4(36):100-103.
18. Flohe G. 1984. Analysis of glutathione peroxidase, *Methods Enzymol*. 105 114-121.
19. Franco R C. 2009. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ* 16:1303-1314, 13.
20. [Franco R., Cidlowski J. 2009. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ* 16:1303-1314.](#)
21. Gadoth N., Gobel H. 2011. Oxidative Stress and Free Radical Damage in Neurology. *Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice*. Springer Science. 514 9 1.

22. Galal MK., Khalaf A., Ogaly HA., Ibrahim MA. 2014. Vitamin E attenuates neurotoxicity induced by deltamethrin in rats. 1-7.
23. Habig WH., Pabst MJ., Jakoby WB. 1974. Glutathione-S-transferase the first step in mercapturic acid formation. *Journal of Biology and Chemistry*. 249, 7130-9.
24. Hamadache M., Benkortbi O., Hanini S., Amrane A., Khaouane L., SiMoussa C. 2016. A quantitative structure activity relationship for acute oral toxicity of pesticides on rats: validation, domain of application and prediction. *J Hazard Mater* 303:28-40
25. Harrill J. 2008. Transcriptional response of rat frontal cortex following acute In Vivo exposure to the pyrethroid insecticides permethrin and deltamethrin. *BMC Genomics* 2008, 9:546, 23.
26. Henine S., Rouabhi R., Gasmi S., Amrouche A., Abide A., Salmi A., Toualbia N., Taib C., Bouteraa Z., Chenikher H., Boussekine S., Kebieche M., Aouimeur M. 2016. Oxidative stress status, caspase-3, stromal enzymes and mitochondrial respiration and swelling of *Paramecium caudatum* in responding to the toxicity of Fe₃O₄ nanoparticles, *Environ Health Sci*. 8 161.
27. Jaako K. T. 2005. Developmental lead exposure impairs contextual fear conditioning and reduces adult hippocampal neurogenesis in the rat brain. . . *neuro journal*, 18.
28. Jang S. D. 2010. Luteolin Inhibits Microglia and Alters Hippocampal-Dependent Spatial Working Memory in Aged Mice. . *Journal of Nutrition*. 140(10):1892, 16.
29. Jürgensen K., Mouritsen M. 2000. Effects of the insecticides malathion and deltamethrin on the phase behaviour of dimyristoylphosphatidylcholine multilamellar lipid bilayers. 1-8.
30. Kumar A., Sasmal D., Sharma N. 2015. An Insight into Deltamethrin Induced Apoptotic Calcium, p53 and Oxidative Stress Signalling Pathways. 015-0217-1. Apoptotic
31. Masoumi A. 2009. *Journal of Alzheimer's Disease*, 703-717. Alzheimer's
32. Michael F., Hughes E A. 2016. Environmentally relevant pyrethroid mixtures: A study on the correlation of blood and brain concentrations of a mixture of pyrethroid insecticides to motor activity in the rat. *Toxicology* 359 - 360 19-28, 10.
33. Ming-Yuan, X., Pan, W. 2015. Redox status in liver of rats following subchronic exposure to the combination of low dose dichlorvos and Deltamethrin. *Pes Bioc Phy*. In press.
34. Mnif W., Hassine Al., Bouaziz A., Bartegi A., Thomas O., Roig, B. 2011. Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. *Int J Environ Res Public Health* 2265-2303. pesticides
35. Mona K Galal A. A. 2014. Vitamin E attenuates neurotoxicity induced by deltamethrin in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14:458, 7.
36. Mona K., Abdel A., Hanan A., Marwa A. 2014. Vitamin E attenuates neurotoxicity induced by deltamethrin in rats. *BMC CAIM*. 14-458.
37. MONIKA DAYAL D. P. 2001. Induction of Rat Brain Cytochrome P450s (P450s) by Deltamethrin: Regional Specificity and Correlation with Neurobehavioral Toxicity. *Neurotoxicity Research*, Vol. 3, pp. 351-357, 7.
38. Patro N S K. 1997. Neurotoxicological effects of deltamethrin on the postnatal development of cerebellum of rat. *J. Biosci*. 22(2):117-130.
39. Redei, E., Ahmadiyah, N., Baum, A., Sasso, D., Slone, J., Solberg, L. 2001. Novel animal models of affective disorders. *Semin Clin Neuropsychiatry*. 43-67. BEHAVIORAL
40. Rehman H. 2006. The modulatory effect of DLM on antioxidants in mice. *J. Elementol. Toxicol*. 371-377.
41. Rjeibi I. 2016. Oxidative damage and hepatotoxicity associated with deltamethrin in rats: The protective effects of *Amaranthus spinosus* seed extract. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 84 853-860, 8.
42. Rodríguez J L. 2016. Effects of exposure to pyrethroid cyfluthrin on serotonin and dopamine levels in brain regions of male rats. *Environmental Research* 146 388-394, 7.
43. Rouabhi R., Gasmi S., Boussekine S., Kebieche M. 2015. Hepatic Oxidative Stress Induced by Zn and Opposite Effect of Se in *Oryctolagus cuniculus*. *J Environ Anal Toxicol*. 289.
44. Sana Chakroun L. E. 2016. Hematological, biochemical, and toxicopathic effects of subchronic acetamiprid toxicity in Wistar rats. *Environ Sci Pollut Res*, 9.
45. Syed F. 2016. Beta-cyfluthrin induced neurobehavioral impairments in adult rats. *Chemico-Biological Interactions*, 243(19-28).
46. Vinayagam Magendira Mani A. M. 2014. Naringin modulates the impairment of memory, anxiety, locomotor, and emotionality behaviors in rats exposed to deltamethrin; a possible mechanism association with oxidative stress, acetylcholinesterase and ATPase. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 7.
47. Wang Xu., Martinez MA. 2016. Permethrin-induced oxidative stress and toxicity and metabolism. A review, *Environmental Research*. 86-10-4.
48. Warso M. L. Warso, MA., Lands, WE. 1983. Lipid peroxydation in relation to prostacyclin and thromboxane physiology and pathophysiology. *Br Med Bull*. 277-280, 7.
49. Warso MA., Lands WE. 1983. Lipid peroxydation in relation to prostacyclin and thromboxane physiology and pathophysiology. *Br Med Bull*. 277-280.
50. Weckbercker G., Cory JG. 1988. Ribonucleotide reductase activity and growth of Glutathione-dependent mouse Leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer Letter*, 40, 257-264. PMID: 3289734.
51. Wozniak D., Olney JW., Kettinger L., Priece M., Miller JP. 1990. Behavioral of the rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 47-56.

52. Xudong T. 2016. DGE analysis of changes in gene expression in response to temperature and deltamethrin stress in the silkworm. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 45-50.

53. Yousef M., Awad T., Mohamed E. 2001. DLM induced oxidative damage and biochemical alterations in rat and its attenuation by vitamin E. *Toxicol.* 240-247.

54. Yuan J., Yankner A., 2016. Apoptosis in the nervous system. *Nature*. 407:802-809.

**All rights are reserved to Algerian journal of Natural Sciences and Tebessa University.
Citation: Gasmi Salim, Rouabhi Rachid and Kebieche Mohamed. 2016. Deltamethrin induced Neurodegeneration and Behavioral Effect by Dysfunction Cytosolic Antioxidant System in Rats Brain. *Algerian J. Nat. Sci.* 1(1): 14-22.**



Article 4: Alteration of membrane integrity and respiratory function of brain mitochondria in the rats chronically exposed to a low dose of acetamiprid

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/319051533>

Alteration of membrane integrity and respiratory function of brain mitochondria in the rats chronically exposed to a...

Article in *Environmental Science and Pollution Research* · August 2017

DOI: 10.1007/s11356-017-9901-9

CITATIONS

0

8 authors, including:



Gasmi Salim

Université de Tébessa

30 PUBLICATIONS 10 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Mohammed KEBIECHE

University of Jijel

46 PUBLICATIONS 135 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Mitochondrial dysfunctions: origin of all diseases. [View project](#)



The impact of persistent organic chemicals (POPs) on human health and animals” [View project](#)

Alteration of membrane integrity and respiratory function of brain mitochondria in the rats chronically exposed to a low dose of acetamiprid

Salim Gasmi¹ · Mohammed Kebieche^{2,3}  · Rachid Rouabhi¹ · Chouaib Touahria⁴ · Asma Lahouel² · Zohra Lakroun² · Sara Henine¹ · Rachid Soulimani³

Received: 9 January 2017 / Accepted: 3 August 2017
© Springer-Verlag GmbH Germany 2017

Abstract The pesticides are used in several fields of agriculture and farms to protect crops against harmful insects and herbs. The increased and uncontrolled use of these pollutants is very hazardous for the population health. Consumption of contaminated food matrices with these pesticides could impair the cell integrity and its molecular function. The main aim of this present study was to evaluate the alteration of the integrity of mitochondrial membranes and respiratory chain potential in the brain of rats exposed during 90 days to acetamiprid (AC), organochlorine of the new generation. After oral administration of AC in rats with 3.14 mg/kg of body weight, the results of this current study showed enhance in mitochondrial oxidative stress status by significant decrease of glutathione (GSH) level, glutathione pyroxidase (GPx), and catalase (CAT) activities. On the other hand, there is an increase in the enzymatic activity of the glutathione s-transferase (GST) and superoxide dismutase (SOD); at the same time, the MDA level was also highly increased. Furthermore, evaluation results of brain mitochondrial integrity revealed a significant increase in membrane permeability and mitochondrial swelling in rats exposed chronically to AC. Instead, other results of this present work showed a significant

decrease in mitochondrial respiration potent (O₂ consumption) in acetamiprid-treated rats. In conclusion, the long duration exposition of the animals to AC has led to respiratory chain dysfunction, disturbance of matrix oxidative status, and a loss of mitochondrial membranes integrity.

Keywords Acetamiprid · Brain mitochondria · Mitochondrial swelling · Membrane permeability · Oxidative stress · Rats

Introduction

Pesticides are used widely in agriculture to control insects all over the world with more than 10,000 commercial formulations of approximately 450 pesticidal compounds currently in use (Yousef et al. 2003). Neonicotinoid insecticides, as a replacement of organophosphates, have been used globally for the treatment of agricultural pests. The most common neonicotinoid insecticides include imidacloprid, acetamiprid, nitenpyram, and clothianidin (Tian 2016). In particular, acetamiprid is a new range of organo-chlorinated insecticides. Although, the compound belongs to the neonicotinoids, it has different characteristic insecticidal properties from the others in the same category of the chemical structure; it is able to alter directly the central nervous system of the insect by disturbing the receiver of acetylcholine in synapses (EFSA 2013). AC presents excellent activities against *Hemiptera*, *Thysanoptera*, and the *lepidopterans* and causes agonistic effects by binding to nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), resulting in abnormal excitation, paralysis, and death of pest organisms (Tian 2016). It is also applicable to fight against the parasites of plants, fruits, trees, and the tea tree (Carole and Harvé 2011). There exist various types of harmful devastating insects of the agricultural cultures and the development of resistance to insecticides in many harmful insects such as the *tinea* of cruciferous and louses became a serious problem

Responsible editor: Philippe Garrigues

✉ Mohammed Kebieche
kebiechem2016@gmail.com

¹ Laboratory of Toxicology, University of Tébessa, 12002 Tébessa, Algeria

² Laboratory of Molecular & Cell Biology, University of Jijel, 18000 Jijel, Algeria

³ Laboratory of Food Neurotoxicology and Bioactivity, University of Metz, Metz, France

⁴ Department of biology, University of Annaba, 23000 Annaba, Algeria

during the last years. Moreover, pest-destroying fight plans by this pesticide could be a harmful danger to the environment (Nawaza et al. 2015). The acute AC toxicity per oral way is approximately 200 mg/kg by the value of LD₅₀ (Testud 2014; Iwasa et al. 2004). The brain is particularly vulnerable to the oxidative damage because of its richness of peroxidable fatty acid, its high-energy requests and its relatively weak antioxidant power (Carole and Harvé 2011). This irreversible molecular damage is the first cause of the neurodegenerative diseases (Adams et al. 1990). Moreover, the mitochondria are the energy centers in the cell, the form of energy in these factories is the ATP provided by the degradation of cellular fuels, and the reactions of energy in these organelles produce a physiologic quantity of free radicals (Çavas 2014). When abnormalities enhanced in mitochondria, the free-radical elements become etiologic factor in neurodegenerative diseases process, through a loss of mitochondrial function and apoptosis signaling pathway initiated by opening of mitochondrial permeability transition pores (mPTP) that leads at the end to cell death (Seaton and Mursden 1996). Pesticide exposure can occur directly during production process or professional use and intoxicate general population. In the first case, intoxicated users with this pesticide are addressed through professional medical services or specialized detoxification centers. However, exposure of the general population to these toxics at low doses via food matrices remains without any serious impact study. Indeed, the few studies on this subject did not provide a clearer understanding about the relationship between neonicotinoides, for example, and the etiology of certain diseases such as metabolic and neurodegenerative diseases, reproductive dysfunction, neurodevelopmental alterations, and cancer (Baldi et al. 2013). Many previous studies have shown that acetamiprid is neurotoxic in acute or chronic-treated animals at low doses, by disturbing locomotive activity and learning and memorizing function (El Hassani et al. 2008; Mandal et al. 2015). So in view of the lack of fundamental research on this subject, it was important to carry out some experimental studies and a review of certain risks associated to acetamiprid exposition in a living organism. The objective of the current work was to study various aspects of the brain mitochondria toxicities in rats exposed for a long duration to acetamiprid at low dose of 3.14 mg/kg, equivalent to 1/60 of LD₅₀ in rats (Testud 2014; Chakroun et al. 2016).

Materials and methods

Chemicals

The pesticide used in this study is acetamiprid at the dose of 3.14 mg/kg (1/60 LD₅₀) (Testud 2014). Commercial product of acetamiprid [C₁₀H₁₁ClN₄] (Mospilan®20 SL (95% purity)), consisting of 200 g/l AC as active ingredient and it has been purchased from Yu Full Industry CO., Ltd., India. The

pesticide was dissolved in distilled water and prepared in sufficient amount for a daily administration during 6 months. The majority of chemicals used in the present study were procured from Sigma Aldrich, Germany.

Animal treatments

Twelve male white *Wistar* rats strain, weighing 220 to 240 g, were obtained from Pasteur Institute (Algeria). Upon arrival, the rats were housed, six per cage. Animals were maintained under a daily 12-h light/dark cycle at a constant temperature (22 ± 2 °C), a relative humidity of 55 ± 10% and a free access to food and water. The rats were subjected to one period of 15 days for adaptation before the indicated treatments. In this study, the rats were divided into two groups of six rats each. All experimental assays were carried out in conformity with international guidelines for the care and use of laboratory animals. Approval number of the animal experiment (Code 01-12-2015) was given also by Algerian Pasteur Institute, Algeria. Processing is carried out by the administration of the prepared solutions by gastric gavage using a probe attached to a syringe daily for 3 months.

- Control group (T) received 0.5 ml of distilled water
- Treated group with AC, receiving 3.14 mg/kg body weight daily during 90 days

Sacrifice of the animals and brain extraction

After 6 months of exposure, rats were sacrificed by decapitation after deep ether anesthesia; brains were removed quickly and cut in two parts, the first one was maintained in –80 °C for mitochondrial isolation and the proportioning of the matrix oxidative stress parameters (GSH, GST, CAT, GPx, and MDA), and the second part was used freshly to realize the mitochondrial integrity and function essays.

Brain mitochondria isolation and matrix preparation

The different brain areas are used for the extraction of the whole mitochondrial fractions as described by the method of Clayton and Doda (2001) with slight modifications. Briefly, the tissues were washed in cold respiration buffer, pH 7.4 (50 mM Tris-HCl, 250 mM sucrose, 1 mM *d*-Ethyl Diamine Acetic Acid (EDTA), BSA 0.2%), then chopped and homogenized in three volumes of the same buffer and centrifuged at 3500 g for 10 min, then the pellet was re-centrifuged in the same conditions. Supernatants from the two centrifugations have been mixed and centrifuged at 15000 g for 20 min. The resultant pellet has been washed twice with PB buffer (50 mM Tris-HCl, 250 mM sucrose) pH 7.4 in the same conditions; resultant mitochondrial pellets were suspended in

300 μ l of PB buffer and frozen at -20 °C until its ulterior use. Mitochondrial matrix was prepared from mitochondria suspensions by freezing and defrosting with repeated homogenization in order to burst mitochondria. After centrifugation at 10,000 g for 10 min, the supernatant was considered as the source of mitochondrial GSH, GPx, GST, CAT, SOD, and MDA.

Assessment of redox status markers in brain mitochondria

GSH The dosage of glutathione in mitochondria is carried out according to the process reported by Weckbercker and Cory (1988). Briefly, 0.8 ml of brain tissue homogenate was added to 0.2 ml of a sulfosalicylic acid at 0.25% and the mixture was agitated freshly in order to eliminate proteins by centrifugation for 5 min at 1000 rpm. 0.5 ml of supernatant was added to 1 ml of Tris-HCl buffer + EDTA (0.02 M, pH 9.6). After agitation, 0.025 ml of DTNB (0.01 M) dissolved in methanol was added and the obtained mixture was incubated for 5 min at room temperature, after that, absorbance was recorded at 412 nm.

GPx Glutathione peroxidase activity was measured by the procedure of Flohe and Gunzler (1984). Briefly, supernatant obtained after centrifuging 5% brain homogenate at 1500 \times g during 10 min followed by 10,000 \times g for 30 min at 4 °C was used for GPx assay. One milliliter of reaction mixture was prepared which contained 0.3 ml of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4), 0.2 ml of GSH (2 mM), 0.1 ml of sodium azide (10 mM), 0.1 ml of H₂O₂ (1 mM), and 0.3 ml of brain supernatant. The reaction was terminated by addition of 0.5 ml 5% TCA after 15 min of incubation at 37 °C. Tubes were centrifuged at 1500 \times g for 5 min, and the supernatant was collected. 0.2 ml of phosphate buffer (0.1 M pH 7.4) and 0.7 ml of DTNB (0.4 mg/ml) was added to 0.1 ml of reaction supernatant. After mixing, absorbance was recorded at 420 nm.

GST The measurement of the activity of glutathion-S-transferase (GST) was evaluated according to the method of Habig et al. (1974). Briefly, the homogenate is centrifuged at 14,000 rpm for 30 min and the recovered supernatant will be used as a source of enzymes. The dosage consists of reacting 200 μ l of the supernatant with 1.2 ml of the mixture CDNB (1 mM), GSH (5 mM) [20.26 mg CDNB, 153.65 mg GSH, 1 ml ethanol, 100 ml phosphate buffer (0.1 M, pH 6)]. Absorbance readings are performed every 15 s for 1 min at a wavelength of 340 nm against a white tube containing 200 μ l of distilled water replacing the amount of supernatant.

CAT The evaluation of catalase activity in brain mitochondria was carried out according to the method of Aebi (1984). Briefly, 780 μ l (100 mM) of phosphate buffer pH 7.4 and 200 μ l d²H₂O₂ (500 mM) freshly prepared was added to

20 μ l of matrix supernatant. The H₂O₂ decomposition rate was followed by monitoring absorption at 240 nm. One unit of CAT activity is defined as the amount of enzyme required to decompose 1 μ mol of hydrogen peroxide in 1 min. The enzyme activity was expressed as micromole of H₂O₂ consumed/min/mg protein.

SOD The enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD) in brain mitochondria was assessed by the method of Beauchamp and Fridovich (1971). For that, 50 μ l of matrix fraction was added to a mixture composed of 2 ml of the reactive medium (sodium cyanide 10⁻² M, solution of NBT at 1.76×10^{-4} M, EDTA 66 mmol, methionine 10⁻² M, riboflavin 2 μ mol, pH 7.8). This mixture was exposed to light of a 15 W lamp for 30 min to induce the photoreaction of riboflavin. Reduction of NBT into formozan gave a blue color. The color was measured by spectrophotometer at 560 nm. The enzymatic activity is calculated in terms of international unit per milligrams of proteins.

MDA The assessment of the MDA levels in mitochondria matrix was carried out according to the method of Esterbauer et al. (1992). One hundred twenty-five microliter of supernatant was homogenized by sonication with 50 μ l of PBS, 125 μ l of trichloroacetic acid-butylhydroxytoluene (TCA-BHT) in order to precipitate proteins and then centrifuged (1000 g, 10 min, and 4 °C). Then, 200 μ l of supernatant was mixed with 40 μ l of HCl (0.6 M) and 160 μ l of TBA dissolved in Tris and then the mixture was heated at 80 °C for 10 min. The absorbance of the resultant supernatant was obtained at 530 nm.

The mitochondrial protein concentration was measured by the method of Bradford (1976) and used beef serum albumin (BSA) as a standard.

Evaluation of swelling, permeability, and mitochondrial respiration

Assessment of mitochondrial swelling was carried out according to the method of Kristal et al. (1996) and modified by Farhi (2015). Briefly, after mitochondria extraction from fresh tissues of the rats' brains at 4 °C, equal volumes were distributed in quartz cells and the absorbance is monitored spectrophotometrically at 540 nm. The decrease in absorbance indicates the increase of mitochondrial swelling.

The estimation of the mitochondrial permeability was carried out using the method of Farhi (2015) which is based on the rate of the mitochondrial size variation after the entrance of the calcium that is added to mitochondrial fresh suspension. This increase in mitochondrial size was monitored by the absorbance reading every 30 s at 540 nm wavelength during 3 min to thus allowing establishing a kinetic curve of the loss of mitochondrial membrane potential.

Mitochondrial respiration was estimated as oxygen consumption using an Oxygraph (Hansatech®, Germany) according to the method described by Henin et al. (2016).

Data analysis

The statistic analysis was carried out using software MINITAB (version 17.1). For obtained charts and histograms, the office Excel 2016 was used. The results are expressed as mean \pm SEM of six rats in each group, and the differences were considered significant with $0.05 \geq p \geq 0.01$, highly significant when $0.01 \geq p \geq 0.001$, and very highly significant when $p < 0.001$ (P threshold of significance).

Results

Oxidative stress status of matrix mitochondria

The results of assessment of the different markers of matrix mitochondria redox status in brain rats after long duration acetamiprid exposure at the dose of 3.14 mg/kg body weight are shown in Table 1. GSH, such as an important antioxidant tripeptide in brain mitochondria, has shown a highly significant ($p = 0.002$) reduction in AC-treated group compared to the normal group. At the same time, the Table 1 showed a significant increase ($p = 0.024$) in the enzymatic activity of the matrix GST following a chronic exposition of the rats to acetamiprid in comparison with the control group. In addition, GPx activity, as a key antioxidant enzyme which could regulate the level of the ROS in mitochondria matrix, has been decreased with highly significant manner ($p = 0.0059$), (Table 1) in AC-treated rats comparing with the normal group. A very highly significant decrease ($p = 0.001$) appeared in brain mitochondrial CAT activity in AC-treated group in comparison to those non-AC-treated rats. On the other hand, the activity of SOD enzyme was highly significantly ($p = 0.021$) increased after 90 days of exposure to acetamiprid when compared to the control group. Levels of MDA were assessed in brain mitochondria of the whole brain in rats in order to show the impact of oxidative stress produced by acetamiprid on lipid compounds. MDA values were significantly increased

($p < 0.01$) in brain mitochondria of the AC-treated rats compared to control (Table 1).

Evaluation of swelling, permeability, and mitochondrial respiration

The toxicological results of acetamiprid on mitochondrial integrity and function parameters (swelling, permeability, respiration) are shown in Table 2. As regards the evaluation of mitochondrial swelling, the results of the present study showed a significant increase ($p \leq 0.0023$) in mitochondria swelling, which is directly proportional to the absorbance values, when the rats were exposed to AC for a long duration at the dose of 3.14 mg/kg body weight in comparison to control group.

On the other hand, the assessment of mitochondrial permeability was calculated as the change of mitochondrial size during 180 s, following the addition of calcium to mitochondrial suspension. The results of this essay are represented by a kinetic curve (Table 2) which demonstrated a significant difference between AC-treated group and normal group with significance degree of p .

Regarding the evaluation of respiratory function of brain mitochondria, the results highlighted a significant decrease in oxygen consumption rate in AC-treated rats comparing to those non-AC-exposed animals (Table 2).

Discussion

The neonicotinoids have unique physical and toxicological properties compared to earlier classes of organic insecticides. The free radicals are very reactive and can attack, if they are not destroyed, various targets such as proteins, DNA, and especially the fatty acids polyunsaturated (Sauer 2014; Pasteur 2013) and could be even more destructive for cell architecture (Rouabhi et al. 2015; Johnson and Weinberg 1993). The aim of this present study was to investigate the effect of chronic acetamiprid exposure on redox homeostasis unbalance in brain mitochondria in rats and its implication on mitochondrial membrane integrity and function. Indeed, oxidative stress is one of the main common toxicity mechanisms between many

Table 1 Variation of mitochondrial oxidative stress parameters in rats' brain under the effect of acetamiprid chronic exposure at the dose of 3.14 mg/kg body weight

	GSH nmol/mg	GST Pmol/min/mg	GPx nmol/min/mg	CAT nmol/min/mg	SOD U/mg	MDA nmol/mg
Control	35.171 \pm 1.63	71.19 \pm 2.50	64.80 \pm 6.08	155.72 \pm 2.40	12.23 \pm 2.65	0.59 \pm 0.03
AC	26.89 \pm 3.219**	81.48 \pm 6.80*	51.10 \pm 8.82**	135.48 \pm 1.96***	23.44 \pm 3.5**	0.82 \pm 0.04***

Each value is expressed as mean \pm standard deviation, we use Student test. Batch Compare treated with acetamiprid compared to control group. ($p \leq 0.05$) significant (*), ($p \leq 0.01$) highly significant (**), ($p \leq 0.001$) very highly significant (***), $p > 0.05$ not significant (ns)

Table 2 Change of mitochondrial swelling, respiration, and permeability in the brain of control rats and treated after 90 days of treatment

	Mitochondrial swelling as (optic density)	Mitochondrial respiration as O ₂ consumption	Mitochondrial permeability as ($\Delta OD/\Delta t$)
Control	75.45 ± 0.027	6.33 ± 1.04	0.215 ± 0.33
AC	0.33 ± 0.038**	3.16 ± 0.90***	0.295 ± 0.029***

Each value is expressed as mean ± standard deviation, we use Student test. Batch Compare treated with acetamidrid compared to control group. ($p \leq 0.05$) significant (*), ($p \leq 0.01$) highly significant (**), ($p \leq 0.001$) very highly significant (***), $p > 0.05$ not significant (ns)

pesticides and persistent substances (Lukaszewicz-Hussain 2008). In the current study, the mitochondrial matrix preparation from the brain of rats treated with acetamidrid showed significant decrease in mitochondria GSH uptake. GSH depletion can enhance oxidative stress and may increase the levels of excitotoxic molecules; both types of action can initiate a loss in mitochondrial function and its integrity susceptible to induce apoptosis signaling pathway in distinct neuronal populations (Jaswinder and Christopher 1997; Di Monte and Lavasan, 2002; Uttara et al. 2009).

In this study, because of their high reactivity and short life, the ROS have been analyzed indirectly *in vivo* by measuring the changes in antioxidant enzymes including GST, GPx, CAT, and SOD. Reduced activity of GPx and CAT was observed in mitochondria when acetamidrid was administered to rats. This abnormality in the rate of different antioxidants might have resulted from intense ROS generation induced by acetamidrid administration in brain mitochondria, which in turn might have caused an increase in malondialdehyde, as a result of enhanced lipid peroxidation (Silva and Gammon 2009). Indeed, reduction in the GPx activities and CAT to increase H₂O₂ and to produce radical OH[•] in the mitochondrion (Cory-Slechta et al. 2005; Banerjee et al. 2001). Thus, the reduction in activity of GPx is due mainly to a hydrogen peroxide overproduction and the decrease of GSH after xenobiotics intoxication (Gasmi et al. 2016; Bourbia 2013; Kebieche et al. 2009). Thus, environmental toxicants can directly attack the mitochondria inducing the generation of ROS, which can further induce the depletion of antioxidant defenses and mediate other oxido-reduction reactions that could promote mitochondrial damage and depletion of antioxidant molecular systems in the brain cell (Lakroun et al. 2015; Franco et al. 2009). The increase accumulation of ROS which exert a direct damage upon brain mitochondria (Shi et al. 2004; Assefa et al. 2005) and the lipid peroxidation which is recorded in this study, by enhancing MDA rate and impairing consequently mitochondrial metabolism and mitochondrial pore transition permeability (MPTP). However, the activity of both SOD and GST has contrary increased in mitochondria matrix in AC-treated rats comparing to the normal group. Therefore, the SOD enhancing activity could be explained by the necessity to offset superoxide overproduction in brain mitochondria AC-treated rats, at the same time; however, it

should be noticed that the increase in the expression of the GST is generally observed when the cell is stressed (Di Monte et al. 1992). The results of our study are in agreement with preceding studies, which revealed that the exposure to xenobiotics belonging to the same family can induce the activity of GST (Lahouel et al. 2016; Bourbia 2013; Chen and Ahn 1998). Indeed, the results of the present study showed an increase in mitochondria swelling and membrane permeability in the acetamidrid-treated rats, probably induced by MPTP induction mediated by ROS-generation. Several authors have reported that apoptosis induced by environmental toxicants is widely associated with alterations in oxidative stress homeostasis which includes both the depletion of antioxidant defenses the increase accumulation of ROS which exert a direct damage upon brain mitochondria (Shi et al. 2004; Assefa et al. 2005; Baltazar et al. 2014). In addition, the results of the current study have revealed a significant loss in mitochondrial respiratory function in intoxicated rats by the pesticide. When antioxidant defense systems are insufficient to compensate pro-oxidant state, the excessive ROS interact with phospholipids and proteins of mitochondrial membranes, resulting in the opening of permeability transition pores, dissipation of membrane potential that could damage mitochondrial ultrastructure and subsequent release of cytochrome-c. Knowing that cytochrome-c is imperative for respiratory chain reactions (RCR) in brain mitochondria, this may be the cause of a fall in oxygen consumption monitored in the present study. Outsourcing of this cytochrome from brain mitochondria to the cytosol is considered an apoptosis-inducing factor (Franco and Cidrowski, 2009; Gao et al. 2014; Morris and Berk 2015). In addition, there is a relationship between mitochondrial dysfunction which is usually mediated by overproduction of O₂⁻ and membrane potential collapse (Morris and Berk 2015; Lakroun et al. 2015). RCR, known as a crucial index of mitochondrial respiratory function, has reflected a fall in its oxygen consumption rate and thus the efficiency of its function.

Conclusion

At the end, we can conclude that the long duration exposure to low dose of acetamidrid generated many toxic effects on the whole brain of rats. Enzymatic and non-enzymatic defense

systems have been impaired to produce abnormalities in brain mitochondria compared to non-acetamiprid-treated rats such as an important unbalance of oxidative stress homeostasis in brain mitochondria matrix, mitochondria swelling, membrane permeability disequilibrium, and inhibition of mitochondrial respiration, indicating the loss of functional and structural integrity of brain cell and mitochondria. These alterations could likely lead to cell death and thus be the etiological factor of neurodegenerative diseases.

References

- Adams J, Vorhees CV, Middaugh LD (1990) Developmental neurotoxicity of anticonvulsants: human and animal evidence on phenytoin. *Neurotoxicol Teratol* 12:203–214
- Aebi (1984) Catalase in vivo, methods in enzymology, vol 105. Academic Press, Orlando, pp 121–126
- Assefa Z, Van Laethem A, Garmyn M, Agostinis P (2005) Ultraviolet radiation induced apoptosis in keratinocytes: on the role of cytosolic factors. *Biochim Biophys Acta* 1755:90–106
- Baldi I, Bouvier G, Cordier S, Coumoul X, Elbaz A, Gamet-Payrastra L, Lebailly P, Multigner L, Rahmani R, Spinosi J, Van Maele-Fabry G (2013) Pesticides. Effets sur la santé. Synthèse et recommandations. Expertise collective. INSERM. Paris, France, p 146
- Baltazar MT, Dinis-Oliveira RJ, de Lourdes BM, Tsatsakis AM, Duarte JA, Carvalho F (2014) Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases—a mechanistic approach. *Toxicol Lett* 230:85–103
- Banerjee BD, Seth V, Rs A (2001) Pesticide-induced oxidative stress: perspectives and trends. *Environ Health* 16:1–40
- Beauchamp C, Fridovich I (1971) Assay of superoxide dismutase. *Anal Biochem* 44:276–287
- Bourbia S (2013) Évaluation de la toxicité de mélanges de pesticides sur un bio-indicateur de la pollution des sols *Helix aspersa*. Doctorat Thesis. Univ Annaba pp177
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Carole I, Harvé Q (2011) Désordres métaboliques et réanimation: de la physiopathologie au traitement. Berlin Heidelberg. New York. ISBN-13: 978-2-287-99026-7.522
- Çavas TN (2014) Effects of fullerene nanoparticles on acetamiprid induced cytotoxicity and genotoxicity in cultured human lung fibroblasts. *Pests Biochem Physiol* 114:1–7
- Chakroun S, Ezzi L, Grissa I, Kerkeni E, Neffati F, Bhouiri R, Sallem A, Najjar MF, Hassine M, Mehdi M, Haouas Z, Ben-Cheikh H (2016) Hematological, biochemical, and toxicopathic effects of subchronic acetamiprid toxicity in Wistar rats. *Environ Sci Pollut Res*. doi:10.1007/s11356-016-7650-9
- Chen X, Ahn DU (1998) Antioxidant activities of six natural phenolics against lipid oxidation induced by Fe²⁺ or ultraviolet light. *JAOCS* 75(12):1717–1721
- Clayton D.A. and J.N. Doda, Isolation of mitochondria from cells and tissues. In: Spector DL, Goldman R, Leinwand L (eds) *Cells: A laboratory manual*. Sci Press, Beijing, China, pp 356–361
- Cory-Slechta D, Thiruchelvam M, Ek R, Bk B, Brooks A (2005) Developmental pesticide exposures and the Parkinson's disease phenotype. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 73:136–139
- Di Monte DA, Lavasani M (2002) Manning-bog ab environmental factors in Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 23:487–502
- Di Monte DA, Chan P, Sandy MS (1992) Glutathione in Parkinson's disease: a link between oxidative stress and mitochondrial damage? *Ann Neurol* 32(S1):S111–S115
- EFSA (2013) Scientific opinion on the developmental neurotoxicity potential of acetamiprid and imidacloprid. *EFSA J* 11(12):3471
- El Hassani, Dacher M, Gary V, Lambin M, Gauthier M, Armengaud C (2008) Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee. *Arch Environ Contam Toxicol* 54: 653–661. doi:10.1007/s00244-007-9071-8
- Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jungens G (1992) The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Biol Med* 13:341
- Farhi S (2015) Neurotoxicity study of cadmium on oxidative stress parameters and the protective effect of selenium on this toxicity in rabbits. University Thesis. *Trace Elem Med Biol* 29:104–10
- Flohe, Gunzler (1984) Analysis of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 105:114–121
- Franco R, Cidlowski JA (2009) Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ* 16:1303–1314
- Franco R, Sanchez-Olea R, Reyes-Reyes EM, Panayiotidis MI (2009) Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: manage a trois. *Mutat Res* 674:3–22
- Gao C, Chen X, Juan LJ, Tang Y, Liu L, Chen S, Yu H, Liu L, Yao P (2014) Myocardial mitochondrial oxidative stress and dysfunction in intense exercise: regulatory effects of quercetin. *Eur J Appl Physiol* 114:695–705
- Gasmi S, Rouabhi R, Kebieche M, Salmi A, Boussekine S, Toualbia N, Taib C, Henine S, Bouteraa Z, Djabri B (2016) Neurotoxicity of acetamiprid in male albino rats and the opposite effect of quercetin. *Biotechnol Ind J* 12(7):113
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione s-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Biol Chem* 249: 7130–7139
- Henin S, Rouabhi R, Gasmi S, Amrouche A, Abide A, Salmi A, Toualbia N, Taib C, Bouteraa Z, Chenikher H, Boussekine S, Kebieche M, Aouimeur M (2016) Oxidative stress status, caspase 3, stromal enzymes and mitochondrial respiration and swelling of *Paramecium caudatum* in responding to the toxicity of Fe₃O₄ nanoparticles. *Environ Health Sci* 8(2):161–167
- Iwasa T, Motoyama N, Ambrose JT, Roe MR (2004) Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Prot* 23:371–378
- Jaswinder SB, Christopher AS (1997) Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res Rev* 25:335–358
- Johnson KJ, Weinberg JM (1993) Postischemic renal injury due to oxygen radicals. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2(4):625–35
- Kebieche M, Lakroun Z, Lahouel M, Bouayed J, Meraihi Z, Souliman R (2009) Evaluation of epirubicin-induced acute oxidative stress toxicity in rat liver cells and mitochondria, and the prevention of toxicity through quercetin administration. *Exp Toxicol Pathol* 61:161–167
- Kristal BS, Park BK, Yu BP (1996) 4-hydroxynonéal est un puissant inducteur de la transition de perméabilité mitochondriale. *Biol Chem* 271:6033–6038
- Lahouel A, Kebieche M, Lakroun Z, Rouabhi R, Fetoui H, Chtourou Y, Zama D, Soulimani R (2016) Neurobehavioral deficits and brain oxidative stress induced by chronic low dose exposure of persistent organic pollutants mixture in adult female rat. *Environ Sci Pollut Res*. doi:10.1007/s11356-016-6913-9
- Lakroun Z, Kebieche M, Lahouel A, Zama D, Soulimani R (2015) Oxidative stress and brain mitochondria swelling induced by endosulfan and protective role of quercetin in rat. *Environ Sci Pollut Res*. doi:10.1007/s11356-014-3885-5

- Pasteur L (2013) La maladie d'Alzheimer : intérêt des molécules d'origine naturelle. Thèse d'exercice en Pharmacie, bibliothèque de l'UPS, Université Toulouse III - Paul Sabatier.
- Lukaszewicz-Hussain A (2008) Subchronic intoxication with chlorfenvinphos, an organophosphate insecticide, affects rat brain antioxidative enzymes and glutathione level. *Food Chem Toxicol* 46(1):82–86
- Mandal PS, Mondal S, Karnam SS, Purohit K (2015) A behavioral study on learning a memory in adult Sprague Dawley rat in induced acetamiprid toxicity. *Explor Anim Med Res* 5(1):27–32
- Morris G, Berk M (2015) The many roads to mitochondria dysfunction in neuroimmune and neuropsychiatric disorders. *BMC Med* 13:68–75
- Nawaza A, Abid N, Muhammad I, Syed S, Hussain S, Muhammad RA, Zahid A (2015) Determination and extraction of acetamiprid residues in fruits and vegetables. *IJFAAS* 1(2):63–66
- Rouabhi R, Gasmi S, Boussekine S, Kebieche M (2015) Hepatic oxidative stress induced by zinc and opposite effect of selenium in *Oryctolagus cuniculus*. *Environ Anal Toxicol* 5:289
- Sauer E (2014) Liver delta-aminolevulinate deshydratase activity is inhibited by neonicotinoids and restored by antioxidants agents. *Environ Res Public Health* 11(11):11676–11690
- Seaton TP, Mursdenf CD (1996) Mitochondrial respiratory enzyme function and superoxide dismutase activity following brain glutathione depletion in the rat. *Biochem Pharmacol* 52:1657–1663
- Shi H, Hudson LG, Liu KJ (2004) Oxidative stress and apoptosis in metal ion induced carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 37:582–593
- Silva MH, Gammon D (2009) An assessment of the developmental, reproductive, and neurotoxicity of endosulfan. *Birth Defects Res Dev Reprod Toxicol* 86:1–28
- Testud F (2014) Insecticides néonicotinoïdes. EMC-Pathologie professionnelle et de l'environnement. EMC Toxicol Pathol. doi: [10.1016/S1877-7856\(13\)62786-5](https://doi.org/10.1016/S1877-7856(13)62786-5)
- Tian YW (2016) A colorimetric detection method of pesticide acetamiprid by fine-tuning aptamer length. *Anal Biochem* 513:87–92
- Uttara B, Sing AV, Zamboni P, Mahajan RT (2009) Oxidative stress and neurodegenerative diseases. *PMC* 7(1):65–74
- Weckbercker G, Cory JG (1988) Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-dependent mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer Lett* 40:257–264
- Yousef MI, El-Demerdash F, Ibrahim K, Al-Salhen K (2003) Changes in some hematological and biochemical indices of rabbits induced by isoflavanones and cypermethrin. *Toxicology* 189:223–234

TRAVAUX AVEC LE GROUPE

Subcellular Study of the Cadmium Selenide Nanoparticles (CdSe-NPs) Toxicity on a Terrestrial Bioindicator Model *Helix aspersa*

Aya Salmi¹, Rachid Rouabhi¹, Nadjiba Toualbia¹,
Chahinez Taib¹, Hadjer Chenikher¹, Salim Gasmi¹
& Samira Boussekine¹

¹Applied Biology Department, Tebessa University, 12000, Tebessa, Algeria

Correspondence and requests for materials should be addressed to R. Rouabhi (r_rouabhi@yahoo.fr)

Received 17 February 2017 / Received in revised form 29 March 2017
Accepted 4 April 2017

DOI 10.1007/s13530-017-0314-4

©The Korean Society of Environmental Risk Assessment and Health Science and Springer 2017

pISSN : 2005-9752 / eISSN : 2233-7784

Toxicol. Environ. Health. Sci. Vol. 9(2), 135-140, 2017

Abstract

Development of nanomaterials and their use on an industrial scale have been booming over the last decade. Indeed, the physicochemical properties of these materials allow their use for various applications, ranging from the manufacture of food products or cosmetics, to the development of tools for electronics or the biomedical sciences. The aim of this work was to study the effects of CdSe on the general redox state of hepatopancreas of the snail *Helix aspersa* and to evaluate the effect of this nanomaterial on mitochondrial swelling and respiration. Our results show an increase in the activity of the antioxidant enzymes of mitochondria (GST, Catalase, MDA) and a decrease in GSH and GPx level in mitochondrial hepatopancreas. Thus, we showed an increase in mitochondrial swelling with a decrease in respiratory level. Finally, our study suggested that mitochondrial dysfunction and oxidative stress were high in the digestive gland of snails treated with 3.6 and 7.2 µg/g/2day.

Keywords: CdSe, *Helix aspersa*, Redox state, Mitochondrial swelling, Respiration, GST, GSH, CAT, GPx

Introduction

Manufactured nanomaterials have new physicochem-

ical properties which allow their use in a large number of food or cosmetic products, the development of tools for electronics or the biomedical sciences¹. However, the increasing use of such materials raises today public health issues. Indeed, the interactions of nanoparticles with biological systems, and their potential toxicity, are at present poorly understood. The industrial use of nanoparticles also leads to the production of wastes whose release into the environment could prove difficult to control and whose consequences are for the moment not well known².

Recent development of nanotechnology will expand the sources of pollution with the increased production of manufactured nanomaterials. There are different sources of production of nanoparticles: natural sources (fires, volcanic eruption...), accidental sources (wood fires, vehicle exhaust, braking...) and industrial sources (nanoparticles manufactured by man)³.

More and more studies are being carried in order to better understand and better master the properties, behavior and risks related to nanoparticles. These include evaluating the toxicity of nanoparticles of varying nature on different models in vivo or in vitro. Most studies carried in vitro show that most metallic nanoparticles induce an increase in the rate of cellular mortality, associated mainly with DNA damage, and a production of reactive oxygen species (ROS).

Of all the types of nanomaterials available, our study was restricted to one type of nanoparticles namely cadmium nanoparticles (CdSe) for their importance in the current development of nanotechnologies.

Results

The results are expressed by the mean ± (standard deviation) of n experiments. The differences are considered: significant when $P \leq 0.05$, very highly significant when $P \leq 0.001$, highly significant when $P \leq 0.01$.

Discussion

Mitochondria is the site of cellular respiration, oxidative phosphorylation and production of ATP (the



Hepatic Oxidative Stress Induced by Zinc and Opposite Effect of Selenium in *Oryctolagus Cuniculus*

Rouabhi R^{1*}, Gasmil S¹, Boussekine S¹ and Kebieche M²

¹Applied biology department, SESNV Faculty, Larbi Tebessi University, Tebessa, 12000, Algeria

²Laboratory of pharmacology and phytochemistry, University of Jijel, Algeria

Abstract

The objective of this work is to study the opposite effect of Selenium on the toxicity induced by zinc in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Twenty rabbits were given repeated per os (p.o.) administration, five with zinc chloride at 0.24 mg/Kg/day, five with 0.05 µg/kg/day of selenium, five with mixture (ZnCl₂/Se) 0.24mg/kg+0.05µg/kg/day and five rabbits served as controls. In the present study, Hepatotoxic effect of zinc chloride translated by a decrease of body weight (weight gain), a decreased of lipid rate, an increased in carbohydrate amount and proteins level in the liver. The pro-oxidant effect of zinc chloride on hepatocytes was first investigated. The gavage of ZnCl₂ into rabbits at the dose of 0.24 mg/kg/day, induced stress by a significant reduction of GST, CAT and glutathione peroxidase (GPx) activity, glutathione (GSH) level. In addition, a significant increase in malonaldehyde (MDA) levels was observed, (index of lipid peroxidation). On the other hand, the supplementation of selenium (Se) 0.05 µg/kg/day orally in rabbits treated with zinc has improved some biochemical parameters and decreased the other harmful effects of zinc; selenium seems to be a simple and effective antioxidant to reduce the imbalance state between the formation of free radicals and antioxidant systems.

Keywords: Antioxidant; *Oryctolagus cuniculus*; Selenium; Zinc chloride; Oxidative stress

Introduction

Human activities have greatly increased the release of various molecules in the environment that some prove toxic to all living beings. These activities include the food industry, metallurgy, mining, pharmaceutical, power plants, and paper mills. Among the introduced molecules, heavy metals occupied a significant place [1].

The toxic potential of a metal for a living body is based on a myriad of parameters. For the same amount, a metal can be toxic under some conditions and be safe in others. It is therefore essential to understand the ways in which a metal is toxic in order to accurately determine the risk it poses in given conditions [2].

Zinc is both essential for metabolism and detoxification of xenobiotics, but as metal is a pollutant to the environment, in a few doses zinc can cause side effects in human [3-7] and animals [8-14].

The world of biological and medical sciences is invaded by a new concept of "oxidative stress" that is to say, a situation in which the cell cannot control the excessive presence of highly toxic oxygen radicals. Currently, it is well accepted that although oxidative stress is not a disease itself, it is potentially involved in many diseases such as trigger or associated with complications during their evolution.

Over production of free radicals can cause an imbalance in cellular redox status producing oxidative damage to biomolecules, (lipids, proteins, DNA). At the same time, antioxidants, such as glutathione, arginine, citrulline, taurine, creatine, selenium, zinc, vitamin E, vitamin C, vitamin A and polyphenols help to regulate the ROS thus generated. Antiradical is further supported with antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase and glutathione peroxidase those exert synergistic actions in removing free radicals [15,16].

Selenium is a component of glutathione peroxidases, antioxidant enzymes are one of the main defenses against attacks from the body produced by oxygen free radicals, this element is in the environment. It is widespread in earth's crust, most tissues and living cells [17]. This work is an investigation of the opposite role of selenium on the toxic effect of zinc in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*).

Material and Methods

Animals

Male rabbits strain *Oryctolagus cuniculus* body weight 1.5-1.9 kg was used in this study. They have been housed individually in stainless metal cages during an adaptation period of 14 days in a controlled temperature/humidity/photoperiod room (22 ± 2°C; 50%; 12 h dark/light cycle). The feeding of rabbits was based on specific artificial diet for rabbits, and they accessed water freely.

Treatment protocol

Rabbits were divided in 4 lots of 5 individuals each: Controls (no treatments), treated with ZnCl₂ at 0.24 mg/kg/day, treated with Se at 0.05 µg/kg/day and treated with mixture Zn+Se (0.24 mg/kg/day; 0.05 µg/kg/day). All treatments are per os (p. o.) way, for 14 days and carried out with conformity to the international guidelines for the care and use of laboratory animals.

Chemicals

In this study, we used the selenium under sodium selenite (Na₂Se₃) form, and zinc as zinc chloride (ZnCl₂), for the treatment of rabbits. All chemicals are provided from Larbi Tebessi university laboratories.

After 14 days of treatment, the rabbits were sacrificed and the organs were picked up, liver and kidney were recovered, weighed and preserved for assays. Some biochemical metabolites (proteins, carbohydrates and fats), and some parameters of oxidative stress in the liver (GSH, GPx, CAT, MDA, GST) was investigated, emphasizing on the role of selenium.

*Corresponding author: Rouabhi R, Applied biology department, SESNV Faculty, Larbi Tebessi University, Tebessa, 12000, Algeria, Tel: 213 213-37-49-03-02; E-mail: r_rouabhi@yahoo.fr

Received April 01, 2015; Accepted April 20, 2015; Published April 26, 2015

Citation: Rouabhi R, Gasmil S, Boussekine S, Kebieche M (2015) Hepatic Oxidative Stress Induced by Zinc and Opposite Effect of Selenium in *Oryctolagus Cuniculus*. J Environ Anal Toxicol 5: 289. doi:10.4172/2161-0525.1000289

Copyright: © 2015 Rouabhi R, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.



RESEARCH ARTICLE

Impairment of mitochondrial integrity and redox status in brain regions during a low-dose long-term exposition of rats to pyrethrinoids: the preventive effect of quercetin

Aïfe Beghout^{1,2} · Mohamed Kebiche^{1,3} · Salim Gasmi⁴ · Zeyneb Chouit¹ · Chouaib Amiou¹ · Asma Lahouel¹ · Zhora Lakroun¹ · Rachid Rouahli⁴ · Hamadi Fetouh⁵ · Rachid Soulliman⁵

Received: 13 February 2017 / Accepted: 27 June 2017
© Springer-Verlag GmbH Germany 2017

Abstract Pyrethrinoids are synthetic pesticides widely used in agriculture and farms to protect crops from weeds, insects, fungi, and molds. Increased and uncontrolled use of these pollutants can have harmful effects on human health via consumption of contaminated food products. In the present study, deltamethrin (DLT = 3.72 mg/kg) and Bifenthrin (BF = 2.6 mg/kg) were used during a long-term exposition in the rats to assess the effect on mitochondrial integrity and function in different brain areas (hippocampus, striatum, cortex, and cerebellum). The results of this study have shown that chronic treatment of rats by both DLT and BF, on their own or in a mixture, has induced a significant increase in mitochondrial MDA, but when quercetin (Que) was co-administered with pesticides, this enhancement has been prevented in the almost of treated rats compared to solvent and control groups. In hippocampus area, GSH has significantly increased in all treated rats, except for BF and DLT-Que-treated groups. In

striatum, GSH has been depleted in the BF and DLT-treated groups compared to control and solvent groups; in contrast, when Que. was associated with pesticides, the rate of this tripeptide has been maintained at normal levels. In the cortex and cerebellum, GSH has been depleted significantly in all treated animals but has increased in DLT-Que. and mixture-Que.-treated groups in the cerebral cortex, at the same time; it has been maintained at normal levels in BF-Que.-treated groups in the cerebellum compared to control and solvent rats. On the other side, the results of this study have shown a loss of catalase (CAT) and glutathione S-transferase (GST) activities in all brain regions of pesticide-treated rats, but such a fall in enzymatic activities has been prevented by Que. when it was co-administered to rats with pesticides at the dose of 5 mg/kg, except in the cerebellum. In addition, this study has shown mitochondria's swelling in almost all the brain areas with exception of the cerebellum, providing information about a loss of mitochondrial membrane integrity in brain neurons of rats exposed to pyrethrinoids. Furthermore, preventive administration of Que., in association with pesticides (5 mg/kg) or their mixture (10 mg/kg), has prevented mitochondria swelling in almost all of the analyzed brain tissues.

Responsible editor: Philippe Garrigues

✉ Mohamed Kebiche
kebichem2016@gmail.com

¹ Laboratory of Cellular and Molecular Biology, University of Mohamed Seddik Ben Yahia, Jijel, Algeria

² Laboratory of Phytochemistry and Pharmacology, University of Mohamed Seddik Ben Yahia, Jijel, Algeria

³ Unité de Recherche Animale et Fonctionnalités des Produits Animaux (UR AFPA), EA 3998, INRA USC 0340, Microplasma et Résistance de la Chaîne Alimentaire (MBCA), Neurotoxicologie Alimentaire et Bioactifs, Université de Lorraine, BP 4102, 57040 Metz, France

⁴ Faculty of SESNV, Applied Biology Department, University of Tébessa, Tébessa, Algeria

⁵ Zoology-Microbiology and Environmental Health Unit (URHEES70), University of Sfax, Sfax, Tunisia

Keywords Deltamethrin · Bifenthrin · Quercetin · Oxidative stress · Mitochondria swelling · Brain regions toxicity

Introduction

In our consumer society, with incessant rise in demand for food, it is more than necessary for us to focus on the importance of great cultures and mass production of agricultural products in order to cover and satisfy the global human needs. This demand cannot be met with conventional agricultural