



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Larbi Tébessi –Tébessa-



Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Appliquée
Domaine des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

En : Science biologique

Option : Toxicologie

Par :

Melle. Soltani Radia & Melle. Brahmi Manara

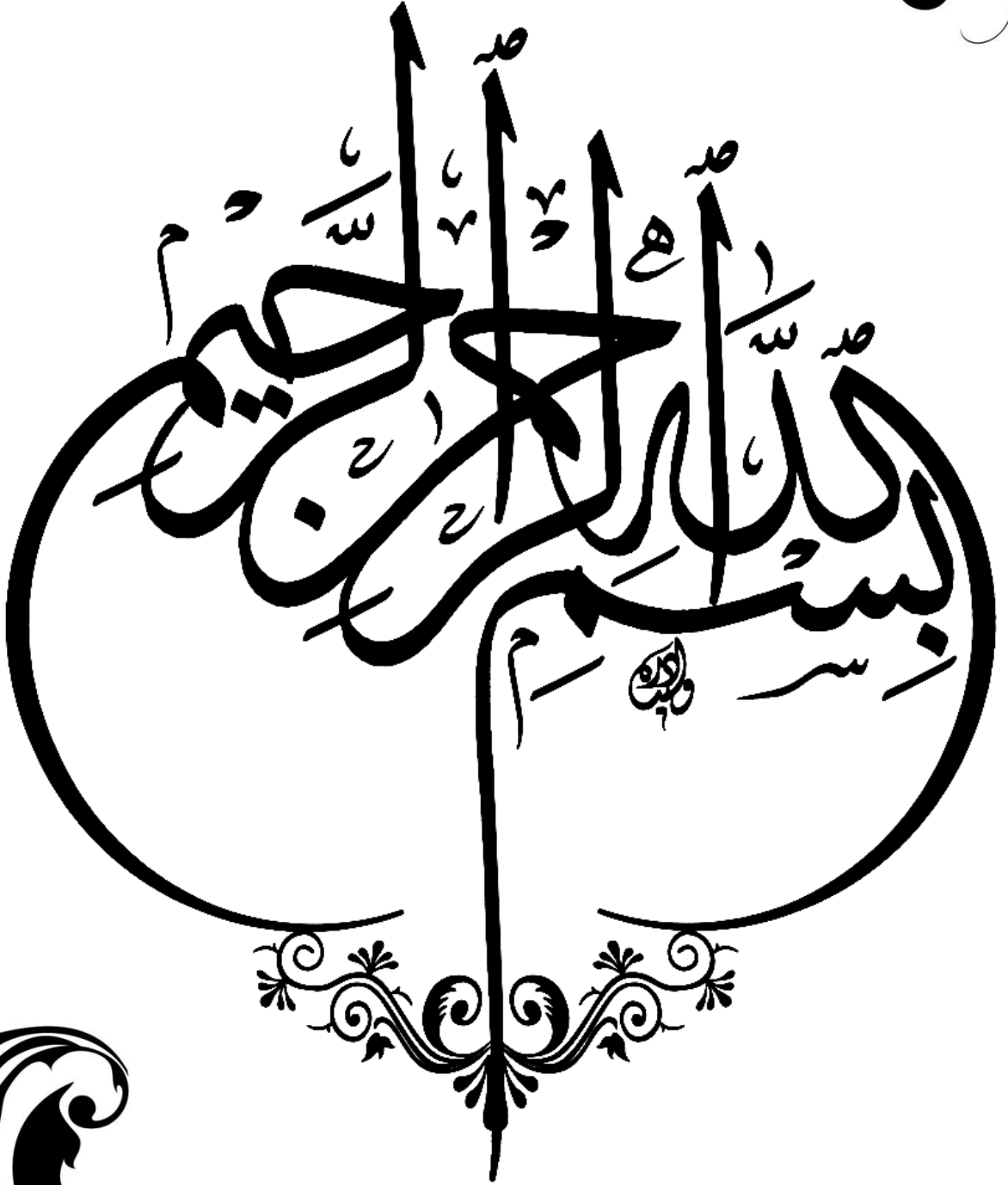
Intitulée :

Contribution a l'étude in vivo des propriétés anti-Alzheimer de l'extrait de l'Ephédra chez les rats exposé au pesticide « Spinosad »

Devant le jury :

M. Djabri B	Prof	Université de Tébessa	Président
M. Gasmi S	MCB	Université de Tébessa	Rapporteur
M. Menaceur F	MCA	Université de Tébessa	Examineur

Date de soutenance : 23/06/ 2020



عن أَبِي هُرَيْرَةَ - رَضِيَ اللَّهُ عَنْهُ - عَنِ النَّبِيِّ - صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ - أَنَّهُ
قَالَ: {مَا أَنْزَلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً}



Remerciements

*Avant tout développement, nos remerciements vont d'abord à
ALLAH le tout puissant.*

*Nous tenons à exprimer notre gratitude au docteur **Gasmí Salím** pour
avoir encadré cette mémoire de fin d'étude. Nous remercions tout
particulièrement pour ses précieux conseils et ses encouragements, et nous
lui sommes très reconnaissants de la confiance qu'il nous a témoignée.*

*Nous tiens à remercier très chaleureusement les membres de jury, qui ont
accepté la charge de juger ce mémoire.*

*Nous remercions le professeur **Djabrí Belgacem**, qui nous a fait l'honneur
d'avoir accepté la présidence du jury pour ce projet de fin d'étude.*

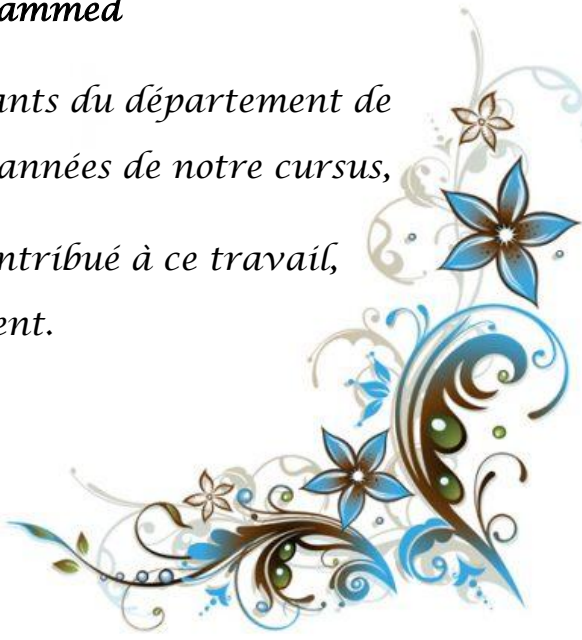
*Nous remercions également monsieur **Menaceur Fouad** d'avoir accepté de
consacrer une partie de son temps à l'examen et au jugement de ces
travaux et de siéger à ce comité.*

*Un merci spécial à monsieur **Ben Aícha Brahím** de nous avoir aidé malgré
ses contraintes de temps, et nous remercions également **Aounallah Samíra***

*Nous remercions **Abáidía Mohammed***

*Nous tenons à remercier aussi tous les enseignants du département de
biologie qui nous ont pris en charge durant les années de notre cursus,*

*Enfin, nous remercions tous ceux qui ont contribué à ce travail,
directement ou indirectement.*



Dédicace

Merci à dieu Allah le tout puissant qui m'a donné le courage et la volonté pour achever ce travail que je dédie

A mes très chers parents en reconnaissance de leurs innombrables sacrifices, leurs précieux conseils, leur soutien moral et leurs encouragements tout au long de mes études et durant la réalisation de ce travail de fin d'étude. Je ne les remercierai jamais assez pour tout ce qu'ils ont fait pour moi.

Grace à dieu, le tout puissant, j'ai accomplie ce travail avec beaucoup d'effort et de patience.

Je dédie

A mon père.

A mon mère qui m'a toujours entouré d'amour et de tendresse.

Je remercie mon mariée Ayoub de m'avoir soutenu et encouragé et m'a toujours encouragé à exceller dans mes études

Je remercie mon frère Midani , Badi, Oussama

A mes chères sœurs Hadia, Siham

A mes sœurs Manara, Souhila, Abir, Ome Kaltoum

A mes collègues de classe 2ème année master toxicologie de la promotion

2019-2020

Que toute personne m'ayant aidé de près ou de loin, trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Dédicace

Merci Allah de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve et le bonheur de lever mes mains vers le ciel et de dire " Ya Kayoum"

Je dédie

Ce modeste travail à mon père et ma mère école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années des études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger. À celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma Que dieu les gardes et les protège.

Je remercie mon mariée Hamza de m'avoir soutenu et encouragé et m'a toujours encouragé à exceller dans mes études

Je dédie

*Je remercie mon frère Anoiar, Walid, Wadih
A mes chères sœurs Rassima, Rabia, Zizou*

À mes sœurs Radia, Souhila, Abir, Ome Kaltoum

À tous ceux qui me sont chères....

À tous famille.....

À tous mes collègues de la promotion 2019-2020.....À tous mes amies...

المخلص

الزهايمر مرض عصبي تنكسي مزمن يصيب الجهاز العصبي ويتلف الذاكرة مصدره العديد من العوامل البيئية والجينية وقد أظهرت بعض الدراسات الوبائية والسمية الحديثة أنه من بين العوامل البيئية التي قد تسببه تلك المرتبطة بالتعرض للمبيدات الحشرية بمختلف أنواعها خاصة لمدة طويلة وبكميات صغيرة.

في الجزء الأول من هذه التجربة تطرقنا الى تقييم السمية العصبية لمبيد حشري من صنف سبينوسين وهو سبينوساد بجرعة 0.25 مغ/كغ/اليوم عن طريق الفم الذي تمت الموافقة عليه حديثا في الجزائر. أما في الجزء الثاني بتقييم التأثير الوقائي والعلاجي لنبات العلندة على هذه السمية بجرعة 100 مغ/كغ/اليوم عن طريق الفم. أجريت هذه التجربة في المخبر على 24 جرذ ذكر من صنف ويستار كنموذج حيواني للتجريب، مقسمة على 4 مجموعات ذوات 6 جرذان: المجموعات الضابطة، المجموعة المعالجة بمستخلص العلندة، المجموعة المعالجة بالسبينوساد والمجموعة المعالجة بمزيج من المستخلص والسبينوساد، لمدة شهر.

استهدفت دراستنا عدة محاور أساسية لتجريب ابتداء من تقييم عمل الانزيمات الخلية' النواقل العصبية، السلوك العصبي، الدراسة النسيجية. وختمت بتحليل الدم للتأكد من حدوث هذه السمية العصبية بعد التجريب. أظهرت النتائج نوعا من السمية العصبية لهذا المبيد المستخدم في التجربة وذلك من خلال انخفاض شديد في معدل نمو الجسم الملاحظ من خلال نقص الوزن، تغير السلوك النفسي والمزاجي الذي يتجلى حالات من القلق والسلوك العدواني، اضطراب ونقص في الذاكرة وميزة التذكر، كما كشفت دراستنا البيوكيميائية عن انخفاض في مستوى بروتين الدماغ كما أن السبينوساد أدى إلى تغير نشاطات الإنزيمات الخلية. أما بالنسبة للدراسة النسيجية ، فتعرض تغيرات هيكلية في شكل الدماغ ببقع سوداء قد تكون بقايا تدمير الأنسجة بواسطة المبيدات الحشرية. أما بالنسبة للاختبارات الدموية ، فقد وجدنا زيادة في نسبة سكر الدم و الكوليسترول في الدم واليوربا. على مستوى آخر ، تم تأكيد الآثار الوقائية العلندة المعالجة لهذه السمية من خلال النتائج التي تم الحصول عليها ، والتي تؤكد فعالية هذا النبات. كما سجلت نتائج التجارب تحسناً في وزن الحيوانات وزيادة في نسبة البروتينات ، لاحظنا أيضاً انخفاضاً في نسبة MDA و GPx وزيادة في GSH و GST و CAT و Ache. من ناحية أخرى ، لاحظنا انخفاضاً في نسبة السكر في الدم والكوليسترول واليوربا.

الكلمات المفتاحية: الزهايمر، السمية العصبية، سبينوساد، العلندة ، الدماغ.

Résumé

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurologique dégénérative chronique qui affecte le système nerveux central et endommage la mémoire en raison de nombreux facteurs environnementaux et génétiques. Certaines études épidémiologiques et toxicologiques récentes ont montré que parmi les facteurs environnementaux pouvant être causés par ceux liés à l'exposition à des pesticides de toutes sortes, en particulier pendant une longue période et en petites quantités. Dans la première partie de cette expérience, nous avons examiné l'évaluation de la neurotoxicité d'un insecticide de classe spinosynes, le spinosad, à une dose de 0,25 mg/kg/jour oralement approuvée récemment en Algérie. Quant à la deuxième partie, elle évalue l'effet préventif et curatif d'*Ephédra sinica* sur cette toxicité à la dose de 100 mg/kg/jour par voie orale. Cette expérience a été réalisée en laboratoire sur 24 rats mâles de la classe Wistar comme modèle animal d'expérimentation, répartis en 4 groupes avec 6 rats : groupes témoins, groupe traité par l'extrait de *l'éphédra sinica*, groupe traité par le spinosad et groupe traité par un mélange de l'extrait et le spinosad, pendant un mois, notre étude a ciblé plusieurs axes d'expérimentation de base, à commencer par l'évaluation du travail du vecteur des enzymes cellulaires, comportement nerveux, étude histologique. Des tests sanguins ont été nécessaires pour confirmer cette neurotoxicité après expérimentation. Les résultats ont montré une sorte de neurotoxicité de ce pesticide utilisé dans l'expérience, à travers une diminution sévère du taux de croissance du corps observé par le changement de perte de poids du comportement mental et de l'humeur qui manifeste des cas de trouble d'anxiété et de comportement agressif, un manque de mémoire et une fonction de mémorisation, comme l'a révélé notre étude biochimique. Sur un autre plan le suivi des biomarqueurs de stress a révélé d' importants effets pour la molécule, qui se sont manifestées par une induction des activités MDA, GPx, et une diminution des taux de GSH, CAT, GST et une diminution du niveau de protéines cérébrales et le Spinosad ont également entraîné des changements dans les activités enzymatiques (MDA, GPx, GST, GSH, CAT) et une diminution de l'activité acétylcholine estérase Ache. Quant à l'étude histologique, présente des modifications structurales de la forme de cerveau avec des taches noires qui peut être les restes d'une destruction tissulaire par l'insecticide. Quant à les testes hématologiques, nous avons constaté un excès de glycémie et de cholestérol dans le sang et l'urée. Sur un autre plan, nous avons évalué les effets préventifs de *l'Ephédra sinica* sur les paramètres récents après le traitement par l'insecticide. À un autre niveau, les effets préventifs de la brousse traitée de cette toxicité ont été confirmés par les résultats obtenus, qui confirment l'efficacité de cette plante. Comme les résultats des expériences ont enregistré une amélioration du poids des animaux et une augmentation du pourcentage de protéines, nous avons également observé une diminution du ratio de MDA, GPx et une augmentation de GSH, GST, CAT et Ache. D'autre part, nous avons remarqué une diminution de la glycémie, du cholestérol et de l'urée.

Mots-clés : Alzheimer, Spinosad, *Ephédra sinica*, Neurotoxicité, Cerveau

Abstract

Alzheimer's disease is a chronic degenerative neurological disease that affects the central nervous system and damages memory due to many environmental and genetic factors. Some recent epidemiological and toxicological studies have shown that among the environmental factors that can be caused by those related to exposure to pesticides of all kinds, especially for a long time and in small quantities. In the first part of this experiment, we examined the evaluation of the neurotoxicity of a spinosyn class insecticide, spinosad, at a dose of 0.25 mg/kg/day orally approved recently in Algeria. As for the second part, it assesses the preventive and curative effect of *Ephedra sinica* on this toxicity at a dose of 100 mg/kg/day orally. This experiment was carried out in the laboratory on 24 male rats divided into 4 groups with 6 rats: control groups, group treated with the extract of the ES, group treated with S and group treated with a mixture of E + S, for one month, our study targeted several basic areas of experimentation, starting with the evaluation of the work of the vector of cellular enzymes, nervous behavior, histological study. Blood tests were necessary to confirm this neurotoxicity after experimentation. The results showed a kind of neurotoxicity of this pesticide used in the experiment, through a severe decrease in the rate of growth of the body observed by the change in weight loss of mental behavior and mood manifests cases of disorder. anxiety and aggressive behavior, poor memory and a memory function, as our biochemical study revealed. On another level, the monitoring of stress biomarkers revealed important effects for the molecule, which were manifested by an induction of MDA, GPx activities, and a decrease in the levels of GSH, CAT, GST and a decrease in the level of brain proteins and spinosad have also resulted in changes in enzyme activities (MDA, GPx, GST, GSH, CAT) and a decrease in acetylcholine esterase AChE activity. As for the histological study, presents structural changes in the shape of the brain with black spots which may be the remains of tissue destruction by the insecticide. As for the hematological tests, we found an excess of glycemia and cholesterol in the blood and urea. On another level, we evaluated the preventive effects of *Ephedra sinica* on recent parameters after treatment with the insecticide. Our results have shown that *Ephedra sinica* corrects various disturbed parameters and eliminates the toxicity of Spinosad either individually or as a mixture. On another level, the preventive effects of the treated bush of this toxicity have been confirmed by the results obtained, which confirm the effectiveness of this plant. As the results of the experiments recorded an improvement in the weight of the animals and an increase in the percentage of proteins, we also observed a decrease in the ratio of MDA, GPx and an increase in GSH, GST, CAT and Ache. On the other hand, we have noticed a decrease in blood sugar, cholesterol and urea.

Keywords: *Alzheimer, Spinosad, Ephedra sinica, Neurotoxicity, Brain.*

Liste d'abréviation

µkPa	Micro kilo pascal
µl	microlitre
µmol	micromoles
%	Pourcentage
Ach	Acétylcholine
Ache	Acétylcholine estérase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPA	Acide aminométhylphosphonique
APP	Protéine Précurseur de l'amyloïde
Apo E	Apolipoprotéine E
ASS	Acide sulfosalicylique
B₁₂	Vitamine B12
BBC	Bleu Brillant de Coomassie
BHT	Butylated hydroxytoluene
BSA	Albumine de sérum de boeuf
Ca²⁺	Le calcium
CAT	Catalase
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzène
Cl	Le chlore
CL₅₀	Concentration Létale 50
cm	Centimètre
CO₂	dioxyde de carbone
CO₃HNa	Bicarbonates de sodium
Cu	cuivre
DDT	dichlorodiphényltrichloroéthane
DL₅₀	Dose létale 50
DNF	Dégénérescences neurofibrillaires
DRO	dérivés réactifs de l'oxygène
DTNB	l'acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobénzoïque
E	Extrait
ECBU	Examen cyto bactériologique des urines
ED	Eau distillée
EDTA	Acide éthylène diamine tétracétique
ERO	espèces réactives de l'oxygène
ES	Ephedra Sinca
Fe	fer
g	gramme
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
GCL	Glutamate Cystéine ligase
GP	Gain de poids
GPx	Glutathion peroxydase
GOD	Glucose oxydase
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
GST	Glutathion S-Transférase
H	Hydrogène
H₂O	L'eau
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène

HAP_s	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HCB	Hexachlorobenzène
HCH	L'hexachlorocyclohexane
HCL	L'acide chlorhydrique
HDL	High Density Lipoproteins
HTA	Hypertension artérielle
IRM	L'imagerie par résonance magnétique
K⁺	Le potassium
Kow	Coefficient de partage octanol/eau
KPa	kilopascal
LDH	Lactate déshydrogénase
LDL	Low-density lipoproteins
LPO	Lipide peroxyde
LSD	Le diéthyllysergamide
M	Molarité
MA	Maladie d'Alzheimer
MAO	Monoamine-oxydase
MDA	Malon dialdéhyde
mg	Milligramme
min	Minute
ml	Millilitre
mm	Millimètre
mM	Millimolarité (mol/l)
mmol	milimole
MP	Maladie de Parkinson
NA	Noradrénaline
NaH₂PO₄	Sodium phosphate monobasic dihydrate
Na₂HPO₄	Sodium phosphate dibasic
NaCl	chlorure de sodium
NaClO	hypochlorite de sodium
NADP	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH	Nicotinamide-adéninedinucléotide-phosphate réduit
NC2+	Cellules gliales (Cellules exprimant le protéoglycane NG2)
nm	Le nanomètre
NMDA	acide N-méthyl-D-aspartique
nmol	nanomole
NH₄⁺	L'ion ammonium
O₂	Oxygène
O₂^{*-}	Radical Superoxyde (anion superoxyde)
OE	Oligoélément
OFT	Open Field Test
PC	Poids corporel
PCBs	Polychlorobiphényles
PF	Poids Final
pH	potentiel hydrogène
PI	Poids initial
POD	Peroxydase
POP	Polluants organiques persistants
PRc	Poids relatif du cerveau

S	Spinosad
Se	Sélénium
Sec	Seconde
Sf9	Spodeptera Frugiperda cells
SN	Système nerveux
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
SOD	Super oxyde-dusmitase
SSA	L'acide sulfosalicylique
t/min	Tour/minute
T	Témoin
TBA	L'acide thiobarbiturique
TBS	Tert-butyldiméthylsilyle
TCA	Trichloracétique
TEP	Tomographie par Émission de Positons
TSH	La thyroestimuline
U.I	Unité internationale
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
VLD	Very low-density lipoprotéine
Zn	Zinc

Liste des figures

Figure N°	Titre de figure	Page N°
01	Classification basée sur la toxicité des pesticides	12
02	Modes d'exposition des organismes vivant aux pesticides	13
03	Structure de (a) spinosyne A et (b) spinosyne D. Spisonyn D a un groupe latéral méthyle sur C6	17
04	Coupe sagittale du cerveau	21
05	Schéma de la structure du neurone	23
06	Schéma de cellules gliales	24
07	Comparaison entre un cerveau d'un sujet sain et d'un malade d'Alzheimer	28
08	Désintégration des microtubules et accumulation des protéines Tau	29
09	Comparaison anatomique cerveau sain/cerveau atteint d'Alzheimer	31
10	Exemple de cerveau d'une personne saine (a) et d'une personne atteint (b) de la maladie d'Alzheimer (c)	33
11	Mécanisme d'action des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase	39
12	Schéma générale de <i>l'Ephedra sinica</i>	43
13	La structure d'éphédrine	48
14	Structure de noréphédrine	48
15	Structure de pseudoéphédrine	49
16	Les feuilles de <i>l'Ephedra Sinica</i> .	52
17	Rat Wistar pendant les essayes	53
18	Cage d'élevage des rats.	53
19	Montage de l'extraction par clevenger	54
20	Traitement des rats par voie oral.	56
21	Prise du poids des rats en utilisant la balance analytique	57
22	Les instruments du test d'open Field	58
23	Teste nage forcée.	59
24	Teste de sucrose.	60
25	Les étapes de technique perfusion.	61
26	Extraction du cerveau	62
27	Prélèvement le Sang	62
28	Schéma récapitulatif du protocole expérimental	63
29	Prise du poids les organes des rats	64
30	Evolution du poids corporel (PC) chez les différents groupes traités durant un mois par le spinosad et à l'ephedra E. (A) : changement cinétique du poids. (B) : Différence des poids total entre les différence groupes des rats.	74
31	La différence entre poids initial et final chez les différents groupes traités durant un mois par le Spinosad S et à l'Ephedra E.	75
32	Evolution du gain de poids corporel (GP) chez les rats témoins et traités après un mois de traitement par le pesticide (S) et l'Ephedra (E).	76
33	Evolution du poids relatif du cerveau (PRc) chez les rats traités durant un mois par le pesticide (S) et l'Ephedra (E).	77

34	Variation de taux des protéines cérébrale (mg/g) chez les rats témoins et traités après Un mois de traitement.	79
35	Variation du taux de MDA ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) chez les rats témoins et traité après un mois de traitement	80
36	Variation de l'activité enzymatique de Catalase ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) chez les rats témoins et traité après un mois de traitement.	80
37	Variation du taux de GPx cérébrale ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) chez les rats témoins et traités après un mois de traitement.	81
38	Variation du Taux de GSH ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protéine) chez les rats témoins et traités par spinosad, l'Ephedra et E+S après un mois de traitement.	82
39	Variation de l'activité de GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) chez les rats témoins et -Effet de spinosad et l'Ephedra sinica après un mois de traitement.	83
40	Variation de l'activité de AchE (nmol/min /mg) chez les rats témoins et Effet de spinosad et l'Ephedra sinica après un mois de traitement.	86
41	Variation des données du test Open Field chez les rats traités durant un mois par le spinosad et l'Ephedra. (A): Temps de latence ; (B): Groning ; (C): Rearing ; (D): fréquence déambulation	87
42	Variation du test de préférence au sucrose et de la consommation d'eau sucrée chez les rats traités durant un mois par le pesticide S et l'Ephedra E.	89
43	Variation du test de nagé forcée chez les rats traités durant un mois par le pesticide S et l'Ephedra E.	90
44	Coupes histologiques ($\times 40$) dans le cerveau totale des rats témoins et traités par l'Ephedra sinica (ES) et Spinosad (S) et leurs combinaisons après 30 jours.	91
45	Coupes histologiques ($\times 40$) dans le cerveau totale des rats témoins et traités par l'Ephedra sinica (ES) et Spinosad (S) et leurs combinaisons après 30 jours.	92
46	L'effet de Spinosad et l'Ephedra sur le taux de glycémie.	93
47	L'effet de Spinosad et l'Ephedra sur le taux d'urée.	94
48	L'effet de Spinosad et l'Ephedra sur le taux de cholestérol.	94
A	Annexe: Courbe d'étalonnage pour dosage des protéines.	128

Liste des tableaux

Tableau N°	Titre de tableau	Page N°
01	Classification du pesticide en fonction de leur cible	09
02	Classification basée sur la toxicité des pesticides	10
03	Liste des principales classes d'insecticides utilisées à ce jour	14
04	Propriétés structurales et physicochimiques du spinosad	16
05	Propriétés physiques et chimiques du spinosyne A et spinosyn D	18
06	Quelque neurotransmetteur important.	25
07	Les premiers symptômes	31
08	Échelle de détérioration globale de Reisberg	38
09	La nomenclature de <i>l'ephedra sinica</i>	45
10	Classification systémique de <i>l'Ephedra sinica</i>	45
11	Variation des poids corporel PC, Gain de poids GP, poids relatifs du cerveau PRc chez les rats témoins et traités Ephedra Sinica (E), Spinosad (S) et Spinosad+Ephedra (E+S) après un mois de traitement	77
12	Variation du taux des protéines cérébrales chez les rats dans les différents lots expérimentaux ($m \pm \delta$).	78
13	Variation cytosolique des Glutathion (GSH), Malon dialdéhyde (MDA), l'activité enzymatique de la Glutathion peroxydase (GPx), Glutathion S transférase (GST), et la catalase (CAT) dans le cerveau total chez les rats témoins et traités Ephedra Sinica (E), Spinosad (S) et Spinosad+Ephedra (E+S) après un mois de traitement	84
14	Activités du taux de AchE chez les rats dans les différents lots expérimentaux ($m \pm \delta$).	85
15	Variation des données de test d'Open field (Temps de latence (Sec), Groning, Rearing, fréquence déambulation) chez les rats témoins et traités Ephedra Sinica (E), Spinosad (S) et Spinosad+Ephedra (E+S) après un mois de traitement	88
16	Variation des données de test de nagé forcée et test de sucrose chez les rats témoins et traités <i>Ephedra Sinica</i> (E), Spinosad (S) et Spinosad+Ephedra (E+S) après un mois de traitement.	90
17	Variation des paramètres hématologique (glycémie, taux d'urée, cholestérol) chez les rats témoins et traités <i>Ephedra Sinica</i> (E), Spinosad (S) et Spinosad+Ephedra (E+S) après un mois de traitement.	95
A	Annexe: Réalisation de la courbe d'étalonnage pour dosage des protéines.	128

Sommaire

Introduction **02**

Partie bibliographique

Chapitre I: Pesticides

1. Généralités sur les pesticides **08**

1.1. Définition **08**

1.2. Classification des pesticides **08**

1.2.1. Selon leur cible **08**

1.2.2. Selon la toxicité **09**

1.2.3. Classification selon le groupe chimique **10**

1.2.4. Selon leur persistance dans l'environnement **10**

1.3. Utilisation des pesticides **11**

1.4. Pesticides dans l'environnement **11**

1.5. Modes d'expositions aux pesticides **12**

2. Insecticides **13**

2.1. Définition des insecticides **13**

2.2. Les différentes familles d'insecticides et leurs modes d'action **13**

3. Spinosynes **15**

3.1. Exemple de spinosynes (Spinosad) **15**

3.2. Propriétés des spinosad **17**

3.3. Toxicocinétique de spinosad **18**

3.4. Toxicité de spinosad **18**

Chapitre II : Neurotoxicité

1. Généralités sur neurotoxicité **21**

1.1. Le cerveau **21**

1.1.1. Histologie du cerveau **22**

1.1.2. Composition cellulaire du cerveau	22
2. Fonctionnement du système nerveux	24
3. Majeurs pathologies neuronales	26
4. Apprentissage, Mémoire et Langage	26
4.1. Anatomie de langage	26
4.2. Anatomie de la mémoire	26
4.2.1. Mémoire à court terme	27
4.2.2. Mémoire à long terme	27
5. Alzheimer	28
5.1. Définition	28
5.2. Physiopathologie	28
A. Atrophie cérébrale	28
B. Les lésions cérébrales dans la MA	29
C. Plaques séniles	30
D. Atteinte des systèmes de neurotransmetteurs.	30
5.3. Symptômes d'Alzheimer	32
5.4. Diagnostic de la MA	32
5.4.1. L'entretien	32
5.4.2. Examen clinique...	32
5.4.3. Imagerie cérébrale: IRM	32
5.4.4. TEP	33
5.4.5. Dosage sanguin	33
5.5. Facteurs de risque de la MA	33
5.6. Les stades de la maladie.	37
5.7. Prise en charge et traitement	38
5.7.1. Traitement médicamenteux	38

5.7.2 Traitement non médicamenteux	39
6. Neurotoxicité de spinosad	40

Chapitre III : *Ephedra Sinica*

Introduction	42
1. Généralité	42
2. Généralités sur la plante	42
2.1. Genre <i>Ephedra</i>	42
3. Sous espèce <i>Ephedra sinica</i>	43
3.1. Définition	43
3.2. Utilisation	44
3.3. Nomenclature	44
3.4. Classification systématique d' <i>Ephedra sinica</i>	45
3.5. Description botanique	45
3.6. Utilisation d' <i>ephedra sinica</i>	46
3.7. Composition chimique d' <i>ephedra sinica</i>	46
3.8. Métabolite secondaire d' <i>ephedra sinica</i>	47
3.8.1. Mécanisme d'action des alcaloïdes d'éphédrine	47
3.8.2. Structure et fonction du métabolite	47
3.9. Valeur nutritionnelle de <i>l'ephedra sinica</i>	49

Partie pratique

1. Matériels et méthodes

1. Matériels et méthodes	52
1.1. Matériels	52
1.1.1. Matériel chimique	52
1.1.2. Matériel végétale	52
1.1.3. Modèle biologique	52

1.2. Méthodes	53
1.2.1. Entretien des animaux	53
1.2.2. Extraction des huiles essentielles	54
1.2.3. Lotissement et traitement	55
1.2.3.1. Choix des doses	55
1.2.3.2. Répartition des rats	55
1.2.3.3. Traitement	55
1.2.4. Evaluation de la neurotoxicose d'un pesticide et effet anti-Alzheimer de l'extrait de l'Ephedra	56
a. Mesure de poids	56
b. Etude neurocomportementale.	57
1.2.5. Technique de perfusion pour étude histologique	60
1.2.6. Sacrifice	62
1.2.7. Estimation du poids relatif du cerveau	64
1.2.8. Préparations des échantillons	64
3. Méthodes de dosage	64
3.1. Paramètres métaboliques	64
3.2. Paramètres du stress oxydant	65
3.3. Dosage d'Ache	68
3.4. Etude histologique	69
3.5. Paramètres hématologiques	69
4. Études statistiques.	71

Résultats

2. Résultats	73
2.1. Effets du spinosad et l'ephedra sur les paramètres de la croissance globale des animaux	73
2.1.1. Poids corporel	74

2.1.2. La différence entre poids initial et final	75
2.1.3. Gain de poids (GP)	76
2.1.4. Poids relatif du cerveau (PRc)	76
2.2. Étude des paramètres biochimiques et enzymatiques	78
2.2.1. Effet du spinosad et l'Ephedra sur les paramètres biochimiques chez les rats..	78
2.2.2. Effet du Spinosad et l'Ephedra sur les paramètres enzymatiques chez les rats	79
2.3. Effets des pesticides et de la spinosad et <i>l'ephedra sinica</i> sur le neurotransmetteur (Ache) dans le cerveau total.	85
2.4. Effets du pesticide et l'Ephedra sur le neurocomportemental chez le rat	86
2.4.1. Test de «Open field ».	86
2.4.2. Test de préférence au sucre	89
2.4.3 Test de nage forcée	90
2.5. Histologie du cerveau total (Topographie du cerveau)	91
2.6. Paramètres hématologiques chez les rats	92
2.6.1. Glycémie	92
2.6.2. Taux d'urée	93
2.6.3. Cholestérol	94
3. Discussion	
3. Discussion	97
3.1. Effets de spinosad et <i>l'ephedra sinica</i> sur les paramètres de la croissance globale	97
3.2. Effets de spinosad et l'ephedra sinca sur les paramètres biochimiques	98
3.3. Effets de spinosad et l'ephedra sinica sur le statut redox	98
3.3.1. Effets sur le taux Malondialdéhyde (MAD)	99
3.3.2. Effets sur le taux de catalase (CAT)	100

3.3.3. Effets sur le taux de GPx	100
3.3.4. Effets sur le taux de GSH	101
3.3.5. Effets sur le taux de GST	101
3.4. Effets de spinosad et l'ephedra sinica sur la neurotransmission cérébrale.	102
3.5. Effets de spinosad et l'ephedra sinica sur le neuro-comportement des animaux	103
3.6. Effets de spinosad et l'ephedra sinica sur l'histologie cérébrale	105
3.7. Effets de spinosad et l'ephedra sinica sur les paramètres hématologiques	105
Conclusion et perspectives	108
Référence	111
Annexe	128

Introduction



Introduction

L'intensification et le maintien d'une production agricole conséquente nécessite à l'usage de produits phytosanitaires destinés à protéger les cultures contre des agents extérieurs non désirables (**Queyrel, 2014**). Le terme "pesticide" est une appellation générique couvrant toutes les 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 (**Gasmi, 2018**). Par contre, ils sont considérés comme des facteurs de risque pour la santé chez l'homme. De nombreuses études épidémiologiques montrent en effet une association entre l'exposition professionnelle aux pesticides et l'apparition de pathologies graves telles que certains cancers, maladies neurodégénératives, comme les maladies de Parkinson et d'Alzheimer. Au sein de la famille des pesticides, les insecticides sont souvent les plus incriminés pour leur caractère neurotoxique. Néanmoins, leurs mécanismes de neurotoxicité et leur impact en santé publique demeurent largement inexplorés (**Payrastra, 2019 ; Thany et al., 2013**)

Sont nommés insecticides, les substances actives ayant la propriété de tuer les insectes, leurs larves ou leurs œufs, mais aussi plus généralement les arthropodes. Ils sont classés par famille en fonction de leur mode d'action. Les cibles potentielles des insecticides sont nombreuses: système nerveux central, le métabolisme respiratoire ou le métabolisme hormonal (**Vanessa, 2014**). Ils sont capables de tuer des insectes en pénétrant dans leur corps par contact direct (entrée cutanée), orale et/ou respiratoire. La plupart des insecticides chimiques utilisés aujourd'hui sont des neurotoxiques, et agissent en empoisonnant le système nerveux de l'organisme cible (**Jose et al., 2017**). Au cours de ces dernières années de nombreuses familles d'insecticides sont apparues. Elles peuvent être classées par groupe selon leurs modes d'action et la cible visée. Ces cibles sont variées et correspondent à des enzymes, des protéines, des canaux, des récepteurs....etc. Le récepteur nicotinique à l'acétylcholine (nAChR) est la cible des néonicotinoïdes et des spinosynes (**Fanny L, 2013**). La neurotoxicité de ces insecticides se manifeste par le blocage de la propagation de l'influx nerveux au niveau des neurones et des synapses, tant au niveau du système nerveux central que périphérique. Action sur la transmission axonale de l'influx nerveux comme la famille des organochlorés, et les pyréthrianoïdes de synthèse. Action sur les synapses et les neuromédiateurs comme les organophosphorés et les carbamates agissent au niveau des synapses cholinergiques, et les néonicotinoïdes, chloronicotiniles, spinosynes et la nicotine ont une action similaire car ce

sont des agonistes du récepteur cholinergique. Les symptômes d'intoxication par les substances neurotoxiques sont les suivants: période de latence, hyperexcitation, manque de coordination, tremblements, convulsions, prostration, mort (**Dorothee, 2011**).

Les spinosynes sont un grand groupe de composés lactoniques macrocycliques qui ont une activité insecticide à large spectre. Elles sont issues de la fermentation de *Saccharopolyspora spinosa* et sont actifs contre de nombreuses espèces de ravageurs économiquement importants. Les spinosynes les plus abondantes du bouillon de fermentation sont la spinosyne A et la spinosyne D, collectivement appelé spinosad, et comprennent l'ingrédient dans les produits de spinosad (**Ted et al., 2019**). Le spinosad fournit un contrôle très efficace des insectes nuisibles agricoles de nombreux corps en raison de ses caractéristiques uniques ciblant l'acétylcholine nicotinique (**Yang et al., 2019**). Le spinosad possède un mode d'action de type neurotoxique nouveau et unique (**Maiza et al., 2011**).

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, le terme de démence est défini comme «un syndrome, généralement chronique ou évolutif, dans lequel on observe une altération de la fonction cognitive, plus importante que celle que l'on pourrait attendre du vieillissement normal. Elle affecte la mémoire, le raisonnement, l'orientation, la compréhension, le calcul, la capacité d'apprentissage, le langage et le jugement ; la conscience, elle, n'est pas touchée». Il existe différents types de démence tel que les démences vasculaires, les démences à corps de Lewy, les dégénérescences lobaires frontotemporales ainsi que la plus connue et la plus fréquente : la maladie d'Alzheimer (**Alice, 2016**). La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative à progression lente trouble qui commence par une légère perte de mémoire et se termine par de graves altération des fonctions exécutives et cognitives (**Hansruedi et al., 2019**). La MA se caractérise par plusieurs aspects, à la fois cliniques, structurels, fonctionnels, et physiologiques (**Laure, 2012**). L'altération de la neurotransmission de l'acétylcholine centrale (ACh) due à la dégénérescence neurale est considérée comme une principale caractéristique neuropathologique de la maladie d'Alzheimer (**Singh et al., 2010**), qui touche 4 millions de personnes à travers le monde (100 000 cas en Algérie) dont 20 % ont plus de 85 ans. Un nouveau cas est diagnostiqué toutes les sept secondes, et il est probable que cette fréquence augmente dans les années à venir à cause du vieillissement de la population. A l'heure actuelle, il n'existe pourtant aucun traitement curatif. Seules des stratégies destinées à atténuer les symptômes de la maladie sont proposées. L'une d'elles consiste à augmenter le taux d'acétylcholine dans le cerveau en inhibant

l'acétylcholinestérase, enzyme responsable de la dégradation de ce neurotransmetteur **(Lamamra, 2018)**.

Les plantes constituent un réservoir de composés biologiquement actifs ayant été utilisés par l'Homme depuis l'aube de l'Humanité. Le développement des connaissances médicales et chimiques ont permis à l'Homme d'en faire des médicaments **(Meriane, 2018)**. Ils produisent un grand nombre de métabolites secondaires, avec une large gamme de propriétés pharmacologiques et toxicologique .Actuellement si on évalue environ 500000 espèces végétales dans le monde, un nombre relativement infime a été étudié sur le plan chimique ou pharmacologique **(Boughrara, 2016)**

Ephedra sinica, une plante importante de la médecine traditionnelle chinoise, contient un complexe mélange d'oligomères de proanthocyanidine comme principaux constituants ; cependant, seuls les composants mineurs ont été chimiquement caractérisés **(Orejola et al., 2017)**, il utilisée depuis des milliers d'années pour ses qualités médicinales en tant que diaphorétique, diurétique, anti asthmatique pour traiter les allergies, l'asthme, la pneumonie, la bronchite **(Yonggang et al., 2011)**. Tous les tissus aériens de cette plante accumulent les alcaloïdes de l'éphédrine, les tiges accumulant les quantités les plus élevées, jusqu'à 3% du poids sec **(Kilpatrick et al., 2016)**. il y a plusieurs familles d'alcaloïdes ayant des propriétés biologiques intéressantes, en particulier les alcaloïdes d'Amaryllidaceae (Ex: la galanthamine, inhibiteur de l'acétylcholinestérase, intéressante pour le traitement de la maladie d'Alzheimer), les morphinanes (Ex: la morphine, puissant analgésique utilisé en médecine), les strychnos (Ex: la strychnine, poison puissant agissant sur le système nerveux central), les alcaloïdes d'Aspidosperma ou pseudo iboga (Ex: la vindoline, précurseur synthétique de la vinblastine, médicament utilisé dans le traitement de certains cancers) **(Dunet, 2009)**.

Dans ce contexte le présent travail est consacré a présenté l'effet neuro-protecteur anti-Alzheimer de l'extrait de *ephedra sinica* contre la toxicité de spinosad chez les rats. Ce travail est structuré en deux parties :

- ✓ La première partie est théorique. Elle est consacrée aux rappels bibliographiques sur les pesticide en générale particulièrement le Spinosad et leur propriétés et toxicité, suivi par une vue sur la maladie d'Alzheimer physiopathologie, diagnostic, les stades, traitement. A la fine de cette partie nous évoquons *l'ephedra sinica* sa classification, composition chimique, et leur utilisation.
-

Introduction

- ✓ La deuxième partie pratique décrit les matériels et les méthodes d'extraction, traitement des rats, le dosage et l'évaluation des activités antioxydants et de l'effet de *Ephedra sinica* sur la toxicité de Spinosad et la présentation des résultats obtenus et leurs discussions. Elle est aussi conclure par conclusion et perspectives de cette étude.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE





Chapitre I

les pesticides



1. Généralités sur les pesticides

1.1. Définition

Le terme pesticide dérive du « Pest », mots anglaise désignant tout organisme vivant (virus, bactéries, champignons, herbes, vers, mollusques, insectes, rongeurs, mammifères, oiseaux), et le terme «-cide» vient du mot latin qui signifie «tuer» (**Saadane, 2018 ; Ayilalath et Jyothis, 2020**). Un pesticide (ou biocide) est un produit chimique organique ou minéral, utilisé pour empêcher d'agir, détruire ou neutraliser un ravageur, un vecteur de maladie humaine ou animale, une espèce végétale ou animale nocive (**Hocinat, 2018 ; Belhaouchet, 2014**). Ce terme désigne assez clairement la notion de toxique pour la vie (**Marie, 2019**). Ils sont largement utilisés en agriculture pour contrôler tous les insectes dans le monde avec plus de 10000 formulations commerciales d'environ 450 composés pesticides actuellement utilisés (**Gasmi et al., 2017**).

1.2. Classification des pesticides

Les pesticides présentent une très grande diversité de caractéristiques physiques, chimiques, structurales et fonctionnelles et identiques les unes des autres. Par conséquent, ils sont classés en fonction de ces propriétés (**Rajveer et al., 2019 ; Gaëlle, 2014**). Il y a plusieurs façons pour les pesticides d'entrer dans la cible des organismes tels que les poils gastriques systémiques. Aussi, comprendre la nature des ingrédients actifs, y compris leur efficacité, leur et les propriétés chimiques sont essentielles pour regrouper les pesticides basés sur la composition chimique (**Nurul et al., 2019**). De plus, le mécanisme d'action de certains pesticides n'est pas complètement élucidé (**Gasmi, 2018**).

1.2.1. Selon leur cible

Les pesticides peuvent être classés en fonction du type d'organisme qu'ils combattent (*tab.01*), ils pourraient être des herbicides ont été créés pour lutter contre les espèces végétales adventices, des insecticides luttent contre les insectes, des fongicides eux sont destinés aux champignons, des acaricides pour tuer les acariens, en hélicides ou molluscicides pour éradiquer les nématocères, rodenticides ou raticides pour combattre les rongeurs vertébrés, etc (**Cruz, 2015 ; Utip et al., 2013 ; Gasmi, 2018**).

Tableau 01. Classification du pesticide en fonction de leur cible (Ayilalath and Jyothis, 2020).

Type de pesticide	Cible
Bactéricide	Bactéries
Défoliant	Feuillage des cultures
Déshydratant	Séchage des cultures
Fongicide	Champignons
Herbicides	Plantes
Insecticides	Insectes
Acaricides	Acariens et tiques
Molluscicides	Limaces et escargots
Nematode	Nematodes
Rodenticide	Rongeurs

1.2.2. Selon la toxicité

Cette classification est basée sur le danger que présentent les pesticides à court terme (toxicité aiguë) après l'utilisation d'une dose létale DL_{50} , tandis qu'une exposition répétée à un pesticide fait Toxicité chronique. Le mode d'entrée des pesticides dans le corps, comme par voie orale, par voie cutanée ou par inhalation, peut déterminer la DL_{50} . Ce détail est estimé à humains. La valeur inférieure de DL_{50} signifie que le pesticide est plus toxique pour l'homme (Mairif ,2015 ; Ayilalath et Jyothis, 2020). En fonction du niveau de toxicité, les pesticides sont classés et indiqués par mots appropriés (*tab. 02*).

Tableau 02. Classification basée sur la toxicité des pesticides (Ayilalath et Jyothis, 2020).

Catégories	Propriétés
Catégories I	<u>Contenir des mots indicateurs - Danger / poison</u> De plus, un symbole de crâne et d'os croisés est requis sur les étiquettes pour pesticides de catégorie I, qui sont décrits comme hautement toxiques. Ces pesticides ont une DL ₅₀ orale aiguë comprise entre 0 et 50 mg/kg
Catégorie II	<u>Contenir un mot d'avertissement – avertissement</u> Les pesticides de cette catégorie sont décrits comme modérément toxiques et a une DL ₅₀ orale aiguë comprise entre 50 et 500 mg/kg
Catégorie III	<u>Contenir un mot d'avertissement — Attention</u> Pesticides légèrement toxiques avec une DL ₅₀ orale aiguë de 500 à 5000 mg/kg
Catégorie IV	<u>Contenir un mot d'avertissement — Attention</u> Pesticides à très faible toxicité qui a une DL ₅₀ orale aiguë supérieure plus de 5000 mg/kg

1.2.3. Classification selon le groupe chimique

Les pesticides peuvent être classés selon leur nature chimique (organochlorés, organophosphorés, thiocarbamates, pyrethroïdes synthétiques, phenylamides, triazine, phenoxyalkonates, phtalimides, dipyrides, ...). Ces familles sont établies en fonction du groupe fonctionnel principal de la molécule, ce qui est utile pour comprendre ses propriétés physico-chimiques mais non suffisant (Marie, 2019, Crux, 2015 ; Nurul et al., 2019 ; Roknul et al., 2020).

1.2.4. Selon leur persistance dans l'environnement

Les pesticides sont classés en deux types principaux :

- **Les polluants organiques persistants (ou POP en abrégé) :** se dégradent lentement dans l'environnement. Selon la Convention de Stockholm 55 qui vise à interdire certains de ces produits, ils sont persistants, bioaccumulables, toxiques et mobiles. La classification de Polluants Organiques Persistants (POPs) regroupe tous est polluants conservatifs (HAPs, PCBs, dioxines, furans, dieldrine, chlordane, DDT, HCH, HCB, lindane, endrine, aldrine, Mirex, toxaphene, chlordeone, heptachlore) (Nicolas, 2020 ; Belhaouchet, 2014).
- **Les polluants non conservatifs (non persistants) :** qui, à terme, disparaissent : ce sont la matière organique, les sels nutritifs, les bactéries, les virus, les polluants organiques biodégradables (certains hydrocarbures, détergents et produits phytosanitaires) (Belhaouchet, 2014).

1.3. Utilisation des pesticides

Les pesticides sont essentiels à la production agricole moderne car ils peuvent efficacement réduire ou contrôler une variété de ravageurs agricoles qui peuvent endommager les cultures et le bétail et diminuer la productivité agricole, pour améliorer les rendements des cultures (Ayilalath et Jyothis, 2020). L'utilisation de ces produits a augmenté au cours des dernières décennies, et l'impact potentiels de ces contaminants sur les aliments et l'environnement le diabète, les troubles génétiques, le cancer et la neurotoxicité (Roknul et al., 2020).

L'année 2012 par exemple a été marquée par une vague de froid en février, un printemps pluvieux et une fin d'été chaude, ce qui a eu pour conséquence d'augmenter la pression des maladies fongiques, et donc le recours aux fongicides (Crux, 2015). Ils sont notamment largement utilisés en agriculture pour protéger les cultures, une protection souvent nécessaire et parfois obligatoire (Mamane, 2015). Les pesticides se sont révélés être un outil essentiel en agriculture et santé publique. Le fait est cependant que les cibles des pesticides sont souvent partagées entre les ravageurs et espèces non ciblées, y compris les humains. C'est particulièrement vrai pour l'organochloré neurotoxique, organophosphoré, et les pesticides pyréthrinés (Jason et al., 2019).

1.4 Pesticides dans l'environnement

Bien que les principales cibles des pesticides soient les végétaux, il est estimé que seulement 0,1% des quantités appliquées atteignent ceux-ci. Les voies de dispersion et de transfert sont nombreuses (fig.01). Les gouttelettes de pesticides 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. Lors de l'application, les pesticides peuvent être entraînés par dérive loin des zones de culture visées ou être directement volatilisés vers l'atmosphère. La revolatilisation 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 (Belhaouchet, 2014).

Deux voies d'entrée principales dans les sols existent pour les pesticides : une voie directe, correspondant à la fraction de pesticide non interceptée par la couverture végétale lors de l'épandage, et une voie indirecte, via les plantes. Une fois sur le sol, les pesticides subissent différents processus influençant leur transport (adsorption, volatilisation, lixiviation et lessivage sur la surface du sol) et leur persistance (transformations/dégradations biotique et abiotique). Le devenir des pesticides est ainsi dépendant des propriétés physico-chimiques

propres de chaque molécule, des propriétés du sol et des conditions climatiques (Carles, 2016).

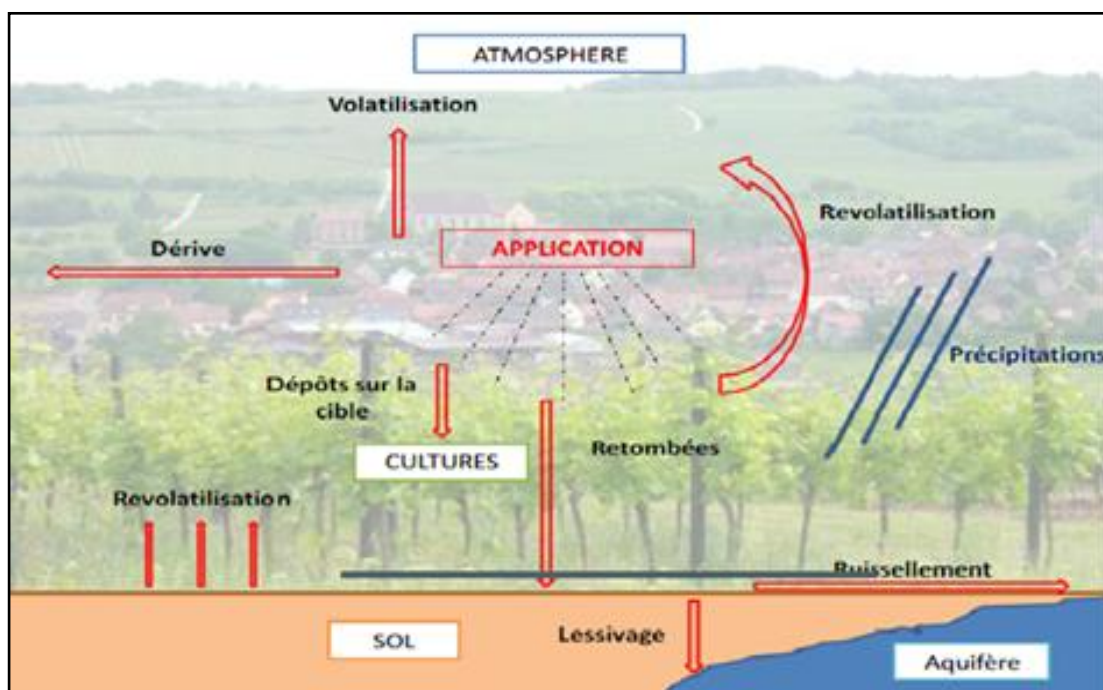


Figure 01. Classification basée sur la toxicité des pesticides (Belhaouchet, 2014).

1.5. 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 (Gasmî, 2018). Les pesticides et leurs résidus ne représentent donc qu'une part des « toxiques » que nous ingérons, l'ingestion ne représentant ailleurs pour les pesticides qu'une des voies de pénétration, la voie respiratoire ou cutanée étant celle à laquelle sont essentiellement exposés les professionnels, producteurs et utilisateurs (Saadane, 2018).

Les pesticides peuvent contaminer les organismes vivants via multiple voies d'exposition (fig.02).

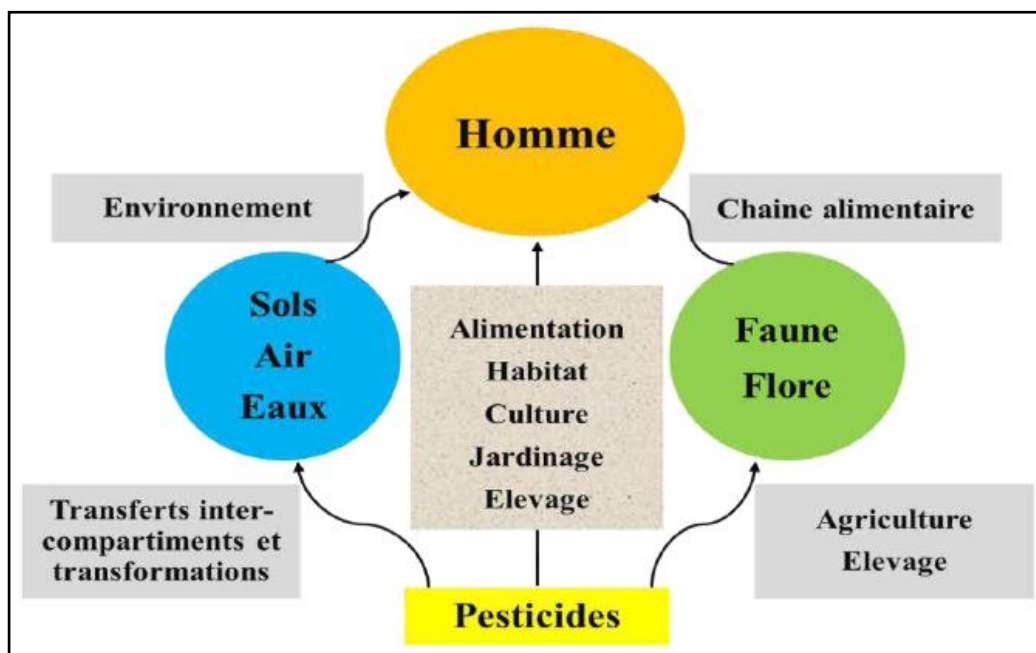


Figure 02. Modes d'exposition des organismes vivants aux pesticides (Gasmi, 2018).

2. Insecticides

2.1. Définition des insecticides

Les insecticides sont des substances qui permettent l'élimination des arthropodes. Ils peuvent être utilisés contre les larves et/ou les œufs (larvicides) ou encore contre les adultes. Ils doivent être nocifs vis à vis des insectes ravageurs mais aussi relativement inoffensifs pour les organismes non cibles (Fanny, 2013). Les insecticides luttent contre les insectes, en bloquant leur développement, en empêchant leur reproduction ou en interférant avec leur système nerveux (Cruz, 2015). Cependant, la majorité de ces produits sont toxiques et difficilement biodégradables. Leur utilisation excessive peut entraîner des risques et quelques fois des conséquences néfastes pour toutes les composantes de l'environnement (Hamlet et al., 2019).

2.2. Les différentes familles d'insecticides et leurs modes d'action

Au cours de ces dernières années de nombreuses familles d'insecticides sont apparues. Elles peuvent être classées par groupe selon leurs modes d'action et la cible visée (Fanny, 2013).

Tableau 03. Liste des principales classes d'insecticides utilisées à ce jour (Fanny, 2013).

Cible	Action	Familles	Exemples de molécules
Croissance et développement	Biosynthèse de la chitine	Benzoylurées	Chlorfluazuron, diflubenzuron,
	Récepteur à l'ecdysone	diacylhydrazines	Chromafénozide, halofénozide
Respiration cellulaire	ATP synthase mitochondriale		Azocyclotine, cyhexatine
	Transport des électrons dans la mitochondrie		Acequinocyl, phosphine
	Acétyl CoA carboxylase		Spirodiclofène, spiromésifène
Intestin			Bacillus thuringiensis
Système nerveux	Canal sodium voltage-dépendant	organochlorés	DDT, méthoxychlore
		pyréthrinoides	Deltaméthrine
	Acétylcholinestérase	Organophosphorés	Malathion, parathion
		carbamates	Carbaryl, thiocarbe
	Récepteur nicotinique à l'acétylcholine	Néonicotinoïde	Acétamipride
		spinosynes	Spinosad , spinétorame
	Récepteur GABA ergique	phénylpyrazoles	éthipole, fipronil
		organochlores	Chlordane
	Récepteur à l'octopamine		Amitraze
	Récepteur à la ryanodine	diamines	chlorantraniliprole

3. Spinosynes

Les spinosynes sont un grand groupe de composés lactoniques macrocycliques qui ont une activité insecticide à large spectre, qui sont non volatils, ont une faible solubilité dans l'eau, résistent à l'hydrolyse jusqu'à pH 5 qui augmente lentement au-delà de ce pH et montrent une photolyse aqueuse rapide à pH 7,0 et ont une demi-vie inférieure à un jour. Ces caractéristiques le rendent idéal pour une utilisation comme larvicide. Elles sont issues de la fermentation de *Saccharopolyspora spinosa* et sont actifs contre de nombreuses espèces de ravageurs économiquement importants. Les spinosynes les plus abondantes du bouillon de fermentation sont la spinosyne A et la spinosyne D, collectivement appelé spinosad, et comprennent l'ingrédient dans les produits de spinosad (Ted et al., 2019 ; Kamaraju et Poonam, 2018).

3.1. Exemple de spinosynes (Spinosad)

De nouveaux insecticides synthétiques ont été développés ces derniers temps décennies, et de nombreux insecticides conventionnels ont été supprimés du marché mondial. Spinosad, une molécule du groupe des spinosynes, est une lactone macrocyclique qui agit à travers contact et ingestion chez les insectes (Valdeir et al., 2020). Spinosad est le premier membre de la classe Naturalyte Dow Agro science des insecticides et c'est un mélange de les neurotoxines seront tétra macrolides cycliques (Belhaouchet et al., 2012). Le spinosad est un mélange de produits naturels de deux composés, le spinosyne A (le composant principal) et le spinosyne D (le composant mineur), qui est synthétisé à partir du processus de fermentation aérobie produit par l'actinomycète du sol *Saccharopolyspora spinosa*, est l'un des bioinsecticides les plus utilisés aujourd'hui (Enric Ureña et al., 2018 ; Renan et al., 2019 ; Vanessa et al., 2019 ; Kamaraju et Poonam, 2018).

Le spinosad est caractérisée par les paramètres physicochimiques et toxicologiques résumés dans le tableau ci après.

Tableau 04. Propriétés structurales et physicochimiques du spinosad (Vanessa et al., 2019 ; Breslin et al., 2000 ; Vanessa et Boscolli, 2019 ; Belhaouchet ,2014).

Nom commercial	Natular DT; Chemical Ab-stract Service [CAS]
Numéro d'enregistrement	131929-60-7 - Spinosyn, utilisé par l'OMS Liste aiguë
Origine microbienne	Saccharopolyspora spinosa
Mélange	85% spinosyn A 15% spinosyn D
Formule chimique	$C_{83}H_{132}N_2O_{20}$
Masse molaire	1477.9g/mol
Solubilité	Spinosyn A soluble (pH 9) à très soluble (pH 5 à 7) Spinosyn D insoluble (pH 9) à soluble (pH 5)
Couleur	Blanc cassé à ocre
Odeur	Odeur faible de peinture au latex
Suspension liquide	480 g/litre de matière active
Point d'ébullition	100°C
Ph	7.69
Densité	1,09 g/ml à 20°C
DL ₅₀	DL ₅₀ > 3738 mg /kg chez le rat
CL ₅₀	> 5.18 mg/l air chez le rat (par inhalation)

3.2. Propriétés des spinosad

Structurellement, le spinosyne A et le spinosyne D diffèrent uniquement par la présence d'un groupe méthyle en C6 (*fig.03*) (Vanessa et Boscolli, 2019).

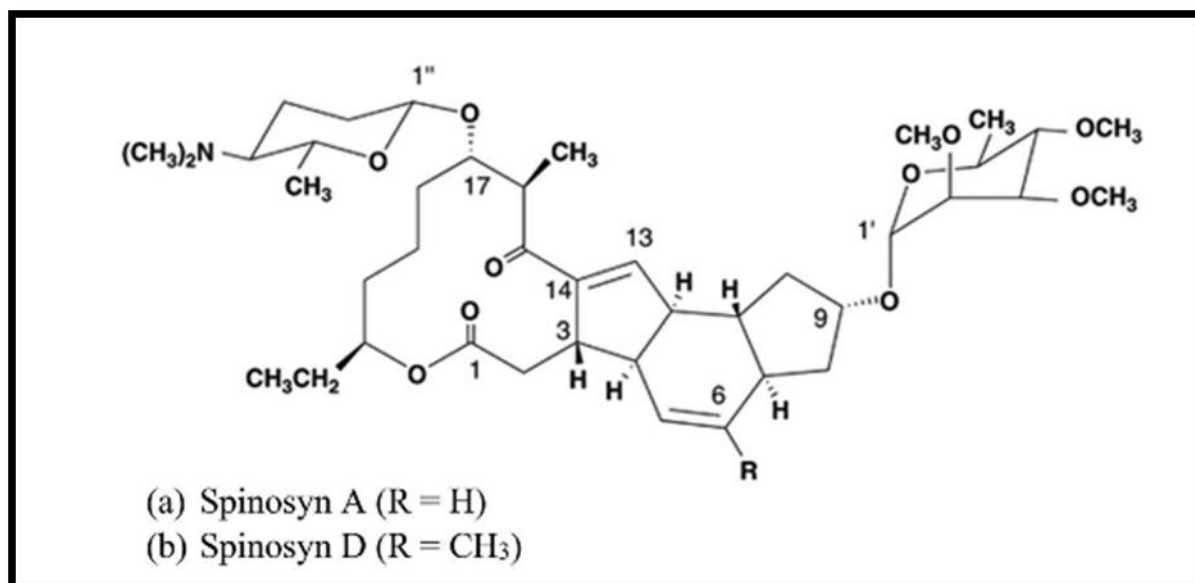


Figure 03. Structure de (a) spinosyne A et (b) spinosyne D. Spisonyn D a un groupe latéral méthyle sur C6 (Vanessa et Boscolli ,2019).

Le spinosyne A et spinosyne D est caractérisée par les paramètres physiques et chimiques résumés dans le tableau si après :

Tableau 05. Propriétés physiques et chimiques du spinosyne A et spinosyn D (Vanessa et Boscolli ,2019).

Propriété physique	Spinosyne A	Spinosyne D
Formule moléculaire	C ₄₁ H ₆₅ NO ₁₀	C ₄₂ H ₆₇ NO ₁₀
Poids moléculaire	731,9	745,9
Point de fusion Solubilité (20 ° C)	120 ° C	170 ° C
Eau (pH 7)	235 mg/L	0.332mg/L
Méthanol	19,0 g/ml	0,252 g/ml
Acétone	16,8 g/ml	1,01 g/ml
Pression de vapeur	3,0x10 ⁻¹¹ kPa	2.0x10 ⁻¹¹ µkPa
Coefficient de partage octanol / eau (Kow)	4,01	4,53

3.3. Toxicocinétique de spinosad

La pharmacocinétique et le métabolisme de la spinosyne A et spinosyn D sont similaires. En fait, le spinosad est rapidement absorbé et largement métabolisé. Des études antérieures avec les deux composants rapportés aucune différence significative dans la biodisponibilité métabolisme et voies d'excrétion chez le rat. De plus, l'administration orale de la spinosyne A et D présentait une absorption incomplète de > 70% de la dose. L'excrétion se produit principalement par voie biliaire dans les fèces (70-90%) et moins de 10% est récupéré dans l'urine (Vanessa et Boscolli ,2019).

3.4. Toxicité de spinosad

Le spinosad (Dow AgroSciences) est relativement nouveau insecticide naturel a été isolé pour la première fois du sol de *Saccharopolyspora spinosa* d'une distillerie de rhum abandonnée en 1982 (Stark et al ., 2004 ; Kamaraju et Poonam, 2018). La dose orale aiguë de DL₅₀ a été déterminée comme 3738 mg/kg chez le rat mâle et 5000 mg/kg chez la souris

(Acar et al ., 2019), et la DL₅₀ cutanée chez le lapin de 3783 mg/kg à plus de 5000 mg/kg (Breslin et al ., 2000 ; Hanley et al., 2002).

Le Spinosad cause chez l'insecte une excitation du système nerveux, mène à un arrêt de l'alimentation, une contraction musculaire involontaire puis à une paralysie. Ces effets sont une conséquence de l'activation des récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (Belhaouchet, 2014). Il est pénétrant dans la peau par contact avec la peau ou de l'estomac et montre son effet en créant excitation dans le système nerveux. Cela se fait en stimulant les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine. Elle affecte également les canaux chlorures associés au GABA par gamma récepteurs de l'acide aminé butyrique (GABA). Stimulation excessive de les motoneurons chez les insectes entraînent des contractions involontaires, tremblements et éventuellement paralysie. Dans ces études, les auteurs ont déclaré que le spinosad ciblait particulièrement les systèmes antioxydants. Ces études ont montré que le stress oxydatif, les dommages à l'ADN, et les fractures chromosomiques augmentent dans les tissus du spinosad et induire l'apoptose (Acar et al ., 2019).



Chapitre II

Neurotoxicité



1. Généralités sur neurotoxicité

La neurotoxicité est une altération fonctionnelle ou changement structural du système nerveux, qui trouve son origine dans l'exposition des agents biologique, physique ou chimique (**Gasmi, 2018**).

1.1. Le cerveau

Le cerveau (ou encéphale) est l'organe principal du système nerveux, système composé du cerveau, du bulbe rachidien et de la moelle épinière. C'est l'organe le mieux protégé du corps humain grâce aux méninges et au crâne, et cela à juste titre, car il est capable d'intégrer des informations, d'analyser l'environnement, de contrôler la motricité du corps et d'assurer toutes les fonctions cognitives (**Lucio, 2015**). Il est ovoïde dont l'extrémité postérieure, le pôle occipital, est plus volumineuse que l'extrémité antérieure, le pôle frontal. Le cerveau pèse environ 1240g (entre 1100 et 1685g) soit 2% du poids du corps. Sa longueur est d'environ 16cm, sa largeur de 14cm et sa hauteur de 12cm (**Kamine, 2013**). Le cerveau désigne le tissu qui se trouve à l'intérieur du crâne. Il s'agit en fait que d'une partie du système nerveux central. La plupart des connexions entre le cerveau et le reste de l'organisme passent par la moelle épinière qui prolonge le tronc cérébral et descend dans le canal rachidien (**Kolb et al., 2019**).

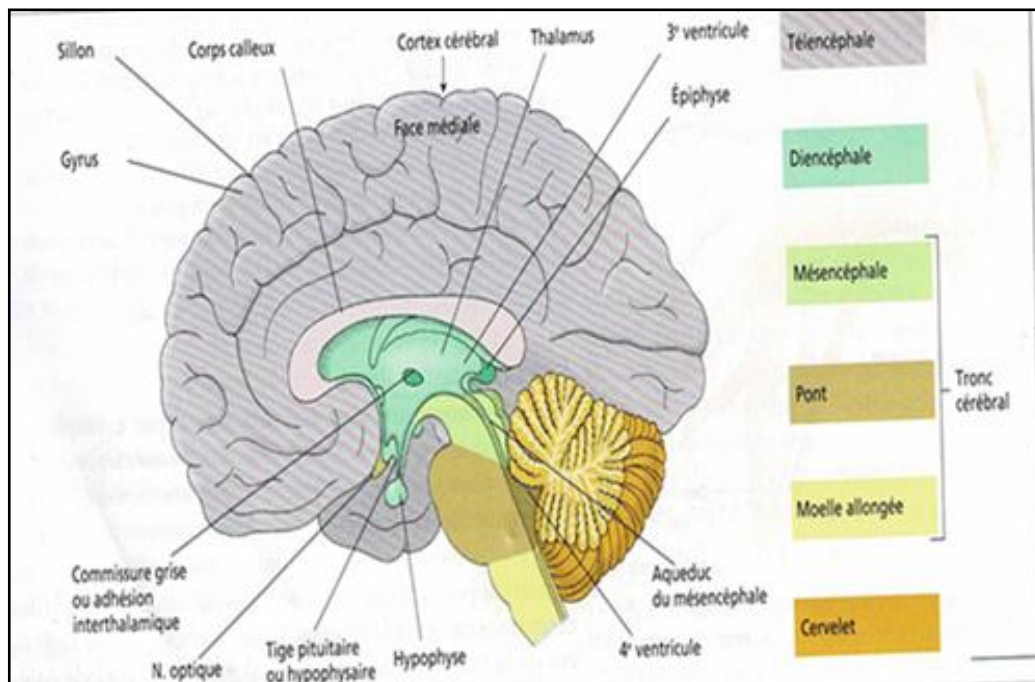


Figure 04. Coupe sagittale du cerveau (**Menche, 2014**).

1.1.1. Histologie du cerveau

Le système nerveux est l'ensemble des structures qui assurent la réception, l'intégration, la transformation et la transmission des informations provenant de l'organisme et de son environnement. Le système nerveux assure ainsi la régulation des principales fonctions de l'organisme et assume le rôle primordial de la vie (**Kamina, 2013**). Le système nerveux comprend deux parties :

- *Une partie intégratrice*, le système nerveux central (SNC) est composé de l'encéphale et de la moelle épinière. Il est responsable de l'analyse, l'intégration, du traitement et de la coordination de l'information sensorielle et des commandes motrices (**Martini et al., 2015 ; Kamina, 2013**), est la partie du système nerveux comprenant l'encéphale (c'est-à-dire le cerveau, le tronc cérébral et le cervelet) et la moelle épinière (**Chevalier, 2011**).

- *Une partie réceptrice et effectrice*, le système nerveux périphérique (SNP) comprend toutes les voies nerveuses et les regroupements de cellules nerveuses (ganglions) situés en dehors du SNC. On distingue après leur zone sortie du système nerveux central, les nerfs crâniens et les nerfs spinaux (**Kamina, 2013 ; Menche, 2014**).

1.1.2. Composition cellulaire du cerveau

Le système nerveux humain est composé principalement de deux types de cellules à l'échelle microscopique: les cellules neuronales (neurones) et les cellules gliales. Le cerveau comprend à peu près 86 milliards de neurones et autant de cellules gliales (**Zhenzhen, 2017**).

- **Les neurones**

Le cerveau est composé de 100 milliards de cellules nerveuses (neurones) qui forment un immense réseau de communication par des connexions entre elles (**Grandjean, 2018**), qui constituent l'unité fonctionnelle du système nerveux. Ces cellules sont excitables ce qui leur permet de traiter et de transmettre l'information sous forme de signaux électriques et chimiques. Une caractéristique essentielle des neurones du cerveau adulte est qu'ils ne se divisent pas et ne peuvent être remplacés en cas de perte neuronale, bien qu'il y ait quelques exceptions (**Chevalier, 2011**). Anatomiquement, un neurone est constitué de trois grandes parties: un corps cellulaire qui contient le noyau; des dendrites, sortes de prolongements multiples responsables de l'arrivée des informations; et de l'axone, prolongement

généralement unique qui permet la transmission de l'information au neurone suivant. Les connexions entre les neurones sont appelées synapses neuronales (Vitry, 2018).

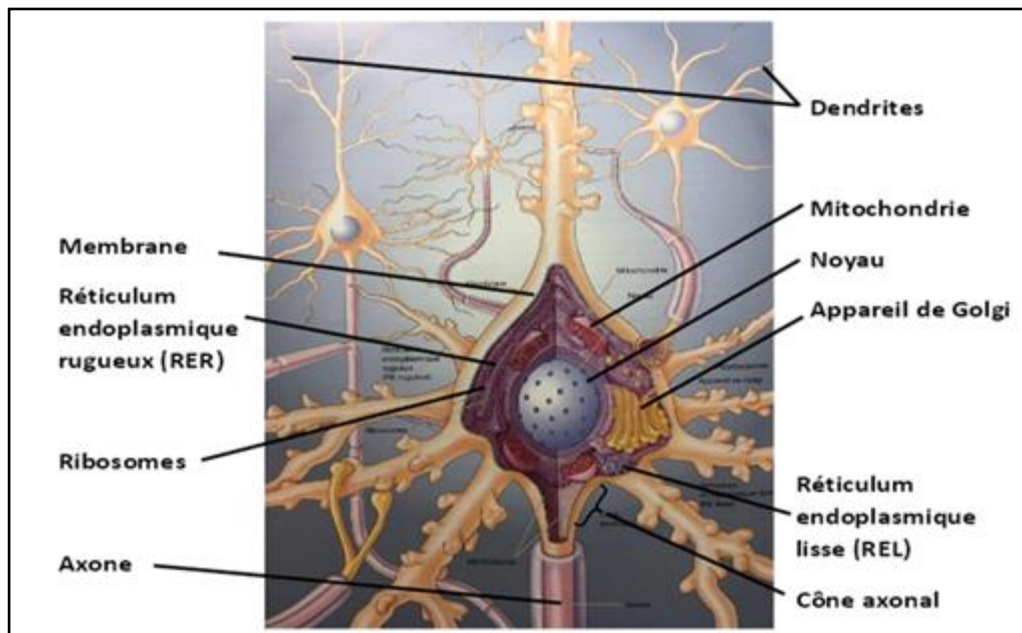


Figure 05. Schéma de la structure du neurone (Zhenzhen, 2017).

Il existe toute une organisation des cellules nerveuses réparties en groupes qui ont tous un rôle précis (pensée, apprentissage, mémoire, vue, odorat, ouïe), chaque cellule nerveuse est approvisionnée, génère de l'énergie, construit un équipement et se débarrasse des déchets. Traitement et stockage des informations, communication entre les cellules, tout cela fait fonctionner le système nerveux, qui doit être convenablement oxygéné (Grandjean, 2018).

- **Les cellules gliales**

Les cellules gliales ne sont capables de déclencher ou de transmettre des influx nerveux, mais remplissent des fonctions de protection, d'alimentation et d'immunologie pour le neurone. Globalement, elles constituent la neuroglie (Menche, 2014). Dans le système nerveux, il y a 5 principaux types de cellules gliales : astrocytes, microglies, oligodendrocytes, les cellules NG2+ et les cellules de Schwann. Les quatre premiers types se trouvent dans le SNC. Contrairement aux neurones, la majorité des cellules gliales n'émettent pas de potentiel d'action (Darabid, 2015).

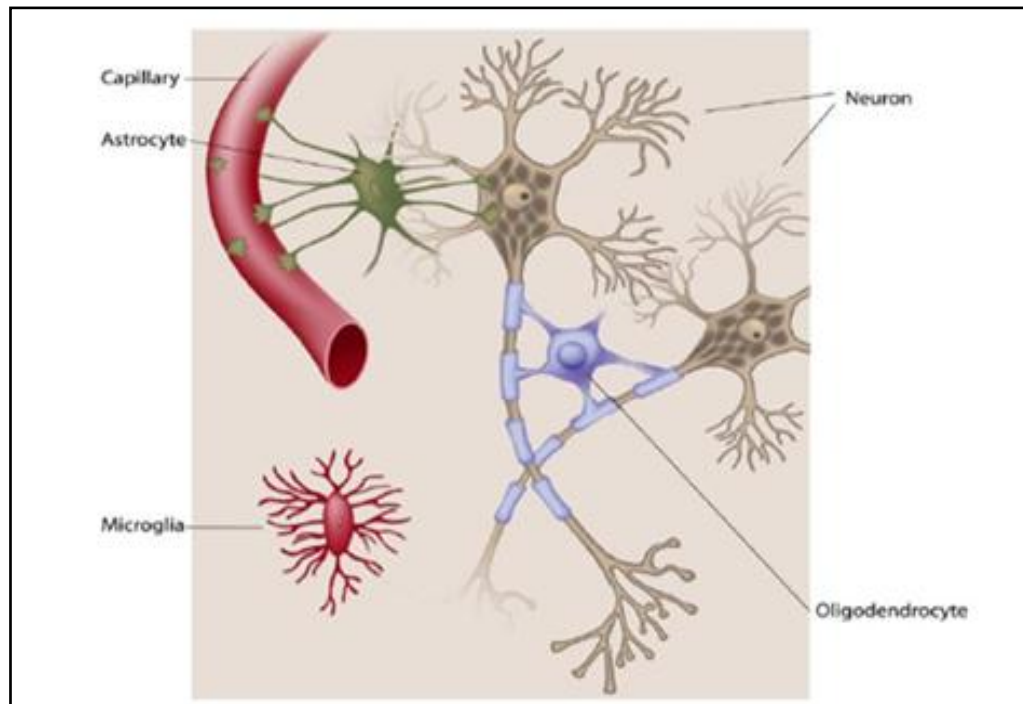


Figure 06. Schéma de cellules gliales (Zhenzhen, 2017).

2. Fonctionnement du système nerveux

• Les neurotransmetteurs

Les neurotransmetteurs sont de plusieurs types. Parmi les plus connus, on peut lister la sérotonine et la dopamine impliquées notamment dans le contrôle de l'humeur et des émotions, l'histamine ou l'acétylcholine. Certains peuvent être activateurs comme le glutamate ou au contraire inhibiteurs comme le GABA (Vitry, 2018).

Tableau 06. Quelque neurotransmetteur important. (Martini et al., 2015)

Neurotransmetteur	Fonction et localisation	Commentaires
Acétylcholine (Ach)	SNC : excitatrice de la majorité des synapses SNP : excitatrice aux jonctions neuromusculaire squelettique ; excitatrice ou inhibitrice des muscles lisses et des glandes du SNA	Neurotransmetteur le mieux connu et le plus étudié.
Noradrénaline (NA)	SNC : excitatrice ou inhibitrice selon le type de récepteur ; cortex cérébral, hypothalamus, cervelet, mésencéphale et moelle épinière SNP : excitation ou inhibitrice aux jonctions neuromusculaires et neuroganglionnaires du SNA	Joue un rôle dans l'attention, la conscience, le sommeil, le rêve, et la température corporelle ; procure une sensation de bien-être augmentée par les amphétamines et les drogues comme l'opium.
Sérotinine	SNC : généralement inhibitrice ; hypothalamus ; système limbique, cervelet, rétine, et moelle épinière.	Joue un rôle important dans les émotions, le sommeil, l'appétit, l'humeur et la température corporelle ; plusieurs substances illicites hallucinogènes, comme la drogue de l'amour (ecstasy) et le LSD ciblent les récepteurs de la sérotinine. Certains médicaments contre la dépression et l'anxiété bloquent son recaptage.
Dopamine	SNC : excitatrice ou inhibitrice selon le type de récepteur ; hypothalamus ; mésencéphale ; système limbique, cervelet, rétine et moelle épinière SNP : excitation ou inhibitrice selon le type de récepteur ; dans certaines synapses neuroganglionnaires du SNA.	Joue un rôle dans l'apprentissage, la mémoire, la motivation et le contrôle des fonctions inconscientes du mouvement et de posture ; le cannabis et l'héroïne augmentent sa concentration en inhibant la GABA
Acide gamma-aminobutyrique (GABA)	SNC : généralement inhibiteur des neurones postsynaptique ; cortex cérébral, cervelet et interneurons du SNC (cerveau et moelle épinière)	Effet inhibiteur direct : ouvre les canaux à Cl ⁻ ; effet indirect : ouvre les canaux à K ⁺ et bloque l'entrée du Ca ²⁺

3. Majeurs pathologies neuronales

- *La maladie de Parkinson (MP)*: est le trouble du mouvement et représente la deuxième maladie dégénérative du SNC, le plus courant qui affecte 2 à 3% de la population âgée de 65 ans et plus. Perte neuronale dans la substantia nigra, qui provoque un striatal carence en dopamine et inclusions intracellulaires contenant des agrégats de α -synucléine sont les caractéristiques neuropathologiques de la maladie de Parkinson (**Poewe et al., 2017 ;Tysnes et Storstein, 2017**).

- *Tumeur cérébrale* : multiplication dans le cerveau de cellules anormales. La tumeur peut être bénigne ou maligne (**Gasmi, 2018**).

-*La maladie d'Alzheimer* : La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative à progression lente trouble qui commence par une légère perte de mémoire et se termine par de graves altération des fonctions exécutives et cognitives (**Hansruedi et al., 2019; Gaate et al., 2020**).

4. Apprentissage, Mémoire et Langage

L'apprentissage et la mémoire et le langage sont des fonctions mentales supérieures qui nécessitent des interactions complexes entre diverses régions du cortex cérébral et entre celui-ci et d'autres parties de l'encéphale. Le traitement de l'information nécessaire à l'exécution de ces fonctions comprend des opérations conscientes et inconscientes (**Martini et al., 2015**).

4.1. Anatomie de langage

L'acquisition du langage repose sur la plasticité cérébrale. Durant l'enfance, des circuits corticaux du langage s'organisent, des stimulations cognitives, sociales et affectives critiques au moment adéquat sont indispensables pour assurer un développement normal (**Kamine, 2013**).

4.2. Anatomie de la mémoire

Le cerveau est extrêmement performant dans l'exercice de la mémoire, à savoir « la capacité de retrouver des expériences passées ». Cette faculté a pour substrat la plasticité synaptique. Les circuits neuronaux de mémorisation sont nombreux et complexe, tout particulièrement la mémorisation des visages. Deux circuits anatomiques schématiques

permettant la perception, le stockage ou l'encodage et la restitution des informations, peuvent être proposés. L'un fait appel au système limbique et l'autre aux noyaux basaux encéphaliques (**Kamine, 2013**).

4.2.1. Mémoire à court terme

La mémoire à court terme permet de garder à l'esprit une information limitée, le temps de l'utiliser. C'est donc une mémoire à faible capacité et très labile. Elle est relativement bien préservée dans la MA. La mémoire de travail désigne une forme de mémoire à court terme qui permet de modifier l'information avant de la restituer. Elle intervient dans de nombreuses sphères cognitives telles que la compréhension de phrases, le calcul...etc. On observe cependant dans la MA des difficultés dans des situations de tâche double (**Bayard, 2017**).

4.2.2. Mémoire à long terme

Conserve long temps les souvenirs, parfois pendant toute une vie. Elle produit deux types de souvenirs à long terme :

-les souvenirs secondaires s'estompent avec le temps et leur rappel exige parfois un effort considérable.

- les souvenirs tertiaires, qui sont gravés pour la vie entière, comprennent votre nom ou la reconnaissance de visages familiers. la mémoire déclarative relate les faits et les événements et est liée à nos pensées conscientes, aux symboles et au langage. La mémoire procédurale concerne les activités motrices qui ont été apprises et répétées au point de devenir des automatismes, comme faire du vélo ou jouer au tennis (**Martini et al., 2015**).

La conversion des souvenirs du court terme au long terme est appelée consolidation mnésique. Elle fait intervenir le corps amygdaloïde et hippocampe, qui appartiennent tous deux au système limbique, car certaines émotions sont souvent associées à la consolidation des souvenirs (**Martini et al., 2015**).

En effet, la lésion du système limbique tel le syndrome de Korsakoff de l'alcoolisme chronique, la maladie d'Alzheimer entraînent une amnésie de l'événement de la vie quotidienne (**Kamina, 2013**).

5. Alzheimer

5.1. Définition

Cette maladie fut écrite pour la première fois en 1907 par le médecin allemand Alois Alzheimer (1864-1915) (**Laure, 2012**). La maladie d'Alzheimer (MA) est un trouble dégénératif neurologique progressif qui se manifeste, au départ, par un déficit de la mémoire épisodique indiquant une atteinte des structures temporales internes (**Zhenzhen, 2017; Amalou, 2018**), il est caractérisé par un déclin progressif de la mémoire, entraînant des troubles importants de la cognition, du langage et de fonctionnement sociale.une variante précoce de la maladie est une source importante de morbidité chez les personnes atteintes de trisomie 21 (**Garrick et al., 2020**). La MA peut toucher des adultes jeunes, mais elle atteint majoritairement les personnes âgées. Elle est en constante évolution du fait de l'augmentation générale de l'espérance de vie et sa prévalence double tous les 5 ans après 65 ans (**Pasteur, 2013**).

5.2. Physiopathologie

A. Atrophie cérébrale

Chez les malades d'Alzheimer une atrophie corticale pourra être observée, avec une perte d'environ de 8% de son poids tous les 10 ans contrairement à un sujet sain qui ne perd que 2% (**Alice, 2016**).

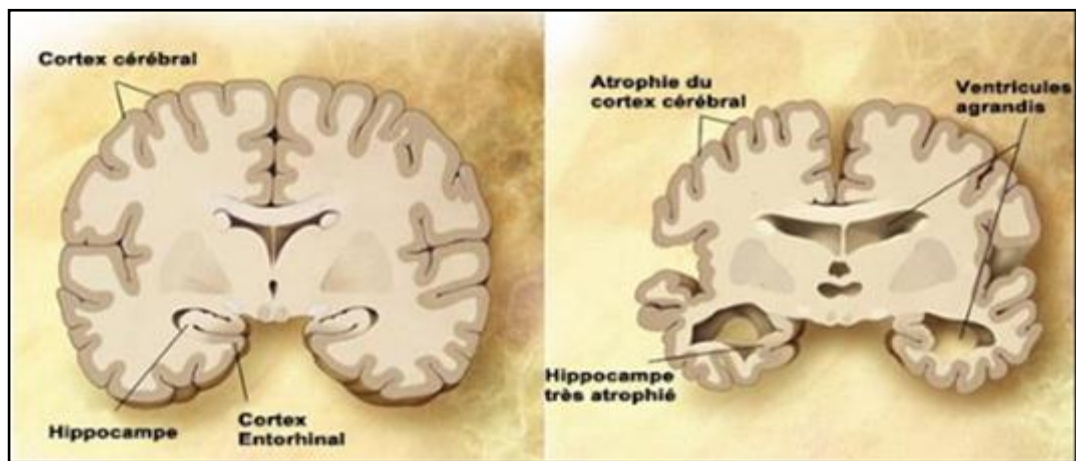


Figure 07. Comparaison entre un cerveau d'un sujet sain et d'un malade d'Alzheimer (**Alice, 2016**).

B. Les lésions cérébrales dans la MA

Il y aurait deux causes principales qui apparaissent environ 10 ans avant l'arrivée des premiers symptômes : les dépôts amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires (**Alice, 2016**).

- Les protéines bêta amyloïdes sont produites excessivement et s'accumulent dans certaines régions du cerveau. On a alors la formation de plaques amyloïdes ou plaques séniles, qui sont associés à la mort neuronale (**Degandt, 2019**).

- L'accumulation anormale de protéines Tau hyper-phosphorylées formant des dégénérescences neurofibrillaires (DNF). Ces DNF sont retrouvées en grande quantité dans les régions temporales internes (hippocampe en particulier). Une hyperphosphorylation de cette protéine l'empêche d'exercer son rôle de polymérisation et de stabilisation des microtubules du cytosquelette (**Grandjean, 2018 ; Courea, 2014**).

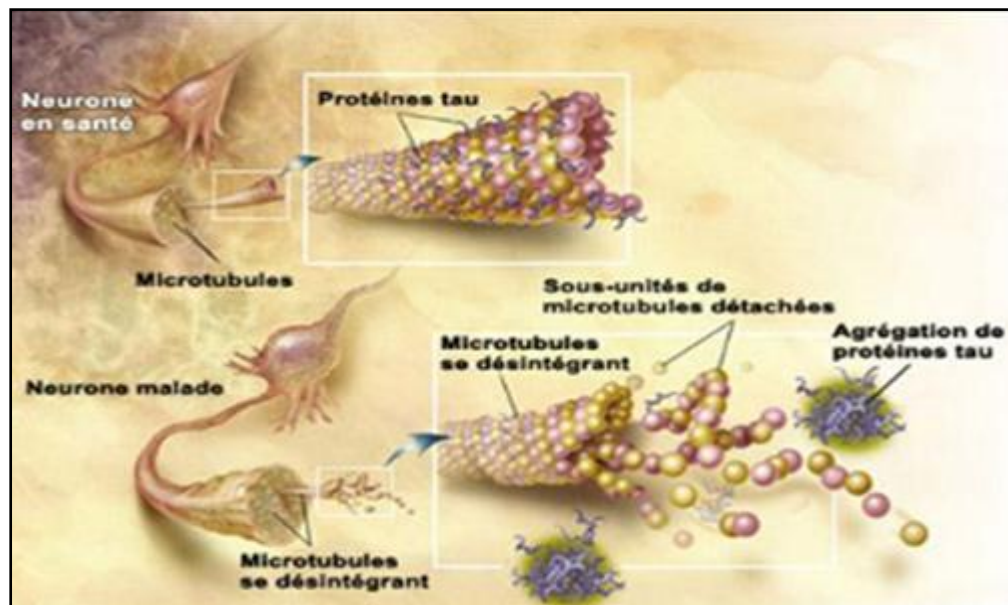


Figure 08. Désintégration des microtubules et accumulation des protéines Tau (**Alice, 2016**).

Les lésions débuteraient au niveau du lobe temporal interne, essentiellement le cortex entorhinal (important centre de la mémoire, principale porte d'entrée de l'hippocampe), et l'hippocampe (siège de la mémoire à court terme), avant de s'étendre vers le reste du cortex (**Mathilde, 2018**).

C. Plaques séniles

Des plaques séniles extracellulaires, constituées d'un dépôt central de substance amyloïde (**Matthieu, 2013**). Les plaques séniles rassemblent les deux types de lésions vues précédemment, c'est-à-dire que dans le cerveau des malades d'Alzheimer, nous observons des «plaques» qui présentent en leur centre des dépôts β -amyloïde et en leur périphérie des lésions neurofibrillaires. En plus de ces deux lésions, il y a une inflammation neuronale due à la présence de protéines inflammatoires, de cytokines pro-inflammatoires et des cellules microgliales en surnombre (**Alice, 2016**).

D. Atteinte des systèmes de neurotransmetteurs

Dans la maladie d'Alzheimer, les systèmes très affectés sont l'hippocampe et le cortex. Deux neurotransmetteurs permettent la transmission de signaux entre les cellules: l'acétylcholine et le glutamate (**Degandt, 2019**).

- **Le système cholinergique**

Dans la maladie d'Alzheimer, le métabolisme de la protéine APP et de la β -amyloïde semble être lié à l'activité du système cholinergique. La choline acétyltransférase, qui permet la synthèse de l'acétylcholine est anormalement diminuée, surtout au niveau de l'hippocampe et du cortex, la concentration en Ach est alors inférieure à la normale. L'Ach est un neurotransmetteur qui joue un rôle important dans le système nerveux pour la mémoire et l'apprentissage (**Alice, 2016**). Le système cholinergique est le plus précocement atteint. L'activité de la choline acétyltransférase est anormalement basse, principalement dans les régions hippocampiques et dans le cortex cérébral chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer. Ce constat est à l'origine des premiers traitements médicamenteux qui sont des inhibiteurs de l'acétylcholine transférase. L'évolution du processus dégénératif induit un effondrement progressif des différents systèmes de neurotransmetteurs (**Coureau, 2014**).

- **Voie glutamatergique**

Le glutamate, et à partir de la glutamine, est le principal neurotransmetteur exciteur du cerveau. Il agit sur les récepteurs ioniques, dans les récepteur NMDA, implique dans la potentialisation à long terme qui sous – tend la mémoire à court terme, sur la récepteurs AMPA qui influencent la libération d'acétylcholine mais également sur les récepteurs métabotropiques dont les rôles sont plus complexes. Les sites de récepteur glutamate

principalement localisés sur les cellules gliales (Julie, 2015). Dans la MA, il y a un déséquilibre du système glutamatergique. Plus précisément, l'activation excessive des récepteurs NMDA induit en effet une cascade d'événements nocifs dont l'issue ultime est la mort cellulaire. Il y a une augmentation importante du glutamate extracellulaire, associée à l'inactivité du transporteur qui normalement élimine le glutamate de la fente synaptique. Le dysfonctionnement des mécanismes d'élimination du glutamate induisent une excitotoxicité en prolongeant anormalement l'action de celui-ci (Grandjean, 2018).

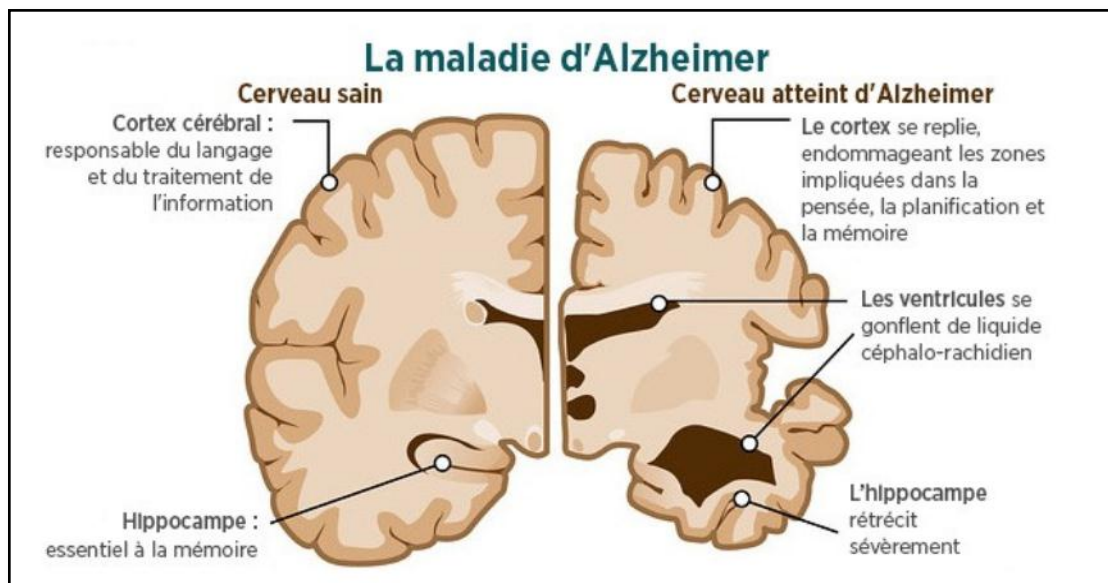


Figure 09. Comparaison anatomique cerveau sain/cerveau atteint d'Alzheimer (Grandjean, 2018).

5.3. Symptômes d'Alzheimer

Les premiers symptômes qui apparaissent dans la maladie d'Alzheimer, peuvent être classés selon 2 catégories, les troubles cognitifs et non cognitifs (tab.07)

Tableau 07. Les premiers symptômes (Lucie, 2013).

Troubles cognitifs	Troubles non cognitifs
<ul style="list-style-type: none"> -Troubles de la mémoire - Aphasie (troubles du langage) - Apraxie (troubles des mouvements) -Agnosie (troubles de la reconnaissance) -Désorientation (spatiale et temporelle) - Troubles attentionnels 	<ul style="list-style-type: none"> -Troubles du comportement (agitation, apathie, désintérêt, ...) -Modification de l'affectivité (irritabilité, agressivité, explosions caractérielles, troubles anxieux, symptômes dépressifs ...)

5.4. Diagnostic de la MA

Diagnostiquer une maladie d'Alzheimer repose essentiellement sur des critères cliniques, un examen neurologique, neuropsychologique et comportemental, sur l'histoire de la maladie, et l'entretien avec l'entourage (**Emiline, 2010**).

Il existe de nombreuses méthodes pour diagnostiquer la maladie d'Alzheimer, notamment les suivantes :

5.4.1. L'entretien

Si il est possible et après accord du patient, il est recommandé d'effectuer l'entretien avec un accompagnant capable de donner des informations fiables. L'entretien évalue le type et l'origine de la plainte et reconstitue l'histoire de la maladie avec le patient et son accompagnant tout en recherchant des antécédents spécifiques tels que les antécédents psychiatriques et traumatiques, les antécédents familiaux de MA ou de maladies apparentées, un syndrome confusionnel antérieur ...etc (**Bayard, 2017**).

5.4.2. Examen clinique

Il doit s'intéresser à :

- L'état général (taille, poids, asthénie)
- Le système cardio-vasculaire (HTA, Troubles du rythme cardiaque, Cholestérolémie, Diabète, Tabac)
- Degré de vigilance (recherche d'une confusion mentale)
- Les déficits sensoriels (visuel, auditif) et moteurs pouvant interférer avec la passation des tests neuropsychologiques (**Grandjean, 2018**).

5.4.3. Imagerie cérébrale: IRM

L'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) est un acte non invasif, non douloureux, mais très bruyant. L'imagerie cérébrale permet d'aider au diagnostic de la maladie d'Alzheimer, même à un stade précoce. Elle permet de voir s'il y a des anomalies cérébrales associées à la MA comme une réduction du volume du cerveau, une atrophie du lobe temporal médian, de l'hippocampe (on y stocke la mémoire), ou de l'amygdale, cette dernière est une région permettant de ressentir et de percevoir certaines émotions (**Degandt, 2019**).

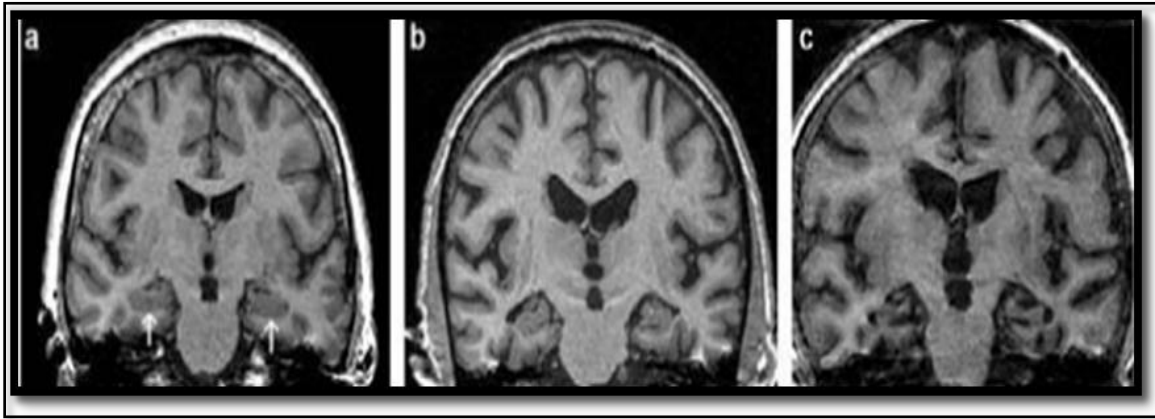


Figure 10. Exemple de cerveau d'une personne saine (a) et d'une personne atteinte (b) de la maladie d'Alzheimer (c) (Alice, 2016).

5.4.4. TEP

La TEP (Tomographie par Émission de Positons) va permettre de mesurer la consommation de glucose. Une baisse de cette consommation indique une diminution du métabolisme neuronal observée dans la maladie d'Alzheimer. La TEP est aussi utilisée pour analyser le nombre de plaques amyloïdes qui sont des lésions cérébrales, grâce à des ligands radiomarqués (TEP-amyloïde). Cette technique consiste à injecter aux patients des radiotraceurs qui vont se lier spécifiquement aux lésions cérébrales caractéristiques de la maladie (plaques amyloïdes, dégénérescences neurofibrillaires) (Degandt, 2019).

5.4.5. Dosage sanguin

Réalisation d'un dosage de la thyroïdostimuline hypophysaire (TSH), d'un hémogramme, d'un ionogramme sanguin, d'une calcémie, d'une glycémie, d'une albuminémie et d'un bilan rénal. En plus, le médecin pourra demander un dosage de la vitamine B12, des folates, un bilan hépatique (transaminases et gamma GT), une sérologie syphilitique, la recherche du VIH ou de la maladie de Lyme. Tous ces tests sont nécessaires afin d'éliminer toutes causes potentielles et réversibles de déclin cognitif, notamment une infection aiguë, des troubles thyroïdiens, un déficit de vitamine B12, pouvant être de cause alimentaire ou iatrogène, ou une insuffisance rénale ou hépatique (Alice, 2016).

5.5. Facteurs de risque de la MA

La MA est multifactorielle, elle résulte d'une combinaison complexe de facteurs de risque non modifiables et de facteurs environnementaux modifiables.

5.5.1. Age

Le vieillissement est le plus grand facteur de risque de développement de la MA. La plupart des personnes atteintes de la MA sont âgées de 65 ans ou plus. Plus rarement, la MA peut toucher des personnes de moins de 65 ans, on parle de MA précoce (**Grandjean, 2018 ; Emiline, 2010**).

5.5.2. Sexe

Les femmes ont un risque de maladie d'Alzheimer accru par rapport aux hommes, particulièrement après l'âge de 80 ans. Dans l'étude PAQUID, l'incidence de la maladie d'Alzheimer était plus élevée chez les hommes que chez les femmes avant 80 ans (**Amalou, 2018**).

5.5.3. Facteurs de risque génétiques

La mutation de trois gènes situés sur les chromosomes 14 et 21 serait responsable de la moitié des formes familiales de la maladie d'Alzheimer (forme précoce). De plus, la présence de l'allèle E4 de l'apolipoprotéine E (apoE) serait également un facteur de risque de la maladie d'Alzheimer (**Emiline, 2010**).

5.5.4. Facteurs de risque cardio-vasculaires

Pourraient être rattachés à la maladie d'Alzheimer comme l'obésité, l'hypertension, le diabète de type 2. Les antécédents d'accidents vasculaires et les traumatismes crâniens pourraient également accroître le risque de maladie d'Alzheimer, du fait de la réduction du débit sanguin (**Emiline, 2010**).

5.5.5. Facteurs de risque environnementaux

De nombreux facteurs environnementaux sont considérés comme des facteurs de risques de la maladie d'Alzheimer. Parmi eux, en retrouve l'alimentation, la consommation de tabac, la consommation excessive d'alcool et de drogues, la sédentarité, pesticide (**Julie, 2015**).

• Stress oxydatif

Le stress oxydant est impliqué dans les mécanismes de mort cellulaire lors des maladies neurodégénératives. La maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson idiopathique et la sclérose latérale amyotrophique sont les plus fréquentes de ces affections. Dans ces trois cas, les marqueurs du stress oxydant sont anormaux (**Desport et Couratier, 2002**).

A) Systèmes antioxydants

Les antioxydants sont définis par HALLIWELL (1999) comme « toute substance qui, en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé, prévient ou

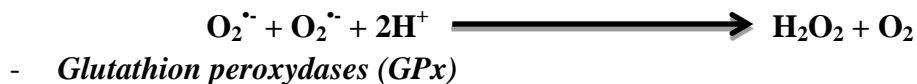
ralentit l'oxydation de ce substrat ». Ils peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine (**Desport et Couratier, 2002**).

Le stress oxydant joue un rôle important dans le vieillissement du cerveau, l'organe qui utilise le plus d'oxygène. La fragilité du cerveau augmente avec l'âge et à plus forte raison sous l'influence de la maladie d'Alzheimer. Le stress oxydant crée des radicaux libres qui à leur tour provoquent davantage de stress oxydant. Une alimentation saine permet de briser ce cercle vicieux et de protéger les cellules cérébrales (**Degandt, 2019**).

A1) Système antioxydant enzymatique

- *Superoxydes dismutases (SOD)*

Les superoxydes dismutases sont des métalloenzymes (ce sont des enzymes utilisant des métaux comme cofacteurs). Il s'agit d'une des premières lignes de défense contre les ERO. Leur cible privilégiée est l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) qu'elle transforme en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) : (**Guillouty, 2016**)



Les enzymes de cette famille sont Sélénium (Se)-dépendante. La glutathion peroxydase (GPX) est présente dans le cytoplasme où elle joue un rôle majeur dans la régulation de l'état redox physiologique intracellulaire des cellules vasculaires. Elle catalyse la réduction des hydro peroxydes (H_2O_2) et des peroxydes lipidiques en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme donneur d'hydrogène (**Zerargui, 2015**).



- *Catalase (CAT)*

La catalase est une enzyme intracellulaire, localisée principalement dans les peroxysomes. Elle catalyse la réaction de détoxification du H_2O_2 (généralement produit par la SOD). Elle est surtout présente au niveau des globules rouges et des hépatocytes (**Zerargui, 2015**).



- *Glutathion S-transférase (GST)*

Réduit les hydroperoxydes en alcools, mais ne réduit pas l'H₂O₂ (**Boussekine, 2014**).



A₂) **Systèmes antioxydants non enzymatiques**

- *Oligoéléments*

Les éléments-trace (oligo-éléments) sont indispensables à de nombreuses fonctions biologiques et physiologiques de l'organisme (**Berger et Roussel, 2017**).

Les oligoéléments (OE) répondent à une classification spécifique qui les divise en quatre groupes :

-*Les OE essentiels*: Iode, Fer, Cuivre, Zinc, Sélénium, Chrome, Molybdène, Fluor

-*Les OE à faible risque de carence (non prouvée chez l'Homme)*: Manganèse, Silicium, Vanadium, Nickel, Etain, Cobalt

-*Les OE expérimentalement essentiels*: Bore, Brome, Arsenic, Plomb, Cadmium, Lithium

-*Les OE pour lesquels existent potentiellement quelques preuves embryonnaires d'essentialité*: Scandium, Tellurium, Beryllium, Lanthane, Niobium (**Charbit, 2017**).

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par des enchevêtrements neurofibrillaires intracellulaires et la formation extracellulaire de plaques séniles composées du peptide β amyloïde, ainsi que d'ions métalliques tels que le cuivre(Cu), le fer (Fe) ou le zinc(Zn) (**Degandt, 2019**).

- *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. 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 (**Gasmi, 2018**).

- **Glutathion (GSH)**

Le glutathion est la molécule soufrée la plus importante dans le cytosol avec une concentration avoisinant quelques millimoles. Hormis cette importance d'ordre quantitative, le GSH constitue un système antioxydant intracellulaire incontournable car ce tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine) est le garant du statut rédox cellulaire. Les cellules et les tissus sains possèdent un milieu intracellulaire réducteur dans lequel plus de 90% du glutathion est à l'état monomérique réduit (GSH). La forme oxydée est notée GSSG et correspond à un dimère de GSH dont les fonctions soufrées sont engagées dans un pont disulfure. Une augmentation permanente du ratio [GSSG/GSH] constitue un stress oxydant **(Bothorel, 2011)**.

- **Malondialdéhyde (MDA)**

Le MDA fait partie des aldéhydes réactifs issus de la décomposition des LPO. En raison de son caractère mutagène et athérogène, il est le produit le plus étudié de la dégradation des LPO. Il a été proposé comme biomarqueur du stress oxydant **(Boussekine, 2014)**. Le stress oxydatif jouerait un rôle dans la pathogénèse des maladies neurodégénératives comme la MA. En effet, le SNC est particulièrement susceptible aux dommages des DRO, entre autre à cause de la consommation élevée d'oxygène au niveau du cerveau, mais aussi de l'abondance des lipides oxydables et des faibles concentrations d'antioxydants par rapport aux autres tissus. Le taux de peroxydation des lipides augmenterait dans les cerveaux des sujets atteints de MA et plus spécifiquement dans la région du lobe temporal médian (siège de l'hippocampe) où les changements histo-pathologiques sont détectables **(Pasteur, 2013)**.

5.6. Les stades de la maladie

La maladie d'Alzheimer est une maladie dégénérative évolutive qui atteint de nombreuses fonctions cognitives nécessaires à l'autonomie de la personne. Les symptômes s'aggravent donc au fil de la maladie. Trois stades correspondant au stade d'évolution peuvent être décrits **(Lacoste-Ferré et al., 2013)**.

La classification la plus utilisée dans le monde est l'échelle de détérioration globale du Docteur Barry Reisberg qui comporte 7 stades:

Tableau 08. Échelle de détérioration globale de Reisberg (**Grandjean, 2018**).

Stade 1	Aucun symptôme
Stade 2	Symptômes légers (pertes de mémoire récente, difficultés à prendre des décisions) sans déclin mesurable aux tests neuropsychologique.
Stade 3	Symptômes légers avec déclin mesurable aux tests neuropsychologiques, mais sans entrave importante aux activités de tous les jours.
Stade 4	Démence légère (capacité de conduire une automobile à condition d'être accompagné).
Stade 5	Démence modérée (choix des vêtements fait par une autre personne ; déplacements effectués à pied dans des endroits familiers seulement ; gestion des finances personnelles effectuée par une autre personne)
Stade 6	Démence sévère (doit être lavé et habillé par une autre personne ; ne peut rester seul).
Stade 7	Démence très sévère à terminale (incapacité de marcher de façon sécuritaire ; difficulté à avaler).

5.7. Prise en charge et traitement

5.7.1. Traitement médicamenteux

Des données physiopathologiques, il ressort trois approches thérapeutiques: Les traitements substitutifs, en particulier, les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase pour augmenter la concentration en acétylcholine, les médicaments agissant sur le système glutaminergique et les approches étiologiques et préventives (**Amlou, 2018**).

✓ Inhibiteurs de l'acétylcholinestérase

La maladie d'Alzheimer est la cause la plus courante de démence chez les personnes âgées. Une approche du traitement symptomatique de la maladie d'Alzheimer consiste à améliorer la neurotransmission cholinergique dans le cerveau en bloquant l'action de l'enzyme responsable de la dégradation du neurotransmetteur acétylcholine. Cela peut être fait par un groupe de médicaments appelés inhibiteurs du cholinestérase (**Birk et Harvey, 2018; Coureau, 2014**). On a vu que la concentration d'acétylcholine diminuait chez le patient atteint de la maladie d'Alzheimer et que cette diminution était responsable de certains

symptômes clés de la pathologie, la cognition, les capacités fonctionnelles et le comportement. Ces inhibiteurs permettent de limiter ces symptômes en améliorant la transmission cholinergique. Le premier médicament de cette classe commercialisé était la Tacrine mais celui-ci a été retiré du fait de son effet toxique au niveau hépatique. Il existe aujourd'hui trois médicaments de ce type sur le marché indiqués dans les formes légères à modérément sévères et dont l'efficacité est comparable : le Donépézil, la Rivastigmine et la Galantamine (Lucie, 2013 ; Grandjean, 2018).

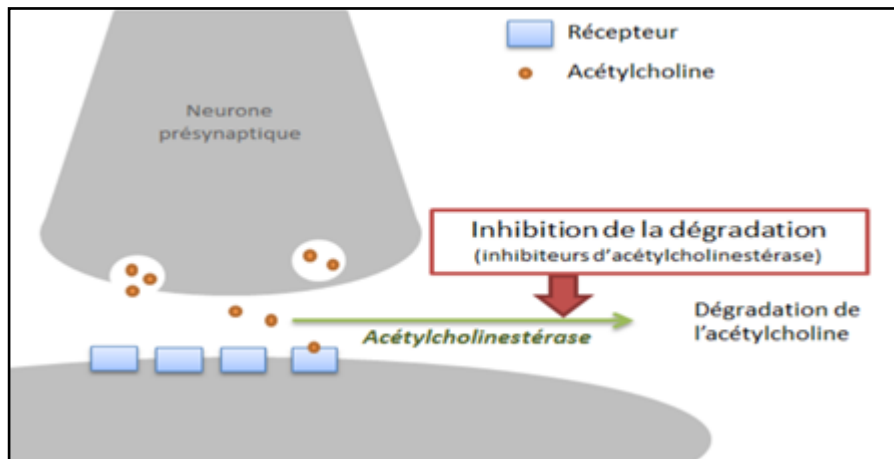


Figure 11. Mécanisme d'action des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (Lucie, 2013).

Des données physiopathologiques, il ressort trois approches thérapeutiques :

- Les traitements substitutifs : traitements cholinergiques, Les antagonistes des NMDA récepteurs, Traitement médicamenteux des troubles du comportement, La bithérapie.

- Les approches étiologiques et préventives : Les anti-inflammatoires, Les produits agissant sur le cholestérol, Les œstrogènes, Les anti-oxydants, Les anti-hypertenseurs.

- Prise en charge des troubles psycho-comportementaux : la première recommandation concernant le traitement des troubles psychos comportementaux de la démence est de ne pas prescrire les neuroleptiques classiques car ils ont une action anticholinergique et accélèrent le déclin cognitif (Amlou, 2018).

5.7.2. Traitement non médicamenteux

Les interventions non médicamenteuses sont un élément essentiel de la prise en charge thérapeutique. En complément du traitement pharmacologique, elles ont pour objectif d'optimiser la prise en charge du malade en ciblant, en fonction de ses besoins, l'amélioration des différents aspects de la maladie tels que les capacités cognitives, l'autonomie, les troubles

de l'humeur et du comportement ou la qualité de vie du patient. Les interventions proposées au patient sont nombreuses et variées: rééducation de l'orientation, stimulation cognitive, rééducation orthophonique, stimulation de l'activité motrice, stimulation sensorielle (**Grandjean, 2018**).

6. Neurotoxicité de spinosad

Le spinosad et l'indoxacarbe sont des insecticides neurotoxiques (**Hugo et al ., 2019**), est largement utilisé pour la protection des cultures. Afin d'élucider les effets du spinosad sur le stress oxydatif et la génotoxicité dans les cellules Sf9, les niveaux de peroxydation lipidique, l'activité des enzymes antioxydantes et les dommages à l'ADN ont été mesurés. Les résultats ont montré que le spinosad provoquait une augmentation en fonction du temps de la formation de malondialdéhyde et une diminution de l'activité du superoxyde dismutase et de la catalase (**Wenping et al., 2017**). Il affecte le système nerveux, agissant comme un antagoniste de l'acétylcholine et du gamma-aminobutyrique acide (GABA) sur les récepteurs nicotiniques. Sur la base de son origine naturelle, il est supposé que le spinosad est plus sûr et moins agressif pour l'environnement que les pesticides synthétiques. De plus, le spinosad a été montré pour augmenter le taux d'espèces réactives de l'oxygène dans *Spodoptera frugiperda* (Sf9), activant la voie de l'apoptose (**Kenner et al ., 2019**). En tant que composé neurotoxique, le mode d'action du spinosad affecte l'acétylcholine récepteurs de ligne (nAChR) directement dans le système nerveux système, agissant précisément comme modulateur allostérique (**Breslin et al., 2000**).

L'activité neurotoxique du spinosad est similaire à celle du groupe des insecticides néonicotinoïdes, mais diffère le site spécifique de la liaison du récepteur nicotinique de l'acétylcholine provoquant une hyperexcitation du système nerveux, provoquant des effets dans le neurotransmetteur de l'acide g-aminobutyrique (GABA) agoniste (**Valdeir et al ., 2020 ; Zhang et al ., 2019 ; Monteiro et al., 2019**). Spinosad perturbe récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine et a donc un effet majeur sur la transmission neuronale (**Mazzia et al., 2020**).



Chapitre III
Ephédra Sinica



Introduction

Depuis très longtemps, les plantes médicinales jouent un rôle déterminant dans la conservation de la santé des hommes et la survie de l'humanité. Elles sont un patrimoine sacré et précieux et constituent une réponse de choix pour fournir à l'organisme, de façon naturelle, les substances nécessaires pour maintenir son équilibre vital (**Adouane ,2016**).

1. Généralité

Les plantes aromatiques et médicinales ont des propriétés importantes, plusieurs médicaments pharmaceutiques ont été dérivés de plantes, ces derniers passent dans l'esprit de la population pour efficacité et tolérance du fait de son origine naturel faisant partie de la médecine douce. Ces plantes naturelles ont joué un rôle très significatif dans la découverte des médicaments. Il est reporté qu'au minimum 119 composés dérivés de 90 espèces de plantes peuvent être considérés comme des médicaments importants. La croissance de l'industrie pharmaceutique et le développement incessant de nouveaux produits médicaux synthétiques et biologiques plus efficaces n'ont pas réduit l'importance de l'utilisation des plantes médicinales. Au contraire, la croissance démographique dans le monde en développement et l'intérêt croissant manifesté au niveau des nations industrialisées ont considérablement augmenté la demande spécifique aux plantes aromatiques et médicinales et à leurs produits dérivés (**Lamamra, 2018**).

Les plantes médicinales sont utilisées pour leurs propriétés particulières bénéfiques pour la santé humaine. En effet, elles sont utilisées de différentes manières, décoction, macération et infusion. Une ou plusieurs de leurs parties peuvent être utilisées, racine, feuille, fleur (**Adouane ,2016**).

2. Généralités sur la plante

2.1. Genre Ephedra

L'origine de l'ephedra a parfois été considérée comme ancienne, peut-être dès ou avant l'éclatement de la Pangée (il y a environ 230 Myr milieu Trias) (**Huang et Price, 2003**).

La famille des Ephedraceae représentée par le seul genre Ephedra (**Cynthia, 2015**). Ephedrae herba a été utilisé dans la médecine traditionnelle chinoise et japonaise (Kampo) depuis les temps anciens, la principale ressource étant en Chine (**Yuki et al., 2009**). Il est bien connu que Ephedra est pharmacologiquement agoniste sympathomimétique au niveau des récepteurs α et β adrénergiques, entraînant une augmentation du rythme cardiaque et de la

contractilité, une vasoconstriction périphérique, une bronchodilatation et une stimulation du système nerveux central (Taketo et al., 2009).

L'usine d'Ephedra, ou "Ma Huang" de la médecine traditionnelle chinoise, est l'une des plus anciennes plantes médicinales connues de l'humanité. Plus de 45 espèces de plantes Ephedra existent (Taketo et al., 2009). Les plantes Ephedra (Ephedraceae) sont largement réparties dans monde. Parmi eux, *Ephedra sinica* (E. sinica), *Ephedra intermedia* (E. intermedia) et *Ephedra equisetina* (E. equisetina) (Fana et al., 2010).

3. Sous espèce *Ephedra sinica*

3.1. Définition

Ephedra sinica est un arbuste semblable à feuilles persistantes originaire d'Asie, utilisée par les humains depuis plus de 5000 ans comme phytothérapie chinoise en Chine (Yifeng et al., 2019 ; Kilpatrick et al., 2016), il est inclus dans un certain nombre de pharmacopées, y compris les pharmacopées chinoise, allemande et japonaise pour le traitement de divers aliments, et a donc une importance économique cosidable (Telleza et al., 2004), est également considéré comme l'un des plantes les plus importantes de la médecine traditionnelle. Il appartient à la famille des Ephedraceae et connue pour ses synonyme en Corée, en Chine et au Japon, c'est-à-dire Ma-huang (Al saeed et al., 2019)



Figure 12. Schéma générale de l'*Ephedra sinica* (site.01).

3.2. Utilisation

Il est utilisé comme diurétique, antipyrétique, diaphorétique et pour soulager la toux et l'asthme. Comme le médicament brut, il a une monographie officielle dans les pharmacopées chinoise et japonaise, où il est standardisé contre les principaux alcaloïdes, l'éphédrine et la pseudoéphédrine. Ainsi, le principal l'accent est conventionnellement mis sur sa teneur en alcaloïdes, bien que cela ne constitue que environ 0,7-0,8% de la plante entière. De toute évidence, la motivation en est les effets de ces alcaloïdes sur le système respiratoire, nerveux central et cardiovasculaire (**Orejola et al., 2017**). *Ephedra sinica* ou Ma Huang a une longue histoire d'utilisation en Chine où elle apparaît pour la première fois dans le Shen Nong Ben Cao Jing, en tant que long sha (sable de dragon), est l'une des plus anciennes plantes médicinales connues de l'humanité et se compose d'environ 50 espèces principalement distribuées dans les régions tempérées et subtropicales de l'Asie (**Meng-Ying et al., 2016**), régions du centre, du sud de l'Amérique du Nord, de l'Afghanistan, du Pakistan, de l'Europe méditerranéenne, de l'Europe du Nord et de l'Europe de l'Est et de la Russie (**Dennis et al., 2002**).

Ephedra sinica est une plante ressemblant à un arbuste connue sous le nom de Ma Huang (MH) ou ephedra, est la plante médicinale traditionnelle chinoise utilisée depuis des milliers d'années (**Ik-Soo et al., 2010**), est décrite comme herbe amère et chaude, non toxique, utilisée pour traiter le paludisme, les maux de tête, et comme antitussif, dans la médecine traditionnelle chinoise et japonaise, la partie aérienne est généralement sautée au miel et combinée avec d'autres plantes pour le traitement du bronchial asthme, de la toux de l'œdème dans la néphrite aiguë, pour induire une diurèse ou une transpiration et des symptômes du rhume (**Dennis et al., 2002**).

3.3. Nomenclature

Ephedra sinica Stapf (Ephedraceae) est une plante médicinale traditionnelle chinoise (nom chinois: Ma Huang) cultivée en Chine, en Corée et au Japon (**Krizevski et al., 2010**).

Tableau 09. La nomenclature de *l'ephedra sinica* (Dennis et al., 2002).

Nom	Pays
Ephedra	Europe
Ma huang	Chine
Ma kon ou Mao	Japon
Arabe	العنددة

3.4. Classification systématique d'*Ephedra sinica*

Tableau 10. Classification systématique de *l'Ephedra sinica* (site.02)

Royaume	Plantae
Subkingdom	Tracheobionta
Superdivision	Spermatophyta
Division	Gnetophyta
Classe	Gnetopsida
Ordre	Ephedrales
Famille	Ephedraceae
Genre	Ephedra

3.5. Description botanique

Comptant environ 50 espèces dans le monde, l'ephedra se trouve dans la diverses régions, y compris la sibérie, le nom chinoise commun , Ma Huang proviendrait de la couleur jaune (Huang) et l'action engourdissant de la plant ,décrites comme engourdissant pour la langue, seules les trois espèces *ephedra sinica*, *ephedra equisetina bunge*, *ephedra intermedia shrenk* sont officielles dans les pharmacopées de chine et japon (Dennis et al., 2002).

Dans les régions montagneuses sèches ,sur les pentes vallonnées , les champs de montagne et les lits de rivière asséchés, ES se trouve dans le nord –est de la chine dans les provinces du liaoning et de jilin et dans le nord, dans les provinces du chanxi, du chanxi , du hebei, du Henan et de la mangolia intérieure .ES atteint une taille de 20 à 40 cm et est décrit comme un arbuste herbacé vivace presque sans feuilles avec un tige principale ligneuse et des tige aériennes dressées en médecine. La plante rarement ramifiée (1-2 mm de diamètre) cylindrique, et de couleur vert très pale à vert jaunâtre les tiges facilement cassables son claire et lorsqu'elles sont fracturées présentent une moelle brun rougeâtre et un bord vert verdâtre. leur odeur est légèrement aromatique et leur testicule est légèrement amer et astringent, les feuilles sont décrites comme écailleuses membraneuse et gaine en forme de triangle aigu, avec des feuilles basale semi-connées entrant les nœuds. Une moelle bronzée rouge apparait à travers la surface cassée des entre- nœuds minces (1-1.5mm de diamètre et 2.5-5cm de longueur). Elle fleurit en mai avec des inflorescences coniques, en juillet, la plante naturelle développe des graines rouges ressemblant à des baies (**Dennis et al., 2002**).

3.6. Utilisation d'*ephedra sinica*

L'ephedra, est la plante médicinale traditionnelle chinoise utilisée depuis des milliers d'années. Au de la de ses activités sympathomatiques, telles que les anti-inflammatoires, matory, anti-anaphylactique, antimicrobien, anti histaminique et hypo glycémique. Les études récentes sur de tels effets pharmacologiques de l'ephedra se sont concentrées plus sur les ingrédients actifs individuels plutôt que sur l'extrait de fines herbes entier comprenant des tiges et de racines et sur la compréhension des mécanismes de leur action (**Ik-Soo et al., 2010**). Les tiges utilisées pour traiter l'asthme, le taux, l'œdème et la fièvre avec anhidrose. Les racines ont longtemps été utilisées comme anti transpirants puissants (**Meng-Ying et al., 2016**), il est utilisée pour traiter le paludisme, les maux de tête, et comme antitussif, dans la médecine traditionnelle chinoise et japonaise (**Dennis et al., 2002**).

3.7. Composition chimique d'*ephedra sinica*

Les ingrédients médicinaux actifs isolés et principaux d'origine des tiges d'ephedra sont les alcaloïdes. les tige contiennent 1à 3 % du totale des alcaloïdes dans la plant ephedra , l'éphédrine représentant 30 à 90% de ce total selon les espèces en autres composants actifs, tel que les flavonoïdes , les polysaccarides, les tannins et les composés phénolique se trouve également dans la tige, d'autre part la féruloylhistamine, les éphédrines A-D et l'ephedrannine A sont des constituants actifs trouvés dans les racines (**Ik-Soo et al., 2010**).

3.8. Métabolite secondaire d'*ephedra sinica*

Les principaux principes actifs d'*ephedra sinica* sont l'alcaloïde phénylpropylamino agoniste adrénergique unique et taxonomiquement restreint, également connu sous le nom d'alcaloïdes d'éphédrine ; noréphédrine, norpseudoéphédrine, éphédrine, pseudoéphédrine, N-méthyléphédrine, N-méthylpseudoéphédrine. Il a été précédemment établi que l'éphédrine est principal alcaloïde accumulé par l'ES alors que dans d'autres espèces telles qu'*ephedra intermedia* et l'*ephedra lomatolepis*, l'alcaloïde prédominant est la pseudoéphédrine (Krizevski et al., 2010).

3.8.1. Mécanisme d'action des alcaloïdes d'éphédrine

En général les alcaloïdes d'éphédrine imitent l'action de l'adrénaline à la fois par l'activité agoniste directe ainsi que par la libération directe de noréphédrine via un mécanisme d'échange médié par le transporteur entraînant la libération de catécholamines endogènes des fibres sympathique post-ganglionnaires (Krizevski et al., 2010).

3.8.2. Structure et fonction du métabolite

a. Alcaloïdes

Les alcaloïdes forment une grande famille hétérogène de métabolites secondaires, qui présentent un intérêt par leurs propriétés pharmacologiques et leurs applications en médecine. Ils provoquent chez l'homme diverses réponses physiologiques et psychologiques, à forte dose sont très toxiques (Zohra, 2013). Les alcaloïdes figurent parmi les principes actifs les plus importants en pharmacologie et médecine. Ce sont des substances organiques azotées, à propriétés basiques ou amers et ayant des propriétés thérapeutiques ou toxiques. Les alcaloïdes sont utilisés comme anti-cancer, sédatifs et pour leur effet sur les troubles nerveux (maladie de Parkinson) (Adouane, 2016).

Les alcaloïdes sont des composés organiques d'origine naturelle, azotés, plus ou moins basiques, de distribution restreinte et doués, à faible dose, de propriétés Pharmacologiques marquées. Ils ont pour précurseurs des acides aminés azotés Principalement (tryptophane, ornithine, phénylalanine, tyrosine, histidine). Les activités pharmaco logiques des alcaloïdes s'exercent dans les domaines les plus Variés :

- au niveau du système nerveux central.

- au niveau du système nerveux autonome : sympathomimétiques ou Sympatholytiques, parasympathomimétiques inhibiteurs des cholinestérases, anti cholinergiques, ganglioplégiques (Christophe, 2014).

b. Ephédrine et noréphédrine

L'éphédrine et la noréphédrine sont également utilisées en médecine occidentale pour leur propriétés vasoconstructives, pour traiter les crises d'asthme aiguës comme la rhinite, la sinusite et la rhinopharyngite, l'éphédrine est également largement utilisée pendant l'anesthésie, elle est fréquemment prescrite pour le traitement de l'asthme bronchique, des allergies et de la surdose de dépresseurs (Krizevski et al., 2010).

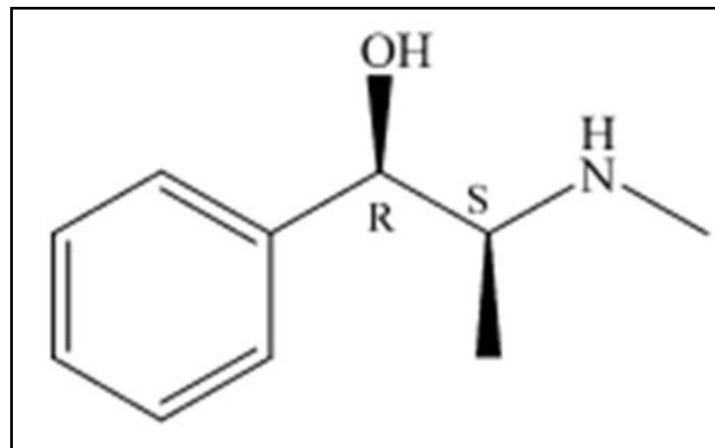


Figure 13. La structure d'éphédrine (Ganzera et al., 2005).

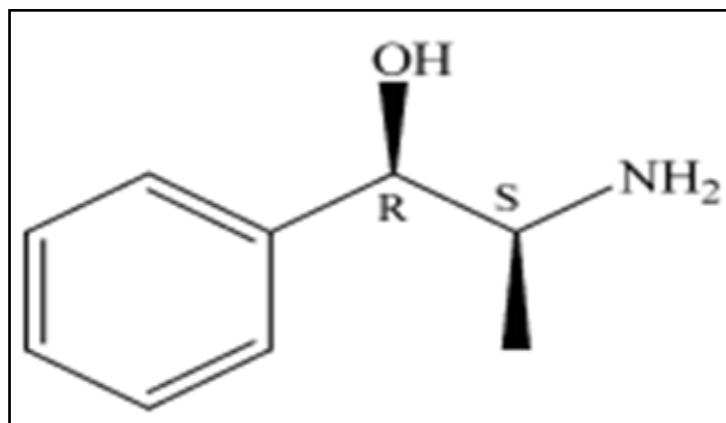


Figure 14. Structure de noréphédrine (Ganzera et al., 2005).

c. Pseudo éphédrine

Le pseudo éphédrine soulage de la gestion nasale (Ik-Soo et al., 2010).

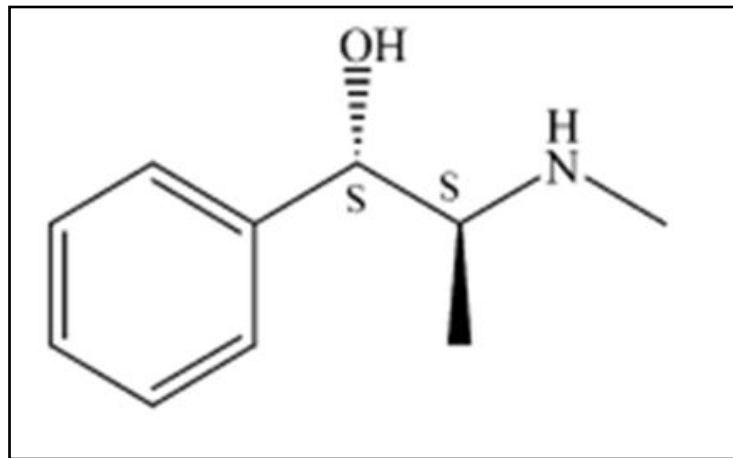


Figure 15. Structure de pseudoéphédrine (Ganzera et al ., 2005).

d. Ephédrines A-D et l'ephedrannine A

Utilisée pour leur effets antihydrotiques et hypotenseurs, ayant des effets presque opposites des constituants de la tige (Ik-Soo et al., 2010).

3.9. Valeur nutritionnelle de l'ephedra sinica

Ephedra sinica en de plus utilisations médicales, les chinois ont utilisé les fruits de ES comme nourriture et consommés en toute sécurité de différentes manière, comme dans les condiments au fromage, les succédanés de thé et le sucre de référence. Les composants nutritionnelles responsables des fruits sont ; les glucides, les protéines, les fibres, les acide gras et minérales. Cependant il n'y pas que quelques rapports relatifs au fruit est-il a été déclaré que la partie fruit de ES est non toxique pour les oiseaux ou même pour les rongeurs (Al saeed et al., 2019).

PARTIE
PRATIQUE





Matériels et méthodes



1. Matériels et méthodes

Cette étude a été menée dans le but d'évaluer l'effet anti-Alzheimer d'huile essentielle de *Ephedra sinica* à dose de 100 mg/kg/j chez des rats exposés au Spinosad à dose de 0.25 mg/kg/j. Les expérimentations effectuées dans cette étude ont été accomplies dans le laboratoire pédagogique de toxicologie du département de Biologie appliquée de l'université de Larbi Tebessi, Tebessa.

1.1. Matériels

1.1.1. Matériel chimique

Dans ce travail, nous avons utilisé l'insecticide Spinosad pour évaluer leur effet nocif. Et des autres réactifs chimiques pour les dosages des biomarqueurs de stress oxydative, paramètres hématologiques et les tests histologiques.

1.1.2. Matériel végétale

Ephedra Sinica a été obtenue de la willaya d'El Oued au cours des mois de novembre à février.



Figure 16. Les feuilles de *Ephedra Sinica*.

1.1.3. Modèle biologique

La présente étude a été réalisée sur des rats mâles *Rattus rattus* de la souche Wistar au nombre de 24 rats (*fig.17*), provenant de l'institut Pasteur d'Alger, âgés de 06 à 08 semaines pesant environ 175 et 320 g. Ce sont des mammifères de l'ordre des rongeurs, largement utilisés dans divers domaines de recherche expérimentale.



Figure 17. Rat Wistar pendant les essais.

1.2. Méthodes

1.2.1. Entretien des animaux

Les rats mâles ont été soumis à une période d'adaptation de deux (02) mois avant l'expérimentation, aux conditions de l'animalerie de département de biologie, à une température ambiante de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ et une photopériode naturelle 12/12h avec une hygrométrie normale (60%). Ils ont été nourris par un régime alimentaire standard (croquets énergétiquement équilibré composé de maïs, le soja, phosphate, cellulose, minéraux, vitamines). Ces rats sont vivres cette période dans des cages en polyéthylène et ont été répartis en quatre (04) groupes de six (06) rats chacun. Les cages sont nettoyées et la litière est changée une fois par deux jours jusqu'à la fin de l'expérimentation. (*fig.18*)



Figure 18. Cage d'élevage des rats.

1.2.2. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles a été réalisée par hydrodistillation avec un appareil de type clewenger au sein du laboratoire de chimie de l'université de Tébessa, 350 g de la matière végétale est imbibée dans 1500 ml d'eau distillée le montage contenu dans un ballon de 2 l, chauffé à reflux à l'aide d'un chauffe-ballon pendant 4 à 5 heures (fig.19).

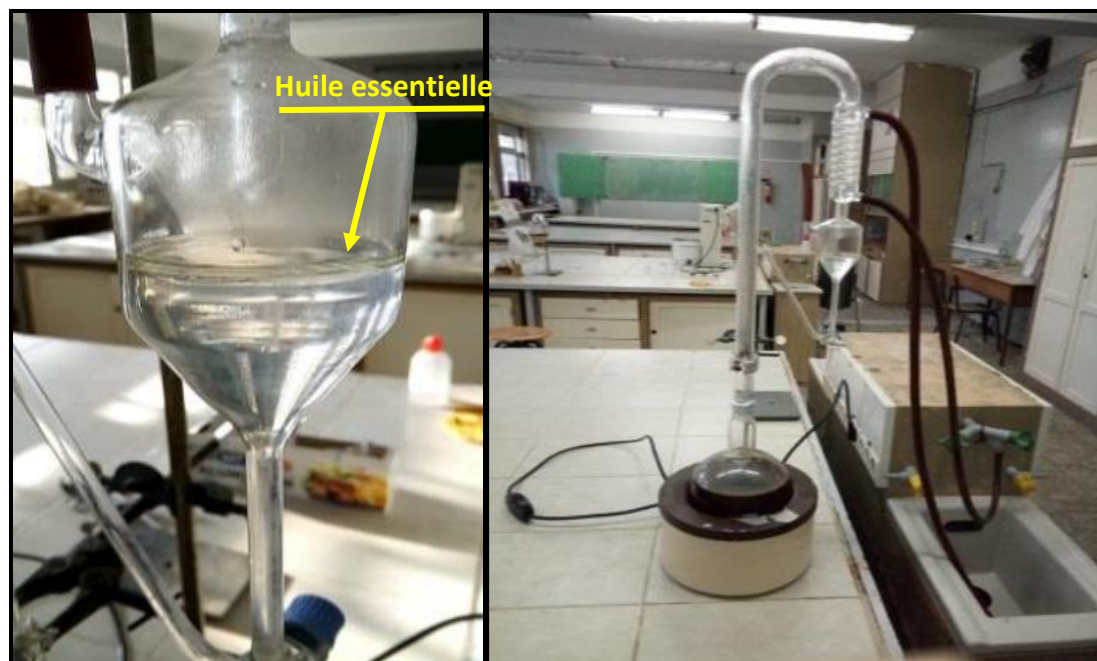


Figure 19. Montage de l'extraction par clewenger

❖ Calcul du rendement

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal sec à traiter.

$$R = (M/M_0) \times 100$$

R : Rendement en huile essentielle exprimé en %.

M : Masse en grammes de l'huile essentielle.

M₀ : Masse en grammes du matériel végétal sec à traiter.

1.2.3. Lotissement et traitement

1.2.3.1. Choix des doses

A. Spinosad

La plupart des études entreprises en toxicologie s'effectuent à la suite de l'administration de la dose par voie orale. Cependant d'autres voies d'administration sont possibles : intra veineuse, intramusculaire, sous-cutanée, percutanée et par inhalation.

Dans cette étude, nous avons utilisé un pesticide spinosad à une dose 0.25mg/L administrées par voie orale pendant un mois. Le choix de ces doses est basé sur des études réalisées sur l'exploration de ce pesticide dans les matrices biologiques qui ont montré (Sheldon et Larry, 2000).

B. *Ephedra Sinica*

Dans cette étude, nous avons utilisé l'huile essentielle de *l'ephedra sinica* à une dose 100mg/Kg/j (Habbachi et al., 2013)

1.2.3.2. Répartition des rats

L'étude a été menée sur un 24 rats males; qui ont été divisés en quatre (4) lots:

- **Lot T:** lot témoin de 06 rats, reçoit l'eau par un gavage pendant un mois
- **Lot (E):** Lot Extrait de 06 rats, traités par l'extrait à dose 100mg/Kg/j pendant un mois
- **Lot (S):** Lot pesticide de 06 rats, traités par spinosad à dose 0.25mg/Kg/j pendant un mois
- **Lot (S+E) :** Lot mixture de 06 rats, traités par l'extrait à dose de 100mg/Kg/j, et par spinosad à dose de 0.25mg/Kg/j, pendant un mois.

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

1.2.3.3. Traitement

Le traitement des rats a été réalisé pendant un mois par voie orale (*fig.20*).



Figure 20. Traitement des rats par voie oral.

1.2.4. Evaluation de la neurotoxicose d'un pesticide et effet anti-Alzheimer de l'extrait de l'Ephedra

Après un mois de l'exposition des animaux un modèle de traitement, deux méthodes d'approches ont été appliquées pour évaluer l'impact de cette 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 anti-Alzheimer de l'Ephedra contre cette neurotoxicité.

a. 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®), La mesure de poids des rats est effectuée chaque jour pendant la période de traitement à l'aide d'une balance numérique (*fig.21*).



Figure 21. Prise du poids des rats en utilisant la balance analytique.

b. Etude neurocomportementale

Cette étude 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 l'Ephedra . Pour atteindre cet objectif, on utilisées plusieurs tests ont été élaborés tels que : le test d'Open Field, test de sucrose (test d'anhédonie), test nage forcée.

b₁) Tests comportementaux révélant d'éventuels troubles locomoteurs

-Test l'open field

L'open Field (**Trey et al., 2015**) permet d'évaluer le niveau d'activité locomotrice et exploratoire de l'animal placé dans une situation nouvelle. Dans un tel environnement, les rongeurs privilégient spontanément l'environnement sécurisé, à savoir la périphérie de l'appareil, protégée par les parois, à la zone centrale éclairée et ouverte. Ce test est basé sur le comportement exploratoire spontané de l'animal, et sur le conflit généré par ce comportement et par l'aversion naturelle du rat pour les environnements découverts. L'Open Field 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. L'animal est déposé au centre du dispositif et laissé libre de l'explorer pendant 5 minutes.

Après le passage de chaque animal, le dispositif est nettoyé avec une solution hydro alcoolique à 10% et séché.

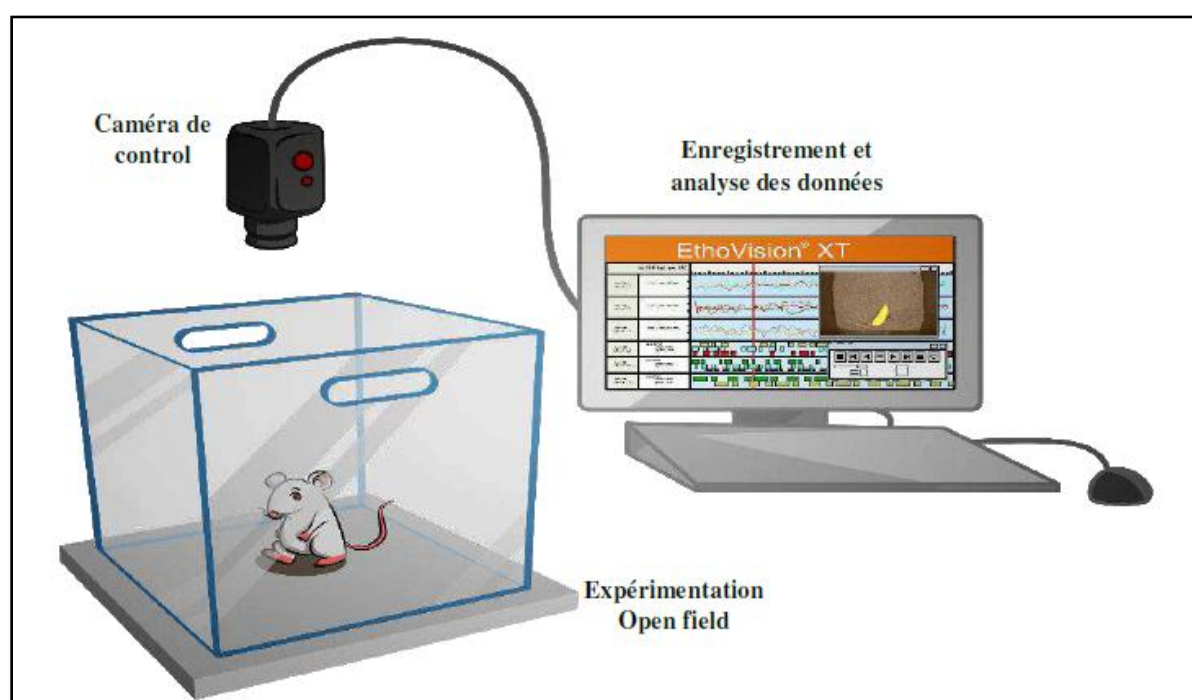


Figure 22. Les instruments du test d'open Field (Gasmi, 2018).

b₂) Tests comportementaux révélateurs de l'état d'anxiété et de dépression

-Teste nage forcée

Durant ce test la mesure de la durée d'immobilité nous renseigne sur le degré de « dépression » de l'animal, plus précisément l'état de résignation de motivation (Hua et al., 2010). La diminution de la durée d'immobilité mesurée rassemble a un effet similaire à celui observée après l'administration d'antidépresseur: moins l'animal est résigné plus il aura tendance à lutter. Le cylindre est rempli d'eau, de telle manière à ce qu'une souris plongée à l'intérieur ne puisse pas toucher le fond du dispositif. Le dispositif consiste en un cylindre en plexiglas transparent de 30 cm de hauteur et 15 cm de diamètre. Porsolt a décrit pour la première fois le test de la nage forcée en 1977. Durant ce test l'animal est placé dans le cylindre. Après un certain temps de nage, il abandonne et se laisse flotter ; ses réactions sont enregistrées durant 5 minutes. Il s'agit du test le plus largement utilisé chez les rongeurs, dans le but d'étudier le phénomène de « dépression ».

Les variables mesurées sont la latence de la première immobilité, la durée de mobilité, la durée d'immobilité, ainsi que les pourcentages respectifs correspondants à ces deux derniers paramètres.



Figure 23. Teste nage forcée.

- *Teste de sucrose*

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 sucré. 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.



Figure 24. Teste de sucrose.

1.2.5. Technique de perfusion pour étude histologique

Après un mois de l'exposition des animaux un modèle de traitement, on a utilisé un rats pour chaque lot par une nouvelle méthode (technique de perfusion) et récupérer les cerveaux pour l'étude histologique, on faite cette technique par les étapes suivantes (fig.25):

- ✓ On injectée le chloral hydraté au niveau zone intra péritonéal pour l'anesthésie.
- ✓ On ouvre le rat.
- ✓ On coupé au niveau de l'oreille droite et injection de NaCl (pour rinçage et lavage des organes) au niveau de ventricule gauche jusqu' à la vide de sang à partir les organes.
- ✓ Ensuite l'injection de formaldéhyde (pour la fixation des organes meilleur fixateur) jusqu' à les organes doit être solide.
- ✓ En fin prélèvement et rinçage des organes et posée dans les boîtes de ECBU puis ajoutée formaldéhyde.



Figure 25. Les étapes de technique perfusion.

Remarque: On fait les analyses d'histologie des cerveaux dans Amanilabo. Laboratoire d'Anatomie et histologie –Lucinde d'Alger-

1.2.6. Sacrifice

A la fin de la période d'administration de traitement (Spinosad et *L'ephedra sinica*) de 30 jours, les animaux sont sacrifiés par décapitation, on récupère le sang pour étude hématologique, et ont prélevé les cerveaux ont été rapidement prélevés et rincés dans le tampon de lavage à froid (fig.26), puis séchés à basse température (4°C) par un papier semi absorbant. Les cerveaux de chaque lot sont pesés et répartis pour l'étude des biomarqueurs: dosage des paramètres de stress oxydatif : GSH, GST, GPx, CAT, MDA, protéine, Ache.



Figure 26. Extraction du cerveau.

-Estimation du sang (étude hématologique)

Après sacrifice prélevé le sang de tous les rats dans les tubes bien stériles, on fait les analyses de hématologie (glycémie, cholestérol, urée) dans laboratoire Bouzaiane- Bir Elater-Tébessa.



Figure 27. Prélèvement le Sang

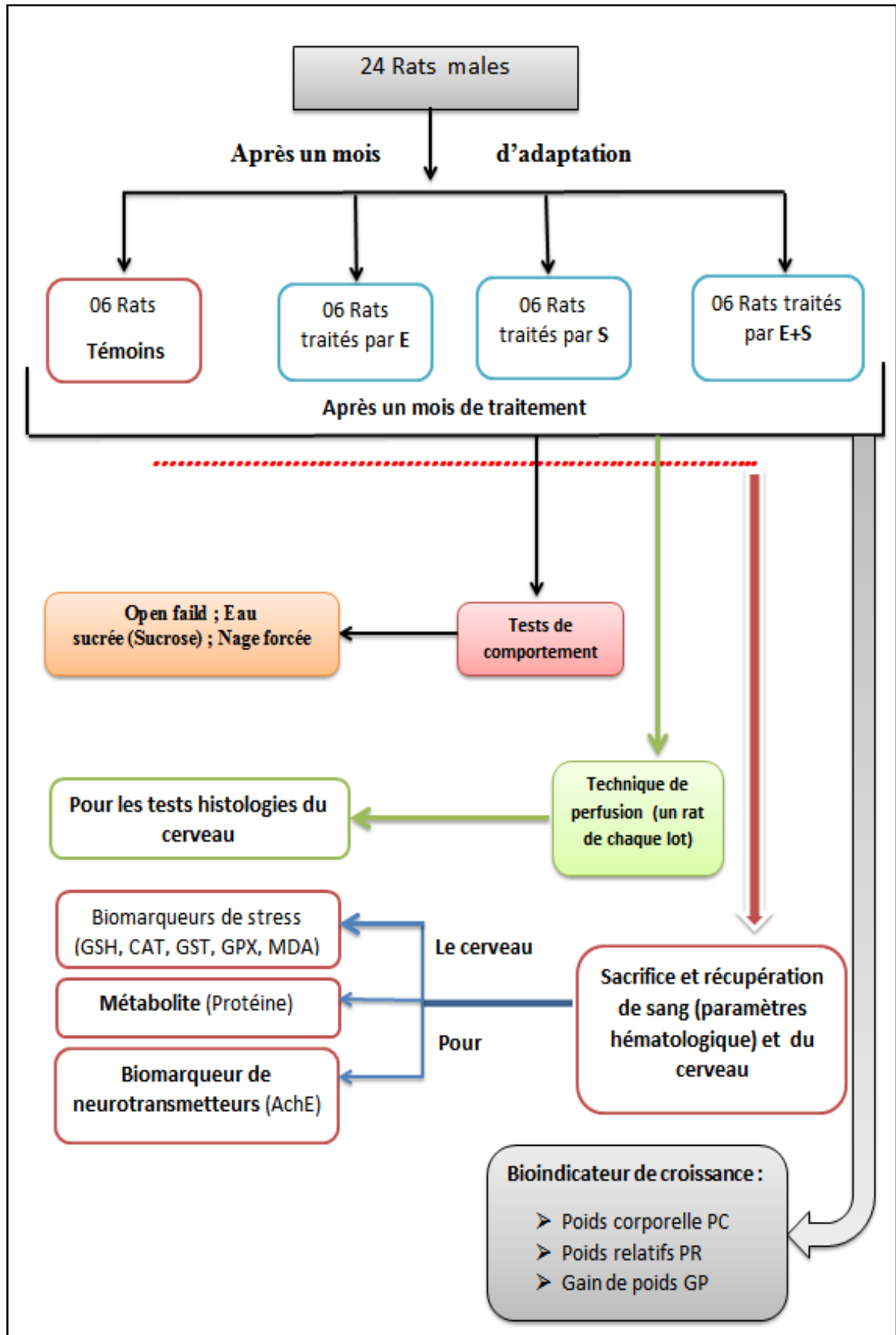


Figure 28. Schéma récapitulatif du protocole expérimental.

1.2.7. Estimation du poids relatif du cerveau

Le poids relatif des organes des rats est calculé par rapport au poids corporels des rats selon la formule suivant :

$$PRO = PO / PC \times 100$$

PRO : poids relative des organes (g)

PO : poids d'organes (g)

PC : poids corporelles des rats (g)



Figure 29. Prise du poids les organes des rats.

1.2.8. Préparations des échantillons

Nous avons pesé le tissu cérébrale 300mg a été homogénéisé dans 3ml de solution de TP (0.1M, PH=7.4). Ensuite les homogénats ont été centrifugées à 12000 t/min pendant 15 min à 4C°, le surnageant résultant a été utilisé pour la détermination de taux de protéine, GSH, GPX, GST, CAT, MDA, Ache.

3. Méthodes de dosage

3.1. Paramètres métaboliques

- **Dosage de la protéine**

La concentration des protéines est déterminée par la méthode de (**Bradford, 1976**) en utilisant l'albumine de sérum de boeuf (BSA) comme standard. Les protéines sont diluées au 1/20 ième dans de l'eau distillée stérile. Au niveau d'une plaque Elisa 200 µl de réactif de

Bradford sont ajoutés ensuite à 20 µl de la dilution et la densité optique est déterminée à 595 nm. Pour le dosage de la protéine consiste à faire réagir 250 µl du surnageant avec 250µl ED et un 1ml BBC laisse 5 min. La lecture des absorbances est effectuée à une longueur d'onde de 595 nm contre un blanc contenant 250 µl d'eau distillée remplaçant la quantité de surnageant. 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*).

3.2. Paramètres du stress oxydant

- **Dosage du MDA**

Le dosage du MDA est réalisé selon la méthode de (**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.

-La concentration de MDA est calculée selon la loi de Beer-Lambert (DO = E.C.L):

$$[C] \text{ (nmol/mg protéine)} = \frac{DO.10^6}{\epsilon.L.X.Fd}$$

C: Concentration en nmol/mg de protéines; *DO*: Densité optique lue à 530 nm.

ε: Coefficient d'extinction molaire du MDA = 1.56105 M⁻¹ cm⁻¹.

L: Longueur du trajet optique = 0.779 cm.

X: Concentration de l'extrait en protéines (mg/ml).

Fd: Facteur de dilution : Fd = 0.2083.

- **Activité de la catalase (CAT)**

Ce dosage a été effectué selon la technique décrite par (**Aebi, 1984**). Les catalases sont présentes dans un grand nombre de tissus. Ce sont des enzymes tétramériques. Chaque unité

porte une molécule d'hème et une molécule de NADPH. L'activité catalase (CAT) a été mesurée à 240 nm à l'aide d'un spectrophotomètre par les variations de la densité optique consécutives à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Les résultats sont exprimés en µmol de H₂O₂ par minute et par mg de protéines. Pour un volume final de 3 ml, le mélange réactionnel est constitué de tampon phosphate (0,1M, pH 7) et de 100 µl d'extrait enzymatique. La réaction est initiée par addition de 150 µl de H₂O₂ à (3%). La vitesse de décomposition de H₂O₂ est déterminée en mesurant la diminution de l'absorbance à 240 nm pendant 1 min. L'activité du CAT est exprimée en unités internationales (U.I.) c'est-à-dire en µmol d'H₂O₂ détruites/min/mg de protéines.

L'activité de catalase est calculée selon la loi suivant :

L'activité de la catalase = $\Delta DO / (\epsilon.L.X.Fd)$

- ΔDO : variation de la densité optique par minute (A1-A2)
- ϵ : coefficient d'extinction 0.043 mM⁻¹ cm⁻¹
- L : largeur de la cuve en cm - X : quantité des protéines en mg/ml
- Fd : facteur de dilution par le H₂O₂ dans le tampon phosphate

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

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

La détermination (calcul) de l'activité de la GPx se fait de la façon suivant:

- Activité de GSH consommée/min/gr de protéine.
- Blanc = 0.04 micro mole de GSH réduit → DO_b.
- Extrait = 0.04 micro mole de GSH réduit → DO_e.

Donc la concentration de GSH réduit qui sera oxydé (disparue) = DO_e-DO_b

X = (DO_e-DO_b) × 0.04/DO_b = quantité de GSH réduit disparue (oxydé) dans 0.2 extrait dans 1ml.

L'activité de la GPx = la quantité de GSH réduit oxydée disparue X 5/ [protéine].

- **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.

❖ La concentration du glutathion est obtenue par la formule suivante:

$$GSH(nmol\ GSH/mg\ protéine) = \frac{DO \times 1 \times 1,525}{13100 \times 0,8 \times 0,5 \times mg}$$

DO: Densité optique

1: Volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0.8 ml homogénat + 0.2 ml de l'acide salicylique).

1.525: Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0.5 ml surnageant + 1 ml Tris + 0.025 ml DTNB).

13100: Coefficient d'absorbance du groupement -SH à 412 nm.

0.8: Volume de l'homogénat après déprotéinisation trouvé dans 1 ml.

0.5: Volume du surnageant trouvé dans un 1.525 ml.

La concentration de GSH est mesurée par rapport à 1mg de protéine. C'est pour cela ce dosage doit être accompagné par le dosage des protéines.

- **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 entraîne la formation d'une molécule nouvelle; 1-S-Glutathionyle 2-4 Di 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. 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.

La concentration de la GST est obtenue par la formule suivante:

$$GST \text{ (nmol GST/min/mg protéine)} = \frac{(DO \text{ échant/min} - DO \text{ blanc/min})}{9,6 \times \text{mg de protéine}}$$

DO échantillon–DO blanc: moyenne des DO des échantillons par minute – moyenne des DO des Blancs par minute.

E+: Coefficient d'extinction moléculaire du C-DNB, $\epsilon_{C-DNB} = 9.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

3.3. Dosage d'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-aminoéthyl 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.

L'activité Acétylcholine estérase est calculée selon la formule suivante :

$$R \text{ (mol/min/mg)} = 5,74 \times 106 \frac{\Delta D_o}{C_o}$$

C_o : Concentration originale du tissu mg/ml.

3.4. Etude histologique

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).

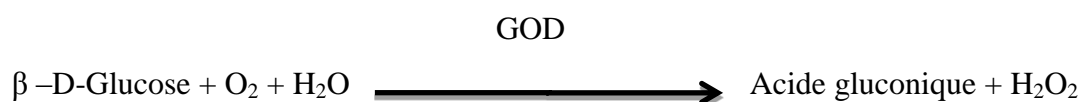
3.5. Paramètres hématologiques

Nous avons utilisé des tests sanguins (Glycémie, urée, cholestérol) comme indicateur pour garantir l'intoxication, selon les protocoles suivants:

3.5.1. Glycémie

Les mesures sont réalisées sur du sérum par la méthode à la GOD et la fiche technique Spinreact .Le glucose est transformé par le glucose oxydase (GOD) en acide gluconique et

peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ce dernier, en présence de peroxydase (POD), oxyde le chromogène incolore (4-aminophénazone) en un composé coloré en rouge (quinoneimine) (**Kaplan, 1984 ; Trinder, 1969**), selon les réactions suivantes :

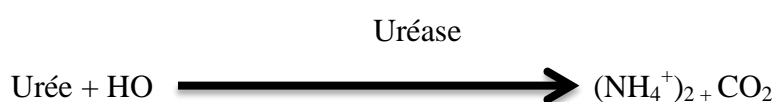


Dans un tube sec 10 µl d'échantillon sont ajoutés à 1ml de réactif de glucose [(GOD : 1500 U/L, POD : 1000 U/L, 4 aminophénazone : 2.6 mmol/l) dissout dans un tampon tris pH7.4 contenant 3mmol/l du phénol], incubation à 37°C pendant 10 minutes, lecture contre un blanc réactif à 500 nm avec utilisation d'un étalon.

$$[\text{Glucose}] \text{ (mg/dl)} = \frac{\text{(A) Echantillon}}{\text{(A) Etalon}} \times 10 \text{ (concentration de l'étalon)}$$

3.5.2. Taux d'urée

Le dosage est réalisé sur le sérum par la méthode colorimétrique utilisant l'uréase selon la fiche technique Spinréact. L'uréase hydrolyse l'urée en ammoniacque (NH_4^+) et le dioxyde de carbone (CO_2). Les ions NH_4^+ réagissent avec le salicylate et l'hypochlorite (NaClO), en présence de nitroprusside pour former l'indophénol de couleur verte (Kaplan et al, 1984), selon les réactions :

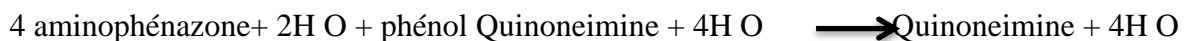
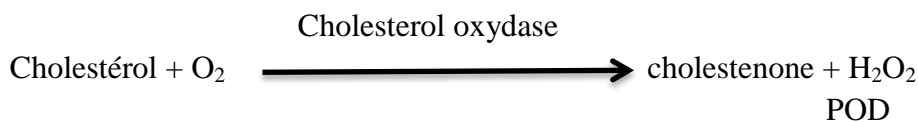


Dans un tube sec 10µl d'échantillon sont additionnés à 1ml de réactif 1 [uréase 30000 U/L dissoute dans un tampon phosphate pH=6.7 : 50mmol/l contenant (EDTA : 2mmol/l, salicylate de sodium : 400mmol/l, nitroprusside de sodium : 10mmol/l)], agitation, incubation à 37°C pendant 5 minutes, ensuite 1ml de réactif 2 (hypochlorite de sodium : 140mmol/l, hydroxyde de sodium: 150 mmol/l) est ajouté au mélange, , agitation, incubation à 37°C pendant 5 min, lecture contre un blanc réactif à 580 nm avec utilisation d'un étalon.

$$\text{Urée (mg/dl)} = \frac{\text{(A)echantillon}}{\text{(A)etalon}} \times 50 \text{ (concentration de l'étalon)}$$

3.5.3. Cholestérol

Méthode colorimétrique selon la fiche technique Spirant. Le cholestérol présent dans le sérum se transforme en composé coloré selon les réactions suivantes (Naito & Kaplan, 1984) :



Dans un tube sec 10µl d'échantillon (sérum) sont additionnés à 1ml de réactif de travail [R2 (Cholestérol estérase: 300 U/L, Cholestérol oxydase: 300 U/L, Peroxydase (POD) : 1250U/L, 4- aminophénazone: 0.4 mmol/l) dissout dans le tampon ; R1(PIPES pH6.9 : 96 mmol/l, phénol : 26 mmol/l)], agitation, incubation à 37°C pendant 05minutes. Lecture de la densité optique à λ=505 nm contre un blanc réactif en utilisant un tube étalon.

$$(\text{Cholestérol}) \text{ mg/dl} = \frac{(A) \text{ échantillon}}{(A) \text{ étalon}} \times 200 \text{ (concentration de l'étalon)}$$

Facteur de conversion : mg/dl x 0.0258 = mmol/l

4. Études statistiques

Les résultats obtenus ont été exprimés par la moyenne de six répétitions (moyen ± écart type), et pour mieux visualiser en utilisant l'office Excel 2010 pour représentés ces résultats sous forme 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 «tukey», 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.



Résultats



2. Résultats

2.1. Effets du spinosad et l'ephedra sur les paramètres de la croissance globale des animaux

Les résultats de l'évaluation des paramètres de croissance en termes de poids corporel, le gain de poids et le poids relatif durant les un mois de traitement des différents groupes d'animaux par le spinosad et *Ephedra sinica*.

2.1.1. Poids corporel

Les résultats de l'évaluation du poids corporel montrent une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) de poids corporel chez les rats traités par S à une dose 0.25 mg/kg/j (*fig.30A*) où le nombre enregistré était ($245.43 \pm 4.75g$), alors qu'il n'a atteint que ($283.25 \pm 15.60g$) chez les rats témoins (*tab.11*).

En revanche, on observe une amélioration de gain de poids à chaque fois qu'on associe l'Ephedra E au pesticide S (*fig.30B*).

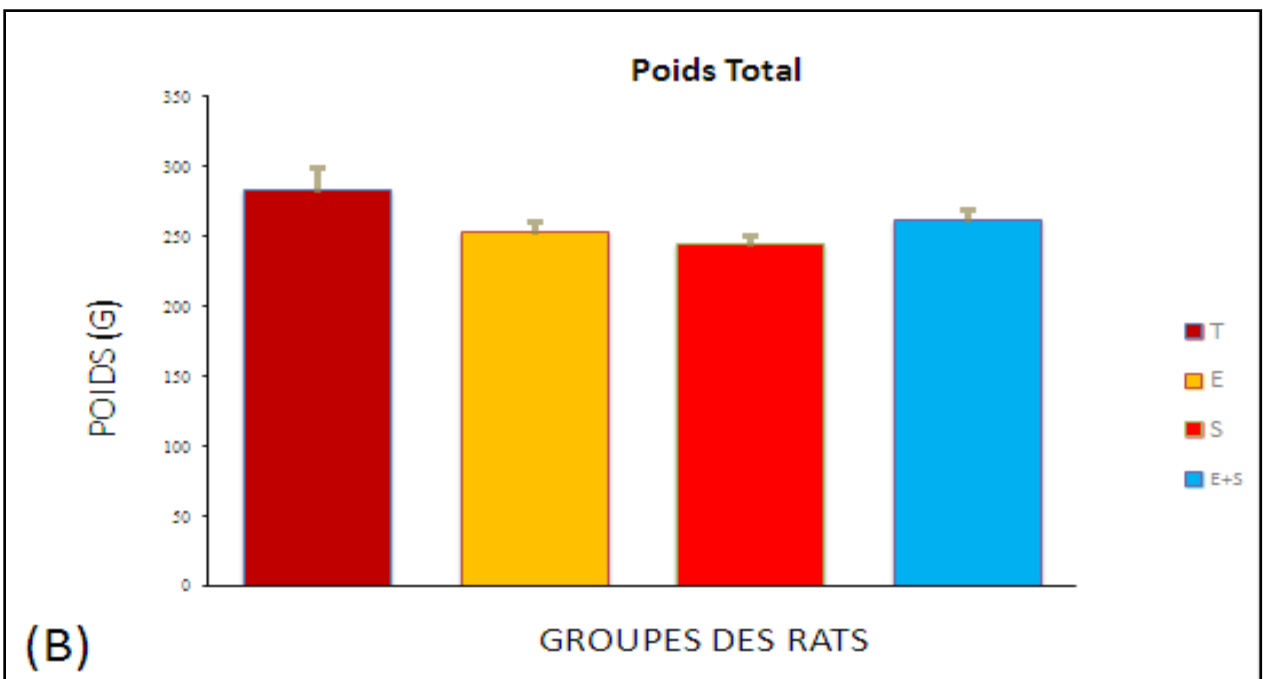
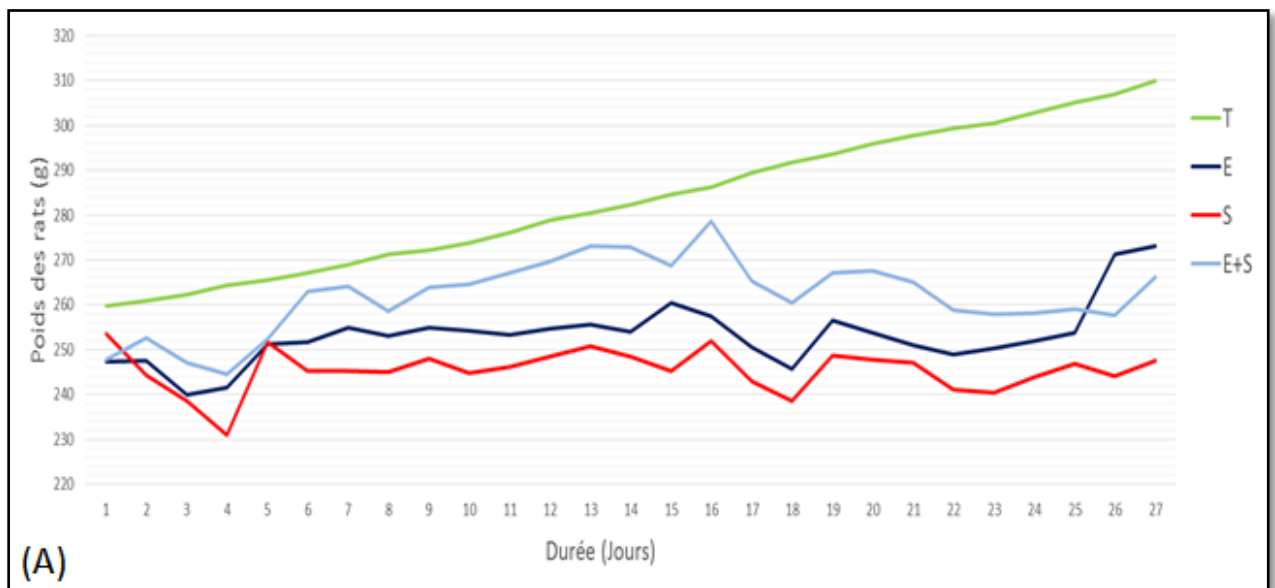


Figure 30. Evolution du poids corporel (PC) chez les différents groupes traités durant un mois par le spinosad (S) et à l'ephedra (E). (A) : changement cinétique du poids. (B) : Différence des poids total entre les différence groupes des rats.

2.1.2. La différence entre poids initial et final

Les résultats de l'évaluation de la différence entre le poids initial et le poids final (fig A.) présentent une diminution non significatif ($P > 0.05$) chez les lots traités par E en

comparaison avec le lot témoin (*fig.31 A*). Ces résultats montrent aussi une diminution très hautement significative ($P \leq 0.001$) chez les rats traités par Spinosad à une dose 0.25 mg/kg/j (*fig.31-B*) où le nombre enregistré était $(-6 \pm 20.09g)$, alors qu'il n'a atteint que $(50 \pm 6.83g)$ chez les rats témoins (*tab.11*).

En revanche, on observe une amélioration de la différence entre le poids initial et poids final à chaque fois qu'on associe l'Ephedra E au pesticide S. (*fig.31-B*)

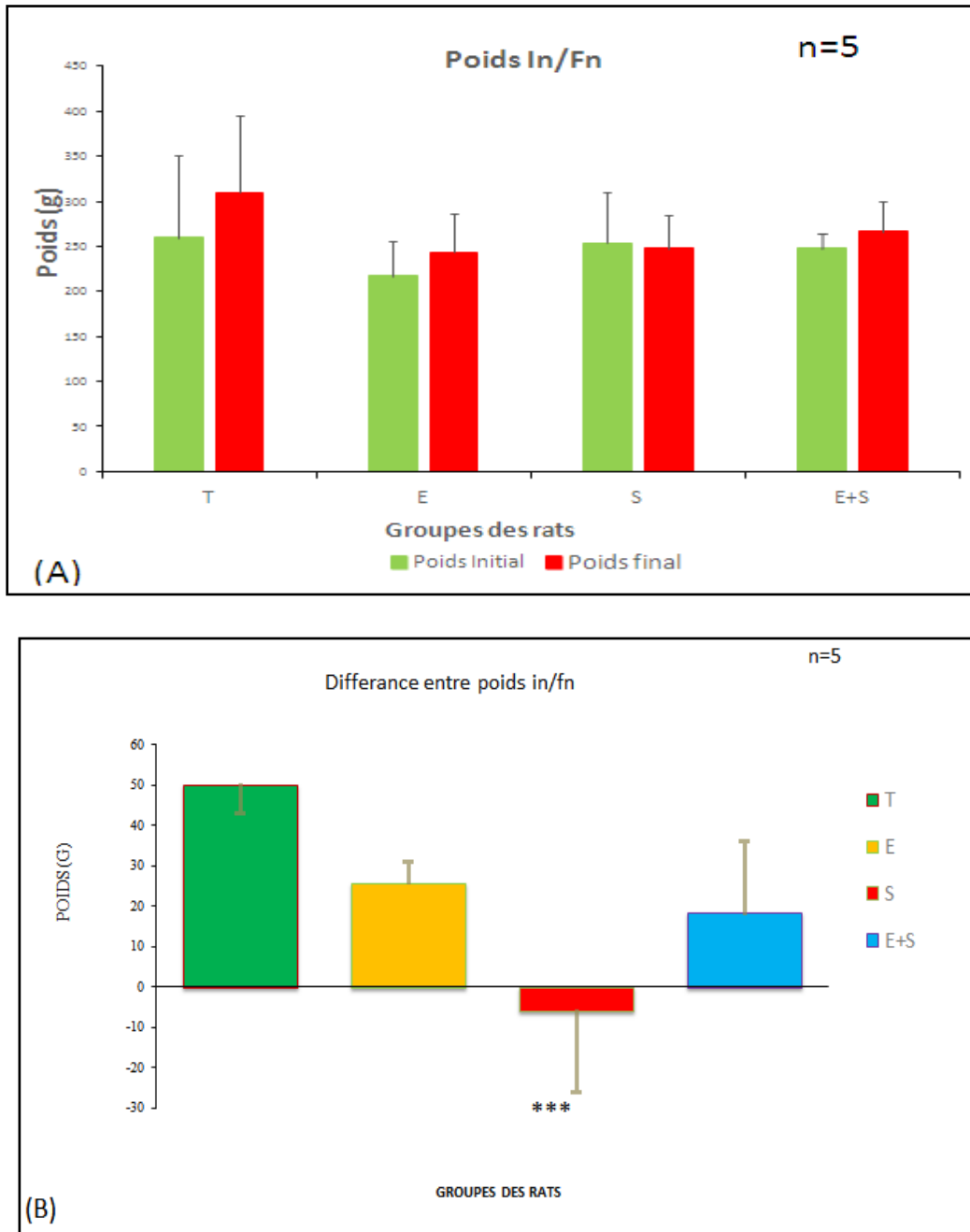


Figure 31. La différence entre poids initial et final chez les différents groupes traités durant un mois par le Spinosad S et à l'Ephedra E.

2.1.3. Gain de poids (GP)

Les résultats de l'évaluation du gain de poids présentent une diminution de gain de poids chez les lots traités par E en comparaison avec le lot témoin. Ces résultats montrent aussi une forte diminution significative de GP chez les rats traités par Spinosad à une dose 0.25 mg/kg où le nombre enregistré était $(-9.33 \pm 6.15 \text{ g})$, alors qu'il n'a atteint que $(56.5 \pm 0.67 \text{ g})$ chez les rats témoins (*tab.11*).

En revanche, on observe une amélioration de gain de poids à chaque fois qu'on associe l'Ephedra E au pesticide S par rapport lot S (*fig.32*).

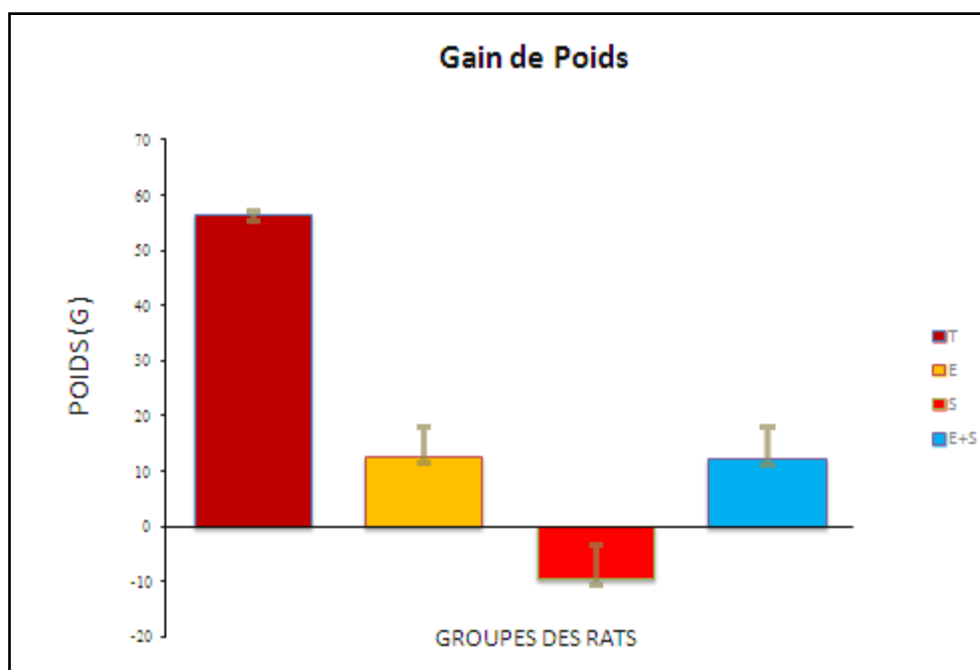


Figure 32. Evolution du gain de poids corporel (GP) chez les rats témoins et traités après un mois de traitement par le pesticide (S) et l'Ephedra (E).

2.1.4. Poids relatif du cerveau (PRc)

Les résultats de l'évaluation du poids relatif PRc, présentent une augmentation non significative ($P > 0.05$) du poids de cerveau chez les rats traités par Spinosad à une dose 0.25 mg/kg/J où le nombre enregistré était $(0.88 \pm 0.08 \text{ g})$, alors qu'il n'a atteint que $(0.76 \pm 0.21 \text{ g})$ chez les rats témoins (*tab.11*).

En revanche, on observe une amélioration de gain de poids à chaque fois qu'on associe l'Ephedra E au pesticide S par rapport lot S (*fig.33*).

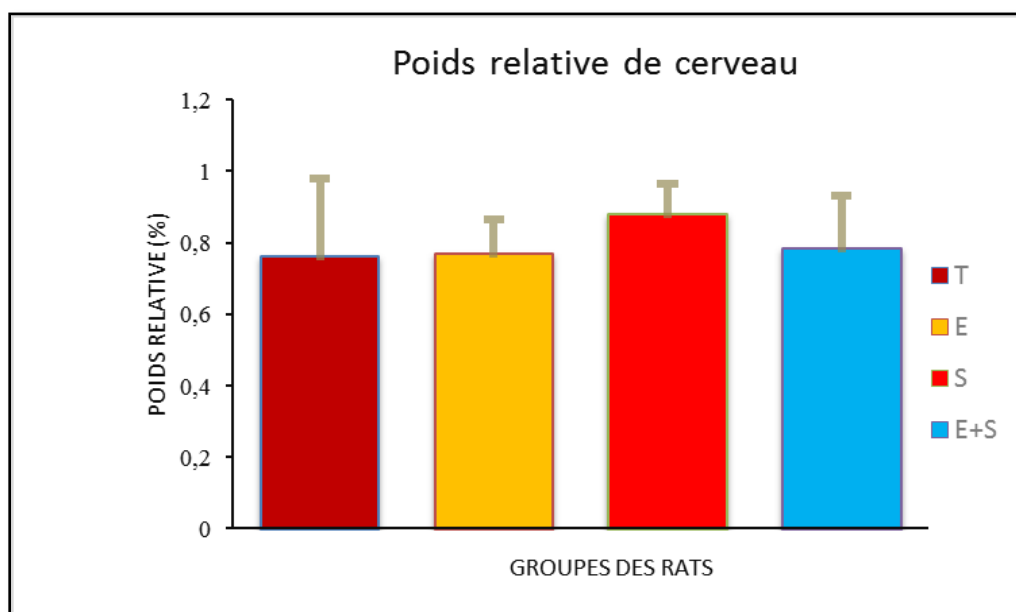


Figure 33. Evolution du poids relatif du cerveau (PRc) chez les rats traités durant un mois par le pesticide (S) et l’Ephedra (E).

Tableau 11. Variation des poids corporel PC, Gain de poids GP, poids relatifs du cerveau PRc chez les rats témoins et traités *Ephedra Sinica* (E), Spinosad (S) et Spinosad+Ephedra (E+S) après un mois de traitement.

Paramétré	Groupes de rats traités			
	T	E	S	E+S
PC (G)	283,25±15,60	253,26±7,09	245,432±4,75	261,89±8,21
Différence entre PI et PF (G)	50±-6,83	25,83±5,01	06±20,09	18,33±17,81
GP (G)	56,5±0,67	12,66±5,59	9,33±6,15	12,33±5,73
PRc (%)	0,76±0,21	0,77±0,09	0,88±0,08	0,78±0,14

2.2. Étude des paramètres biochimiques et enzymatiques

2.2.1. Effet du spinosad et l'Ephedra sur les paramètres biochimiques chez les rats

➤ Effet du spinosad et l'Ephedra sur le taux des protéines

La figure 34 et le tableau 12 montrent le taux des protéines cérébrales. Nous constatons une diminution hautement significative ($P \leq 0.01$), de taux de protéine cérébrale chez le lot traité (S) Spinosad à une dose 0.25mg/Kg/j où le nombre enregistré était (0.29 ± 0.07 Mg/Mg d'CHAN), alors qu'il n'a atteint que (0.55 ± 0.05 Mg/Mg d'CHAN) chez les rats témoins (tab.12).

En revanche, on observe une amélioration de gain de poids à chaque fois qu'on associe l'Ephedra E au pesticide S (fig.34).

Tableau 12. Variation du taux des protéines cérébrales chez les rats dans les différents lots expérimentaux ($m \pm \delta$).

Lots expérimentaux	T	E	S	S+E
protéine (Mg/Mg d'CHAN)	$0,55 \pm 0,05$	$0,53 \pm 0,05$	** $0,29 \pm 0,07$	$0,47 \pm 0,05$

Chaque valeur est exprimée es moyenne \pm écart type. Le test de student est appliqué pour une étude statistique comparative entre les différents groupes traités et les groupes témoins.

($P \leq 0.05$) : significatif (*), ($P \leq 0.01$) : hautement significatif (**), ($P \leq 0.001$) : très hautement significatif (***), ($P > 0.05$) : non significatif.

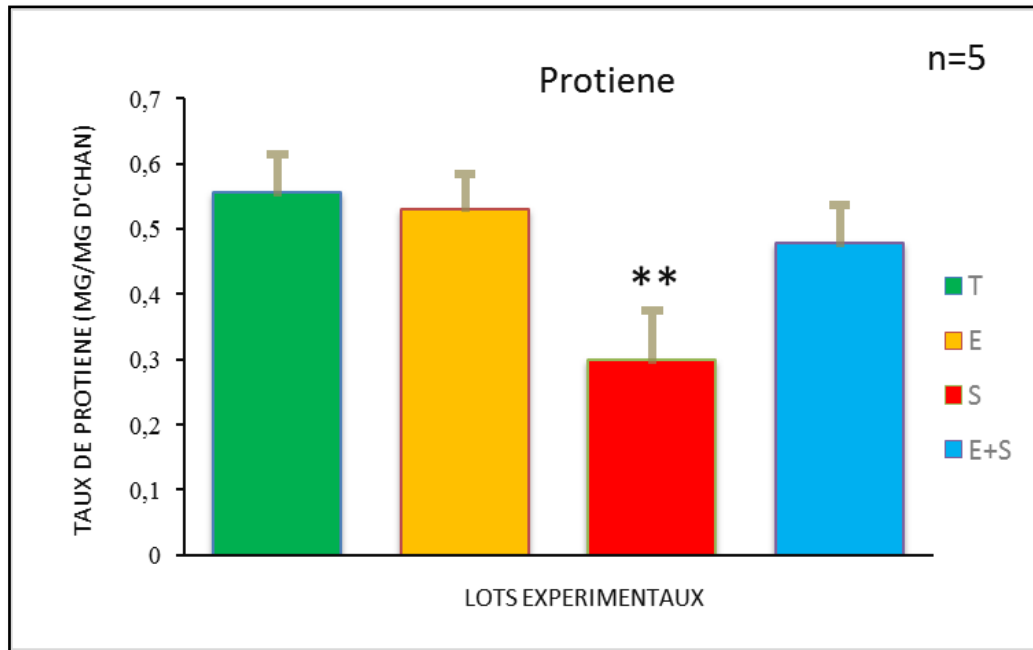


Figure 34. Variation de taux des protéines cérébrale (mg/g) chez les rats témoins et traités après Un mois de traitement.

2.2.2. Effet du Spinosad et l'Ephedra sur les paramètres enzymatiques chez les rats

A. Effet du spinosad et l'ephedra sur le taux de malondialdéhyde (MDA)

La figure 35 et le tableau 13 représentent le traitement des rats Wistar par Spinosad à une dose (0.25mg/kg/jour) et l'ephedra à une dose (100mg/Kg/j) pendant un mois. Nous notons une augmentation très hautement significative ($P \leq 0.001$) de la teneur en malondialdéhyde (MDA) cérébrale, dans le lot traité par le S, par rapport au lot témoin (*tab.13*).

En revanche, on observe une amélioration de taux de MDA à chaque fois qu'on associe l'Ephedra E au pesticide S (*fig.35*).

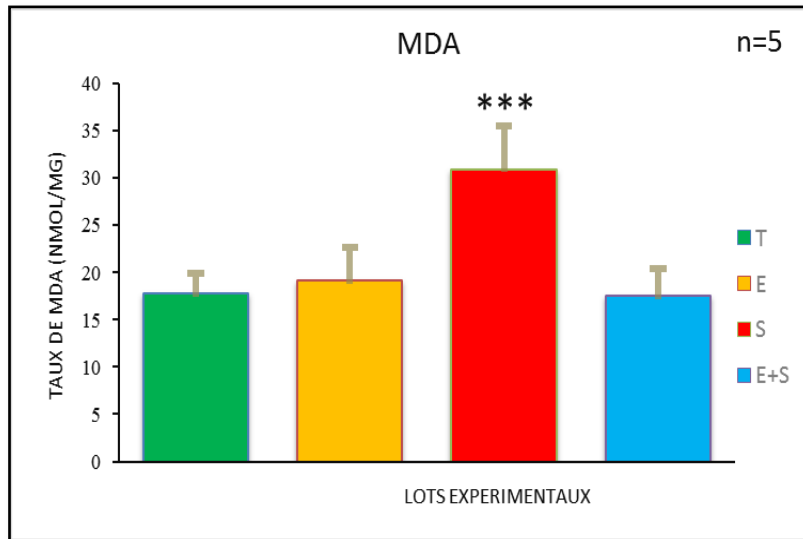


Figure 35. Variation du taux de MDA ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) chez les rats témoins et traité après un mois de traitement

B. Effet du spinosad et l'ephedra les variations d'activité de catalase CAT

La figure 36 et le tableau 13 montrent que l'activité de catalase CAT. Nous constatons une augmentation non significative ($P > 0.05$) de taux de CAT cérébrale chez le lot traité (E) par rapport le lot témoin et une diminution très hautement significatif ($P \leq 0.001$) de taux CAT cérébral chez le lot traité par (S) à une dose 0.25 mg/kg/j par rapport les rats témoins (tab.13).

En revanche, on observe une amélioration de l'activité CAT à chaque fois qu'on associe l'Ephedra E au pesticide S (fig.36).

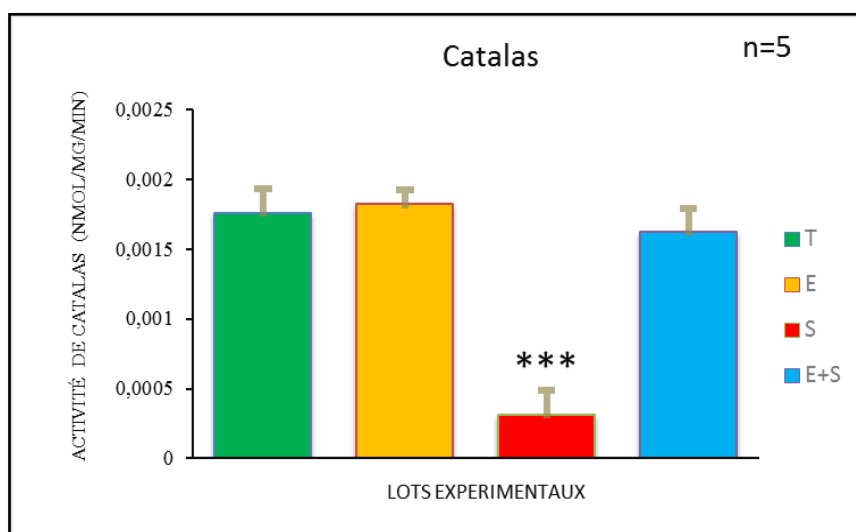


Figure 36. Variation de l'activité enzymatique de Catalase ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) chez les rats témoins et traité après un mois de traitement.

C. Effet du spinosad et l'ephedra sur les variations d'activité de la Glutathion peroxydase GPx

La figure 37 et le tableau 13 montrent que l'activité de Glutathion peroxydase GPx. Nous constatons une augmentation hautement significative ($P \leq 0.01$) de taux de GPx cérébrale chez le lot traité (S) à une dose 0.25 mg/kg/j par rapport les rats témoins (*tab.13*).

En revanche, on observe une amélioration de taux de GPx cérébral à chaque fois qu'on associe l'Ephedra E au pesticide S (*fig.37*).

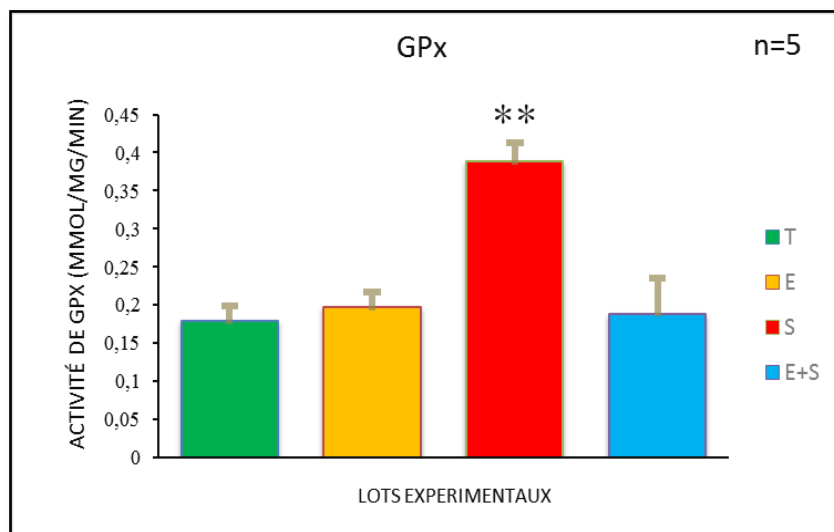


Figure 37. Variation du taux de GPx cérébrale ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) chez les rats témoins et traités après un mois de traitement.

D. Effet du spinosad et l'ephedra sur le taux de Glutathion réduit GSH

La figure 38 et le tableau 13 représentent le taux de GSH cérébrale. On remarquera une augmentation non significatif ($P > 0.05$) de taux de GSH au niveau du lot traité par E à une dose 100mg/Kg/j et une diminution très hautement significative ($P \leq 0.001$) de la teneur cellulaire en glutathion réduit (GSH) au niveau du lot traité par Spinosad (S) à une dose de (0.25mg/kg/j) pendant un mois comparant au lot témoin.

En revanche, on observe une amélioration de la teneur cellulaire en GSH à chaque fois qu'on associe l'Ephedra E au pesticide S (*fig.38*).

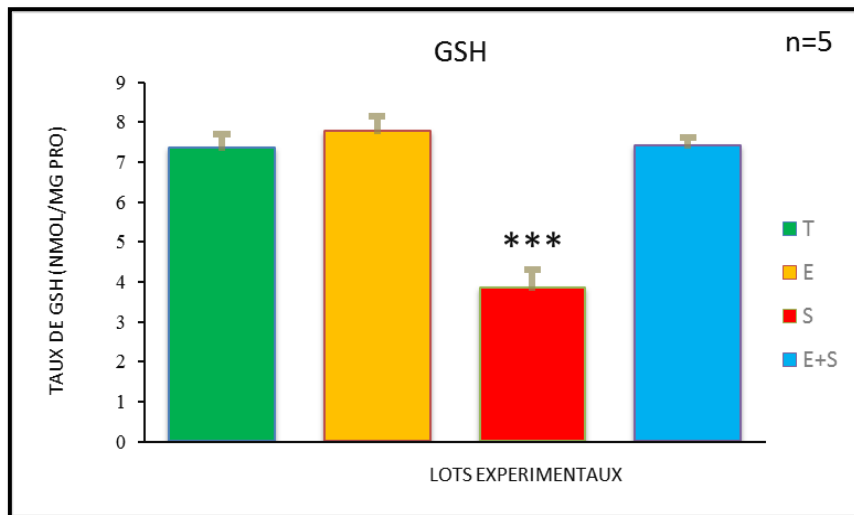


Figure 38. Variation du Taux de GSH ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protéine) chez les rats témoins et traités par spinosad, l'Ephedra et E+S après un mois de traitement.

E. Effet du spinosad et l'Ephedra sur les variations d'activité de Glutathion-S-transférase GST

La figure 39 et le tableau 13 représentent le taux de GST cérébrale. On remarquera une augmentation non significatif ($P > 0.05$) de taux de GST au niveau du lot traité par E à une dose $100\text{mg}/\text{Kg}/\text{j}$ et une diminution hautement significative ($P \leq 0.01$) de taux de GST cérébral au niveau du lot traité par Spinosad (S) à une dose de ($0.25\text{mg}/\text{kg}/\text{j}$) pendant un mois comparant au lot témoin.

En revanche, on observe une augmentation significatif ($P < 0.05$) de taux de GST cérébrale à chaque fois qu'on associe l'Ephedra E au pesticide S (*fig.39*).

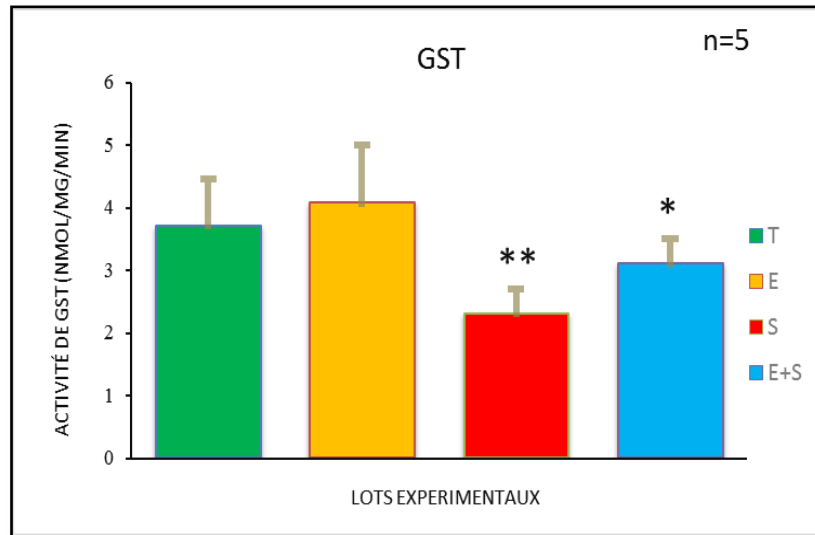


Figure 39. Variation de l'activité de GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) chez les rats témoins et effet de spinosad et *l'Ephedra sinica* après un mois de traitement.

Tableau 13. Variation cytosolique des Glutathion (GSH), Malon dialdéhyde (MDA), l'activité enzymatique de la Glutathion peroxydase (GPx), Glutathion S transférase (GST), et la catalase (CAT) dans le cerveau total chez les rats témoins et traités *Ephedra Sinica* (E), Spinosad (S) et Spinosad+Ephedra (E+S) après un mois de traitement.

Paramètres	Groupes de rats traités			
	T	E	S	E+S
MDA ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine)	17,76 \pm 2,12	19,15 \pm 3,45	*** 30,95 \pm 4,50	17,51 \pm 2,88
CAT ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine)	0,001 \pm 0,001	0,001 \pm 0,0001	*** 0,0003 \pm 0,0001	0,001 \pm 0,0001
GPx ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine)	0,17 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01	** 0,38 \pm 0,02	0,18 \pm 0,04
GSH ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protéine)	7,35 \pm 0,33	7,77 \pm 0,37	*** 3,84 \pm 0,46	7,41 \pm 0,21
GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine)	3.7067 \pm 0.7534	4.06 \pm 0.93	** 2.30 \pm 0.40	* 3.09 \pm 0.40

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

2.3. Effets des pesticides et de la spinosad et l'ephedra sinica sur le neurotransmetteur (Ache) dans le cerveau total

✓ Acétylcholine estérase

Les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'activité de l'acétylcholinestérase dans le cerveau total. On remarque une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) de l'activité de l'Ache est enregistrée dans le cerveau global chez le groupe traité par S à une dose 0.25mg/Kg/j et une augmentation non significatif ($P > 0.05$) cher le groupe traité par E à une dose 100mg/Kg/j pendant un mois comparant au lot témoin.

En revanche, on observe une augmentation significatif ($P < 0.05$) de taux de l'activité Ache à chaque fois qu'on associe l'Ephedra E au pesticide S (*fig.40*) et remarquée une augmentation significative ($p \leq 0,05$) de l'activité de cette enzyme est également observée chez le lot traité par E+S par rapport le groupe traité par le S comparés tous au lot témoin.

Tableau 14. Activités du taux d'AchE chez les rats dans les différents lots expérimentaux ($m \pm \delta$).

Lots expérimentaux	T	E	S	E+S
Ache (nmol/min/mg)	81,09±6,18	83,91±3,14	*** 41,65±5,18	* 71,48±4,10

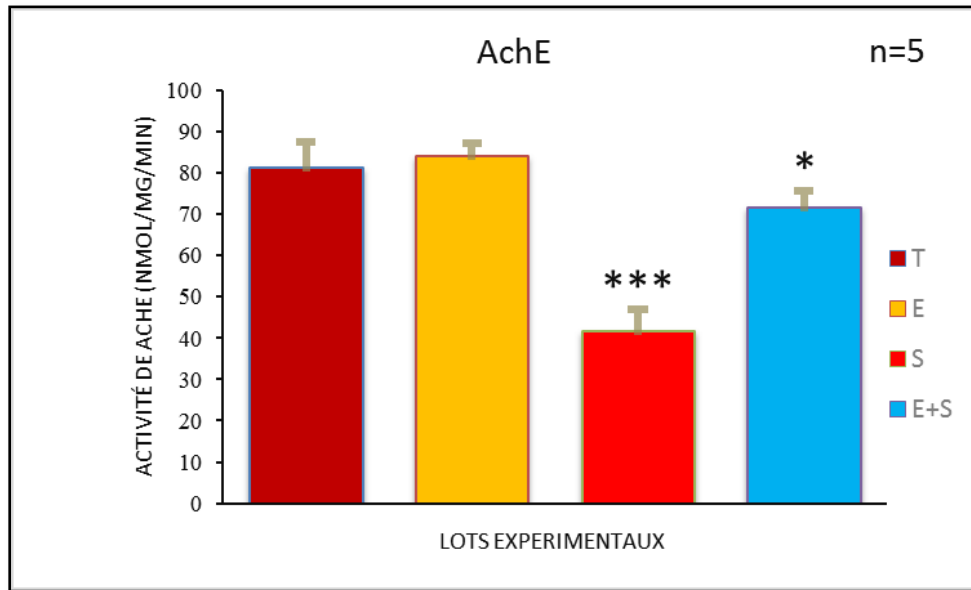


Figure 40. Variation de l'activité de AchE (nmol/min /mg) chez les rats témoins et Effet de spinosad et *l'Ephedra sinica* après un mois de traitement.

2.4. Effets du pesticide et l'Ephedra sur le neurocomportemental chez le rat

2.4.1. Test de «Open field »

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

- La figure (41-A) présente une augmentation du temps de latence par le S dans la zone intermédiaire par rapport aux témoins.
- La figure (41-B) présente une augmentation du nombre total de Groning par rapport aux témoins.
- La figure (41-C) présente une diminution du nombre total de Reaning par rapport aux témoins.
- La figure (41-D) présente une diminution du nombre total de fréquence déambulation par rapport aux témoins.

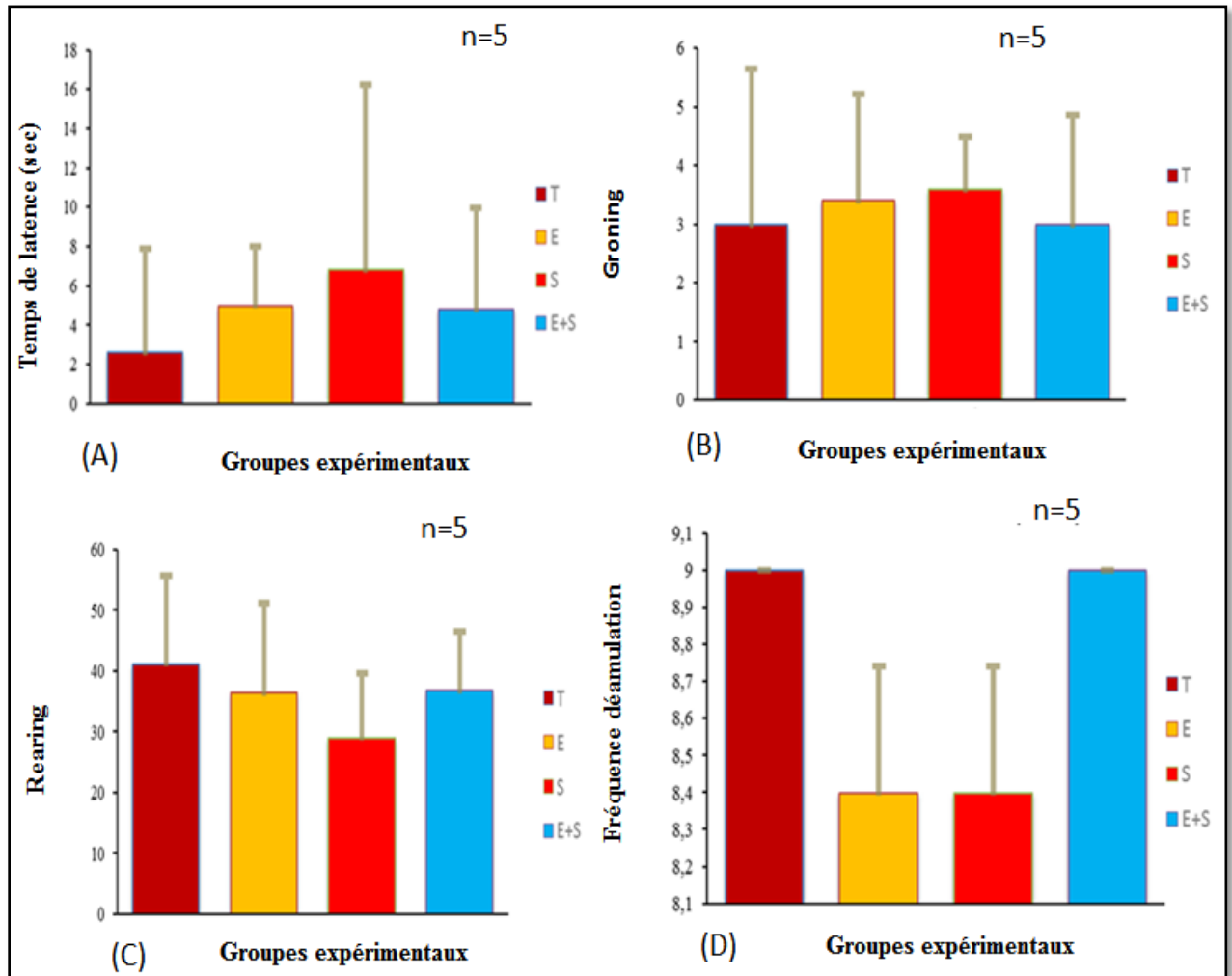


Figure 41. Variation des données du test Open Field chez les rats traités durant un mois par le spinosad et l'Ephedra. (A): Temps de latence ; (B): Groning ; (C): Rearing ; (D): fréquence déambulation

Le tableau 15 présent Variation des données de test d'Open field, nous avons remarqué chez les rats traités par S à une dose 0.25mg/Kg/j une augmentation de temps de latence (Sec) où le nombre enregistré était (6.8±9.41 sec), alors qu'il n'a atteint que (2.6±5.27 Sec) chez les rats témoins et une augmentation de nombre de groning où le nombre enregistré était (3.6±0.89), alors qu'il n'a atteint que (3±2.64) chez les rats témoins et une diminution de nombre de rearing où le nombre enregistré était (29±10.60), alors qu'il n'a atteint que (41.2±14.46) chez les rats témoins, et une diminution de nombre de fréquence déambulation où le nombre enregistré était (8.4±0.34), alors qu'il n'a atteint que (9±0) chez les rats témoins.

En revanche, on observe une amélioration de ces données à chaque fois qu'on associe l'Ephedra E au pesticide S.

Tableau 15. Variation des données de test d'Open field (Temps de latence (Sec), Groning, Rearing, fréquence déambulation) chez les rats témoins et traités Ephedra Sinica (E), Spinosad (S) et Spinosad+Ephedra (E+S) après un mois de traitement.

Données de test d'Open Field	Groupes de rats traités			
	T	E	S	E+S
Temps de latence (Sec)	2,6±5,27	5±3	6,8±9,41	4,8±5,16
Groning	3±2,64	3,4±1,81	3,6±0,89	3±1,87
Rearing	41,2±14,46	36,4±14,65	29±10,60	36,8±9,67
Fréquence déambulation	9±0	8,4±0,34	8,4±0,34	9±0

2.4.2. Test de préférence au sucrose

Les résultats obtenus de ce test montrent chez le groupe traité par S une diminution très hautement significative ($P \leq 0.001$) de consommation d'eau après 3h où le nombre enregistré était (4.66 ± 7.93 ml), alors qu'il n'a atteint que (20.66 ± 11.01 ml) chez les rats témoins (*tab.16*), et une diminution hautement significatif ($P \leq 0.01$) de consommation d'eau sucrée après 3h par rapport le groupe témoin où le nombre enregistré était (34.33 ± 9.02 ml), alors qu'il n'a atteint que (65 ± 10.66 ml) chez les rats témoins (*tab.16*), et une augmentation significatif ($P < 0.05$) de consommation d'eau sucrée chez les rats traités par E+S comparé aux témoins, et aussi ces mêmes résultats ne montrent aucune différence significative chez les rats traités par E par rapport aux témoins (*fig.42*).

En revanche, on observe une amélioration de concentration de consommation d'eau et d'eau sucrée à chaque fois qu'on associe l'Ephedra E au pesticide S.

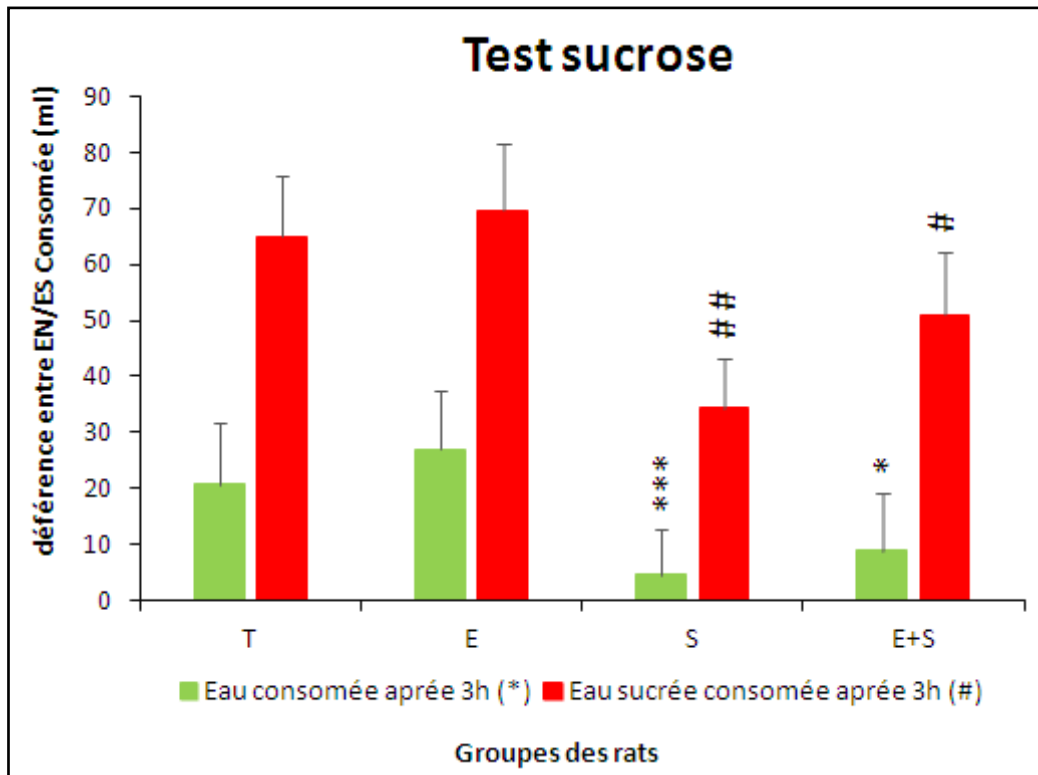


Figure 42. Variation du test de préférence au sucrose et de la consommation d'eau sucrée chez les rats traités durant un mois par le pesticide S et l'Ephedra E.

2.4.3 Test de nage forcée

Les résultats affichés dans de la figure 43 et le tableau 16 montrent une diminution hautement significative ($p \leq 0,01$) du temps de résistance chez les rats traités par S comparés aux témoins, où le nombre enregistré était (1.32 ± 0.31), alors qu'il n'a atteint que (5 ± 0) chez les rats témoins (*tab.16*).

En revanche, on observe une amélioration de temps de résistance chaque fois qu'on associe l'Ephedra E au pesticide S (*fig.43*).

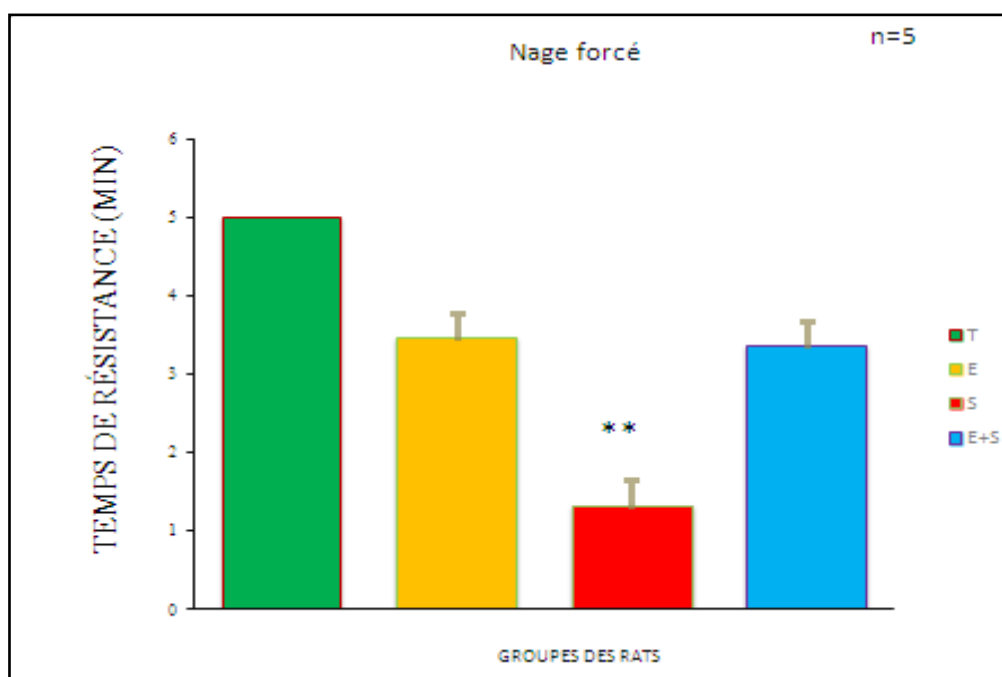


Figure 43. Variation du test de nagé forcée chez les rats traités durant un mois par le pesticide S et l’Ephedra E.

Tableau 16. Variation des données de test de nagé forcée et test de sucrose chez les rats témoins et traités *Ephedra Sinica* (E), Spinosad (S) et Spinosad+Ephedra (E+S) après un mois de traitement.

Paramètre	Groupes de rats traités			
	T	E	S	E+S
Test de nagé forcée (min)	5±0	3,46±0,32	1,32±0,31 **	3,37±0,31
Test de sucrose (ml)	20,66±11,01	27±10,57	4,66±7,93 ***	9±10,14 *
	65±10,66	69,66±11,80	34,33±9,02 ##	51±11,07 #

2.5. Histologie du cerveau total (Topographie du cerveau)

2.5.1. Effets de pesticide et de l'Ephedra sur l'observation macroscopique du cerveau

On observe une diminution de la taille de cerveau chez les rats traités par le pesticide spinosad par rapport au témoin.

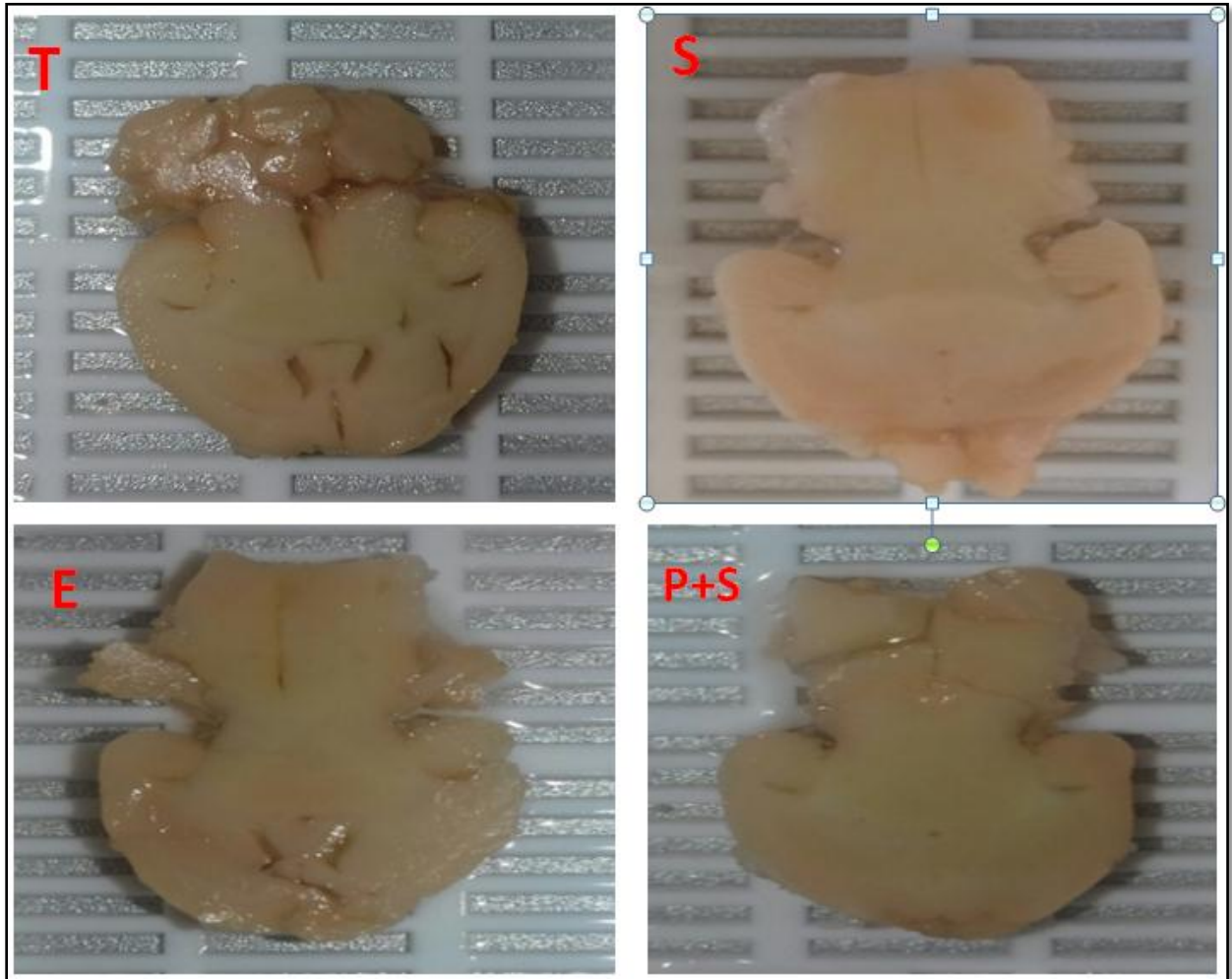


Figure 44. Observation macroscopique du cerveau chez les rats traités par S, E, E+S et les rats témoins.

2.5.2. Effets de pesticide et de l'Ephedra sur l'histologie globale du cerveau

L'observation des coupes histologiques du cerveau totale des rats traités par le Spinosad à 0.25mg/Kg/j pendant 30 jours, révèle une modification morphologique de région cérébrale bien visible par rapport au groupe témoins, la coupe histologique montre une altération structurale des tissus marqués par la présence des taches noires qui sont des zones dilatées et comparés au cerveau témoin. Aussi, on a pu constater un changement morphologique dans la taille de régions cérébrale comparée au cerveau témoin. On conclue par une observation de remaniements auto-lytiques dans les tissus cérébraux.

Alors que le traitement des animaux par *Ephedra sinica* à 100mg/Kg/j seule ou associée au pesticide spinosad les altérations tissulaire induites par le pesticide.

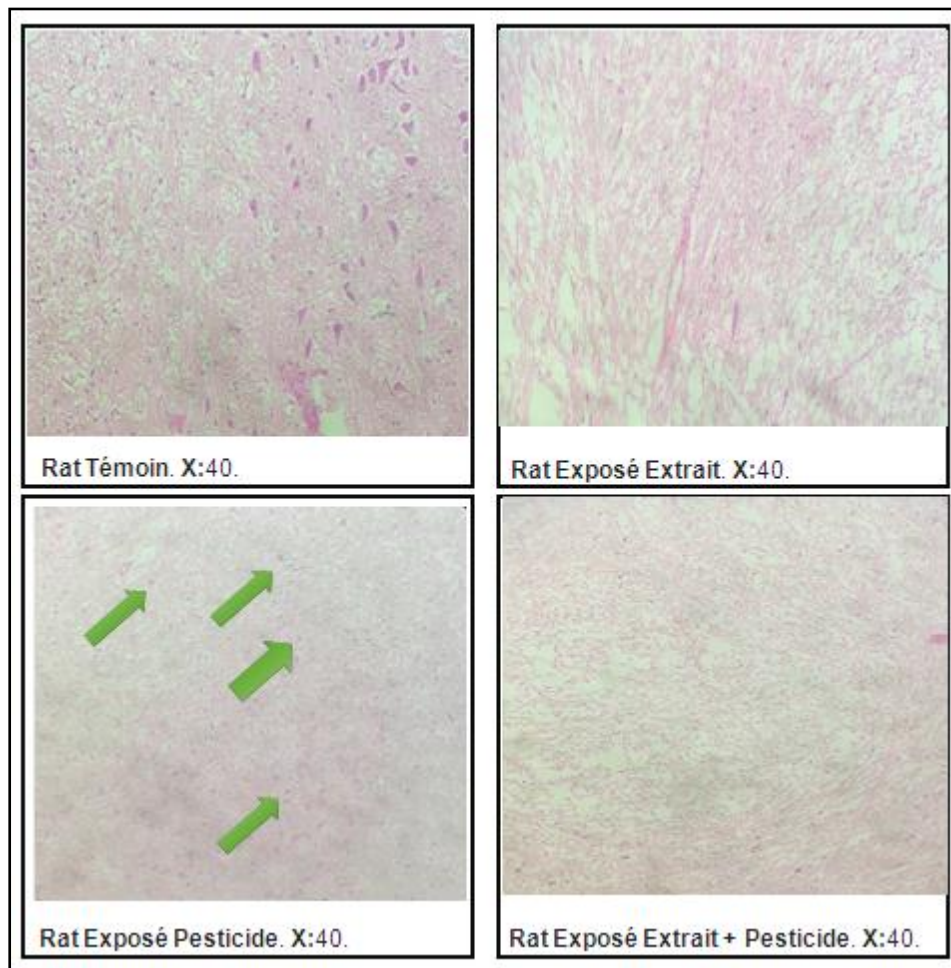


Figure 45. Coupes histologiques ($\times 40$) dans le cerveau totale des rats témoins et traités par *Ephedra sinica* (ES) et Spinosad (S) et leurs combinaisons après 30 jours.

2.6. Paramètres hématologiques chez les rats

Les paramètres hématologiques des rats sont des analyses sur le sang [Glycémie, Taux d'urée et cholestérol]

2.6.1. Glycémie

Le traitement des rats par l'insecticide Spinosad a induit une augmentation hautement significative ($P \leq 0.01$) du taux de glycémie chez les rats traitée par le spinosad à une dose 0.25 mg/kg où le nombre enregistré était (1.54 ± 0.08 g/L), alors qu'il n'a atteint que (1.28 ± 0.05 g/L) chez les rats témoins (tab.17).

En revanche, on observe amélioration de taux de la glycémie à chaque fois qu'on associe l'Ephedra E au pesticide S par rapport les rats traités par le spinosad (*Fig.46*).

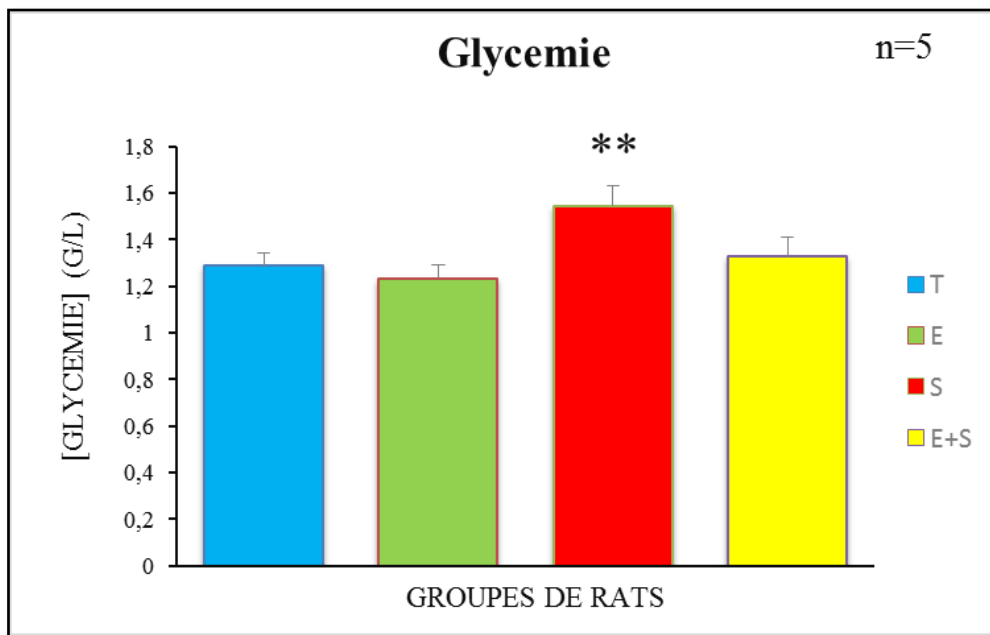


Figure 46. L'effet de Spinosad et l'Ephedra sur le taux de glycémie.

2.6.2. Taux d'urée

Le traitement des rats par l'insecticide Spinosad a induit une augmentation très hautement significative ($P \leq 0.001$) du taux d'urée chez les rats traitées par le spinosad à une dose 0.25 mg/kg où le nombre enregistré était ($0.74 \pm 0.06 \text{g/L}$), alors qu'il n'a atteint que ($0.25 \pm 0.05 \text{g/L}$) chez les rats témoins (*tab.17*).

En revanche, on observe amélioration de taux d'urée à chaque fois qu'on associe l'Ephedra E au pesticide S par rapport le lot traitée par le spinosad (*fig.47*).

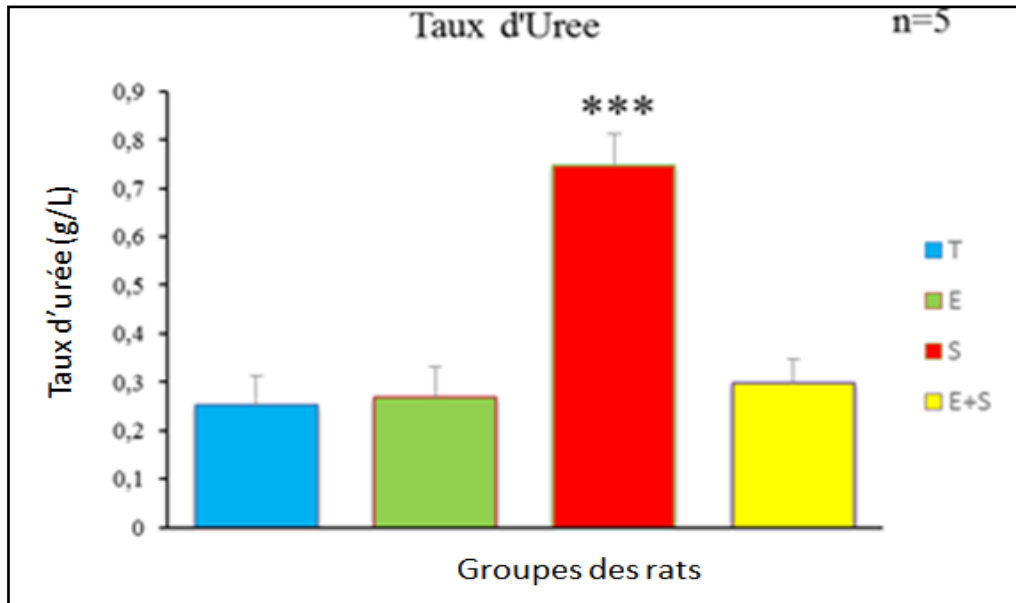


Figure 47. L'effet de Spinosad et l'Ephedra sur le taux d'urée.

2.6.3. Cholestérol

Le traitement des rats par l'insecticide Spinosad a induit une augmentation hautement significative ($P \leq 0.01$) du taux de cholestérol chez les rats traitées par le spinosad à une dose 0.25 mg/kg où le nombre enregistré était ($0.88 \pm 0.05 \text{g/L}$), alors qu'il n'a atteint que ($0.66 \pm 0.04 \text{g/L}$) chez les rats témoins (*tab.17*).

En revanche, on observe une amélioration de taux de cholestérol à chaque fois qu'on associe l'Ephedra E au pesticide S par rapport les rats traités par le spinosad (*fig48.*).

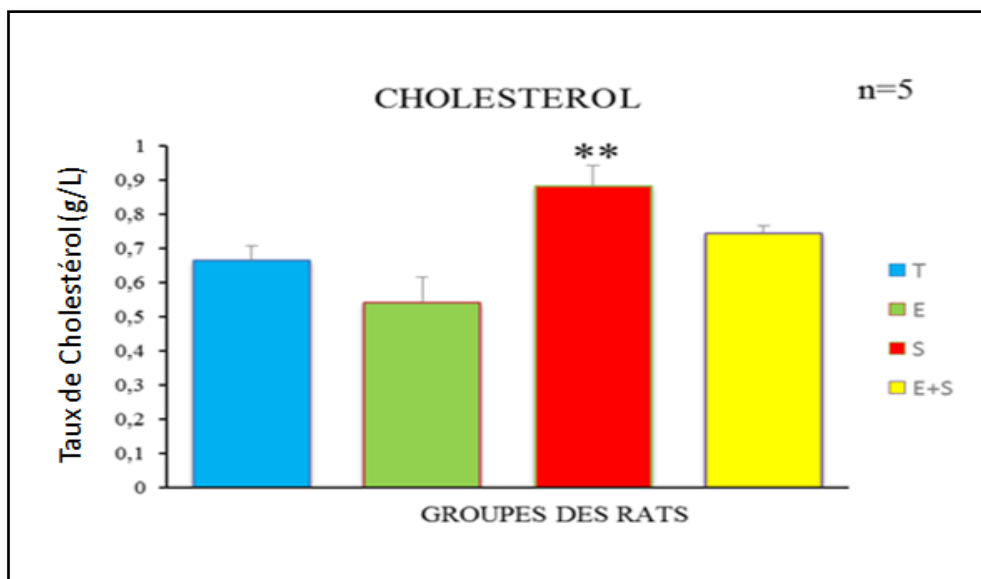


Figure 48. L'effet de Spinosad et l'Ephedra sur le taux de cholestérol.

Tableau 17. Variation des paramètres hématologique (glycémie, taux d'urée, cholestérol) chez les rats témoins et traités *Ephedra Sinica* (E), Spinosad (S) et Spinosad+Ephedra (E+S) après un mois de traitement.

Paramètres	Groupes de rats traités			
	T	E	S	E+S
Glycémie (g/L)	1,28±0,05	1,23±0,05	** 1,54±0,08	1,32±0,08
Taux d'urée (g/L)	0,25±0,05	0,27±0,06	*** 0,74±0,06	0,29±0,04
Cholestérol (g/L)	0,66±0,04	0,54±0,07	** 0,88±0,05	0,74±0,02

Chaque valeur est exprimée es moyenne ± écart type. Le test de student est appliqué pour une étude statistique comparative entre les différents groupes traités et les groupes témoins.

($P \leq 0.05$) : significatif (*), ($P \leq 0.01$) : hautement significatif (**), ($P \leq 0.001$) : très hautement significatif (***), ($P > 0.05$) : non significatif.



Discussions



3. Discussion

De récentes études épidémiologiques suggèrent que les pesticides pourraient contribuer au développement de maladies neurodégénératives, comme les maladies de Parkinson et d'Alzheimer. Au sein de la famille des pesticides, les insecticides sont souvent les plus incriminés pour leur caractère neurotoxique (Steeve H et al., 2013). 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 (Gasmi, 2018). Le stress oxydant est impliqué dans les mécanismes de mort cellulaire lors des maladies neurodégénératives. La maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson idiopathique et la sclérose latérale amyotrophique sont les plus fréquentes de ces affections. Dans ces trois cas, les marqueurs du stress oxydant sont anormaux (Desport et Couratier, 2002).

Dans cette présente étude, nous sommes intéressés, à priori à la mise en évidence d'un éventuel effet neurotoxique sur le cerveau total chez les rats exposés à des petites doses plus réalistes possibles du spinosad (S), et à l'intérêt de la prévention de cette toxicité par *l'ephedra sinica* (ES), 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 de spinosad et *l'ephedra sinica* sur les paramètres de la croissance globale

Les résultats de l'évaluation des paramètres pondéraux suggèrent que l'administration d'insecticide spinosad provoque une diminution significative de la croissance corporelle chez les rats traités par spinosad à dose 0.25mg/Kg/j. 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 certaine cytokine proinflammatoire que l'organisme puisse libérer après les effets toxiques des pesticides. 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 (Gasmi, 2018).

Ce résultat s'accorde avec l'étude de **Belhaouchet, 2014**, qui en travaillé sur l'évaluation de la toxicité du spinosad « insecticide nouvellement introduit en Algérie » sur un modèle expérimental bioindicateur de la pollution « *Helix aspersa* »

Par ailleurs, l'utilisation de *l'ephedra sinica* 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 (**Gasmi, 2018**).

3.2. Effets de spinosad et *l'ephedra sinica* sur les paramètres biochimiques

Dans la MA, L'expression de toutes les protéines pro-apoptotiques était significativement diminuée (**Claire et al., 2016**). D'après les résultats de ce travail, l'exposition des rats au spinosad à induit une diminution de taux de protéine cérébrale. Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Chaabane et al., 2012**, L'exposition de spinosad, entraine une diminution dans le contenu en protéines. Ces modifications métaboliques pourraient s'expliquer par des perturbations dans le contrôle nerveux et endocrinien (via les neurohormones et hormones) causées par la neurotoxicité du spinosad.

En revanche, on observe une amélioration de taux de protéine chez les rats traités par la mixture de spinosad et *l'ephedra*, selon la composition de *l'ephedra* (alcaloïdes, flavonoïdes...), les flavonoïdes qui diminuer la peroxydation lipidique, parce que la peroxydation lipidique et le taux de protéine qui fonctionnement inversé.

3.3. Effets de spinosad et *l'ephedra sinica* 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 de ROS (-2% transformé en O₂[°]), mais avec les systèmes antioxydants cellulaires cette quantité ne présente aucun risque pour l'organisme (**Gasmi, 2018**). D'après les résultats obtenus de cette étude, l'exposition des animaux au pesticide spinosad présente un déséquilibre du statut redox dans le cerveau. Le stress oxydatif est impliqué dans de très nombreuses pathologies telles que le cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, vieillissement accéléré. Il est un des facteurs de genèse de maladies plurifactorielles telles que la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (**Kada, 2018**).

En revanche, on observe une amélioration sur les paramètres de stress oxydatif chez les rats traités par la mixture de spinosad et l'ephedra, cela est dû aux composants de cette plante.

3.3.1. Effets sur le taux Malondialdéhyde (MDA)

Dans notre étude, nous avons constaté que le taux de MDA tend à augmenter chez les rats traités par l'insecticide spinosad par rapport aux témoins. Malondialdéhyde (MDA), comme un biomarqueur de la peroxydation lipidique, est susceptible d'être ajouté à des biomacromolécules, entraînant une lésion cérébrale secondaire. Le malondialdéhyde (MDA), l'un des plus importantes espèces carbonylées réactive, est un biomarqueur essentiel de la peroxydation lipidique. Le MDA surproduit peut réagir avec des protéines ou des acides nucléiques et endommager irréversiblement la fonctionnalité du cerveau, conduisant à une nouvelle reperfusion blessure (Di Su et al., 2020). Nos résultats sont en accord avec les travaux de Maiza et al., 2011, dans cette étude le taux de MDA chez les séries traitées par le spinosad significativement augmentée, en comparaison aux séries témoins, indiquant donc une peroxydation lipidique des membranes cellulaires, L'augmentation du taux de MDA suite à une déficience du système de défense antioxydant. Et nos résultats sont en accord aussi avec les travaux de Belhaouchet et al., 2012, qui a étudié « Evaluation of the biomarkers of the oxidative stress induced by a biopesticide: The Spinosad on an alternate model: *Helix aspersa* ». Et nos résultats sont en accord aussi avec les travaux de Wenping et al., 2017, la concentration de MDA a augmenté après une exposition au spinosad, qui est largement utilisé comme indicateur de peroxydation lipidique. Celles-ci les résultats ont indiqué que la peroxydation lipidique. Nos résultats ont montré que 30 jours de l'exposition de spinosad a augmenté significativement le taux de MDA dans le cerveau, ce résultat s'accorde avec l'étude de (Saadi et al., 2018).

En revanche, on observe une amélioration De taux de MDA chez les rats traités par la mixture de spinosad et l'ephedra, selon la composition de l'ephedra (alcaloïdes, flavonoïdes...), les flavonoïdes constituent la classe la plus étudiée, la propriété antioxydant des flavonoïdes la mieux décrite est leur capacité à piéger le radical libre: radical hydroxyle, l'anion super oxydé et les radicaux peroxydes. Les flavonoïdes inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle (C₃OH) fortement réactif.

Nous pouvons estimer que ce pesticide a un effet sur la formation de MDA et que l'action anti- oxydant de ephedra, dans l'extrait de l'ephedra sinica qui présente des teneurs

élevées en alcaloïdes et flavonoïdes agissent d'une manière neuroprotectrice et normalise ces effets toxiques, ce résultat s'accorde avec l'étude de **(Bounihi, 2016)**.

3.3.2. Effets sur le taux de catalase (CAT)

Nous avons constaté dans la présente étude que le taux de la catalase a significativement diminué chez les rats traités par le spinosad. La catalase (CAT) se distingue comme l'une des enzymes naturelles les plus efficaces pour catalyser la division de H_2O_2 en HO et O_2 ; H_2O_2 est l'une des espèces réactives de l'oxygène (ROS) impliquées dans les oxydants le stress **(Rubio-Riquelme et al., 2020)**. La CAT localisée principalement dans le peroxyosome, mais elle se trouve aussi dans le cytoplasme, la CAT permettent ainsi l'élimination du H_2O_2 . Tout fois catalase semble jouer un rôle important en présence de forte concentration de H_2O_2 **(Rouaki, 2016)**. La catalase est une enzyme de la phase II qui joue un rôle important dans les mécanismes de désintoxication. Il catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène hors de l'eau et de l'oxygène moléculaire. d'activité CAT s'explique par des lésions cellulaires causées par l'exposition aux contaminants **(Belhaouchet et al., 2012)**. Et nos résultats sont en accord aussi avec les travaux de **Wenping et al., 2017**, Dans les cellules traitées au spinosad, nous avons observé une diminution de l'activité CAT. Dans des conditions de stress oxydatif, le ROS a altéré les propriétés chimiques des biomolécules, ce qui provoque des agressions oxydatives telles que la dénaturation des protéines, la peroxydation des lipides et l'oxydation des acides nucléiques. Les cellules présentent une variété de moyens de défense mécanismes pour neutraliser les dommages oxydatifs; l'enzyme antioxydant de CAT constitue comme la première ligne de défense contre les effets toxiques des radicaux superoxydes.

3.3.3. Effets sur le taux de GPx

En ce qui concerne le taux de GPx au niveau de cerveau, les résultats de la présente montrent qu'il tend à augmenter chez les rats exposés à spinosad par rapport aux témoins. La glutathion peroxydase est localisée dans le cytosol, le réticulum endoplasmique et dans la membrane interne des mitochondries **(Guillouty, 2016)**. La glutathion peroxydase (GPx) est un important intracellulaire enzyme qui décompose les peroxydes d'hydrogène (H_2O_2) en eau; et les peroxydes lipidiques à leurs alcools correspondants principalement dans les mitochondries et parfois dans le cytosol. L'enzyme joue un rôle plus crucial dans l'inhibition du processus de peroxydation lipidique et protège donc les cellules du stress oxydatif **(Ighodaro, Akinloye, 2017)**. Et nos résultats sont en accord aussi avec les travaux de **Acer et**

al., 2019, il a été observé que le spinosad activé la glutathion réductase au niveau cellulaire et augmentation de l'activité GPx.

3.3.4. Effets sur le taux de GSH

Le glutathion est le composé réducteur soufré le plus abondant dans le compartiment intracellulaire. Le glutathion génère un radical superoxyde qui doit être pris en charge par une SOD, ce qui témoigne, là encore, de l'importance de la coopération entre les différents systèmes de défense anti-radicalaire (**Bouaricha, 2013**). Le glutathion (GSH) est un antioxydant endogène important trouvé en concentrations millimolaires dans le cerveau, est l'un des antioxydants thiol les plus abondants dans les cellules. Beaucoup les maladies chroniques et liées à l'âge sont associées à une baisse des niveaux cellulaires de GSH ou altération de l'activité catalytique du glutamate, une enzyme biosynthétique du GSH cystéine ligase (GCL) (**Braidy et al., 2019**). Glutathion (GSH), le antioxydant hydrosoluble majeur, est connu pour protéger les cellules membranes et lipoprotéines de peroxydation, est impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires, y compris défense antioxydante via une interaction directe avec les espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou via les activités des enzymes de détoxification comme les peroxydases GSH (**Petek et Nevin, 2013**). Dans notre étude, nous avons constaté que le taux de GSH tend à diminué chez les rats traités par le spinosad par rapport aux témoins, et nos résultats sont en accord aussi avec les travaux de **Maiza et al., 2011**.

3.3.5. Effets sur le taux de GST

Nos résultats montrent une diminution du taux de GST lors d'une exposition à l'insecticide spinosad au niveau du cerveau des rats. La glutathion S-transférase (GST) est une grande famille de gènes codant pour des enzymes multifonctionnelles, présentes principalement dans le cytoplasme. Les GST sont principalement impliqués dans le métabolisme du stress oxydatif via la conjugaison d'une variété de substrats, tels que les composés endobiotiques et xénobiotiques pour détoxifier les molécules de piégeage (**Ghanganal et al., 2020**). La glutathion S-transférase (GST) sont des enzymes de détoxification qui jouent un rôle crucial dans la formation de la résistance aux grandes classes de pesticides et allèles-produits chimiques (**Edosa et al., 2018**). Le résultat que nous avons obtenu est cohérent avec les travaux de **Belhaouchet et al., 2012**, ou ils ont remarqué une augmentation de l'activité GST cette augmentation est un réponse au stress oxydatif provoqué par la présence de Spinosad dans le corps. Le résultat que nous avons obtenu est cohérent aussi avec les travaux

de **Wenping et al., 2017**, Dans notre cas, les dommages des radicaux libres de l'actif les sites des enzymes antioxydants pourraient être une cause possible du déclin de l'activité des enzymes de cellules Sf9 traitées au spinosad. La GST est une enzyme clé des systèmes de désintoxication cellulaire, qui est important pour la protection antioxydant et le métabolisme xénobiotique. Dans la présente étude, l'activité de la GST a été augmentée dans les cellules Sf9 qui ont été exposés aux deux concentrations de spinosad. La peroxydation lipidique est considérée comme un indicateur des dommages oxydatifs des composants cellulaires.

3.4. Effets de spinosad et l'ephedra sinica 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 (**Gasmi, 2018**). D'après les résultats obtenus de cette étude, l'exposition des animaux au pesticide spinosad présente une diminution de taux de l'Ache dans le cerveau par rapport aux témoins. L'Ache représente un biomarqueur de neurotoxicité habituellement utilisé pour révéler l'exposition aux produits chimiques comme les organochlorés et le carbamate, l'inhibition de l'Ache a été fréquemment utilisée en toxicologie, pour diagnostiquer certains contaminants environnementaux tels que le complexe mélanges de polluants, détergents et métaux lourds. AChE est impliquée dans les systèmes de transmission de l'influx nerveux à travers l'organisation. L'inhibition de l'enzyme par les nombreux neurotoxiques implique une accumulation de la substance émettrice, l'acétylcholine (Ache), dans l'espace synaptique, qui maintient de ce fait une transmission permanente du nerf impulsion, conduisant à la mort de l'individu (**Belhaouchet et al., 2012**). Dans la maladie d'Alzheimer, les troubles cognitifs sont associés à une dégradation progressive des fibres cholinergiques à l'origine de l'hypothèse cholinergique de la MA. Cette maladie produit des altérations dans l'expression et l'activité de la choline-acétyltransférase et de l'acétylcholinestérase (Ache) (**Julie J., 2015**). Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Chaabane et al., 2012**, Dans cette étude l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase est diminuée par le spinosad. Le site cible des divers insecticides, à action neurotoxique est principalement l'acétylcholinestérase. Et aussi ces résultats sont en accord avec les travaux de **Monteiro et al., 2019**, des effets inhibiteurs du spinosad sur l'activité AChE ont été signalés pour d'autres espèces d'insectes et, en tant que modulateur des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine, certaines altérations de l'activité AChE étaient attendues.

La présente étude a démontré que l'exposition in vivo au spinosad provoquait une inhibition de l'Ache dans le cerveau. Des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes d'inhibition d'Ache par spinosad (**Petek et Nevin, 2012**).

Les flavonoïdes des propriétés neurosédatives, antispasmodiques, diurétiques, anti-œstrogènes (isoflavones), contre la sénescence cérébrale et ses conséquences telles l'altération de la mémoire et la confusion. (**Chelli et Zenad, 2018**).

3.5. Effets de spinosad et l'ephedra sinica 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 (**Gasmi, 2018**). Après un mois de traitement (30 jours), on observe une perturbation comportementale dans les différents paramètres neurocomportementaux dans les différents tests chez les rats exposés au pesticide afin d'évaluer leur activité locomotrice, émotionnelle, exploratoire, mémorisation et l'apprentissage. Les résultats du test d'Open-field (OF), test de sucrose et test de nagé force qui ont montré un changement comportemental.

3.5.1. Test d'open field

Le test en champ ouvert (OFT) est une mesure courante du comportement exploratoire et de l'activité générale chez les souris et les rats, où la qualité et la quantité de l'activité peuvent être mesurées. Principalement, le champ ouvert (OF) est une enceinte, généralement de forme carrée, rectangulaire ou circulaire avec des murs environnants qui empêchent toute fuite. Le résultat d'intérêt le plus fondamental et le plus courant est le «mouvement»; cependant, cela peut être influencé par la puissance motrice, la conduite exploratoire, le gel ou tout autre comportement lié à la peur, la maladie, le temps relatif dans le cycle circadien, parmi de nombreuses autres variables. La distance parcourue, le temps passé à se déplacer, l'élevage et le changement d'activité au fil du temps font partie des nombreuses mesures qui peuvent être tabulées et rapportées (**Todd et al., 2009**).

Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Acar et al., 2019**, Le test d'Open field (OFT) a été utilisé pour observer la locomotrice activité et comportements anxieux des animaux. Dans le test OF, nous avons observé une diminution significative de la distance totale parcourue par les sujets dans tous les groupes subissant un spinosad. Bien que le groupe de spinosad ait diminué taux de mouvement, nous n'avons pas trouvé ces différences

significatives. Ces résultats révèlent l'effet du spinosad sur l'activité locomotrice. Le test OF est également un test utilisé pour démontrer comportement anxieux

3.5.2. Test de sucrose

Après un mois de traitement, on observe chez les rats traités par le spinosad une perturbation de consommation d'eau et d'eau sucrés par rapport aux témoins aux témoins. Ce test est basé sur un paradigme de libre choix entre deux biberons, l'un contenant de l'eau, l'autre une solution de saccharose (**El Hage, 2012**) Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Elodie, 2003**

En revanche, on observe une amélioration de concentration de consommation d'eau et d'eau sucrée à chaque fois qu'on associe l'Ephedra E au pesticide S.

3.5.3. Test de nage force

Après un mois de traitement, on observe chez les rats traités par le spinosad une diminution du temps de résistance par rapport aux témoins. Le test de nage forcée est validé comme aux approches expérimentales pour évaluer le potentiel d'efficacité des antidépresseurs chez les rongeurs. Les animaux de laboratoire sont placés dans une cuive d'eau et d'évasion liés à des comportements de mobilité est quantifié (**Can et al., 2012**).

Ces résultats est conforme avec les résultats des travaux (**Frih et al., 2010 ; Gardiera et al., 2001**) et aussi l'edude de **Bourin et al., 2002**, La clonidine potentialise les effets de la tranylcypromine, de la phénelzine et de deux analogues dans le test de nage forcée chez la souris. La théorie classique de la dépression des amines biogéniques est basée en partie sur l'action antidépressive des inhibiteurs de la MAO et des bloqueurs de recapture des monoamines. Initialement, une carence fonctionnelle en noradrénaline ou en 5-hydroxytryptamine (5-HT) dans la fente synaptique a été proposée comme base neuronale de la dépression. Cependant, cette théorie ne parvient pas à expliquer certains aspects fondamentaux de la dépression, car certains antidépresseurs ne semblent pas augmenter la concentration synaptique des monoamines. Un nombre croissant de preuves suggère que l'activité thérapeutique des antidépresseurs peut impliquer une action directe sur plusieurs systèmes récepteurs.

En revanche, on observe une amélioration de temps de résistance chez les rats traités par la mixture de spinosad et l'ephedra, parce que l'ephedra a diminuée la dépression.

3.6. Effets de spinosad et l'ephedra sinica sur l'histologie cérébrale

L'étude histologique menée sur le cerveau total chez les rats exposés au l'insecticide spinosad et à l'ephedra sinica a montré des ruptures et des lésions entre les cellules cérébrales par rapport au cerveau témoin. Ces ruptures peuvent être le résultat de la mort cellulaire par nécrose ou apoptose de mitochondrie-dépendant (**Gasmi, 2018**).

En ce qui concerne l'observation histologiques du cerveau total chez le groupe traité par l'insecticide spinosad, les coupes histologiques montrent une altération structurale des tissus marqués par la présence des taches noires qui sont des zones dilatées et comparés au cerveau témoin. Aussi, on a pu constater un changement morphologique dans la taille de régions cérébrale comparée au cerveau témoin. Et nos résultats sont en accord aussi avec les travaux de **Guerfali et al., 2020**, de l'étude de sensibilité des souches de champ et de laboratoire de *Ceratitis capitata* au malathion et au spinosad en Tunisie. Le cerveau des adultes non traités a montré la présence des cellules neurosécrétoires et gliales avec chromatine condensée dans les pars intercerebralis. Pendant le traitement adulte, nous avons remarqué que l'aspect de certaines cellules change de la dose utilisée.

Ces changements sont le résultat d'une nécrose, inflammation ou d'une apoptose cellulaire massive dans le cerveau sous les effets délétères de ROS produits par les pesticides (**Gasmi, 2018**).

3.7. Effets de spinosad et l'ephedra sinica sur les paramètres hématologiques

Dans cette étude l'administration de spinosad par voie orale à une dose de 0.25mg/Kg/j pendant un mois (30 jours) à augmenter significativement la glycémie et l'élévation de taux de cholestérol et l'urée, avec une normalisation de la glycémie chez le lot traité par *l'ephedra sinica*.. Les études longitudinales récentes ont mis en évidence des associations épidémiologiques entre certains facteurs et la maladie d'Alzheimer (MA), notamment les facteurs de risque cardiovasculaires, comme l'hypertension artérielle, le diabète, les apports nutritionnels, l'obésité, l'hyperhomocystéinémie et les dyslipémies. Ils paraissent tous associés à un risque majoré de survenue de MA incidente, tout particulièrement l'hypertension artérielle et le diabète (**Thomas et al., 2006**). La perturbation de l'homéostasie du cholestérol peut favoriser le développement de la maladie d'Alzheimer (**Nathalie et Noël Octave, 2014**). Le cholestérol est essentiel à la croissance et à la prolifération des cellules. Les cellules de mammifères normales répondent à leurs besoins en

cholestérol grâce à son absorption ou à sa synthèse de novo (**Javier et al., 2019**). L'importance du cholestérol et son essentialité pour l'Homme est examinée Le cholestérol est transporté au niveau de l'organisme humain par des lipoprotéines (chylomicrons, VLDL, LDL et HDL). Principalement les LDL, considérées «mauvais cholestérol » transportent le cholestérol du foie vers les tissus pour leurs besoins; alors que les HDL «bon cholestérol » ramènent le cholestérol vers le foie pour le recycler. Ainsi, le cholestérol est plutôt bon pour ces différentes fonctions dans l'organisme, et sa carence peut entraîner des dommages cellulaires, ainsi qu'une réduction de la synthèse des hormones comme la testostérone ou encore la vitamine D. L'hypercholestérolémie devrait être considérée comme un indicateur d'un problème de santé au niveau des cellules, que le corps essaye de surmonter par mobilisation du cholestérol (**Alaoui, 2019**).

Conclusion



Cette étude vise à évaluer la toxicité d'un biopesticide nouvellement introduit en Algérie, le Spinosad, chez les rats wister. Dans un premier temps consiste sur les effets du spinosad sur les paramètres métabolique et enzymatique de système nerveux de rats. Ce traitement provoque des troubles se manifeste par une perturbation dans le développement des paramètres physiologiques (diminution du poids des rats,). D'un autre côté, nous avons mis en évidence la perturbation du métabolisme globale à travers la diminution très hautement significative du taux de protéines totales.

En ce qui concerne l'étude des biomarqueurs d'exposition nous avons mis en évidence une diminution hautement significative du taux du glutathion et une diminution de la GST, et de l'inhibition de Catalase, augmentation hautement significative de GPx, de même qu'une augmentation très hautement significative du taux de MDA confirmant d'un côté la toxicité du biopesticide et de l'autre le déclenchement des systèmes de défense de l'organisme. Et un trouble comportementale.

De plus, nous avons mis en évidence une activité neurotoxique du pesticide à travers l'inhibition de l'activité Ache. L'étude histologique a confirmé cette sensibilité de l'espèce vis-à-vis de l'insecticide à travers des atteintes tissulaires observées particulièrement au niveau de cerveau. D'autre partie de notre travail concerne le rôle de sang dans la distribution du xénobiotique et la répercussion de cette activité sur les paramètres sanguins. Nos résultats ont mis en évidence une augmentation du taux de glycémie, et cholestérol, urée au niveau de ces derniers.

Ainsi, le Spinosad est toxique pour la santé et cette toxicité induit des perturbations Physiologiques et métaboliques. Il apparait donc que même les pesticides d'origine biologique semblent être aussi néfastes pour l'écosystème que les pesticides de synthèse. Ces grand changement des paramètres métaboliques et de stress oxydatif constituent des indicateurs de la neurotoxicité de spinosad pourront ainsi provoquer l'apparition des maladies neurodégénératives comme l'Alzheimer...etc.

Notre travail visait aussi à mettre en évidence l'effet neuroprotecteur de l'extrait de ephedra sinica contre cette toxicité et nos résultats ont montré ainsi que le traitement des rats exposé spinosad pendant 30 jours et par l'extrait ephedra du à raison de 100 mg/Kg/j ; avait pour effet protecteur de l'extrait sur la fonction neurale. Ces résultats confirment que le traitement par l'extrait a pu protéger l'organisme contre les effets neurotoxique des pesticides spinosad.

Perspectives

En vue de compléter notre travail il serait intéressant :

- De développer les dosages des biomarqueurs (LDH, SOD).
- Dosage de butyle estérase.
- Dosage de protéine bêta-amyloïde.
- D'étudier la toxicité de spinosad au niveau de l'autre organe (foie, rein, poumon).
- De réaliser une étude sur la mitochondrie.
- Des études sur les autres maladies liées à l'exposition de ce pesticide.

Références
Bibliographiques



- Acar A, Akkoc H & Erdinc M** (2019) The effects of spinosad on antioxidant system and cognitive performance of mice. Archives of physiology and biochemistry 1-5.
- Adouane S** (2016) Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région méridionale des Aures. Mémoire Magistère. Université Mohamed Khider - Biskra-. P5-10.
- Aebi** (1984) Catalase. In L. Packer (Ed), methods in enzymology, Academic press Orlando 105: 121-126.
- Aït hamlet S, Djekoun M, Bensoltane S et Berrebbah H** (2019) Effets du thiamethoxame et de la tefluthrine sur les biomarqueurs physiologiques de l'escargot terrestre *Helix aspersa*. Revue Agrobiologia 9(2): 1491-1498
- Alaoui L** (2019) le cholestérol: Bon ou mauvais ? Rev. Mar. Sci. Agron. Vét. (2019) 7(3): 498-501
- Alice D** (2016) MALADIE D'ALZHEIMER: Rôle du pharmacien d'officine dans la prise en charge des malades et de leurs aidants familiaux, Thèse doctorat. Université de Lille 2. P5-35.
- Al saeed W, Al Dhamen M, Rizwan, Niyaz A, Naqvi A**, 2019, Clinical uses and Toxicity of Ephedra sinica: An Evidence-Based Comprehensive Retrospective Review (2004–2017), Pharmacogn J. 11(1): 447-452.
- Al saeed W, Al Dhamen M, Rizwan A, Niyaz A, Naqvi A**(2019) Clinical uses and Toxicity of Ephedra sinica: An Evidence-Based Comprehensive Retrospective Review (2004–2017). Pharmacogn J. 11(2): 439-444.
- Amalou S** (2018) données épidémiologiques de la maladie d'Alzheimer dans la région de Blida, difficultés diagnostiques et propositions pour améliorer la qualité de la prise en charge, thèse doctorat. Université Saad Dahlab de Blida. P5-68.
- Araujo R, Lopesa M, Barbosab W, Gonçalvesc W, Fernandesc K, Gustavo F, Tavaresc M** (2019) Spinosad-mediated effects on survival, overall group activity and the midgut of workers of *Partamona helleri* (Hymenoptera: Apidae), Ecotoxicology and Environmental Safety 175 (2019) 148–154.
- Ayilalath A et Jyothis M** (2020) Characteristics and Types of Slow/Controlled Release of Pesticides, School of Biosciences, Mahatma Gandhi University, Priyadarshini Hills P.O, Kottayam, Kerala, India P141-144.
- Bayard C** (2017) l'intérêt de la musicothérapie dans le traitement de la maladie d'Alzheimer, Thèse doctorat. Université de Bourgogne. P32-39.

-Belhaouchet N (2014) Evaluation de la toxicité du Spinosad « insecticide nouvellement introduit en Algérie » sur un modèle expérimental bioindicateur de la pollution « *Helix aspersa* », Thèse doctorat. Université d'Annaba. P5-8.

-Belhaouchet N, Djebbar M, Meksem L, Grara N, Zeriri I, Berrebbah H (2012) Evaluation of the biomarkers of the oxidative stress induced by a biopesticide: The Spinosad on an alternate model: *Helix aspersa*. *Journal of Applied Sciences Research*, 8(8): 4199-4206.

-Berger M et Roussel A (2017) Complémentation ou oligo-éléments : qui, pourquoi, comment ? *Nutrition clinique ET métabolisme* 31: 93-102

-Birk JS ET Harvey RJ (2018) Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. *Cochrane Systematic Review – Intervention - Cochrane Database of Systematic Reviews* 237:1-338.

-Bothorel P (2011) Implication du stress oxydant dans la biologie tumorale & Intérêt d'une supplémentation en antioxydants au cours d'une chimiothérapie, thèse doctorat. Université de Limoges faculté de pharmacie. P38.

-Bouaricha H (2013) Evaluation du stress oxydatif induit par le Proclaim : Essai comparatif sur deux modèles biologiques (*Helix aspersa* et *Paramecium sp.*), thèse doctorat. université badji Mokhtar – Annaba. P 42-43.

-Boughrara B (2016) Inventaire et étude ethnobotanique et chimique des plantes à intérêts thérapeutique et nutritif du parc national El-Kala, thèse doctorat. Badji mokhtar annaba university, P 01.

-Bounihi A (2016) Criblage phytochimique, Étude Toxicologique et Valorisation Pharmacologique de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia* (Lamiacées), thèse doctorat. Université Mohammed, faculté de médecine et de pharmacie- rabat, P29

-Boussekine S (2014) Contribution à l'étude de l'effet du sélénium sur le mécanisme biochimique chez le diabète expérimental, thèse doctorat, Université Badji Mokhtar Faculté des Sciences Département de Biochimie. P 13-19

- 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: 248-254

- Braidly N, Martin Z , Jugder B, Jeffrey W, Tharusha J , Daniel K , Perminder S and Wallace B** (2019) The Precursor to Glutathione (GSH), γ -Glutamylcysteine (GGC), Can Ameliorate Oxidative Damage and Neuroinflammation Induced by A β ₄₀ Oligomers in Human Astrocytes. *Front. Aging Neurosci.* 1-11
- Breslin w, Marty m, Vedula u, Liberacki a and Yano b** (2000) developmental toxicity of Spinosad administered by gavage to CD1 rats and New Zealand White rabbits. *Food and Chemical Toxicology* 38: 1103-1112
- Can A, Dao D, Arab M, Terrillion C, Piatadosi S, Gould T** (2012) Le test de notation force Souris. *www.jove.com*
- Carles L** (2016) Devenir de mélanges de pesticides : étude des voies de biodégradation et développement d'une méthode préventive de bioremédiation, thèse doctorat. Université d'Auvergne. p 11-12
- Chaabane M, Benchaabane S, Kilani-morakchi S et Aribi N** (2012) Physiotoxicité du spinosad, évaluée sur deux générations, chez une espèce invasive, tuta absoluta (lepidoptera), et chez un modèle de référence, drosophila melanogaster (diptera) *Bull. Soc. zool. Fr.*, 2012, 137(1-4) : 57-68
- Charbit V** (2017) Les oligéléments: Role et conseils du pharmacien d'officine, Thèse doctorat. Université de Marseille, P18-19
- Chelli M, Zenad H** (2018), Evaluation in vitro de l'activité antioxydante des trois espèces végétales dans la région des Aurès, mémoire master. Université des Frères Mentouri Constantine 1.p 56
- Chevalier N** (2019) Polluants organiques persistants et cancers hormono-sensibles: Analyse des effets des perturbateurs endocriniens sur l'agressivité de cellules tumorales hormono-sensibles par vidéoimagerie. *Les cahiers de la Recherche. Santé, Environnement, Travail, ANSES*, 2019, Les perturbateurs endocriniens, p.20-22.
- Chevalier G** (2011) Analyse des interactions entre lymphocytes T CD8 et neurones au moyen du modèle de neuroinflammation induite par le Bornavirus, Thèse doctorat. L'université de toulouse. P35
- Christophe A** (2014) limites et risques de la phytothérapie, Thèse docteur. Université de limoges. P18

- Claire P, James N, Seth L, Clive H, Jacques H, Delphine B** (2016) Diminution de l'expression des protéines apoptotiques après immunisation active anti-amyloïde dans la maladie d'Alzheimer Morphologie Volume 100, Issue 330, Page 169
- Cottrell T, Reeves B, and Horton D** (2019) Spinosyns Cause Aedeagus Eversion in *Carpophilus* spp. (Coleoptera: Nitidulidae). *Journal of Economic Entomology*, XX(XX), 2019, 1–7
- Coureau L** (2014) le medecin generaliste et le soutien audomicile des patients atteints de maladie d'alzheimer: pratiques et difficultés après l'application du plan Alzheimer 2008-2012, étude comparative des milieux urbain, semi-rural et rural, Thèse doctorat. Université pierre et marie curie paris VI. P23-30
- Cruz J** (2015) Etude de la contamination par les pesticides des milieux eau, air et sols, Thèse Doctorat. L'Université de Bordeaux. P25-29
- Guillouty A** (2016) Plantes médicinales et antioxydants, thèse docteur, université Toulouse III Paul Sabatier faculté des sciences pharmaceutiques. Page 275-
- Cynthia F** (2015) Pollen grains of *Ephedra tweediana* C.A.Mey., recent species of the Ephedraceae in Brazil. Taylor & Francis
- Darabid H** (2015) Régulation de l'activité et de la connectivité synaptique par les cellules gliales au cours du développement de la jonction neuromusculaire de mammifères, thèse doctorat. Université de Montréal. P27
- Degandt A** (2019) La Maladie d'Alzheimer et ses thérapeutiques, Thèse doctorat. Université de Lille. P10-65
- Dennis J , Mckenna, Phd Kenneth Jones Kerry Hughe, MSc** (2002) botanical medicinal , major herbal supplements, second edition, the Haworth herbal Press An Imprint of the Haworth Press, Inc, New York*London*oxford, P 271-273
- Desport J et Couratier P**(2002) Stress oxydant et maladies neurodégénératives Oxydative stress in neurodegenerative diseases. *Nutrition clinique et métabolisme* 16: 253–259
- Di Su, Ping Li, Xin Wang, Wei Zhang, Yandi Zhang, Chuanchen Wu, Wen Zhang, Yan Li, Wenjun Tai, and Bo Tang** (2020) Observing Malondialdehyde Mediated Signaling Pathway in Cerebral Ischemia Reperfusion Injury with a Specific Nanolight. *Analytical Chemistry (Anal. Chem)*, 92, 3, 2748–2755
- Dorothee B** (2011) L'impact des pesticides sur la santé humaine, thèse doctorat. L'université henri poincare - nancy 1. P 27-29.

- Dunet J** (2009) Reactions de Michael et de Mannich appliquées à des arylcyclohexa-2,5-dienes en vue de la synthèse d'alcaloïdes de type aspidosperma et morphinanes, Thèse doctorat. L'université de Bordeaux I. P9
- Edosa TYong H. J, Maryam K, Young Sang A, Mi Young N, Yeon S. H** (2019) Current status of the management of fall webworm, *Hyphantria cunea*: Towards the integrated pest management development. *J Appl Entomol.*; 143: 1–10.
- El Hage C** (2012) L'anxiété liée au sevrage à la cocaïne: Étude comportementale et neuroanatomique, Thèse doctorat. Université Claude Bernard-Lyon1. P52
- Ellman G, Courtney K, Andres V, Featherstone R** (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholine esterase activity. *Biochem Pharmacol* 7(88)
- Elodie, Hélène, Marie Ollivier** (2003) Analyse comportementale de juvéniles dans un modèle de séparation mère/nouveau-né chez le rat, Thèse doctorat. École nationale vétérinaire d'Alfort. P63-65
- **Emiline L** (2010) maladie d'Alzheimer et thérapies non médicamenteuses : évaluation de la stimulation cognitive et de l'activité physique sur le fonctionnement exécutif, thèse doctorat. Université Victor Segalen Bordeaux2. P12-45
- Enric Ureña E, Guillem-Amat A, Couso-Ferrer F, Beroiz B, Nathalia P, López-Errasquín E, Castañera P, Ortego F & Hernández-Crespo P** (2019) Multiple mutations in the nicotinic acetylcholine receptor *Ccα6* gene associated with resistance to spinosad in medfly *Scientific Reports* 9: 2961 1-12
- **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
- Fana Q, Yuanliang W, Peng S, Sha L, Yang L** (2010) Discrimination of Ephedra plants with diffuse reflectance FT-NIRS and multivariate analysis. *Talanta* 80 : 1245–1250
- **Fanny L** (2013) Étude des effets liés à l'exposition aux insecticides chez un insecte modèle, *Drosophila melanogaster*, Thèse doctorat. L'université d'Orléans. P6-24
- Frih H, Djenidi R, Ali Rachedi B, Frih N, Tahraoui A et Bairi A** (2010) Le kétoconazole antagonise les effets immunogonadotropes au test de la nage forcée chez le rat mâle Wistar. *Rev. can. physiol. pharmacol.* 88 : 733–744

- Gaëlle P** (2014) Etude de l'échantillonnage intégratif passif pour l'évaluation réglementaire de la qualité des milieux aquatiques : application à la contamination en pesticides et en éléments trace métalliques des bassins versants du Trec et de l'Auvézère, Thèse Doctorat.universite de Limoges .p27-28
- **Ganzer M, C. Lanser, Stuppner H** (2005) Simultaneous determination of Ephedra sinica and Citrus aurantium var. amara alkaloids by ion-pair chromatography, Talanta 66; 889–894, Available online at www.sciencedirect.com, page 890.
- Gardiera A, Trillata A, Malagiéa I, Davidc D, Hascoëtc M , Colombelc M, Jollietc P , Jacquota C, Henb R, Bourinc M** (2001) Récepteurs 5-HT1B de la sérotonine et effets antidépresseurs des inhibiteurs de recapture sélectifs de la sérotonine. A. M. Gardier et al. / C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie / Life Sciences 324 ; 433–441
- Garrick A, Priebe, Mark M, Kanzawa** (2020) Reducing the progression of Alzheimer's disease in Down syndrome patients with micro-dose lithium. Medical Hypotheses 137; 109-573., journal homepage
- Gasmi S** (2018) Neurotoxicité de deux pesticides (Acetamipride et Deltamethrine) et la prévention de cette toxicité par la quercétine chez le rat, Thèse Doctorat. Université de Tébessa. P06-P111
- Gasmi S & Kebieche M & Rouabhi R & Chouaib Touahria & Asma Lahouel & Lakroun Z & Henine S & Soulimani R** (2017) Alteration of membrane integrity and respiratory function of brain mitochondria in the rats chronically exposed to a low dose of acetamiprid. Environ Sci Pollut Res 24:22258–22264
- **Gate D, Saligramma N, Leventhal O, Yand A, Unger M et al** (2020) clonally expanded CD8 T cells patrol the cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. Nature volume 577, pages399–404
- Ghangal R, Rajkumar M, Rohini G & Mukesh J** (2020) Genome-wide analysis of glutathione S-transferase gene family in chickpea suggests its role during seed development and abiotic stress Molecular Biology Reports volume 47, pages2749–2761
- Grandjean S** (2018) Prise en charge de la maladie d'Alzheimer a l'officine, Thèse doctorat. Université de Marseille. P28-76
- Guerfali M, Hamden H, Fadhl S, Djobbi W, Sillini L, Marzouki W and Ammar M** (2020) Susceptibility of Ceratitis capitata Field and Laboratory Strains to Malathion and Spinosad in Tunisia. Pakistan J. Zool., vol. 52(4), pp 1407-1414

- Guillouty A** (2016) Plantes médicinales et antioxydants, thèse doctorat. Université Toulouse III paul sabatier P26-28
- Habbachi W, Benhissen S, Ouakid M.I Farine J.P** (2013) Effets biologique d'extraits aqueux de *peganumharmala* (L.) (Zygophyllaceae) sur la mortalité et le développement larvaire de *drosphila melangaster* (Diptera- drosophilidae) Algerian journal of aridenvieonment. 3:1, 82-88.
- 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.
- Hanley T, Jr , Breslin W, Quast J, et Carney E** (2002) Evaluation of Spinosad in a Two-Generation Dietary Reproduction Study Using Sprague-Dawley Rats. Toxicological sciences 67,144 –152
- Hansruedi M, Jose D, Zhuyu P, Fan G, Shahin M et al** (2019) Single-cell transcriptomic analysis of Alzheimer's disease. Nature 570, 332–337
- Hocinat A** (2018) Biodégradation de quelques composés organiques volatils et certains pesticides par des actinomycètes provenant d'un sol agricole et deboues activées, thèse de doctorat. Université de Constantine P35-37
- Houlot, R.** (1984). Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. Ed. Maloine, 19-21, 225-227.
- **Huang J ET Price R.A.,** (2003) Estimation of the Age of Extant Ephedra Using Chloroplast rbcL Sequence Data. Mol. Biol. Evol., Vol. 20, N°3, pp 435–440.
- Ighodaro O, Akinloye O** (2017) First line defence antioxydants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. Alexandria Journal of Medicine XXX (2017) XXX-XXX
- Ik-Soo K, Young-Jun P, Sung-Jin Y, Hee-Bong L** (2010) Ephedrannin A and B from roots of *Ephedra sinica* inhibit lipopolysaccharide-induced inflammatory mediators by suppressing nuclear factor- κ B activation in RAW 264.7 macrophages, International Immunopharmacology 10: 1616-1625.

- Javier G, Lou B, Erol C, Yihui S, Konnor L, Rohiverth G et al** (2019) Squalene accumulation in cholesterol auxotrophic lymphomas prevents oxidative cell death. *Nature* volume 567, pages 118–122
- Jason R, Fitsanakis V, Westerink R, Kanthasamy A** (2019) Neurotoxicity of pesticides. *Acta Neuropathologica* 138:343–362
- Jose M, Duarte J, Lucas C, Juan D. Bautista and Isabel M** (2017) Insecticide Reproductive Toxicity Profile: Organophosphate, Carbamate and Pyrethroids. *Journal of Toxins* ; 4(1): 7
- Julie J** (2015) intérêt des thérapies par l'art et des autres thérapies non médicamenteuse dans la prise en charge du patient de la maladie d'Alzheimer, thèse doctorat université de rouen UFR de médecine de pharmacie. P 30-37
- Kada S** (2018) Recherche d'extraits de plantes médicinales doués d'activités biologiques, thèse doctorat, Université Ferhat Abbas Sétif 1, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. P23.
- Kamaraju R and Poonam Sharma Velamuri** (2018) Spinosad: A biorational mosquito larvicide for vector control. *Indian J Med Res*; 147(1): 4–6.
- **Kamaraju R ET Velamuri P** (2018) Spinosad: A biorational mosquito larvicide for vector control. *Indian J Med Res*. 147(1): 4–6.
- Kamina P** (2013) Anatomie Clinique 2e Edition, éditions Maloine, France P3-P343
- Kaplan A.** (1984). Lipids. *Clin Chem the C.V. mosby Co. Si louis. Tronto. Princeton*; 918-919.
- Kaplan A.**(1984). Urea. *Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton*; 1257-1260 and 437 and 418.
- Kenner M, Hudson V, Franciane R, Wagner G, Tales V, Jose E, Gustavo F** (2019) *Aedes aegypti* larvae treated with spinosad produce adults with damaged midgut and reduced fecundity. *Chemosphere* 221: 464-470
- Kilpatrick K, Agnieszka P, Jillian M. H, Mark W.S, Efraim L, Peter J. F, Frédéric M** (2016) Characterization of aromatic aminotransferases from *Ephedra sinica* Stapf, *Amino Acids* 48:1209–1220

- Kilpatrick K, Pajak A, M.Hagel J, W.Sumarah M ,Lewinsohn E, J.Facchini P, Marsolais F** (2016) Characterization of aromatic aminotransferases from *Ephedra sinica* Stapf. *Amino Acids* 48:1209–1220
- Kolb B, Whishaw I, Campbell T** (2019) *Cerveau et comportement*. de boeck supérieur s.a., 2019 Rue du Brosquet, 7, B-1348 louvain-la- Neuve . 5^eédition. Parie. P3
- Krizevski R, Bar E, Shalit O, Sitrit Y, Ben-Shabat S, Lewinsohn E** (2010) Composition and stereochemistry of ephedrine alkaloids accumulation in *Ephedra sinica* Stapf , *Phytochemistry* 71 :895–903.
- Krizevski R, Einat B, Shalit O, Yaron S, Ben-Shabat S , Lewinsohn E** (2010) Composition and stereochemistry of ephedrine alkaloids accumulation in *Ephedra sinica* Stapf, *Phytochemistry* 71; 895–903
- Lacoste-Ferré M, Duran D, Vellas B** (2013) *The Alzheimer’s disease and odontology*. EDP Sciences AOS 263; 8-18
- Lamamra M** (2018) *Activités biologiques et composition chimique des huiles essentielles d’Ammiopsis aristidis Coss. (Syn. Daucus aristidis Coss.) et d’Achillea santolinoides Lag*, thèse doctorat. Université Ferhat Abbas Sétif 1. P01
- Laure S** (2012) *Etude multimodale de la maladie d’Alzheimer: Forme sporadique prodromale, formes génétiques, et altération du traitement visuel*, Thèse doctorat. Université Toulouse III. Français. P9-12
- Louat F** (2013) *Etude des effets liés à l’exposition aux insecticides chez un insecte modèle, Drosophila melanogaster*, thèse doctorat. Université d’Orléans. P5-7
- Lucio G. Costa, Toby B. Cole, Jacki Coburn, Yu-Chi Chang, hoi Dao, Pamela J. Roque** (2015) Neurotoxicity of traffic-related air pollution. *NeuroToxicology* xxx (2015) xxx–xxx n1-7.
- Lucie M** (2013) *les difficultés rencontrées lors du développement de nouvelles molécules thérapeutiques dans l’indication de la maladie d’Alzheimer*, Thèse doctorat. Université de lorraine. P32-48
- Mairif S** (2015) *Contribution à l’étude de l’effet toxique des pesticides à usage domestique utilisé en Algérie*, Thèse Doctorat. Université de Guelma. P6-7

- Maiza A, kilani S, Morakghi F,Rehamnia F, Bensbaa et Aribi N** (2011) activité d'un biopesticide, le spinosad chez blattella germanica ; effets sur divers biomarqueurs (LDH, GSH , MDA), Bull. Soc. Zool.Fr: 136 (1-4) ; 189-204.
- Mamane A** (2015) effets sanitaires aigus de l'exposition auxpesticides en milieu rural : etude dans un pays du nord : phytotriv ;etude dans un pays du sud : phytoniger, thèse doctorat .l'université de Bordeaux. P17
- Marie C** (2019) Exposition professionnelle aux Inhibiteurs de la Succinate Déshydrogénase (toxicité aigüe et chronique) : Une revue systématique de la littérature, Thèse doctorat. Université de Toulouse III. P13-18
- Martini, Ober, Bartholomew, Nath** (2015) L'essentiel de la biologie humaine une approche visuelle. Éditions du renouveau pédagogique. Canada. P123-P164
- Mathilde F** (2018) Le recours aux soins dans la démence: la surmédicalisation en question. Ex-ploitation des données de l'échantillon généraliste des bénéficiaires, Thèse doctorat. Université Paris-Saclay. Français. P22
- Matthieu B** (2013) Le repérage précoce de la maladie d'Alzheimer en médecine générale enquête auprès de 205 médecins généralistes de la Haute-Vienne, Thèse doctorat. Université de limoges. P21
- Mazzia C, Capowiez Y, Marliac G, Didier J, Pasquet A** (2020) Spinosad application in an apple orchard affects both the abundance of the spider Araneus diadematus and its web construction behavior, Ecotoxicology 29:389–397
- Menche N** (2014) Biologie anatomie physiologie. Rue de l'école-de-Médecine75006 Parie-France. 5eédition. P60-138
- Meng-Ying L , Jian-Bo S , Wang M, Hong-Yan F ,Zhang Z , Feng-Guo X** (2016) Comparative analysis of volatile oils in the stems and roots of Ephedra sinicavia GC-MS-based plant metabolomics, Chinese Journal of Natural Medicines 14(2): 0133-0140, P 133
- Meriane D** (2018) Etude biologique et phytochimique de Calobota saharae (Coss. & Dur.) Boatwr. & B.E. van Wyk, these doctorat. Université Ferhat Abbas Sétif 1. P01.
- Monteiro H , João L.T. Pestana , Sara C. Novais , Amadeu M.V.M. Soares , Marco F.L. Lemos** (2019) Toxicity of the insecticides spinosad and indoxacarb to the non-target aquatic midge Chironomus riparius, Science of the Total Environment 666; 1283–1291

- Naito, H.K., Kaplan, A.** (1984). Cholestérol. Clin Chem the C.V Mosby CO. St Louis Toronto. Princlon: 1194-11206 and 437.
- Nathalie P, Jean-Noël O** (2014) Cholestérol, activité neuronale et maladie d'Alzheimer Cholesterol, neuronal activity and Alzheimer disease., * jean-noel.octave@uclouvain.be., Med Sci (Paris) 2014 ; 30 : 244–246
- Nurul S ,Kobun R ,Vonnice M** (2019) Classification, extraction and current analytical approaches for detection of pesticides in various food products . Journal of Consumer Protection and Food Safety 14:209–221
- Orejola J, Matsuo Y, Yoshinori S and Takashi T** (2017) Characterization of Proanthocyanidin Oligomers of Ephedra sinica. Molecules: 22, 1308 1-18
- Pasteur L** (2013) la maladie d'Alzheimer : intérêt des molécules d'origine naturelle, Thèse doctorat. Université Toulouse III. P 9-61
- Payraastre L** (2019) Impact des mélanges de pesticides, Innovations Agronomiques 73 (2019), 51-59
- Petek P, Nevin N** (2012), In vivo acetylcholinesterase inhibition in the tissues of spinosad exposed Oreochromis niloticus, journal homepage. Environmental toxicology and pharmacology 3 4: 473–477
- Petek P, Nevin Ü** (2013) Oxidative stress and apoptosis was induced by bio-insecticide spinosad in the liver of Oreochromis niloticus. Environnemental toxicology and pharmacology 36 (2013) 956-963
- Poewe W, Klaus S ,Tanner C, Halliday G, Brundin P ,Volkman J, Anette-Eleonore S and Anthony. L** (2017) Parkinson disease. Nature Reviews Disease Primers : 1-21
- Queyrel W** (2014) Modélisation du devenir des pesticides dans les sols à partir d'un modèle agronomique : évaluation sur le long terme, Thèse doctorat. L'université pierre et marie curie. P1.
- Rajveer K, Gurjot K, Shweta R and Khan J** (2019) Pesticides Classification and its Impact on Environment .Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci 8(3): 1889-1897

- Roknul A, Haile M, Baoguo X, Shoma Devic, Md Abu Bakar Siddiqued, Sarah L. Stanleye, Bhesh Bhandarif, Junsong Zhua** (2020) Efficacy of ultrasound treatment in the removal of pesticide residues from fresh vegetables: A review. *Trends in Food Science & Technology* 97; 417–432
- Rouaki F** (2016) effet de l'ingestion de l'huile de tournesol et de la supplementation en alpha tocopherol sur certains paramètres structuraux et fonction du tissu cardiaques chez le rat en croissance, thèse doctorat. Ecole nationale superieure d'agronomie EL harrach ,P 31.
- Rubio-Riquelme N, Huerta-Retamal N, Gómez-Torres M1 and Martínez-Espinosa R** (2020) Catalase as a Molecular Target for Male Infertility Diagnosis and Monitoring: An Overview. *Antioxidants*, 9(1), 78; <https://doi.org/10.3390/antiox9010078>
- Saadane O** (2018) L'impact des pesticides sur l'environnement et la santé humaine et méthodes alternatives, Thèse de docteur. Université de Rabat. P5-6
- Saadi L, Bouazza M, Mokrane A, Aicha M., Lebaili N** (2018) Evaluation of the effect of spinosad on lipid peroxidation and antioxidant markers in female mice, *International Journal of Biological and Agricultural Research.*, Pages 14- 20.
- Serchov et al** (2016) Signaling pathways regulating homer1A expression. *Boil Chem* 397 (3) 207-214
- Singh A,Gupta A, Mishra A,Gupta V, Bansal P, Kumar S** (2010) Medicinal Plant for Curing Alzheimer's Disease, *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives :* 1(2):108 – 114
- Sheldon D. West, Larry G. Turner.** (2000). Determination of Spinosad and Its Metabolites in Citrus Crops and Orange Processed Commodities by HPLC with UV Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(2):366-72
- Stark J, Vargas R, et Miller N** (2004) Toxicity of Spinosad in Protein Bait to Three Economically Important Tephritid Fruit Fly Species (Diptera: Tephritidae) and Their Parasitoids (Hymenoptera: Braconidae). *J. Econ. Entomol.* 97(3): 911Ð915
- Steeve H, Guy L, Valeurie R, Saltell D** (2007) Exploring the pharmacological properties of insect nicotinic acetylcholine receptors, *Trends in Pharmacological Sciences* 28(1):14-22
- Taketo O, Yukiko N, Shigehiko K, Akihito T, Kuber J, Takahisa N,Masahiko K, Setsuko S** (2009) Metabolome Analysis of Ephedra Plants with Different Contents of Ephedrine Alkaloids by Using UPLC-Q-TOF-MS. *Planta Med* 75: 1356–1362

- Ted E. C, Benjamin L. R and Dan L. H** (2019) Spinosyns Cause Aedeagus Eversion in *Carpophilus* spp. (Coleoptera: Nitidulidae), *ournal of Economic Entomology*, XX (XX), 2019, 1–7.
- Telleza M, Khan I, Schaneberg B, Crockett S, Rimando A, Kobaisy M** (2004) Steam distillation–solid-phase microextraction for the detection of *Ephedra sinicain* herbal preparations, *Journal of Chromatography A*, 1025 : 51–56.
- Thany S, Reynier P, Lenaers G** (2013) Neurotoxicité des pesticides Quel impact sur les maladies neurodégénératives ? *médecine/sciences*: 29 : 273-278
- Thomas V, Athanase B, Rene V, Georgs k** (2006) Facteurs de risque de la maladie d’Alzheimer: vers une prévention? Risk factors for Alzheimer: towards prévention?., *la press médicale*. vol 35,N° 9.C2, page 1309-1316.
- Todd D. Gould T, Dao D, Kovacsics C** (2009) The Open Field Test. Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice pp 1-20. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-303-9_1
- **Trinder, P.** (1969). *Ann. Clin. biochem.* 6, 24-33.
- Tysnes O et Storstein A** (2017) Epidemiology of Parkinson’s disease. *Journal of Neural Transmission* volume 124, pages901–905
- **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
- Valdeir C , Martínez L , Plata-Rueda A , Fernandes F , Tavares W , Zanuncio J , Serrao J** (2020) Histopathological and cytotoxic changes induced by spinosad on midgut cells of the non-target predator *Podisus nigrispinus* Dallas (Heteroptera: Pentatomidae), *Chemosphere* 238: 124-585
- **Vanessa E** (2014) Étude d’un insecticide naturel nommé PA1b : mécanisme d’action et expression hétérologue, Thèse doctorat. INSA de Lyon, Français. P28
- **Vanessa S and Boscolli B** (2019) Properties, toxicity and current applications of the biolarvicide spinosad. *Journal of toxicology and environmental health, part B*
- Vanessa S , Carlos E , Oliveira M ,Cassio R , Limongi J , Boscolli B** (2019) Evaluation of toxicity and environmental safety in use of spinosad to rationalize control strategies against *Aedes aegypti* . *Chemosphere* 226 (2019) 166-172

- **Vitry M** (2018) imagerie du cerveau et hypnose thèse doctorat. universite toulouse III – paul sabatier. P50-P51.
- **Weckbercker G and Cory JG** (1988) Ribonucleotide reductase activity and growth of Glutathione depended mouse Leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer Letter* 40: 257-264
- Wenping X, Mingjun Y, Jufang G, Zhang Y & Liming T** (2017) Oxidative stress and DNA damage induced by spinosad exposure in *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells, *food and agricultural immunology*, 1-11.
- Yang Z, Hui C, Yangyang F, Yun Y, Jufang G, Wenping X, Zhiping X, Zhong L, Liming T** (2019) Cytotoxic effects of bio-pesticide spinosad on human lung A549 cells, *Chemosphere* 203: 182-189.
- Yifeng L, Tianyi C and Quan Z** (2019) the chloroplast genome of an important herb species, *Ephedra sinica* (Ephedraceae). *Mitochondrial dna part b*.vol.4, no.2, 3894–3895 journal homepage
- Yonggang X, Haixue K, Bingyou Y, Qihong W, Jun L, Yanping S, Yanhong W** (2011) Optimum extraction of acidic polysaccharides from the stems of *Ephedra sinica* Stapf by Box–Behnken statistical design and its anti-complement activity, *Carbohydrate Polymers* 84: 282-291.
- Yuki k, Shu Z, Takayuki O, Tanaka K, Javzan B, Chinbat S,HirotoshiF, Masayuki M, and Komatsu K** (2009) molecular analysis and Chemical Evaluation of *Ephedra* Plants in Mongolia. *Biol. Pharm. Bull.* 32(7) 1235—1243
- Zerargui F** (2015) Activité antioxydante des extraits de racines *Tamus communis* L. et caractérisation des substances bioactives, thèse doctorat. Université Ferhat Abbas Sétif1.P1-126.
- Zhang Y , Chen H , Yangyang F , Yang Y , Jufang G , Wenping X , Zhong L, Liming T** (2019) Cytotoxic effects of bio-pesticide spinosad on human lung A549 cells, *Chemosphere* 230:182-189.
- Zhenzhen Y** (2017) Etude de la morphologie et de la distribution des neurones dans le cerveau de macaque par microscopie optique, Thèse doctorat. Université Pierre et Marie Curie. P9-15.

-Zohra M (2013) Etude Photochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie, Thèse de doctorat. Université Tlemcen. P24-25.

Site Web

Site01.<https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fbooksofdante.wordpress.com>.

Site01.<https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=profile&symbol=EPHED&display=31>

Annexes



1. Courbe d'étalonnage pour dosage des protéines

Tableau A. Réalisation de la 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

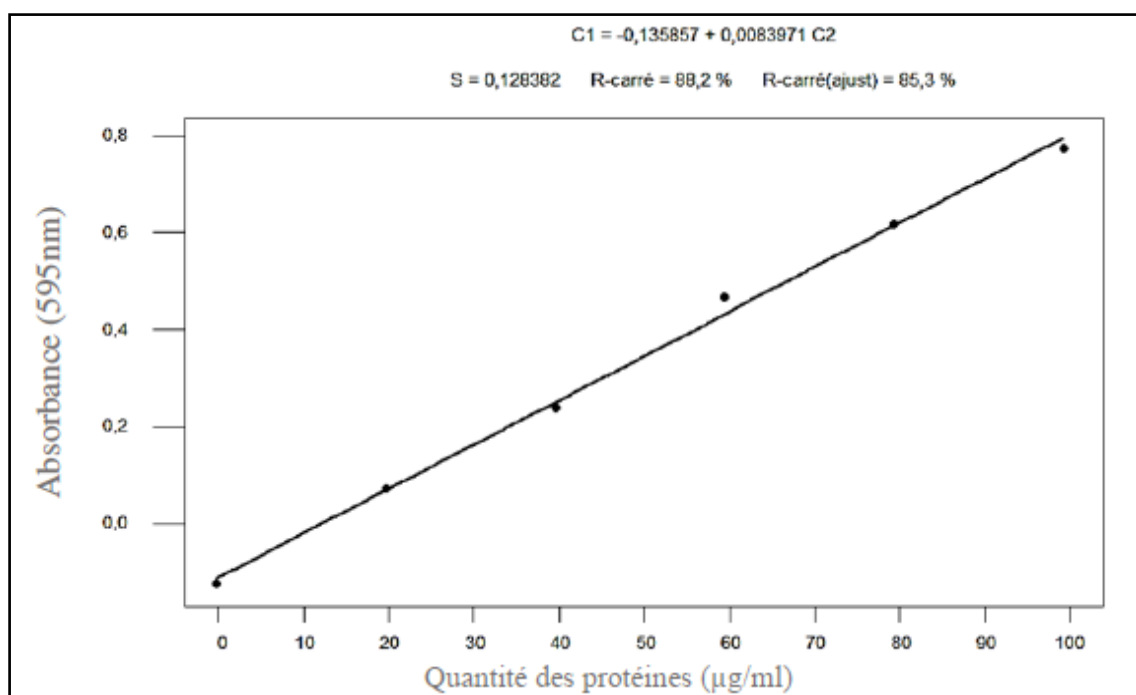


Figure A. Courbe d'étalonnage pour dosage des protéines.

2. Matériels et appareils utilisés

- ✓ Eau distillée.
- ✓ NaCL
- ✓ TCA (Trichloro acétique).
- ✓ Acide orthophosphorique (à 85%).
- ✓ BBC (Bleu Brillant de Coomassie).
- ✓ Ethanol (à 95%).
- ✓ Sodium phosphate dibasique.
- ✓ ASS (Acide sulfosalicylique).
- ✓ Sodium phosphate monobasique.
- ✓ Tris.
- ✓ HCl
- ✓ Centrifugeuse (SELECTA).
- ✓ Balance analytique
- ✓ Balance de précision (KERN).
- ✓ Etuve (HERAEUS).
- ✓ Agitateur magnétique (WITEG).
- ✓ Matériel de dissection.
- ✓ Centrifugeuse sigma 1-15.
- ✓ Réfrigérateur.
- ✓ Bain marie (MEMMERT).
- ✓ Bain glacée

- ✓ Bicarbonates de sodium (CO_3HNa)
- ✓ Méthanol absolu.
- ✓ EDTA (Acide éthylène diamine tétracétique).
- ✓ DTNB (l'acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobénoïque).
- ✓ Na CL (0.9%)
- ✓ Chloral hydraté
- ✓ Formaldéhyde
- ✓ GSH
- ✓ BHT (Butylated hydroxytoluene)
- ✓ CDNB
- ✓ TBA
- ✓ H_2O_2
- ✓ Acétyle choline (Ache)
- ✓ Agitateur Vortex (THERMOS).
- ✓ Spectrophotomètre (UV mini 1240, SHIMADZU).
- ✓ Mortier + Pilon (Broyeur manuel).
- ✓ Pissette.
- ✓ Verre de montre.
- ✓ Spatule.
- ✓ Baromagnétique.
- ✓ Micropipettes (10 μl à 5000 μl).
- ✓ 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.

3. Préparation du formaldéhyde (10%)

$$\begin{array}{l}
 - \text{ Solution mère (36\%)} \xrightarrow{1000\text{ml}} \\
 - \text{ Solution déliée (10\%)} \xrightarrow{x}
 \end{array}
 \left. \vphantom{\begin{array}{l} \\ \\ \end{array}} \right\} X=277.77$$

$$Y = 1000 - 277.77$$

4. Préparation des solutions

Le protocole de préparation des solutions pour dosage des différents paramètres.

❖ Préparations des tampons phosphate pour homogénéisations

Nous prenons 4.90 g de Na_2HPO_4 et 1.39g NaH_2PO_4 puis ajoutons les deux réactif dans un 450 ml d'eau distillé agitation.

❖ Préparation des solution des GSH

- ✓ Solution Tris (0.4M), EDTA (0.02 M) et pH =9.6

Nous prenons 12.11 g Tris et 1.87 g EDTA puis ajoutons les deux réactifs dans un 250 ml d'eau distillé et agitation.

- ✓ Solution EDTA (0.02 M)

Nous prenons 5.61 g EDTA puis ajoutons dans un 75 ml d'eau distillé et agitation.

- ✓ Solution DTNB (0.01 M)

Dissoudre 200 mg DTNB puis ajoutée dans un 50 ml éthanol et agitation.

- ✓ Solution Acide Salicylique (0.25%)

Nous prenons 250 mg acide salicylique puis ajoutons dans un 100 ml d'eau distillé et agitation.

❖ Préparations des solutions des MDA

- ✓ Solution TBS, Tris, NaCl pH=7.4

Nous prenons 8.775 g NaCl puis ajoutons 1L d'eau distillé après agitation puis 6.06 g Tris et complétés le volume a 1L par la solution Na Cl et agitation.

- ✓ Solution TCA, BHT

Nous prenons 20 g TCA puis ajoutons 1L d'eau distillé pour obtenir TCA 20% après agitation puis poser 1 g de BHT et complétés le volume a 100 ml par solution TCA 20% et agitation à chaud.

- ✓ Solution HCl (0.6 M)

Prélever 51.56ml d'HCl et compléter le volume à 1L par l'eau distillé et agitation.

- ✓ Solution Tris-TBA

Nous prenons 0.78 g Tris puis ajoutons dans un 250 ml d'eau distillé après agitation puis poser 4.32 g TBA compléter le volume à 1L par solution Tris (26 Mm) et agitation.

❖ Préparations des solutions des GPX

- ✓ Solution GSH (0.1)

Nous prenons 6.14 mg GSH puis ajoutons 200 ml d'eau distillé et agitation.

- ✓ Solution TCA (1%)

Nous prenons 1g TCA puis ajoutons dans un 100 ml ED et agitation.

- ✓ Solution DTNB (1.0mM)

Nous prenons 100 mg DTNB puis ajoutons dans un 250 ml méthanol absolu et agitation.

- ✓ Solution H₂O₂

Prélever 13 ul H₂O₂ puis ajouton 1L ED.

❖ Préparations des solutions des GST

- ✓ Solution CDNB (0.02 M)

Nous prenons 202.55 mg CDNB puis ajoutons 50 ml éthanol absolu et agitation.

- ✓ Solution GSH (0.1M)

Nous prenons 153.65mg GSH puis ajoutons 50 ml ED et agitation.

- ✓ Préparations des solutions des CAT

- ✓ Solution TP (0.1 M) pH=7.4

Solution A ; Nous prenons 3.12g NaH₂PO₄ puis ajoutons 100 ml ED et agitation.

Solution B ; Nous prenons 7.16g Na₂HPO₄ puis ajoutons 100 ml ED et agitation.

Mélanger ; 16 ml de solution (A) avec 84 ml de solution (B).

- ✓ Solution H₂O₂

Prélever 30 ul H₂O₂ puis ajoutée 1 ml ED

❖ **Préparations des solutions des protéines**

- ✓ Solution BBC

50 mg BBC puis ajoutée 25ml éthanol agitation pendant deux heures + 50ml acide ortho phosphorique + 425ml ED.


❖ **Préparations des solutions de l'Ach**

- ✓ Solution DTNB, Nous prenons 20 mg DTNB puis ajoutons 7.5 mg de CO₃HNa (Bicarbonates de sodium), puis 5ml tampon tris.

- ✓ Tampon tris (0.1, PH=7) :

0.6g tris 50ml ED 

- ✓ Solution de l'Ache :

94.4mg 04ml ED 

5. Equations

Sucrose preference = V (sucrose solution) / [V (sucrose solution) + V (water)] x 100%

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



Third International Symposium
Medicinal Plants and Materials (MPM-2020)

Certificate

The Organizing Committee of the Third International Symposium Medicinal Plants and Materials (MPM-2020) organized in University of Larbi Tebessi- Tébessa (Algeria) on February 25 to 27, 2020, certified that:

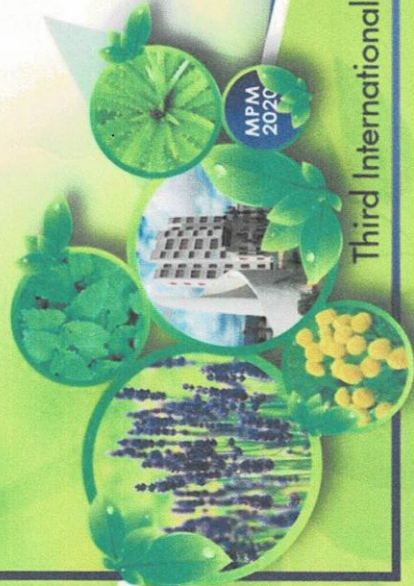
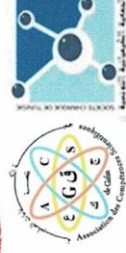
SOLTANI Radhia

Took part in the symposium as :

MEMBER OF THE ORGANIZING COMMITTEE

Handwritten signature in blue ink over a red circular stamp. The stamp contains Arabic text: "الجامعة العربية الإسلامية" (Islamic Arab University), "الكلية العلمية" (Faculty of Sciences), "إدارة البحوث العلمية و العلاقات الخارجية" (Directorate of Scientific Research and External Relations), "تونس" (Tunisia), and "2020".

President of Symposium
Dr. MENACEUR Fouad



Third International Symposium (MPM - 2020)

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ LARBI TEBESSI – TEBESSA –
FACULTÉ DES SCIENCES EXACTES ET SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE APPLIQUÉE



Attestation de Participation

*Le comité d'organisation de la première journée scientifique sur la Biologie des Plantes
Médicinales, tenue à Tébessa le 22 janvier 2020, atteste par la présente que :*

Melle, Mme. Solitani Radhia

A participé à cette manifestation en tant que membre de comité d'organisation.

*Présidente de la journée
Dr. Samira BOUSSEKINE*





Third International Symposium

Medicinal Plants and Materials (MPM-2020)

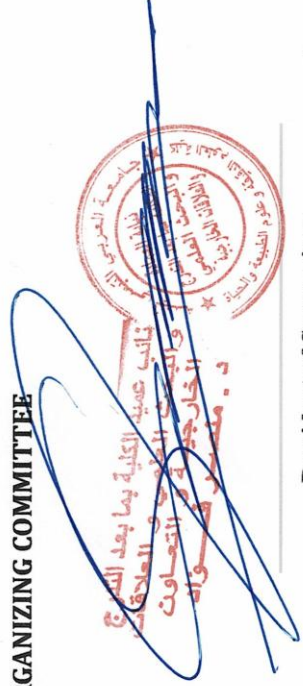

Certificate

The Organizing Committee of the Third International Symposium Medicinal Plants and Materials (MPM-2020) organized in University of Larbi Tebessa (Algeria) on February 25 to 27, 2020, certified that:

BRAHMI Manara

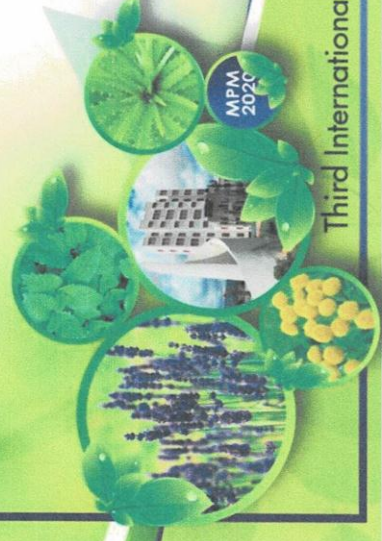
Took part in the symposium as :

MEMBER OF THE ORGANIZING COMMITTEE

President of Symposium

Dr. MENACEUR Fouad



Third International Symposium (MPM - 2020)

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ LARBI TEBESSI – TEBESSA –
FACULTÉ DES SCIENCES EXACTES ET SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE APPLIQUÉE



Attestation de Participation

Le comité d'organisation de la première journée scientifique sur la Biologie des Plantes
Médicinales, tenue à Tébessa le 22 janvier 2020, atteste par la présente que :

Melle, Mme. Brahimi manara

A participé à cette manifestation en tant que membre de comité d'organisation.

Présidente de la journée

Dr. Samira BOUSSEKINE

