

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Mohammed Seddik Ben Yahia - Jijel
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Moléculaire
et Cellulaire



جامعة محمد الصديق بن يحيى - جيجل
كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية

Thèse

Présentée par

M^{me} BEGHOUL AFAFE

En vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat en Sciences

Spécialité : Biologie

Option : Biochimie

Thème

*Altérations des cellules cérébrales et
neurocomportementales associées à l'exposition chronique
aux pyréthrinoides et effets cytoprotecteurs de la quercétine*

Membres de jury

Président: Pr. Sifour M., Université Mohamed Seddik Benyahia-Jijel
Directeur de thèse: Pr. Kebieche M., Université de Batna 2
Examineurs : Pr. Bouzidi A., Université de Ferhat Abass -Setif
Pr. Houcher B., Université de Ferhat Abass -Setif
Pr. Ouled Haddar H., Université Mohamed Seddik Benyahia-Jijel

Année universitaire: 2019-2020



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à ma petite famille:

*Mon cher mari **MOHAMED BOUMEZER**, qui a su être là
lors de nombreux moments de doute.*

*A mes quatre chers enfants **SAMI, ZAKI, HANI** et le petit **ALI***

*A ma chère mère **Nouara Ayadi** qui m'a tout donné sans rien en retour et
qui m'a encouragé et soutenu
dans mes moments les plus difficiles.*

*A ma chère sœur **NADJET** pour ses précieux conseils durant tout mon
cycle universitaire.*

*A mes frères **SALIM, MOHAMMED** et **SAMIR**, qui ont toujours été
présents.*

*A **SAIDA** et **SALHA** famille **FENIER**, qui m'ont soutenu à garder
mes enfant toutes ces années.*

A ceux qui m'ont toujours soutenu et encouragé psychologiquement.

A tous mes amies en qui j'ai toujours trouvé le soutien et le réconfort.



Remerciements

*Je remercie tout d'abord **ALLAH** le tout puissant et miséricordieux, qui m'a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.*

*Je tiens à remercier chaleureusement mon encadrant «**KEBIECHE Mohammed**», professeur à l'université de Batna 2, pour m'avoir dirigé, guidé et éliminé les obstacles tout le long de ce travail. Ses conseils et ses remarques constructifs étaient très bénéfiques pour mon travail. Son soutien permanent ainsi que sa disponibilité pour l'achèvement de ce travail m'ont été très favorables. Je lui témoigne ma gratitude pour sa patience et son soutien.*

Les recherches qui font l'objet de cette thèse ont été réalisées au sein du Laboratoire de Phytochimie et pharmacologie, les laboratoires de la faculté SNV et l'animalerie de l'université de Jijel.

*J'adresse mes plus sincères remerciements à «**M^e SIFOUR Mohammed**», Professeur à l'Université de Jijel, qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de jury. J'aimerais lui manifester ma profonde gratitude.*

J'adresse aussi mes remerciements aux examinateurs de cette thèse:

*Je remercie vivement «**M^{me} Ouled Haddar Houria**», Professeur à l'université de Jijel, pour avoir accepté de faire partie de ce jury.*

*Je remercie également «**M^e BOUZIDI Abdelouheb**», Professeur A à l'université de Sétif, pour avoir accepté de faire partie de ce jury.*

*J'adresse mes profonds remerciements à «**M^e HOUCHER Bakhouche**», Professeur à Université de Sétif, qui m'a fait l'honneur par sa présence comme examinateur.*

*Ce travail n'aurait pu aboutir sans l'aide de nombreuses personnes : amies et collègues : **ZEINEB CHOUIT**, **LAHOUEL ASMA**, sans oublier les collègues et les enseignants : **AMIOUR Chouib**, **GASMI Salim**, **BOUTENNOUNE Hannane**, **KHENNOUF Tarek**, **SAFIA Hebila** et **HADIA Bouraoui**.*

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à tous les enseignants qui m'ont enseigné et qui par leurs compétences m'ont soutenu dans la poursuite de mes études.

*Mes grands remerciements au directeur de laboratoire de Phytochimie et Pharmacologie : **Mr Belghoubi** pour son soutien et aide tout au long ces années de travail.*

Je remercie aussi les responsables du laboratoire de Toxicologie Moléculaire et Cellulaire pour leur soutien et permission d'accéder aux matériels du laboratoire

Enfin, je remercie tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Résumé

Les maladies neurodégénératives sont d'une étiologie multifactorielle faisant intervenir des facteurs environnementaux, alimentaires et génétiques. Des études épidémiologiques et toxicologiques ont montré que la plupart de ces maladies sont associées à une exposition chronique aux produits phytosanitaires. Dans cette étude nous nous sommes intéressés à l'évaluation de la neurotoxicité due à l'exposition chronique à deux pyréthrinoïdes (PYRs), la bifenthrine (BF) et la deltaméthrine (DLT) seules ou en mixture sur un modèle animal (rats Wistar *albinos*), femelles adultes d'une part et à l'étude de l'effet préventif et cytoprotecteur de la quercétine (QUER), contre cette toxicité d'autre part. L'approche expérimentale de la présente étude est divisée en trois axes ; le premier axe consiste à l'étude du statut redox mitochondrial dans les différentes régions du cerveau en l'occurrence l'hippocampe, le striatum, le cervelet et le cortex cérébral et l'intégrité structurale des mitochondries, chez le rat exposé chroniquement aux PYRs ; le deuxième axe s'intéresse à l'évaluation du stress oxydatif cytosolique -régional afin de mettre en évidence le degré et la portée du déséquilibre redox dans les autres compartiments cellulaires à savoir le cytosol au-delà des mitochondries ; et finalement l'étude neurocomportementale afin de mettre en évidence la portée des altérations sur les facultés cognitives et comportementales de l'animal. Les résultats obtenus dans cette étude ont montré une neurotoxicité induite par les deux PYRs utilisés (BF et DLT), à travers la perturbation du statut redox dans les mitochondries et le cytosol, phénomène ayant provoqué un gonflement mitochondrial qui est susceptible d'altérer l'intégrité fonctionnelle et structurale de cette organelle. En effet, l'évaluation du stress oxydatif a révélé d'importants effets toxiques des deux PYRs se manifestant *via* une augmentation du taux du malondialdéhyde (MDA) cytosolique et mitochondrial ; une diminution de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) mitochondriale et cytosolique sauf dans le striatum où il y a une augmentation suite à l'exposition à la DLT ; le taux de glutathion (GSH) augmente dans le cytosol du cervelet, du striatum et diminue dans les mitochondries du cortex et du cervelet et s'altère significativement dans les autres régions. L'activité de la superoxyde dismutase (SOD) cytosolique s'induit par les PYRs dans toutes les régions ; l'activité de la glutathion-s-transférase (GST) diminue dans les mitochondries et le cytosol de l'hippocampe et s'altère dans le cytosol des autres régions ; l'activité de la glutathion peroxydase (GPX) est altérée dans le cytosol et l'hippocampe et est induite dans le cytosol des autres régions. Les tests neurocomportementaux révèlent surtout chez le groupe DLT : une hypomotricité, une altération de la mémorisation spatiale et non spatiale provoquée, une installation d'un état d'anxiété, une dépression évaluée par le test de sucrose. Sur un autre plan, nous avons évalué les effets préventifs de la QUER sur les paramètres étudiés après le traitement par les PYRs. Les résultats ont démontré que la QUER diminue le taux de MDA cytosolique, elle élimine l'altération des enzymes antioxydants provoquée par la DLT et la mixture, mais non de la BF. Sur le plan neurocomportemental, la QUER a un effet antidépresseur, améliore le déficit locomoteur, la mémorisation et l'apprentissage et réduit le niveau d'anxiété.

Mot clés : pyréthrinoïdes, stress oxydant, régions du cerveau, comportement, neurotoxicité

Abstract

Neurodegenerative diseases have a multifactorial etiology involving environmental, dietary and genetic factors. Epidemiological and toxicological studies show that most of these diseases are associated with chronic exposure to plant protection products. In this study, we were interested in the evaluation of the neurotoxicity of two pyrethroids (PYRs), namely the bifenthrin (BF) and the deltamethrin (DLT) on an animal model (Wistar *albinos* rats), on the one hand, and the study of the preventive and cytoprotective effect of the quercetin (QUER), against this toxicity on the other hand. The experimental approach of this study is divided into three axes; the study of the mitochondrial redox status in the different regions of the brain, in this case the hippocampus, the striatum, the cerebellum and the cerebral cortex and the structural integrity of the mitochondria, in adult female Wistar *albinos* rats chronically exposed to PYRs; evaluation of the neuro-regional cytosolic oxidative stress in order to highlight the degree and the range of the redox imbalance in the other cellular compartments namely the cytosol beyond the mitochondria; and finally the neurobehavioral study in order to highlight the extent of alterations on the cognitive and behavioral faculties of the animal. The results obtained in this study show a neurotoxicity induced by the two PYRs used (BF and DLT), through the disturbance of the redox status in the mitochondria and the cytosol, a phenomenon that has caused mitochondrial swelling which is likely to alter the functional and structural integrity of this organelle. In fact, the evaluation of oxidative stress revealed significant toxic effects of the two PYRs manifesting an increase in cytosolic and mitochondrial malondialdehyde (MDA); a decrease in the mitochondrial and cytosolic catalase (CAT) enzyme activity except in the striatum where there was an increase following exposure to DLT. The level of glutathione (GSH) increased in the cytosol of the cerebellum, striatum and decreased in the mitochondria of other regions. Cytosolic superoxide dismutase (SOD) activity was induced by PYRs in all regions; glutathione-s-transferase (GST) decreased in the mitochondria and cytosol of the hippocampus and was altered in the cytosol of other regions; glutathione peroxidase (GPX) was altered in the cytosol of the hippocampus and was induced in the cytosol of other regions. The neurobehavioral tests revealed especially in the DLT group: a hypomotricity, an alteration of the spatial and non-spatial storage caused an installation of a state of anxiety, and depression as revealed by the sucrose test. On another level, we evaluated the preventive effects of quercetin (QUER) on recent parameters after PYRs treatment. The results of this study demonstrated that QUER decreased the level of cytosolic MDA, prevented the alteration of antioxidant enzymes caused by DLT and the mixture, but not the effects induced by BF. On the neurobehavioral level, QUER has an anti-depressive effect, improved locomotor deficit, memorization and learning and reduced the level of anxiety.

Key words: Pyrethroids, oxidative stress, brain regions, behaviors, neurotoxicity.

المخلص

للأمراض التنكسية العصبية أسباب متعددة العوامل تشمل العوامل البيئية، الغذائية والجينية. تبين الدراسات الوبائية والتسممية أن معظم هذه الأمراض مرتبط بالتعرض المزمن لمنتجات وقاية النبات. في هذه الدراسة، اهتمنا بتقييم التسمم العصبي لاثنين من البيريثرينويدات (PYRS)، وهما البيفنثرين (BF) و الدلتامثرين (DLT) على نموذج حيواني (فئران ويستار ألبينوس) من ناحية، ودراسة التأثير الوقائي الخلوي للكرسيتين (QUER)، ضد هذا التسمم من ناحية أخرى. ينقسم المنهج التجريبي لهذه الدراسة إلى ثلاثة محاور؛ دراسة حالة الأكسدة والارجاع للميتوكوندريا في مناطق مختلفة من الدماغ، في هذه الحالة الحصين، المخطط، المخيخ والقشرة المخية والسلامة الهيكلية للميتوكوندريا، في الفئران المعرضة بشكل مزمن للبيريثرينويدات؛ تقييم الإجهاد التأكسدي العصبي الخلوي-في مناطق الدماغ من أجل تسليط الضوء على درجة ونطاق اختلال الأكسدة في الأجزاء الخلوية الأخرى وهي السيتوزول بعد الميتوكوندريا؛ وأخيرا دراسة السلوك العصبي من أجل تسليط الضوء على مدى التغيرات في القدرات المعرفية و السلوكية للحيوان. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة أن التسمم العصبي ناجم عن اثنين من البيريثرينويدات المستخدمة (البيفنثرين و الدلتامثرين)، من خلال اضطراب حالة الأكسدة في الميتوكوندريا و السيتوزول، وهي ظاهرة تسببت في انتفاخ الميتوكوندريا والتي من المحتمل أن تغير من السلامة الوظيفية والهيكلية لهذه العضية. في الواقع، كشف تقييم الإجهاد التأكسدي عن آثار سامة معتبرة لكلا المبيدين تتجلى في زيادة في كمية MDA الخلوي و الميتوكوندري/ انخفاض في نشاط إنزيم الكاتالاز في الميتوكوندريا و السيتوزول إلا في المخطط حيث توجد زيادة بعد التعرض للدلتامثرين؛ يزداد مستوى GSH في سيتوزول المخيخ، المخطط و التناقص في ميتوكوندريا القشرة و المخيخ و يتناقص بشكل معتبر في المناطق الأخرى. يتم ارتفاع نشاط إنزيم SOD الخلوي بواسطة البيريثرينويدات في جميع المناطق؛ انخفاض GST في الميتوكوندريا و السيتوزول من الحصين ويتم تغييره في سيتوزول المناطق الأخرى؛ يتناقص GPX في سيتوزول الحصين و يتزايد في سيتوزول المناطق الأخرى. تكشف الاختبارات السلوكية العصبية خاصة في مجموعة الدلتامثرين: نقص في الحركة، وتغير مستحدث في الذاكرة المكانية وغير المكانية، ظهور حالة من القلق، والاكتئاب الذي تم تقييمه بواسطة اختبار السكروز. على مستوى آخر، قمنا بتقييم الآثار الوقائية للكرسيتين على المؤشرات السابقة بعد العلاج بالبيريثرينويدات. أظهرت نتائج هذه الدراسة أن الكرسيتين يقلل من مستوى MDA السيتوزولي، يقضي على تغيرات نشاط الإنزيمات المضادة للأكسدة التي تسببها الدلتامثرين و الخليط، ولكن ليس من طرف البيفنثرين. على مستوى السلوك العصبي، الكرسيتين له تأثير مضاد للاكتئاب، يحسن النقص العضلي الهيكلي، الحفظ والتعلم و يقلل من مستوى القلق.

الكلمات المفتاحية: البيريثرينويدات، الإجهاد التأكسدي، مناطق الدماغ، سلوك عصبي.

Liste des abréviations

°C : degré Celsius
µl : microlitre.
µmol : micromole
½ O₂ : oxygène singulet
3-PBA : acide 3-phénoxybenzoïque
5-HIAA : 5-hydroxy-3-indolacetic acid
5-HT : sérotonine
ACh : acétylcholine
AChE : acétylcholine estérase
AMPA : activés par le α-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4- isoxazolepropionate
ATP : adénosine triphosphate
BDNF : brain-derived neurotrophic factor (facteur neurotrophique issu du cerveau)
BF: bifenthrine
BM: test de Barnes (Barnes maze)
Br₂CA: cis-(2,2-dibromovinyl)-2,2-diméthylcyclopropane-1-carboxylic acid
BSA: bovine Sérum Albumine
CAT : catalase
CC : compartiment clair
CCAS : cerebellar cognitive affective syndrome
CDNB : 1-chloro, 2,4-dinitrobenzène
CO : compartiment obscur
COMT : catechol-O-méthyltransférase
CYP : cyperméthrine
DJA : dose journalière admissible
DL50 : dose létale 50
DLT : deltaméthrine
DO : densité optique
DTNB : acide 5,5'-dithiobis (2- acide nitrobenzoïque) ou réactif d'Ellman.
EC : emulsion concentrée
EDTA : acide Ethylène-Diamine-Tétraacétique
EPM : labyrinthe en croix surélevée (elevated plus maze)
FST: test de la nage forcée (forced swim test)
g : gravité.
GABA : acide γ-aminobutyrique
GPx : glutathion peroxydase
GR : glutathion réductase
GSH : glutathion réduit
GSSG : glutathion oxydée
GST : glutathion-s-transférase
H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
HCL : chlorure d'hydrogène
HPLC : chromatographie liquide a haute performance
Kg : kilogramme
LDB : test du chambre obscure / claire (Light/Dark Box test)
LOO• : radical peroxyde d'acide gras
LPO : pyroxydation lipidique (Lipid Peroxydation)
M : molaire (mole par litre)

MDA : acide Malondialdéhyde
mg : milligramme
min : minute
MIX: mixture
mM: millimole
MB: test des billes enterrées (marble burying test)
MWM: test de Morris (Morris Water Maze)
Na : sodium
NaCl : chlorure de sodium
NBT : nitroblu-tétrazolium
NMDA : acide N-méthyl-D-aspartique
NMDARs : les recepteurs acide N-méthyl-D-aspartique
nM: nanomole
NO : oxyde nitrique
NOAEL: No Observable Adverse Effect Level
NOR : test de reconnaissance de nouvel objet (Novel Object Recognition)
NOS : espèces d'oxyde d'azote (nitrogen oxide species)
O₂^{•-} ion superoxide (anion superoxyde)
ONOO⁻: ion peroxydinitrite
OP: test du champ ouvert (Open Field)
p : probabilité
PB: tampon phosphate (Phosphate Buffer)
pH: potentiel hydrogène
POPs: polluants organiques persistants
PTP : pore de transition de perméabilité mitochondrial
PYRs : pyréthriinoïdes
QUER : quercétine
RNS : espèces réactives de l'azote (reactive nitrogen species)
ROS : reactive oxygen species
Se : sélénium
SEM : erreur standard de la moyenne
SN : système nerveux
SNC : système nerveux central
SNP : système nerveux périphérique
SOD: super oxyde-dusmitase
SULT : sulfotransférase
TBA: acide thiobarbiturique
TBARS: thiobarbituric acid reactive substances
TCA: trichloroacétique.
TEP : tomographie par émission de positrons
TH: tyrosine hydrolase
TNB: thionitrobenzoate
Tris : 2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol
TrKB : Tropomyosin receptor kinase B.
UI : unité internationale
UGT : uridine 5-diphosphoglucuronosyltransferase
VGSC : canaux sodiques voltage-dépendant (Voltage-gated sodium channels)

Liste des figures

Figure 1.	Présentation des six pyréthrinés naturels.....	5
Figure 2.	Structure chimique de quelque PYRs.....	6
Figure 3.	Devenir des pyréthrinoïdes dans l'environnement.....	7
Figure 4.	Liaison de la DLT plasmatique totale à l'albumine humaine sérique (HSA), aux protéines plasmatiques et aux lipoprotéines.....	13
Figure 5.	Les principales voies métaboliques de la BF chez le rat.....	14
Figure 6.	Dégradation des pyréthrinoïdes et élimination de ces métabolites dans l'urine..	15
Figure 7.	Les voies métaboliques de la deltaméthrine chez les mammifères.....	16
Figure 8.	Les principaux composants anatomiques du système nerveux.....	18
Figure 9.	Le neurone.....	20
Figure 10.	Le potentiel membranaire de repos.....	22
Figure 11.	Le potentiel d'action.....	24
Figure 12.	Spécialisation pré- et post-synaptique.....	25
Figure 13.	Localisation de l'hippocampe.....	29
Figure 14.	Le striatum.....	32
Figure 15.	Représentation des principales zones du cortex cérébral.....	33
Figure 16.	Organisation laminaire du cortex.....	34
Figure 17.	Aspect morphologique du cervelet.....	37
Figure 18.	Circuits cellulaires du cervelet.....	39
Figure 19.	Représentation de la vue cérébelleuse macroscopique et association entre les sous-régions cérébrales et les fonctions.....	42
Figure 20.	Schéma topologique du récepteur canal sodium voltage-dépendant (VGSC)	44
Figure 21.	Transitions d'état des canaux sodiques associées à des courants transitoires de sodium mesurés par la technique de voltage-clamp, en absence et en présence de PYR.....	45
Figure 22.	Sites de liaison possibles de la DLT avec AChE.....	47
Figure 23.	Mécanismes d'action supposés des pyréthrinoïdes.....	48
Figure 24.	Action de la DLT sur le p53 induisant l'apoptose.....	49
Figure 25.	La voie de signalisation de stress par la DLT.....	50
Figure 26.	Les voies de signalisation du stress oxydatif induites par la deltaméthrine.....	53
Figure 27.	La structure de la quercétine.....	55

Figure 28.	Schéma de la réaction entre le DTNB et les groupements –SH.....	63
Figure 29.	Variation du taux de MDA mitochondrial sous l'effet de BF, DLT et leur mixture associée ou non à la quercétine dans les différentes régions du cerveau des rats (hippocampe, striatum, cortex et cervelet)	67
Figure 30.	Variation du taux de GSH mitochondrial sous, l'effet de DLT, BF et leur mixture associé ou non à la QUER dans les différentes régions du cerveau des rats (hippocampe, striatum, cortex, cervelet).....	68
Figure 31.	Protocole d'extraction du cytosol à partir du tissu nerveux.....	76
Figure 32.	Effet de l'exposition chronique au BF, DLT et leur mixture, seuls ou associés à la quercétine, sur le taux de MDA cytosolique dans les 4 régions du cerveau...	80
Figure 33.	Effet de l'exposition chronique au BF, DLT et leur mixture, seuls ou associés à la quercétine, sur le taux de GSH cytosolique dans les 4 régions du cerveau...	82
Figure 34.	Effet de l'exposition chronique au BF, DLT et leur mixture, seuls ou associés à a la QUER, sur l'activité enzymatique de la catalase cytosolique dans les 4 régions du cerveau.....	84
Figure 35.	Effet de l'exposition chronique au BF, DLT et leur mixture, seuls ou associés à la QUER, sur l'activité enzymatique de la SOD cytosolique dans les 4 régions du cerveau.....	86
Figure 36.	Effet de l'exposition chronique au BF, DLT et leur mixture, seuls ou associés à la QUER, sur l'activité enzymatique de la GST cytosolique dans les 4 régions du cerveau.....	88
Figure 37.	Effet de l'exposition chronique au BF, DLT et leur mixture, seuls ou associés à la QUER, sur l'activité enzymatique de la GPx cytosolique dans les 4 régions du cerveau.....	89
Figure 38.	Test de la piscine de Morris.....	101
Figure 39.	Test de Barnes.....	104
Figure 40.	Test de la reconnaissance de nouvel objet (NOR).....	106
Figure 41.	Test du champ ouvert (open field).....	107
Figure 42.	Test de labyrinthe en croix surélevée (elevated plus maze test).....	109
Figure 43.	Test de chambre clair/obscur (dark light box).....	110
Figure 44.	Test des billes enterrés.....	112
Figure 45.	Test de la nage forcée (forced swim test)	113
Figure 46.	Test d'anhédonie (test de sucrose).....	115

Figure 47.	Effet des BF, DLT et leur mixture, seuls ou associés à la quercétine sur le temps de latence du test de la piscine de Morris pendant les séances d'acquisition chez le rat.....	116
Figure 48.	Effet de l'exposition chronique au BF, DLT et leur mixture, seuls ou associés à la quercétine sur le temps de latence des essais du 3 ^{ème} jour du test de la piscine de Morris (mémoire de travail)	117
Figure 49.	Effet de l'exposition chronique au BF, DLT et leur mixture, seuls ou associés à la quercétine sur le temps passé dans le quadrant cible durant le test de sonde de la piscine de Morris (probe test)	118
Figure 50.	Effet de l'exposition chronique des animaux aux DLT, MIX, seuls ou associés à la quercétine sur la mémorisation spatiale pendant les 7 jours du test de Barnes.....	119
Figure 51.	Effet de l'exposition chronique des animaux aux DLT, MIX, seuls ou associés à la quercétine sur le test de la reconnaissance de nouvel objet.....	122
Figure 52.	Effet de l'exposition chronique aux BF, DLT et leur mixture, seuls ou associés à la quercétine sur le nombre de redressement dans le test du champs ouvert (open field).....	123
Figure 53.	Effet de l'exposition chronique des animaux aux DLT, MIX, seuls ou associés à la quercétine sur le nombre de défécation dans le test du champs ouvert (open field).....	124
Figure 54.	Effet de l'exposition chronique au BF, DLT et leur mixture, seuls ou associés à la quercétine sur le nombre de carreaux totales traversés dans le test du champs ouvert (open field).....	124
Figure 55.	Effet de l'exposition chronique au BF, DLT et leur mixture, seuls ou associés à la quercétine sur le nombre de carreaux et la zone du champs ouvert (open field).....	125
Figure 56.	Effet de l'exposition chronique au DLT, MIX, seuls ou associés à la quercétine sur les paramètres du test de labyrinthe en croix surélevée.	127
Figure 57.	Effet de l'exposition chronique au BF, DLT et leur mixture, seuls ou associés à la quercétine sur les paramètres comportementaux du test de champ clair/obscur chez le rat.....	129
Figure 58.	Effet de l'exposition chronique aux DLT, MIX, seuls ou associés à la quercétine sur le nombre des billes enterrées	130
Figure 59.	Effet de l'exposition chronique au DLT, MIX, seuls ou associés à la quercétine sur le temps total (cumulé) d'immobilité en secondes durant le test de la nage forcée.....	131

Figure 60.	Effet de l'exposition chronique aux BF, DLT et leur mixture, seuls ou associés à la quercétine sur la consommation de sucrose et l'eau sucrée au cours du test de l'anhédonie.....	132
-------------------	--	------------

Liste des tableaux

Tableau 1	Evolution en tonnes des pyréthrinoïdes commercialisés en France entre 2000 et 2004.....	7
Tableau 2	Principales propriétés chimiques et toxicologiques de la bifenthrine et de la deltaméthrine.....	11
Tableau 3	Les principales neurotransmetteurs.....	26
Tableau 4	Le gonflement des mitochondries évalué par la décroissance de la densité optique dans les différentes régions du cerveau (hippocampe, striatum, cortex, cervelet) chez le rat, exposés à long terme à DLT, BF et leurs mixture associés ou non à la QUER.....	66
Tableau 5	L'activité du CAT mitochondriale dans les différentes régions du cerveau (hippocampe, striatum, cortex et cervelet) chez les rats traités de façon chronique à DLT, BF et leur mélange associé ou non à la QUER.....	69
Tableau 6	L'activité du GST mitochondriale dans les différentes régions du cerveau (hippocampe, striatum, cortex et cervelet) chez les rats traités de façon chronique par DLT, BF et leur mélange associé ou non à la QUER.....	70
Tableau 7	Répartition et traitement des animaux.....	75
Tableau 8	Formules pour l'analyse des données dans le test de NOR.....	106
Tableau 9	Effet de l'exposition chronique aux DLT, MIX, seuls ou associés à la quercétine sur le temps total passé à explorer les deux objets au cours de la session de formation et de la session du test.....	121

Sommaire

Liste des abréviations	I
Liste des figures	III
Liste des tableaux	VI
<i>Introduction générale</i>	1
<i>Rappels bibliographiques</i>	
Chapitre 1. Les pyréthriinoïdes	3
1. Généralités	3
1.1. Historique	3
1.2. Propriétés physicochimiques et classification	4
1.3. Utilisation et risques environnementaux	6
1.4. Exposition de la population générale	8
2. Les pyréthriinoïdes étudiés : la bifenthrine et la deltaméthrine	9
2.1. Propriétés générales de la bifenthrine et de la deltaméthrine	9
2.2. Toxicocinétique de la bifenthrine et de la deltaméthrine	11
2.2.1. Absorption et distribution	11
2.2.2. Métabolisme et élimination	13
3. Toxicité de la bifenthrine et de la deltaméthrine	16
Chapitre 2 : La neurotoxicité des pyréthriinoïdes	17
1. Le système nerveux	17
1.1. Organisation et composition du système nerveux	17
1.1.1. Organisation du système nerveux	17
1.1.2. Les neurones	19
1.1.3. Les gliocytes	21
1.2. La transmission de l'influx nerveux et synapses	21
1.2.1. Potentiel et influx nerveux	21
1.2.2. Synapses et neurotransmission	24
1.3. Régions du cerveau étudiées	28
1.3.1. L'hippocampe	28
1.3.1.1. Anatomie	28
1.3.1.2. Physiologie	30
1.3.2. Le striatum	31
1.3.2.1. Anatomie	31
1.3.2.2. Physiologie	31
1.3.3. Le cortex	33
1.3.3.1. Anatomie	33
1.3.3.2. Physiologie	36
1.3.4. Le cervelet	36
1.3.4.1. Anatomie	36
1.3.4.2. Physiologie	39
2. Neurotoxicité des pyréthriinoïdes	42
2.1. Action des pyréthriinoïdes sur les canaux sodiques	43

2.2. Action des pyréthriinoïdes sur l'acétylcholinestérase	45
2.3. Action des PYRs sur les neuromédiateurs	47
2.4. Action apoptotique des pyréthriinoïdes	48
2.5. Action des pyréthriinoïdes sur le statut Redox	51
2.6. Action des pyréthriinoïdes sur le dysfonctionnement mitochondrial	51
2.7. Action des pyréthriinoïdes sur le stress oxydatif	52
3. Effets neurocomportementaux suite à l'exposition aux PYRs	54
Chapitre 3 : La quercétine	55
3.1. La quercétine : Absorption, Métabolisme et Biodisponibilité	56
3.2. Effets neuroprotecteurs de la quercétine	57
<i>Partie expérimentale</i>	
Chapitre I : Evaluation régionale du statut redox et l'intégrité des mitochondries du cerveau chez les rats exposés chroniquement à de faibles doses de pyréthriinoïdes et effet préventif de la quercétine	58
1. Introduction	58
2. Matériels et méthodes	58
2.1. Produits chimiques	58
2.2. Choix des doses	59
2.3. Traitement d'animaux	60
2.4. Prélèvement des échantillons	60
2.4.1. Sacrifice des animaux et extraction du cerveau	60
2.4.2. Dissection des cerveaux	60
2.5. Isolement des mitochondries et extraction de la matrice	61
2.6. Essai du gonflement mitochondrial	62
2.7. Évaluation du statut redox mitochondrial régional du cerveau	62
2.7.1. Évaluation de la peroxydation lipidique mitochondriale	62
2.7.2. Dosage du taux de GSH mitochondrial	63
2.7.3. Évaluation de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale	63
2.7.4. Évaluation de l'activité enzymatique de GST mitochondriale	64
2.8. Analyses statistiques	65
3. Résultats	65
3.1. Évaluation du gonflement mitochondrial <i>in vivo</i>	65
3.2. Évaluation de la peroxydation lipidique <i>in vivo</i> dans les mitochondries du cerveau	66
3.3. Évaluation du GSH mitochondrial dans les différentes régions du cerveau	67
3.4. Évaluation des enzymes antioxydantes dans les mitochondries cérébrales, CAT et GST	68
4. Discussion	70
5. Conclusion	73
Chapitre II : Etude de l'impact de l'exposition chronique aux pyréthriinoïdes à faibles doses chez le rat adulte et la prévention par la quercétine : évaluation du stress oxydant cytosolique	74
3.7.3. Introduction	74
3.7.4. Matériels et méthodes	74

2.1. Produits chimiques	74
2.2. Les animaux de laboratoire	75
2.3. Traitement des rats	75
2.4. Prélèvement des échantillons	76
2.4.1. Sacrifice des animaux et extraction du cerveau	76
2.4.2. Dissection des cerveaux	76
2.4.3. Extraction de la fraction cytosolique des tissus nerveux	76
2.5. Techniques de dosages des paramètres de stress oxydatif	77
2.5.1. Evaluation de l'activité enzymatique de la CAT et de GST cytosoliques et le taux de GSH cytosolique	77
2.5.2. Dosage du malondialdéhyde (MDA)	77
2.5.3. La superoxyde dismutase (SOD)	77
2.5.4. La glutathion peroxydase (GPx)	78
2.6. Analyse statistique	79
3. Résultats	79
3.1. Effets des pyréthriinoïdes et de la quercétine sur le statut redox dans les différentes régions du cerveau	79
3.1.1. Effets des pyréthriinoïdes et de la quercétine sur le taux de MDA cytosolique	79
3.1.2. Effets des pyréthriinoïdes et de la quercétine sur le taux de GSH cytosolique dans les différentes régions du cerveau	81
3.1.3. Effets des pyréthriinoïdes et de la quercétine sur l'activité enzymatique de la catalase cytosolique dans les différentes régions du cerveau.	83
3.1.4. Effets des pyréthriinoïdes et de la quercétine sur l'activité enzymatique de la SOD cytosolique dans les différentes régions du cerveau	85
3.1.5. Effets des pyréthriinoïdes et de la quercétine sur l'activité enzymatique de la GST cytosolique dans les différentes régions du cerveau	87
3.1.6. Effets des pyréthriinoïdes et de la quercétine sur l'activité enzymatique de la GPx cytosolique dans les différentes régions du cerveau	87
4. Discussion	90
5. Conclusion	97
Chapitre III : Variations neurocomportementales chez le rat adulte exposé chroniquement aux pyréthriinoïdes à faibles doses et l'effet de la quercétine	98
1. Introduction	98
2. Matériel et méthodes	99
2.1. Matériels	99
2.2. Méthodes	99
2.2.1. Tests de mémorisation et d'apprentissage	99
2.2.1.1. Test de Morris (Morris water maze) MWM	99
a. Description générale	99
b. Procédure	100
c. Paramètres mesurés	101
2.2.1.2. Test de Barnes (Barnes maze) BM	102

a. Description générale	102
b. Procédure	102
c. Paramètres mesurés	103
2.2.1.3. Test de reconnaissance d'objet (novel object recognition) NOR	104
a. Description générale	104
b. Procédure	105
c. Paramètres mesurés	106
2.2.2. Tests d'anxiété	106
2.2.2.1. Test du champ ouvert (Open Field) OP	106
a. Description générale	106
b. Procédure	107
c. Paramètres mesurés	107
2.2.2.2. Test du labyrinthe en croix surélevée (elevated plus maze test) EPM	108
a. Description générale	108
b. Procédure	108
c. Paramètres mesurés	109
2.2.2.3. Test du chambre claire /obscure (dark light box) DLB	109
a. Description générale	109
b. Procédure	110
c. Paramètres mesurés	110
2.2.2.4. Test des billes (marble burying test) MB	111
a. Description générale	111
b. Procédure	111
c. Paramètres mesurés	112
2.2.3. Tests de dépression	112
2.2.3.1. Test de la nage forcée (forced swim test) FST	112
a. Description générale	112
b. Procédure	113
c. Paramètres mesurés	113
2.2.3.2. Test de sucrose (test d'anhédonie)	114
a. Description générale	114
b. Procédure	114
c. Paramètres mesurés	114
3. Résultats	115
3.1. Effets des pyréthriinoïdes et de la quercétine sur le neurocomportemental des rats	115
3.1.1. Test de Morris	115
3.1.2. Test de Barnes	118
3.1.3. Test de reconnaissance d'objet	120
3.1.4. Test du champ ouvert (open field test)	123
3.1.5. Test de labyrinthe en croix surélevée (Elevated Plus Maze Test)	126
3.1.6. Test de chambre claire/obscure (Dark Light Box Test)	126

3.1.7. Test des billes enterrés	128
3.1.8. Test de la nage forcée	130
3.1.9. Test de sucrose (anhédonie)	131
4. Discussion	133
4.1. Effet de BF, DLT et leur mixture associés ou non à QUER sur l'activité locomotrice chez les rats	133
4.2. Effet de BF, DLT et leur mixture associés ou non à la QUER sur l'apprentissage spatial et mémorisation chez les rats	135
4.3. Effet de BF, DLT et leur mixture associés ou non à la QUER sur l'apprentissage non spatial et mémorisation chez les rats	137
4.4. Effet de BF, DLT et leur mixture associés ou non à la QUER sur le comportement anxieux chez les rats	139
4.5. Effet de BF, DLT et leur mixture associés ou non à QUER sur le comportement dépressif chez les rats	141
5. Conclusion	142
<i>Conclusion générale</i>	143
<i>Références bibliographiques</i>	145
<i>Annexe</i>	164

Introduction

Introduction générale

Notre société connaît une augmentation incessante de la demande de la nourriture, il est donc plus que nécessaire de nous concentrer sur l'importance des grandes cultures et de la production de masse de produits afin de couvrir et de satisfaire les besoins humains globaux. Cette demande ne peut pas être satisfaite par les méthodes de production agricole conventionnelles, ce qui a conduit à choisir l'intensification agricole par une utilisation intensive des deux produits agrochimiques et des pesticides pour produire plus de biomasse végétative et réduire les vecteurs de différents phytopathogènes (Refaie et al., 2014).

Malheureusement, ces substances chimiques sont dangereuses et sont des sources permanentes de toxicité pour la santé de la population qui suscite beaucoup d'attention en toxicologie environnementale. Effectivement, ces polluants sont responsables de graves problèmes environnementaux, problèmes en raison de leur persistance et de leur bioaccumulation dans la chaîne alimentaire. Plusieurs études ont montré une forte implication de ces xénobiotiques dans l'apparition de multiples maladies (Vandelac et Bacon, 1999 ; Ashar et Muthu, 2012 ; Dar et al., 2013).

L'exposition aux pesticides peut se produire soit directement pendant le processus de la production, ou par l'utilisation professionnelle. Dans ce cas, les personnes en état d'ébriété sont traitées par les services médicaux professionnels ou par les centres de désintoxication spécialisée. Cependant, l'exposition de la population générale à ces substances toxiques à faible dose via des matrices biologiques, en particulier des produits alimentaires et son impact grave sur l'organisme vivant, reste peu étudié. Les quelques études sur le sujet n'ont pas fourni une compréhension plus claire de la relation entre ces polluants et l'étiologie de certaines maladies telles que les maladies métaboliques et neurodégénératives, le dysfonctionnement de la reproduction, les troubles du neurodéveloppement et le cancer (Baldi et al., 2013).

Les pyréthrinoïdes de synthèse sont de plus en plus utilisés, ils atteignent 30% des insecticides utilisés dans le monde. Ils deviennent le choix préféré des agriculteurs pour leur forte teneur en insecticides, leur efficacité et leur tendance à être rapidement biodégradés dans l'environnement (Nieradko-Iwanicka et Borzecki, 2015) ; bien que cette propriété continue d'être trop controversée par d'autres travaux précédents, qui ont rapporté qu'ils ont trouvé des preuves, que les pyréthrinoïdes sont des composés lipophiles et leurs taux d'extraction sont corrélés considérablement avec les quantités de la matière grasse (Farajzadeh et al., 2014). Ces produits chimiques sont les pesticides les plus utilisés au niveau de l'Algérie, comme la

deltaméthrine et la bifenthrine. Cependant, différentes études ont étudié la relation entre les pathologies humaines et l'exposition aiguë des consommateurs à ces pyréthriinoïdes via les produits alimentaires susceptibles d'être contaminés par leurs résidus (Hossain et al., 2013).

Sur le marché, la vente de ces produits est également non contrôlée, et sous le manque de laboratoires spécialisés à travers le territoire national pouvant effectuer des analyses spécifiques dont celles relatives aux taux des résidus de pesticides. Il évoque même la contamination de nappes phréatiques dans certaines régions de pays.

Pendant plus d'un demi-siècle, on a pensé que les pyréthriinoïdes n'agissaient que par la dérégulation rapide du système nerveux, sans aucun effet cytotoxique significatif. Cependant, il a été prouvé que l'exposition aux pyréthriinoïdes peut provoquer la mort des neurones chez les animaux adultes, en inhibant le développement du système nerveux chez les nouveau-nés des rongeurs (Nieradko-Iwanicka et Borzęcki, 2016).

- Cette étude porte donc sur l'évaluation de la toxicité cérébrale de la deltaméthrine et de la bifenthrine, administrées chroniquement (6 et 4 mois) à des doses de 3,72 et 2,6 mg / kg respectivement, seuls ou en mixture, chez les rats Wistar. Dans la présente étude, le statut redox mitochondrial et cytosolique et son impact sur l'intégrité de la membrane des mitochondries sont principalement ciblés par cette étude, dans différentes régions majeures du cerveau (hippocampe, striatum, cortex et cervelet).

- Par ailleurs, les études neurocomportementales, au regard des perturbations neuronales éventuelles induites par les pesticides étudiés, seront également abordées dans cette thèse, telles que la locomotion, l'apprentissage, la mémorisation, l'anxiété et la dépression, afin de rechercher une association possible entre l'effet moléculaire cellulaire et l'effet neurocomportemental.

- D'autre part, ce travail nous permettra de comprendre si les molécules bioactives comme la quercétine peuvent réduire ou prévenir le dysfonctionnement induit par les pyréthriinoïdes.

Rappels bibliographiques

Chapitre 1. Les pyréthrinoïdes

1. Généralités

1.1. Historique

L'utilisation des substances toxiques ayant un pouvoir insecticide est très ancienne. Il y a 2000 ans, les Chinois utilisèrent déjà de la poudre de fleurs des pyrèthres séchées (Richou-Bac et Venant, 1985 ; Mestres et mestres, 1992 ; Davies et al., 2007), se composant généralement de 30% d'ingrédient actif collectivement appelé pyréthrine (Rehman et al., 2014).

La chimie de synthèse a progressé rapidement durant les années 1930 et au début des années 1940, une gamme de nouveaux pesticides a été élaborée, y compris les insecticides organochlorés (Ameziane, 2016), et par la suite les organo-phosphorés, les carbamates ... etc (Richou-Bac & Venant, 1985). Après la seconde guerre mondiale, en dépit de l'excellente propriété insecticide des pyréthrinoïdes naturels et de leur faible niveau de toxicité chez les mammifères, il s'est avéré qu'ils sont peu utiles dans la protection des cultures dû à leur instabilité à la lumière et à l'oxygène. Ils ont été délaissés au profit des insecticides organiques tels que les organophosphorés, organochlorés ou encore carbamates, plus performants mais aussi moins chers et plus stables (Testud & Grillet, 2007).

L'instabilité à la lumière des pyréthrinoïdes naturels amène le besoin de préparer des analogues synthétiques, le premier pyréthrinoïde de synthèse est l'alléthrine, mis au point en 1949, et commercialisé en 1952 (Bradberry et al., 2005 ; Hénault-Ethier et al., 2016). Par la suite, l'abandon des organochlorés et l'importante toxicité des organophosphorés et des carbamates ont favorisé le développement puis l'introduction sur le marché des pyréthrinoïdes de synthèse, dans les années 1960 à 1970, de nombreuses molécules nouvelles, développées à partir de la structure chimique des pyréthrines (Aligon et al., 2010 ; Duce, 2012), les améliorations portant sur la puissance d'action et la photostabilité, ont permis l'autorisation de leur utilisation phytosanitaire à grande échelle (Testud et Grillet, 2007).

Leur efficacité à très faible dose, le peu de résistances développées par les insectes, la faible toxicité chez les mammifères et l'absence de persistance dans l'environnement ont fait des pyréthrinoïdes les insecticides de référence (Testud & Grillet, 2007 ; Dar et al., 2015).

Les pyréthrinoïdes (PYRs) représentent actuellement plus de la moitié du marché mondial des insecticides, soit plus de 100 000 tonnes et dix milliards de dollars par an (Li et al., 2017). Ce sont des insecticides polyvalents agissant par contact et ingestion : ils entraînent une

sidération immédiate (effet de choc) puis la mort du ravageur. Les spécialités commerciales se présentent usuellement sous forme de concentrés émulsionnables où la substance active, dosée de 2,5 jusqu'à 250 g/l, est en solution dans des hydrocarbures pétroliers. Il existe également des suspensions concentrées aqueuses, des granulés auto-dispersibles et des poudres mouillables. Les doses d'emploi, de l'ordre de quelques grammes à des dizaines de grammes à l'hectare, sont 10 à 100 fois inférieures à celles des organophosphorés, venant compenser un coût de production relativement élevé, lié à la complexité des procédés de synthèse (Testud et Grillet, 2007).

1.2. Propriétés physicochimiques et classification

Les pyréthrinoïdes (PYRs) sont des molécules qui se trouvent, à température ambiante et sous forme pure, souvent en substances cireuses, mais pouvant être aussi sous diverses formes allant du liquide au solide. Les valeurs de solubilité dans l'eau sont très faibles rendant plusieurs PYRs insolubles dans un milieu aqueux. La solubilité dans un solvant organique est toutefois excellente (Laskowski, 2002). Les composés commerciaux ne contiennent qu'un certain pourcentage d'ingrédient actif, se situant généralement entre 5 et 35%. Pour augmenter leur efficacité, les pyréthrinoïdes sont formulés avec des composés tels que le pipéronyl butoxyde, le pipéronyl sulfoxyde et le sesamex, qui agissent avec une synergie (Berger-preieß et al., 1997 ; Thatheyus et Selvam, 2013). Les applications se réalisent par aérosols ; une diffusion dans l'air est possible mais restreinte due à leur faible volatilité après sédimentation. Ces substances sont peu mobiles et ont tendance à se lier au sol et aux sédiments organiques. Ces pesticides se retrouvent donc dans les milieux aquatiques sous forme complexée aux particules (Weisel, 2020). Les molécules sont dégradées rapidement par photolyse et oxydation. Leur demi-vie dans l'environnement en aérobie se situe entre 2 et 97 jours (Laskowski, 2002). Par exemple, la deltaméthrine a une demi-vie de dégradation de 11 à 72 jours dans le sol selon l'humidité, la température, l'ensoleillement et l'activité bactérienne (Elliott 1989), alors que pour la bifenthrine, elle est de 96 jours dans le sol, et 408 jours dans l'eau (Laskowski, 2002).

L'activité insecticide des extraits naturels, est due à la présence de six esters de l'acide cyclo-propanecarboxylique, cet acide peut être substitué par deux radicaux différents (CH_3 et $\text{CO}_2\text{-CH}_3$) menant d'une part à l'acide chrysanthémique et d'autre part à l'acide pyrétrique. Dans l'extrait naturel, 6 substances sont trouvées (figure 1), dérivées de l'acide chrysanthémique (pyréthrine I, cinérine I, jasmoline I) ou de l'acide pyrétrique (pyréthrine II, cinérine II et jasmoline II) (Richou-Bac et Venant, 1985).

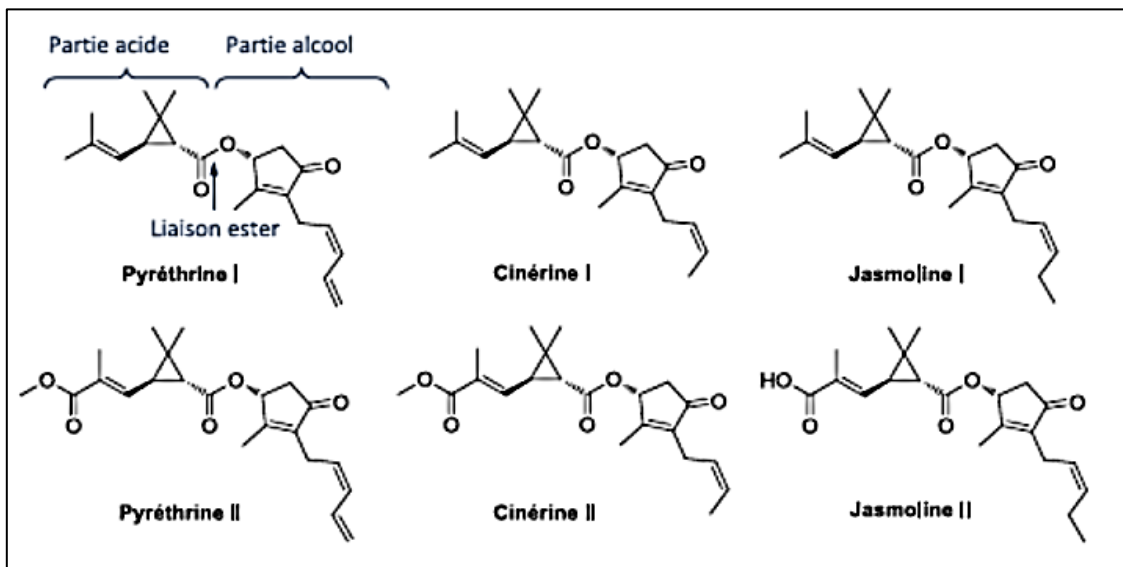


Figure 1. Présentation des six pyréthrines naturelles (Elliot, 1989).

Par la suite, des modifications de la structure moléculaire des pyréthrines naturelles ont permis la synthèse de deux catégories de PYRs, selon le substituant de la moitié alcool ou acide de la molécule similaire à la pyréthrine se distinguant par la présence ou non d'un radical cyanide (-CN), ainsi par leur mode d'action toxique (Rajawat et al., 2019) à savoir :

- **Type I** : sont des composants dépourvus du groupe cyano, (Abreu-Villaca et Levin, 2017) comme bifenthrine (58%), perméthrine (31%) et la cyfluthrine (14%) (Li et al., 2017).
- **Type II** : sont des composants contenant les groupes cyano comme la deltaméthrine et la cyperméthrine (Abreu-Villaca et Levin, 2017 ; Rajawat et al., 2019).

Les PYRs de la première génération (par exemple, l'alléthrine, l'imiprothrine, la phénothrine, la pralléthrine, la résméthrine et la tétraméthrine) ont été développés au début des années 1970, qui se dégradent rapidement au soleil. Et à la fin des années 1970, les PYRs de deuxième génération (par exemple, la bifenthrine, la cyhalothrine, la cyfluthrine, la cyperméthrine, la deltaméthrine, l'esfenvalérate, la fenpropathrine et la perméthrine) ont été conçus pour être plus photostables, ils sont fréquemment utilisés dans les produits de lutte contre divers insectes nuisibles, dans les cultures agricoles, dans et autour des habitations résidentielles et d'animaux domestiques (Morgan, 2012 ; Habr et al., 2014). La figure 2 montre la structure chimique de 14 types de PYRs les plus utilisés dans les domaines agricoles.

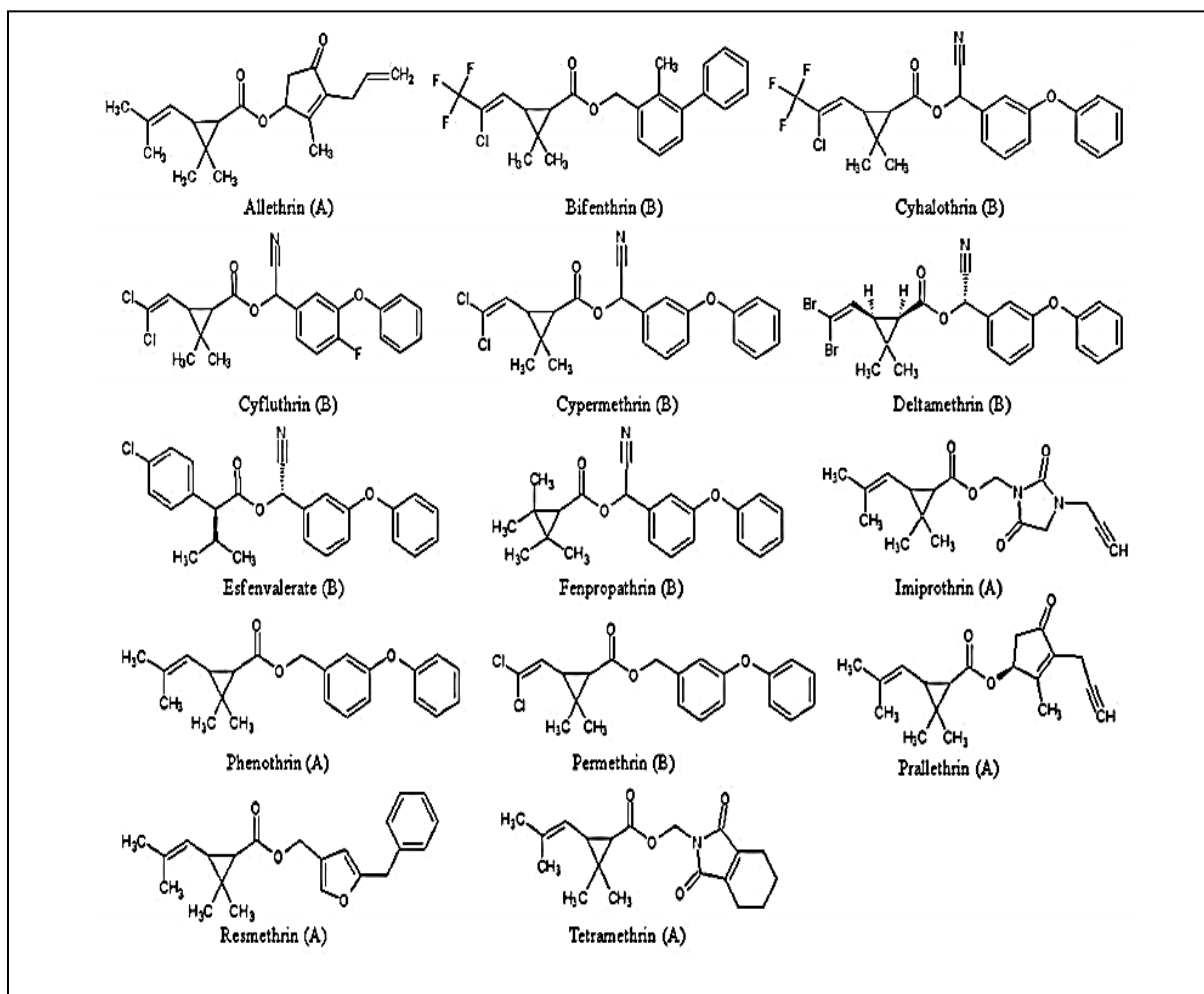


Figure 2. Structure chimique de quelque PYRs (Morgan, 2012).

(A) : PYRs de première génération. (B) : PYRs de deuxième génération.

1.3. Utilisation et risques environnementaux

Les pyréthrinoïdes de synthèse sont largement utilisés comme pesticides en agriculture comme en horticulture, mais également en médecine vétérinaire et en tant qu'insecticides domestiques (Ding et al., 2012). Leur importance semble augmenter chaque année, ils constituent le groupe d'insecticides le plus utilisé en Angleterre, représentant 91% de la superficie des grandes cultures traitée à l'insecticide, leur utilisation a augmenté de 1,38 million d'hectares entre 2000 et 2013 (Underwood et Mole, 2016). Une augmentation d'utilisation de 17% leur permet de garder la première place en matière d'utilisation en France et même au niveau européen (tableau 1) (Aubertot et al., 2007) ; 3000 tonnes de PYRs sont produites chaque année en Chine pour des utilisations multiples (Ding et al., 2012), les résidus de PYRs résultant de leur utilisation sont retrouvés dans différentes récoltes, la contamination du thé par la deltaméthrine a été rapporté en Inde jusqu'à 50 mg/kg (Pitoy et al., 2019).

Tableau 1. Evolution en tonnes des pyréthrinoides commercialisés en France entre 2000 et 2004 (Aubertot et al., 2007).

Année	2000	2001	2002	2003	2004
Pesticides					
Pyréthroïdes (tonnes)	193	161	170	175	226
Insecticides totales (tonnes)	3103	2488	2316	2223	2469

Les PYRs sont stables à l'intérieur des maisons ; à l'abri de l'eau et de la lumière (Bergerpreiß et al., 1997). Lors d'utilisation domestique, ces pesticides peuvent être rejetés dans l'eau par les égouts, les usines de traitement des eaux usées semblent peu efficaces pour les éliminer (Weston et Lydy, 2010). Etant parmi les pesticides les plus lipophiles actuellement utilisés, les PYRs se lient facilement au carbone organique et aux particules et s'accumulent dans le sol et les sédiments ou ils se dégradent en quelques mois (figure 3) (Knauer et al., 2016). Du fait de leur utilisation répandue et de leur persistance relativement longue, des résidus de pyréthrinoides ont été retrouvés de manière omniprésente dans le milieu aquatique dans de nombreuses régions du monde (Lu et al., 2019). Les eaux de surfaces des zones agricoles sont contaminées par les PYRs à des concentrations surpassant parfois les critères pour la protection chronique de la vie aquatique (Girou et Fortin, 2010).

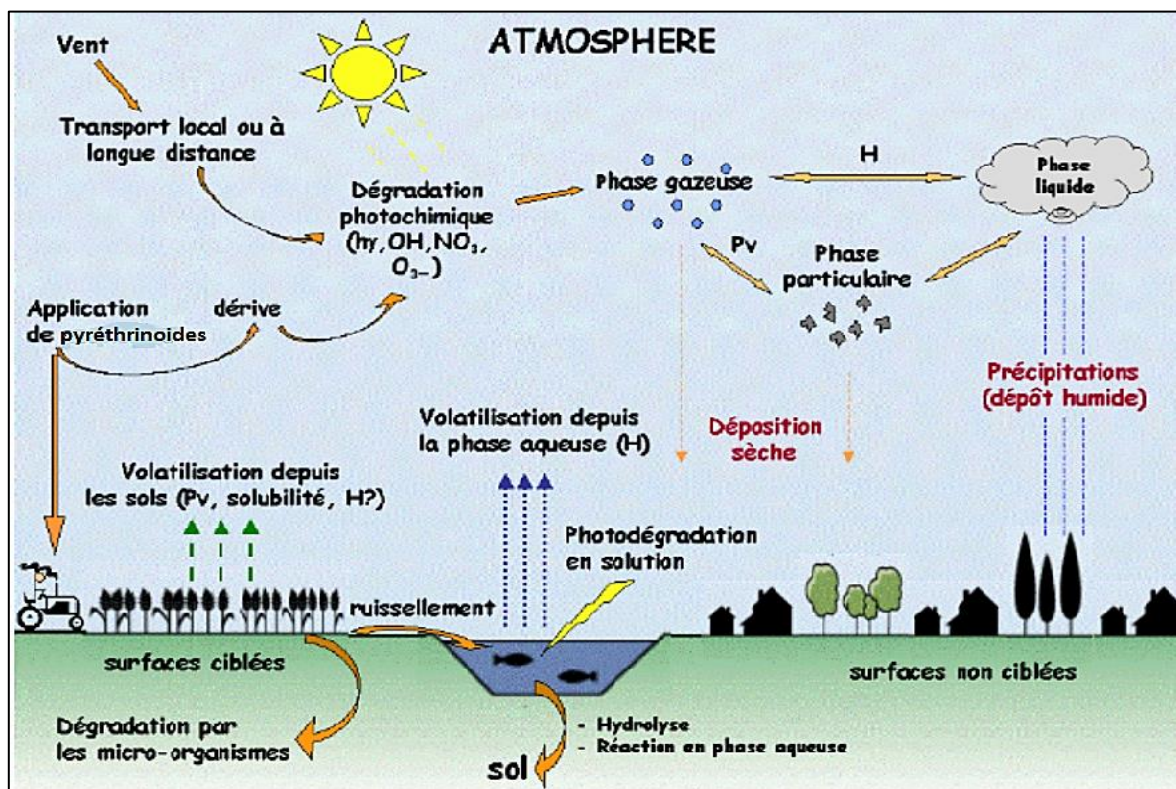


Figure 3. Devenir des pyréthrinoides dans l'environnement (Lichiheb et al., 2015).

1.4. Exposition de la population générale

Les travailleurs agricoles sont fréquemment exposés aux PYRs, ce qui peut poser un problème, particulièrement lorsque les bonnes pratiques de travail ne sont pas observées. Les PYRs sont utilisés pour l'élevage animal et la production alimentaire, plusieurs fruits (pomme, fraise et autres baies) et légumes (maïs sucré, pomme de terre, carotte, laitue, oignon, ciboule, et de nombreuses crucifères) peuvent être traités avec des PYRs dans le monde, l'utilisation agricole de ces insecticides laissera des résidus chez les aliments traités, et leur ingestion constitue une source d'exposition principale (Hénault-Ethier et al., 2016). Des taux élevés de PYRs allant jusqu'à 1200 ng/g de poids liquide ont été trouvés dans des échantillons du lait maternel humain (Zhang et al., 2015). Bien qu'il existe des normes, quant à la présence de résidus de pesticides dans les aliments et que la majorité des aliments s'y conforment, certaines denrées retrouvées sur le marché ne les respectent pas, l'ingestion inclue aussi l'ingestion de sol ou de poussière, notamment chez l'enfant (Hénault-Ethier et al., 2016). Les PYRs sont présents aussi à des concentrations comprises entre moins de 0,01 et 2,5 % dans l'environnement domestique sous forme d'insecticides ménagers en aérosols, plaquettes pour diffuseurs électriques ou spirales à combustion lente. La plupart des formulations incluent du pipéronyl-butoxyde, un synergisant qui augmente l'efficacité et la durée d'action de l'insecticide (Testud et Grillet, 2007).

Bien que plus lente, l'absorption cutanée pendant les travaux d'application ou au contact de surfaces traitées reste également possible (Hénault-Ethier et al., 2016), l'utilisation des moustiquaires imprégnées par les PYRs constitue une partie importante de la stratégie de lutte contre le malaria dans les régions affectées, mais représente également une autre forme d'exposition différente de celle des agriculteurs, soit l'exposition dermique et respiratoire (Barlow et al., 2001), car les PYRs sont liposolubles or, la membrane des cellules, comme celles de la peau, est constituée d'une bicouche lipidique, ainsi, l'emploi d'un shampoing contre les puces engendre une absorption limitée par la peau.

Du reste, l'inhalation de fines gouttelettes ou de particules de poussière en suspension dans l'air peut également survenir, particulièrement lorsque les PYRs sont employés dans des espaces clos. Une fois entrés dans l'organisme, les PYRs sont convertis en produits de dégradation (métabolites) puis excrétés dans l'urine (Hénault-Ethier et al., 2016). Le logement reste à ce jour le lieu privilégié de l'utilisation de ces insecticides, à la hauteur de 89 % (Bouvier et al., 2005).

L'exposition aux PYRs peut être liée à plusieurs sources et par des multiples voies. La quantification de l'exposition n'est pas un processus trivial. Comme les métabolites des PYRs actuellement utilisés sont généralement excrétés dans l'urine, la surveillance biologique de l'exposition aux pesticides a impliqué généralement la quantification des métabolites urinaires du pesticide dans de nombreuses études épidémiologiques. Les études d'excrétion chez l'Homme et les études d'exposition professionnelle ont confirmé que les cinq métabolites non spécifiques, notamment l'acide *cis*-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-diméthylcyclopropane carboxylique (*cis*-DCCA), le *trans*-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-diméthylcyclopropanecarboxylique (*trans*-DCCA), l'acide 3-phénoxybenzoïque (3-PBA), l'acide 4-fluoro-3-phénoxybenzoïque (4F3PBA) et le *cis*-(2,2-dibromovinyl)-2,2-diméthylcyclopropane-1-carboxylique (*cis*-DBCA), sont des indicateurs importants de l'exposition aux PYRs chez l'Homme.

Le métabolite pyréthroïde le plus fréquemment détecté est la 3-PBA, métabolite courant de nombreux pyréthroïdes, tels que la perméthrine, la cyperméthrine et la deltaméthrine, suivis des *trans*- et *cis*-DCCA, deux métabolites isomères géométriques de la perméthrine, de la cyperméthrine et de la cyfluthrine. La 4F3PBA et la *cis*-DBCA sont des métabolites spécifiques de la cyfluthrine et de la deltaméthrine, respectivement (Ding et al., 2012).

2. Pyréthrinoïdes étudiés : bifenthrine et deltaméthrine

2.1. Propriétés générales de la bifenthrine et de la deltaméthrine

La bifenthrine (BF) est un PYR de type I insecticide acaricide, nouvellement introduit, avec huit stéréo-isomères dont l'isomère *cis*- est l'isomère actif (Khan et al., 2013), à l'exception de la deltaméthrine, la BF et les autres PYRs sont des mélanges d'isomères, il a été démontré que les différents isomères d'un même PYR (présence d'un centre chiral) peuvent avoir des propriétés toxicologiques tout à fait différentes (Aligon et al., 2010).

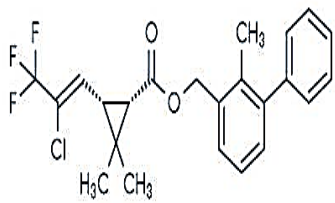
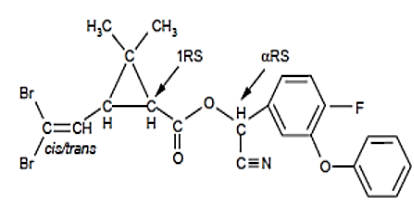
La BF a été développée au milieu des années 1980 et approuvée pour la première fois au Royaume-Uni en 1988 (Dar et al., 2017), elle se présente sous forme d'un solide cireux de couleur gris pâle avec une légère odeur douceuse, le produit à usage professionnel se présentait sous forme de concentré émulsionnable dosé de 20 à 100 g/L, en solution dans des hydrocarbures pétroliers. Il existait aussi des suspensions concentrées en solution aqueuse (Rambourg, 2011). Selon sa structure chimique (tableau 2) et la symptomatologie après intoxication aiguë, la BF ne porte pas le groupement α -cyano, causant le syndrome T qui se caractérise par une hyperexcitation et un combat agressif, une incoordination et des

tremblements du corps entier (Scollon et al., 2011 ; Hossain et al., 2013 ; Nieradko-Iwanicka et al., 2015; Cycoń et al., 2017), chez les mammifères et l'Homme, la toxicité est considérée faible car le clivage facile de la liaison ester central dans le foie, produit des métabolites relativement non toxiques, qui sont éliminés dans l'urine. Par ailleurs, la résistance relative des mammifères vis-à-vis des PYRs est attribuée à leur température corporelle élevée par rapport à celle des insectes, le métabolisme rapide dans le foie et la faible sensibilité des canaux de sodium (Nieradko-Iwanicka et al., 2015).

La deltaméthrine (DLT) représente un PYR de type II photostable, elle représente également le métabolite primaire d'un autre PYR, la tralométhrine (Erstfeld, 1999) ; synthétisée par Elliot et al. en 1974 (Anadon et al., 1996), se présente sous forme de poudre cristalline de couleur blanche à crème (FAO, 2004). Comme elle est considérée le PYR insecticide le plus actif (Davies et al., 2007), son utilisation est large dans les zones urbaines pour lutter contre les moustiques et les infestations de punaises de lit ; en raison de sa faible persistance dans l'environnement, de la faible fréquence de développement d'une résistance chez les insectes et d'une toxicité comparativement moins élevée pour l'Homme, elle est devenue l'insecticide de choix dans la plupart des pays (Tewari et al., 2018). C'est l'un des insecticides les plus puissants parmi les PYRs avec un groupe α -cyano, qui produit le type II de syndrome neurologique « choréoathétose avec salivation » ou syndrome «CS », caractérisé par une salivation et des convulsions (Mani et al., 2013).

Au niveau structural, la DLT présente l'avantage de ne posséder qu'une seule configuration chimique (Bradberry et al., 2005 ; Davies et al., 2007), rendant la caractérisation de sa cinétique plus aisée. C'est la raison pour laquelle le nombre et le contenu des études sur la DLT sont plus importants et plus poussés que pour les autres PYRs (Willemin, 2014). L'absorption volontaire d'une forte dose d'une spécialité vétérinaire ou phytosanitaire liquide à base de PYR provoque des signes digestifs (douleurs épigastriques, vomissements, diarrhée) et des troubles neuromusculaires (tremblements, fasciculations, myoclonies), surtout marqués avec les dérivés de type II. Un homme de 53 ans par exemple ayant ingéré 200 ml d'une spécialité contenant 25 g/l de DLT a rapidement présenté des vertiges et des myoclonies, accompagnés de vomissements et d'une diarrhée aiguë, la situation s'est compliquée d'un coma en myosis, émaillé de convulsions, ainsi que d'une pneumopathie d'inhalation, l'évolution s'est faite vers la guérison sans séquelle (Testud et Grillet, 2007). Le tableau 2 résume quelque propriétés chimiques et toxicologiques de la BF et de la DLT.

Tableau 2. Principales propriétés chimiques et toxicologiques de la bifenthrine (Dong, 1996 ; EFSA, 2011 ; Rambourg, 2011 ; Syed et al., 2017) et de la deltaméthrine (Mestres et Mestres, 1992 ; EC, 2002 ; Testud et Grillet, 2007 ; EFSA, 2010 ; Dubey et al., 2012).

Nom		Bifenthrine	Deltaméthrine
Masse molaire		422,9 g/mol	505,2 g/mol
Formule chimique		C ₂₃ H ₂₂ ClF ₃ O ₂	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃
Nomenclature		1S,3S)-3-(Z)-2-chloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enyl 2,2-diméthylcyclopropane-1-carboxylate	(1R,3R)-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-diméthyl-cyclopropane carboxylate de(S)-α-cyano-3-phénoxybenzyle
Structure chimique			
Solubilité	Eau	<0,001mg/l à 20 °C pH 5-7	0,0002mg/l à 25°C
	Méthanol	48.0 g/l at 20°C	8 g/l at 22°C
	Xylène	556.3 g/l at 20°C	175 g/l at 22°C
	Acétone	735.7 g/l at 20°C	675 g/l at 22°C
	1,2-dichloroethane	743.2 g/l at 20°C	725 g/l at 22°C
Toxicologie	DL50	186 mg/kg	186 mg/kg
	NOAEL (voie orale)	3 mg/kg /j chez le rat femelle pendant 2 ans	1 mg/kg /j chez le rat pendant 90 jours
	DJA	0,015mg/kg	0,01mg/kg

2.2. Toxicocinétique de la bifenthrine et de la deltaméthrine

2.2.1. Absorption et distribution

Dans les premières heures après une exposition orale à un produit chimique, sa concentration dans le sang peut changer en raison de la dynamique de ce compartiment. Les concentrations de produits chimiques dans le sang sont sensibles à l'absorption, la distribution et à la clairance métabolique et rénale. Selon la volatilité du produit chimique, le dégagement pulmonaire peut aussi être un facteur important. Après les phases d'absorption et de distribution,

les concentrations des produits chimiques dans le sang sont moins dynamiques (Testud et Grillet, 2007 ; Scollon et al., 2011).

Généralement, les PYRs sont lipophiles et semblent être facilement absorbés, soit par voie orale ou par voie cutanée (Barlow et al., 2001 ; Rehman et al., 2014). Par voie orale, 50 % de la BF est absorbée par le tractus gastro-intestinal dans 4 à 6 h environ, alors le reste est excrété dans les fèces (EFSA, 2011). L'absorption cutanée a été estimée à 12 % sur la base de données *in vivo* chez le rat et *in vitro*, sur la peau des rongeurs (rat) et sur la peau humaine (Dong, 1996). Les études les plus récentes sur l'exposition des travailleurs et des personnes exposées à des dérivés des applications agricoles ont évalué les niveaux urinaires des métabolites des pyréthrinoïdes plutôt que de mesurer les concentrations atmosphériques pour évaluer les expositions par inhalation, l'inhalation d'air contribue généralement à <10% de la dose totale reçue par la population générale (Weisel, 2020).

La BF est distribuée majoritairement dans le tissu adipeux, la peau, le foie et le poumon, mais aussi dans le pancréas, les ovaires et le système nerveux (Scollon et al., 2011). La demi-vie d'élimination après arrêt d'administration dans la circulation générale est de 48h, alors que dans le foie elle est d'environ 19 jours, pour le tissu adipeux est 51 jours, une accumulation potentielle est estimée dans le tissu adipeux (EFSA, 2011).

La DLT est facilement absorbée par le tractus gastro-intestinal après administration orale chez le rat et la souris (Barlow et al., 2001 ; Rehman et al., 2014), leur biodisponibilité est faible quelle que soit la voie d'exposition (Testud et Grillet, 2007). En premier temps, la fixation sur les protéines plasmatiques atteint 50 à 60%, bien qu'une proportion substantielle (de 30 à 35 %) s'associe avec les lipoprotéines (figure 4), d'après les travaux de Sethi et al., (2019), la fraction libre des PYRs est approximativement deux fois plus élevée chez le rat que chez l'Homme (Sethi et al., 2019). Chez l'Homme, l'absorption, la distribution et l'excrétion ont été étudiées chez trois volontaires humains mâles ayant reçu de la DLT marquée au C¹⁴ radioactif en une seule dose de 3 mg par voie orale. Les concentrations plasmatiques étaient maximales 1 à 2 heures après l'administration, les niveaux de cellules sanguines et de salive étaient très faibles.

D'après les travaux d'Anadon et al. (1996) chez le rat, la DLT est rapidement mais incomplètement absorbée après une administration orale de 26 mg/kg, la demi-vie d'absorption est calculée pour être 0,61 h, la biodisponibilité après cette administration a été 14,13% (Anadon et al., 1996).

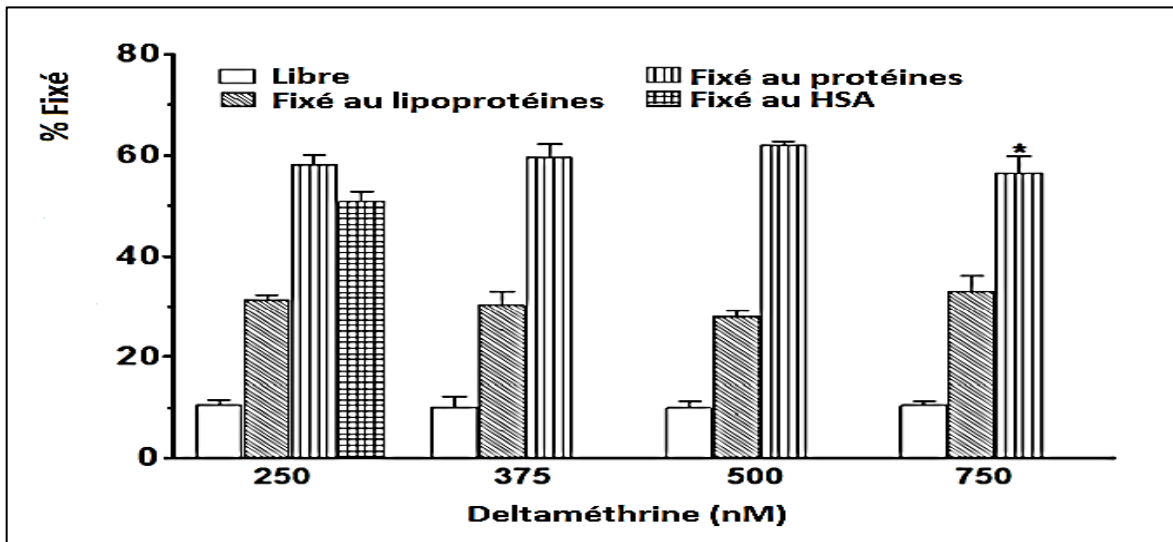


Figure 4. Liaison de la DLT plasmatique totale à l'albumine humaine sérique (HSA), aux protéines plasmatiques et aux lipoprotéines (Sethi et al., 2019).

D'après la même étude, des concentrations élevées de la DLT sont trouvées par ordre décroissant dans l'hypothalamus, l'hippocampe, muscle anococcygien, le cervelet, le cortex frontal, les putamens caudés, le médulla et les bulbes rachidiens, les concentrations de 4'-OH-deltaméthrine dans la plupart de ces tissus est généralement similaire ou plus faible dans la plupart de ces tissus. Ces résultats indiquent que la DLT s'accumule dans le tissu nerveux. Cette étude s'intéresse au métabolite majeur 4'-OH-deltaméthrine, les autres métabolites produits par le clivage, au niveau de la liaison ester et par conjugaison des acides carboxylique et des phénols résultants, ne sont pas étudiés car pratiquement, sont inactifs et probablement sont rapidement excrétés de l'organisme, vu leur polarité (Anadon et al., 1996). Après l'exposition de 3 hommes volontaires à une dose de la DLT de 3 mg par voie orale, la concentration plasmatique était maximale à 1 à 2 h après l'administration, avec un temps de demi-vie d'élimination apparente du plasma de 10 à 11,5 h. Le taux dans les cellules sanguines et la salive était très faible (Barlow et al., 2001).

2.2.2. Métabolisme et élimination

Les voies métaboliques des PYRs chez l'Homme n'ont pas été bien étudiées, mais les preuves limitées disponibles suggèrent qu'elles sont probablement similaires à celles des rongeurs (Barlow et al., 2001). Après une exposition de 7 jours chez le rat, la plupart de la BF radioactive a été éliminée dans les urines ou les excréments, une partie importante étant convertie en divers métabolites. Certains principaux métabolites dans les selles et l'urine comprennent le 3-OH hydroxy méthyl bifenthrine, le 4-OH-hydroxy méthyl bifenthrine, la 4'-monométhyl catechol bifenthrin (figure 5). Les principales voies de la biotransformation de la

BF ont été étudiées chez des rats, comprenant l'oxydation par une hydrolyse du composé, via des enzymes de cytochrome P-450 dépendant de NADPH ou par un clivage, par des estérases ou par hydrolyse. Les réactions de phase I peuvent également être suivies par des réactions de conjugaison entraînant l'élimination du composé par les urines (Testud et Grillet, 2007 ; Scollon et al. 2011).

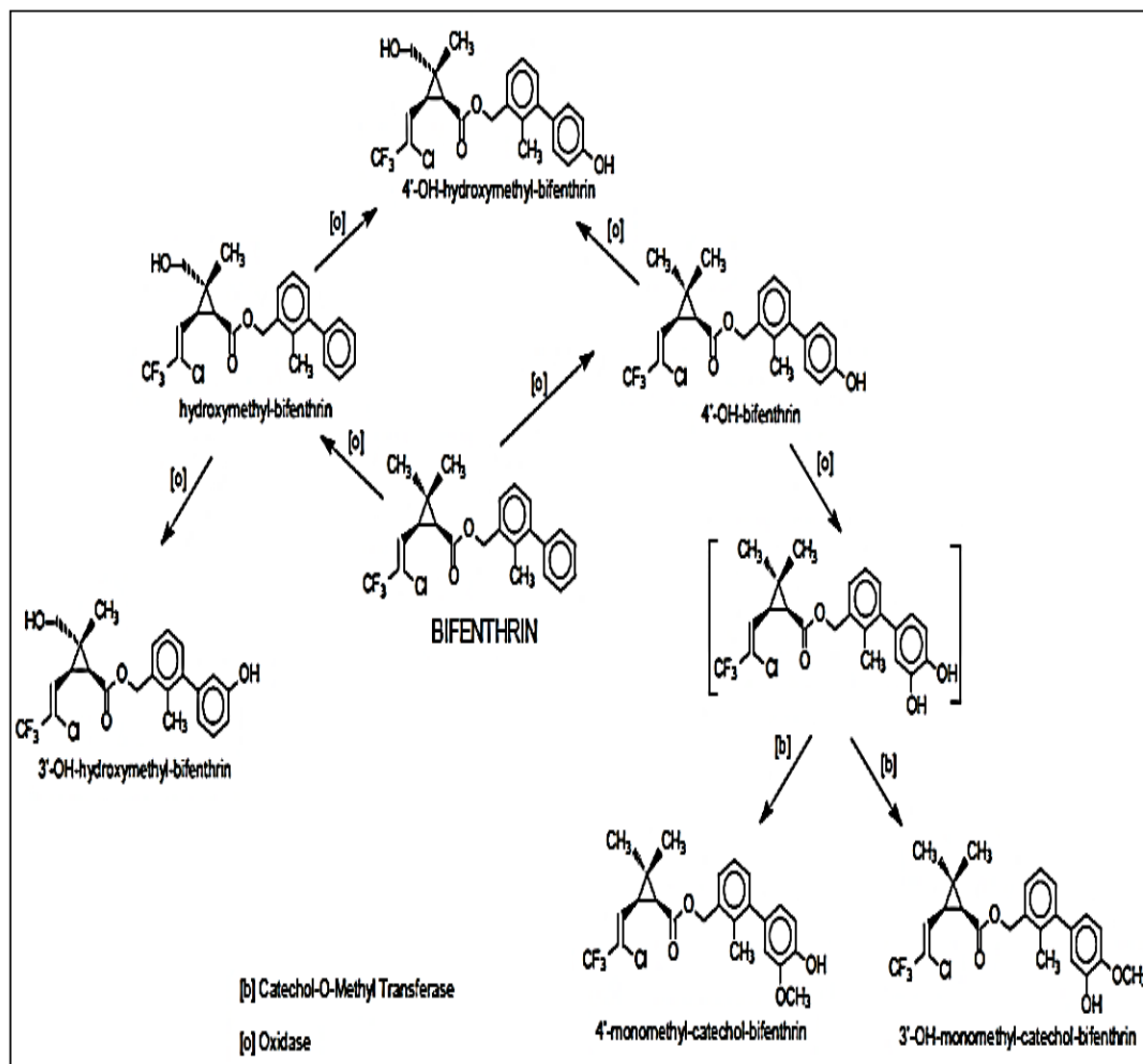


Figure 5. Les principales voies métaboliques de la BF chez le rat (Dong, 1996).

Chez l'Homme, la figure 6 indique que les PYRs (DLT ou perméthrine ou cyperméthrine) ingérés accidentellement, s'éliminent dans l'urine en donnant, d'une part l'acide 3-phénoxybenzoïque (3-PBA) ou l'acide fluoro-3-phénoxybenzoïque (F-PBA), d'autre part l'acide *trans*-3-(2, 2-dichlorovinyl) -2,2-diméthylcyclopropane carboxylique (*trans*-Cl₂CA) ou l'acide *cis*-3-(2,2-dibromovinyl) -2,2-diméthylcyclopropane-1-carboxylique (Kanza et al., 2019).

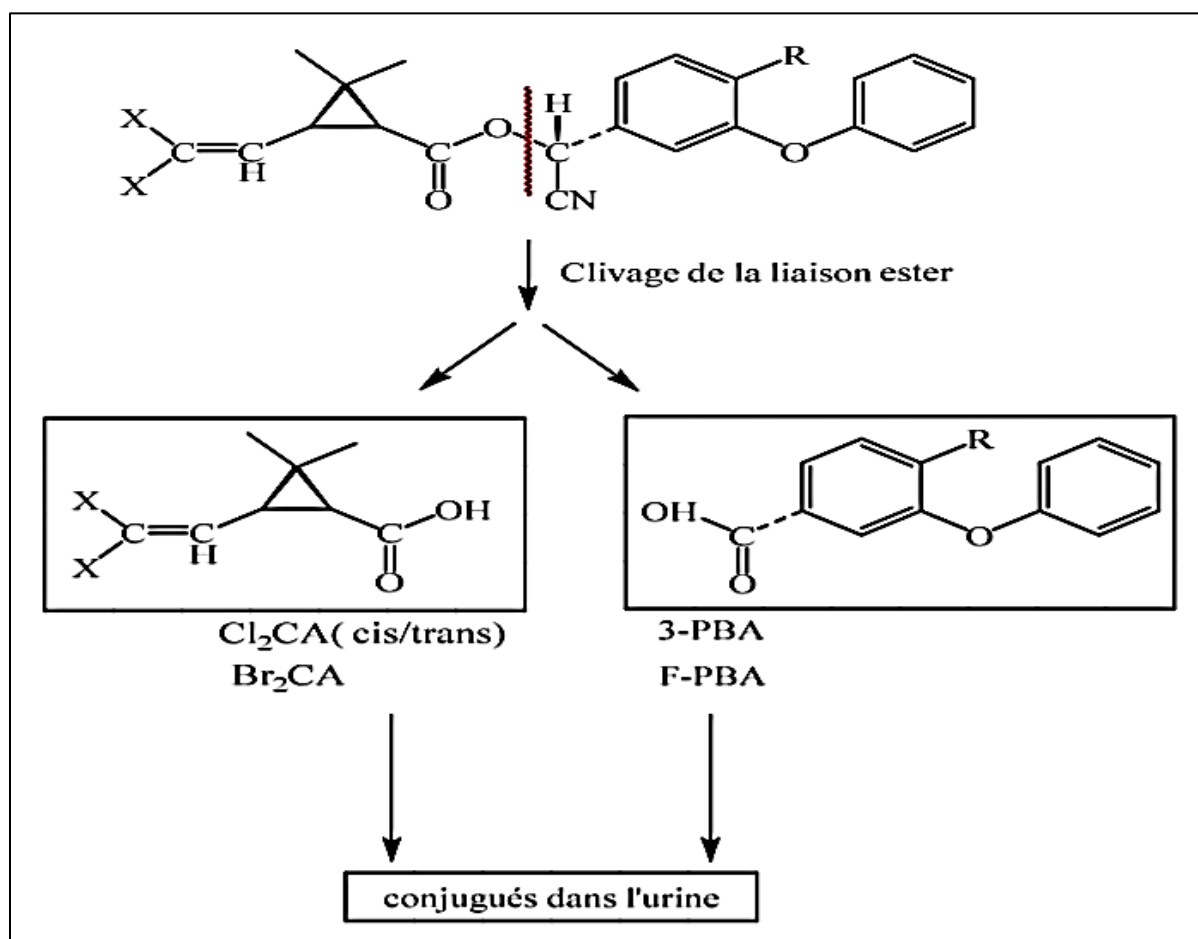


Figure 6. Dégradation des pyréthrinoïdes et élimination de ces métabolites dans l'urine (Kanza et al., 2019).

Après 5 jours de l'administration orale de 3 mg de la DLT aux 3 hommes volontaires, 10 à 26% de la dose ont été éliminés par les fèces et 51 à 59% par l'urine, dont 90% ont été excrétés dans les premières 24 heures. Une demi-vie urinaire de 10 à 13,5 heures correspondait à la demi-vie plasmatique (Barlow et al., 2001 ; Rehman et al., 2014).

Chez les mammifères, la DLT est métabolisée aux niveaux des microsomes hépatiques par deux voies, la voie d'hydrolyse et la voie oxydative (Ding et al., 2012 ; Nieradko-Iwanicka et Borzecki, 2015). La voie d'hydrolyse est la voie prédominante du métabolisme hépatique *in vitro* de la DLT chez l'Homme, tandis que le métabolisme oxydatif hépatique (figure 7) est la voie prédominante chez les animaux (McGregor, 2000).

Des études chez le rat ont montré que la DLT qui est un ester, est rapidement métabolisée par les estérases tissulaires, qui sont largement répandues, notamment dans la paroi intestinale et le foie, et par les oxydases microsomiales hépatiques avec une demi-vie d'élimination plasmatique apparente de 10 à 11,5 heures (Rehman et al., 2014).

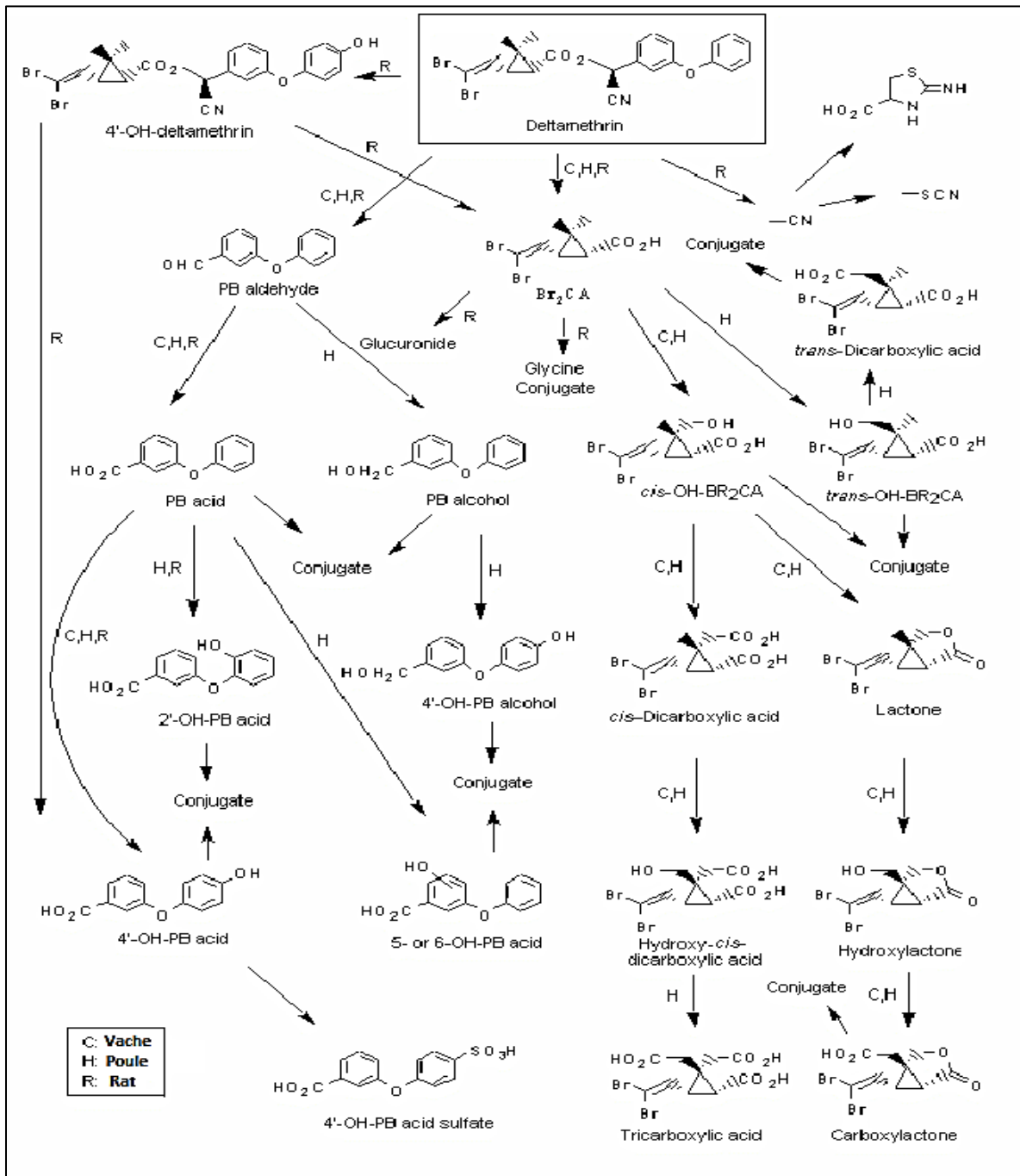


Figure 7. Les voies métaboliques de la deltaméthrine chez les mammifères (McGregor, 2000).

3. Toxicité de la bifenthrine et de la deltaméthrine

Les effets toxiques de la BF par rapport à d'autres pyréthrinoïdes, sont plus nombreux comme l'endommagement du foie et l'altération de la morphologie du sang (Ikram et al., 2016). Les études décrivant l'altération de la biochimie, de l'hématologie et de l'histopathologie en raison de sa toxicité se limitent aux insectes ; peu d'études sont disponibles rapportant le potentiel de stress oxydatif de cet insecticide en particulier et des pyréthrinoïdes en général chez les animaux adultes (Dar et al., 2015 ; Dar et al., 2016).

La concentration sanguine de la BF dans le sang n'est pas un bon indicateur pour l'étude des changements neurocomportementales, l'étude de Scollon et al. (2011) démontre que la concentration du BF dans le cerveau est un bon indicateur ; d'après son étude, une concentration cervicale de 289 ng/g peut diminuer l'activité motrice à 50%. Aucun effet sur la reproduction n'est trouvé dans une étude de 2 générations chez le rat y compris le niveau de dose plus élevé ; le NOAEL maternel pertinent est de 60 ppm (3 mg/kg/j) et le NOAEL pour la reproduction est de 5 mg/ kg/j, en fonction de l'apparition de tremblements et d'un poids corporel légèrement inférieur chez les femelles des générations P et F1 pendant la gestation et la lactation. La BF n'est pas génotoxique ni *in vivo* ni *in vitro* selon des tests sur des souris (EFSA, 2011).

La DLT est répertoriée dans la liste noire par la Convention de Stockholm (Green Peace). Elle est très toxique pour les poissons et les abeilles (Euro Com, 2002). En solution, dans un solvant non aqueux, la DLT présente sa plus faible DL50 de 19 mg/kg par voie orale chez la souris et d'environ 130 mg/kg/j chez le rat (Mestres et Mestres, 1992). La toxicité de la DLT par voie cutanée est faible ; la DL50 correspondante est supérieure à 800 mg/kg chez le rat et supérieure à 2000 mg/kg chez le lapin (INRS, 2007). L'intoxication aiguë se manifeste chez le rat et la souris par les signes suivants : hypersalivation, diarrhée, dyspnée, faiblesse, défaut de coordination motrice, hypotonie, tremblements, mouvements cholériformes, tachycardie, difficultés respiratoires et convulsions cloniques. Les paralysies des muscles respiratoires sont susceptibles de conduire à la mort. La sévérité des symptômes est corrélée à la concentration de la DLT dans le cerveau (Dubey et al., 2012 ; INRS, 2007).

Chapitre 2 : La neurotoxicité des pyréthrinoïdes

1. Le système nerveux

1.1. Organisation et composition du système nerveux

1.1.1. Organisation du système nerveux

Le système nerveux (SN) est le centre de régulation et de communication de l'organisme ; nos pensées, nos actions, nos émotions attestent son activité. Ses cellules communiquent au moyen de signaux électriques rapides et spécifiques qui entraînent des réponses presque immédiates. La classification structurale qui englobe tous les organes du système nerveux, comprend deux subdivisions :

- Le système nerveux central (SNC) ou cérébro-spinal est formé de la moelle épinière et de l'encéphale qui se compose du tronc cérébral ; du cervelet et du cerveau, l'ensemble constitue le névraxe, il constitue le centre de régulation et d'intégration du système nerveux, il

interprète l'information sensorielle qui lui parvient et produit au besoin des réponses motrices fondées sur l'expérience et les conditions ambiantes (Zayed et al., 2003).

- Le système nerveux périphérique (SNP) est la partie du système nerveux située à l'extérieur du SNC ; il est principalement formé des nerfs issus de l'encéphale (nerfs crâniens) et de la moelle épinière (nerfs rachidiens) (figure 8). Les nerfs spinaux transmettent les influx entre certaines autres parties du corps et l'encéphale, et inversement. Les nerfs du SNP sont donc de véritables lignes de communication qui relient toutes les parties du corps en transmettant les influx des récepteurs sensoriels au SNC, et du SNC aux glandes et aux muscles appropriés (Purves et al., 2018).

Les nerfs du SN constituent les voies afférentes aussi appelées voies sensibles qui transforment les informations des récepteurs vers le système nerveux central et les voies efférentes aussi appelées voies motrices qui transforment les réponses du système nerveux central vers les effecteurs. Les voies efférentes se divisent en deux parties :

- Les efférences somatiques qui amènent les réponses vers les muscles squelettiques.
- Les efférences autonomes qui amènent les réponses vers les muscles lisses, le muscle cardiaque et les glandes et qui se divisent elles-mêmes en efférences sympathiques et en efférences parasympathiques (Zayed et al., 2003).

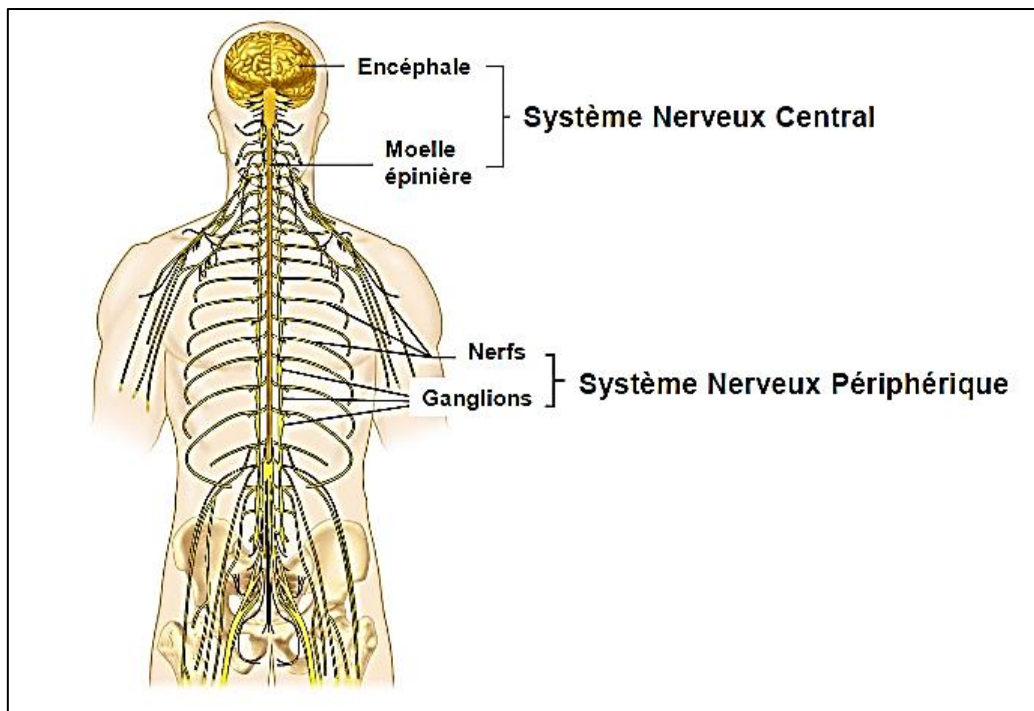


Figure 8. Les principaux composants anatomiques du système nerveux (Purves et al., 2018).

1.1.2. Les neurones

La découverte que le système nerveux est constitué de cellules qui lui sont propres résulte de l'expansion notable de la microscopie et des techniques histologiques sur coupes fines à la fin du XIX siècle, mais aussi de la découverte de deux colorations extraordinaires pour visualiser les cellules nerveuses qui ont été nommées à cette occasion « neurones ». La première est due à l'allemand Franz Nissl (1860, 1919), qui montra que le crésyl violet était susceptible de se fixer sur des corpuscules (nommés depuis « corps de Nissl ») présents dans le cytoplasme des neurones autour du noyau. Les corps des cellules nerveuses et eux seuls sont donc colorés (Hammond, 2015). Vers la même époque, l'italien Camillo Golgi (1843, 1926) découvre que lorsqu'on plonge un tissu nerveux dans une solution de chrome argentique, un nombre très limité de neurones se colorent dans leur totalité en noir. Cette technique sera mise à profit par son contemporain l'espagnol Santiago Ramon y Cajal (1852, 1934) pour décrire les neurones de tout le système nerveux, leur développement et leur régénération (Vibert et al., 2011).

Les neurones ou cellules nerveuses, sont des individualités morphologiques (Cajal & Ramón, 2002), spécialisés dans la transmission des messages (influx nerveux) entre les diverses parties du corps. Ils peuvent présenter des variations structurelles, mais ont de nombreux points communs (figure 9). Ils possèdent tous un corps cellulaire, qui contient le noyau et constitue le centre métabolique de la cellule, et un ou plusieurs prolongements issus de ce corps cellulaire, il constitue un centre métabolique du neurone, il contient les organites habituels, sauf les centrioles (ce qui confirme la nature amitotique de la plupart de ces cellules). Le réticulum endoplasmique rugueux appelé substance chromatophile ou corps de Nissel, et les neurofibrilles ou neurofilament (des filaments intermédiaires jouant un rôle important dans le maintien de la forme de la cellule), y sont particulièrement abondants. La longueur des prolongements, ou neurofibres, varie de quelques micromètres à plus d'un mètre. Chez l'être humain, les plus longs prolongements s'étendent de la région lombaire de la moelle épinière jusqu'au gros orteil. Les prolongements neuronaux qui transmettent les messages reçus par la cellule (signaux électriques) vers le corps cellulaire portent le nom d'axones. Certains neurones sont dotés de centaines de dendrites ramifiées, mais tous ne possèdent qu'un seul axone, qui prend naissance dans une région du corps cellulaire appelée cône d'implantation de l'axone (Marieb, 2008).

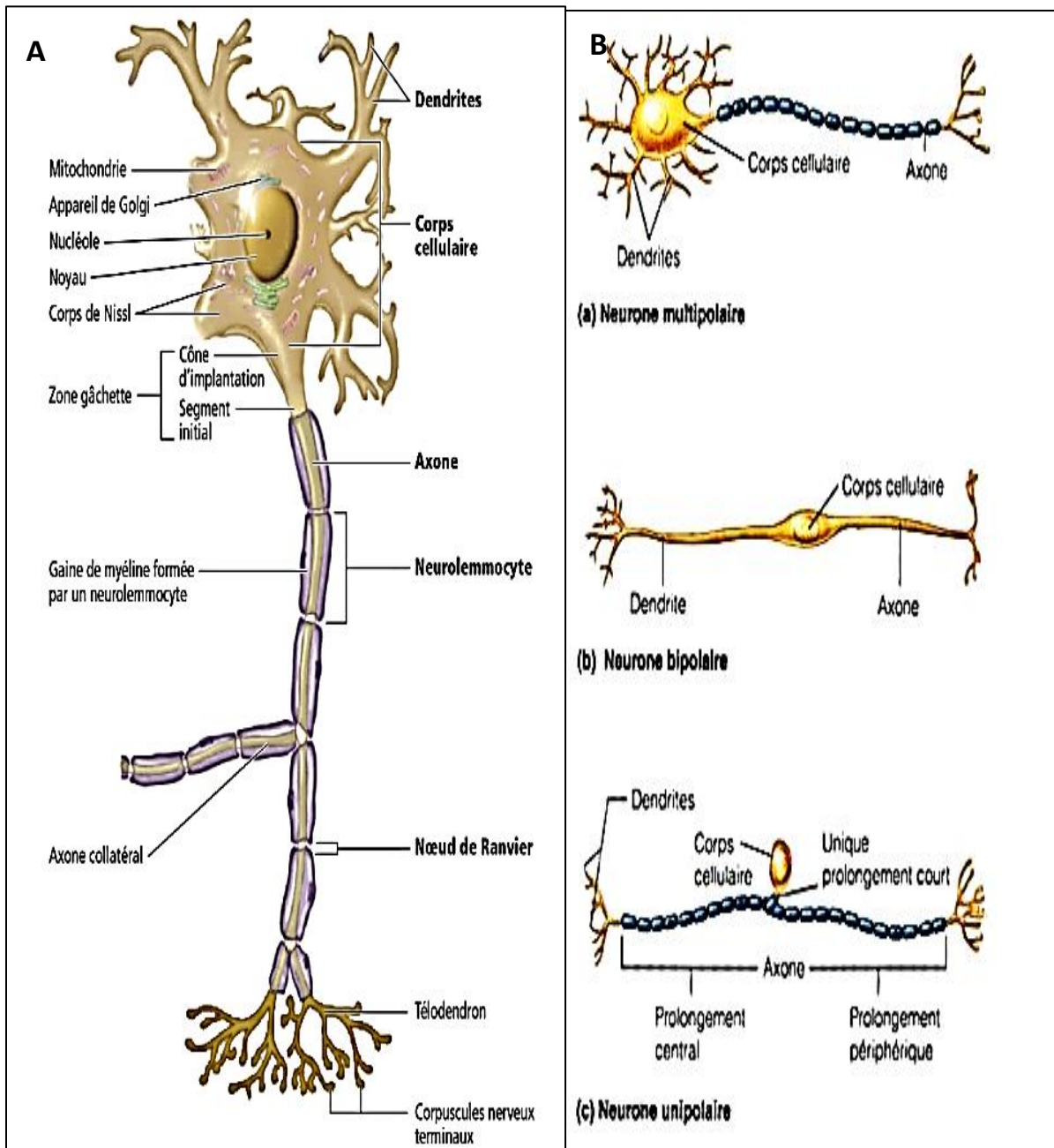


Figure 9. Neurone (Mader et Windelspecht, 2009).

A : structure d'un neurone moteur typique. B : classification structurale des neurones

Selon la structure, la classification repose sur le nombre de prolongement qui émergent du corps cellulaire, on trouve :

- **Les neurones multipolaires**, qui sont le type le plus courant, comme tous les neurones moteurs et les neurones d'association.
- **Les neurones bipolaires**, sont pourvus de deux prolongements.
- **Les neurones unipolaires** : comprend un prolongement unique qui émerge du corps cellulaire, ce prolongement est court et se divise en forme de T en une branche proximale (prolongement central) et une branche distale (prolongement périphérique).

1.1.3. Les gliocytes

Neuf fois plus nombreux que les neurones, les gliocytes forment dans le SNC la névroglie. Les différents types de gliocytes soutiennent, isolent et protègent les fragiles neurones, et chacun remplit des fonctions particulières (von Bartheld et al., 2016). La névroglie est composée des cellules suivantes :

- **Les astrocytes** : Les astrocytes sont des cellules gliales en forme d'étoile, avec des processus diversifiés qui établissent des contacts étroits avec les neurones et les vaisseaux sanguins (Adamsky et Goshen, 2018). Les astrocytes interviennent dans les échanges entre les capillaires et les neurones, et forment entre ces deux types de structures une barrière vivante. Ils protègent ainsi les neurones contre les substances nocives qui pourraient se trouver dans le sang. Les astrocytes participent aussi à la régulation du milieu chimique cérébral en récupérant les ions en excès et en effectuant le recaptage des neurotransmetteurs libérés. Ils favorisent également le développement des synapses (Pfrieger, 2010)
- **Les microglies** : les microglies, en forme d'araignée, sont des macrophagocytes qui éliminent les débris tels que les cellules mortes de l'encéphale et les bactéries, leur taille et leur nombre sont observés augmenter dans certaines maladies (Streit et al., 1988).
- **Les épendymocytes** : les épendymocytes sont des cellules de type épithélial tapissant les cavités de l'encéphale et de la moelle épinière. Le battement de leurs cils facilite la circulation du liquide cébrospinal qui remplit ces cavités et forme un coussin protecteur autour du SNC (Bruni, 1998).
- **Les oligodendrocytes** : les oligodendrocytes sont pourvus de prolongements aplatis qui s'enroulent fermement autour des neurofibres du SNC. Ils constituent ainsi des enveloppes lipidiques isolantes appelées gaines de myéline (Stadelmann et al., 2019).

Les gliocytes sont semblables aux neurones sur le plan de la structure (comme eux, ils ont des prolongations cellulaires, mais, contrairement à ces derniers, ils ne transmettent pas d'influx nerveux et ne perdent jamais la capacité de se diviser. Par conséquent, la plupart des tumeurs cérébrales, qu'elles soient bénignes ou malignes, sont des gliomes, c'est-à-dire des masses formées à partir de gliocytes (des astrocytes le plus souvent) (Djellaoui et al., 2019).

1.2. La transmission de l'influx nerveux et synapses

1.2.1. Potentiel et influx nerveux

Toutes les cellules vivantes ont une différence de potentiel entre les deux faces de leur membrane. C'est le potentiel de repos de la membrane. Mais la propriété unique des neurones

et des cellules musculaires est leur capacité à propager des signaux électriques (Vibert et al., 2011). La membrane cellulaire, très peu perméable aux protéines anioniques et aux phosphates du liquide intracellulaire, ne laisse passer que les ions diffusibles (le sodium Na^+ , le potassium K^+ et le chlore Cl^-). En dehors de toute stimulation, la membrane neuronale est chargée négativement sur son versant interne et positivement sur son versant externe en raison d'une répartition inégale des ions de part et d'autre de cette membrane. On mesure donc une différence de potentiel d'environ -60 mV entre les milieux intra- et extracellulaire, appelée « potentiel membranaire de repos ». Cet équilibre dépend, d'une part, d'un transport ionique passif impliquant les gradients électrochimiques liés à la diffusion des ions au travers des canaux ioniques passifs (figure 10) et, d'autre part, d'un transport actif correspondant à l'effet électrogénique de la pompe Na/K-ATPase (Rigoard et al., 2009). Tous les signaux électriques générés dans les cellules nerveuses se superposent au potentiel de repos, certains signaux dépolarisent la membrane cellulaire, rendant l'intérieur moins négatif ; d'autres l'hyperpolarisent, le rendant plus négatif (Nicholls et al., 2012 ; Hammond, 2015).

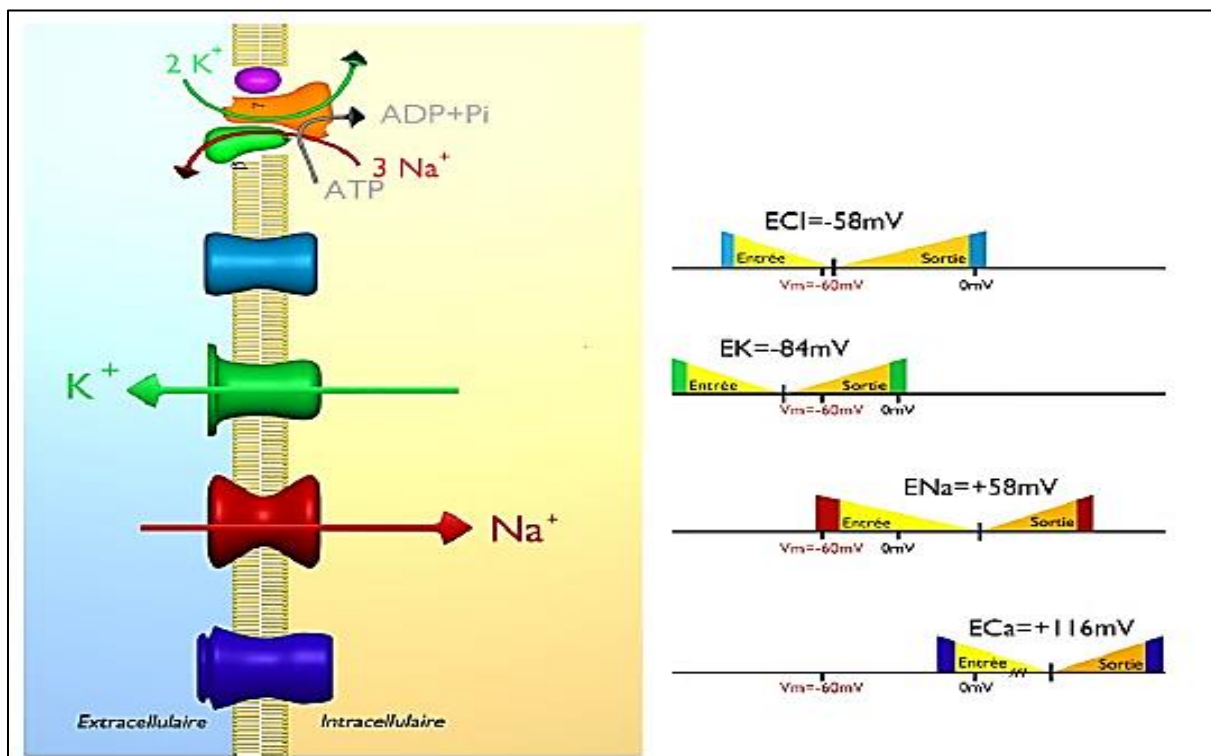


Figure 10. Le potentiel membranaire de repos (Rigoard et al., 2009).

Les mouvements ioniques transmembranaires passifs, lorsque la membrane est au potentiel de repos ($V_m = -60 \text{ mV}$), sont régis par le gradient électrochimique ($V_m - E_{\text{ion}}$) où E_{ion} est le potentiel d'équilibre de l'espèce ionique considérée. Lorsque V_m est supérieur à E_{ion} , (comme pour le K^+), le mouvement ionique pour un potentiel égal à V_m est une sortie hors de la cellule (mouvement inverse pour un ion chargé négativement). Lorsque V_m est inférieur à E_{ion} (comme pour le Na^+), le mouvement ionique pour un potentiel égal à V_m est une entrée dans la cellule (mouvement inverse pour un ion chargé négativement). Lorsque V_m et E_{ion} sont égaux, il n'y a pas de mouvement ionique (c'est le cas de l'ion Cl^-). Pour $V_m = -60 \text{ mV}$, la conductance de l'ion Ca^{2+} est nulle, le canal est fermé.

Au cours d'un potentiel d'action se produisent les événements suivants : sous l'effet du stimulus, le potentiel membranaire de repos (négatif) diminue vers une valeur moins négative (dépolariation) (Figure 11A). Quand il atteint une valeur critique appelée potentiel seuil (-40 mV), le canal sodique dépendant du voltage est activé, ce qui aboutit à une « augmentation en avalanche » de la conductance sodique et à une entrée rapide de sodium dans la cellule (Figure 11B). Durant cette phase de dépolariation, l'état de négativité de l'intérieur de la cellule n'est pas seulement réduit mais le potentiel membranaire peut même atteindre des valeurs positives (phénomène appelé *overshoot*, Figure 11C). Avant que l'*overshoot* ne soit atteint, la conductance sodique diminue (l'inactivation du canal sodium dépendant du voltage commence après une milliseconde) couplée à une augmentation retardée de la conductance du canal potassique, ce qui permet aux ions potassium chargés positivement de diffuser de la cellule vers l'extérieur, concourant ainsi, avec l'aide de la pompe Na/K-ATPase (Figure 11D), au rétablissement d'un potentiel de membrane négatif (phase de repolarisation). Quelques millisecondes avant que la conductance potassique ne retrouve sa valeur de repos, le potentiel de membrane peut même atteindre une valeur plus négative que sa valeur de repos d'origine (hyperpolarisation). Une fois le potentiel seuil atteint, la dépolariation est une « réponse par tout ou rien » (Rigoard et al., 2009).

De nombreux potentiels d'action peuvent être déclenchés successivement du fait que les quantités d'ions diffusant à travers la membrane des cellules sont extrêmement faibles (de l'ordre d'un ion intracellulaire pour 100 000) et que la pompe à sodium se charge de rétablir rapidement les concentrations ioniques d'origine. Peu de temps après la phase de dépolariation du potentiel d'action, il existe une courte période pendant laquelle le nerf ou le muscle n'est pas excitable même pour des intensités extrêmement fortes : c'est la période réfractaire absolue. À cette période succède une période réfractaire relative pendant laquelle on ne peut déclencher qu'un potentiel d'action d'amplitude et de vitesse réduites mais uniquement au moyen d'un stimulus d'intensité supérieure à celle ayant entraîné le potentiel seuil initial. Dès que le potentiel membranaire retrouve à nouveau son niveau d'origine, le potentiel seuil et le potentiel d'action reprennent leurs valeurs initiales (Rigoard et al., 2009). Les signaux nerveux sont composés d'une série d'impulsions discrètes, également appelées potentiels d'action. Dans le cerveau et dans tout le corps, la plupart des impulsions dans la plupart des neurones sont de la même force - environ 100 millivolts (0,1 volt). Ils sont également de même durée (environ une milliseconde (1/1 000 de seconde)), mais se déplacent à des vitesses variables. Les informations qu'ils transmettent dépendent de la fréquence à laquelle ils passent en termes d'impulsions par seconde, d'où ils viennent et où ils se dirigent (Carter, 2019).

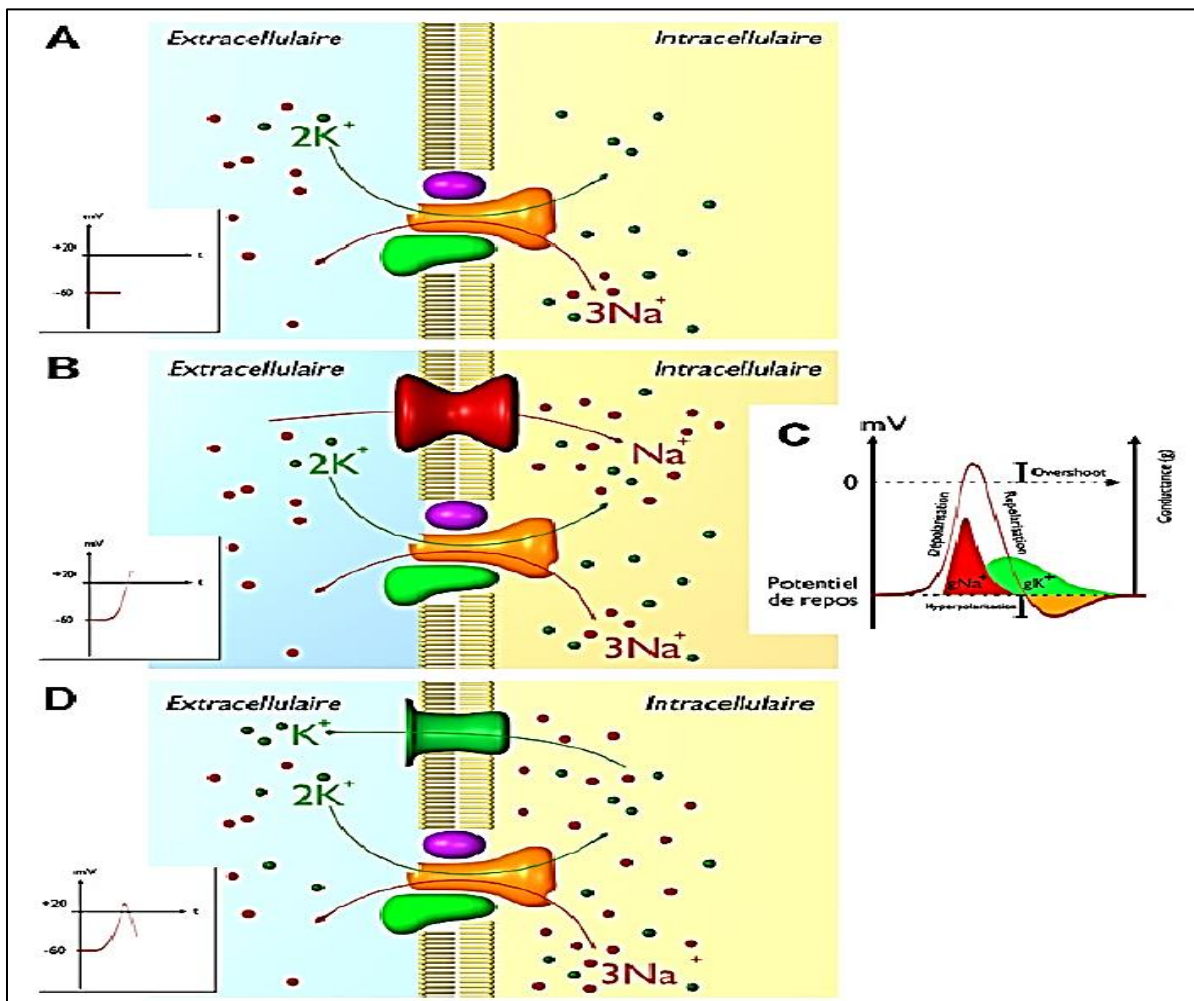


Figure 11. Le potentiel d'action (Rigoard et al., 2009).

A. État de repos. B. Dépolarisation (augmentation brève de Na^+). C. Conductance et potentiel d'action. D. Repolarisation (augmentation retardée de K^+).

1.2.2. Synapses et neurotransmission

Le complexe synaptique est l'unité de base de chaque synapse chimique, car il renferme le minimum nécessaire à la transmission d'informations d'un neurone à l'autre. En effet, chaque élément présente une spécialisation morphologique et fonctionnelle (figure 12) :

- **Élément présynaptique** : est caractérisé par la présence de vésicules incluses dans les terminaisons du cytoplasme axonal. Ces vésicules servent au stockage du neurotransmetteur. Par ailleurs, dans la même région, on note la présence de nombreuses mitochondries qui apporteront l'énergie nécessaire à la libération de ce transmetteur à partir des vésicules.
- **Fente synaptique** : la partie externe de la membrane présynaptique et celle de la membrane post-synaptique sont séparées par une fente synaptique de 20 à 50 μm . C'est dans cette fente que sera libéré le neurotransmetteur vésiculaire qui partira à la recherche d'un site récepteur approprié au niveau de la membrane post-synaptique. En effet, la membrane du neurone post-synaptique est caractérisée par la présence de structures spécialisées capables de se lier de façon

spécifique et transitoire au neurotransmetteur libéré par l'élément présynaptique. Les synapses chimiques se présentent donc comme un système asymétrique, dans lequel l'information ne peut passer que de l'élément présynaptique, qui contient les vésicules du neurotransmetteur, vers l'élément post-synaptique, qui contient les récepteurs compatibles avec ce neurotransmetteur. Le potentiel d'action de l'élément présynaptique modifiera dans certains cas, par l'intermédiaire du neurotransmetteur, le potentiel membranaire post-synaptique localement.

- **Élément post-synaptique :** La sommation temporelle et spatiale de ces variations de potentiel permettra de générer éventuellement un potentiel d'action dans le neurone post-synaptique qui pourra être propagé le long de l'axone de celui-ci pour transmettre à une troisième cellule une nouvelle information. L'enchaînement de tous ces processus nécessaires pour obtenir un transfert d'information d'un neurone à l'autre nécessite un certain temps nommé délai synaptique (Vibert et al., 2011).

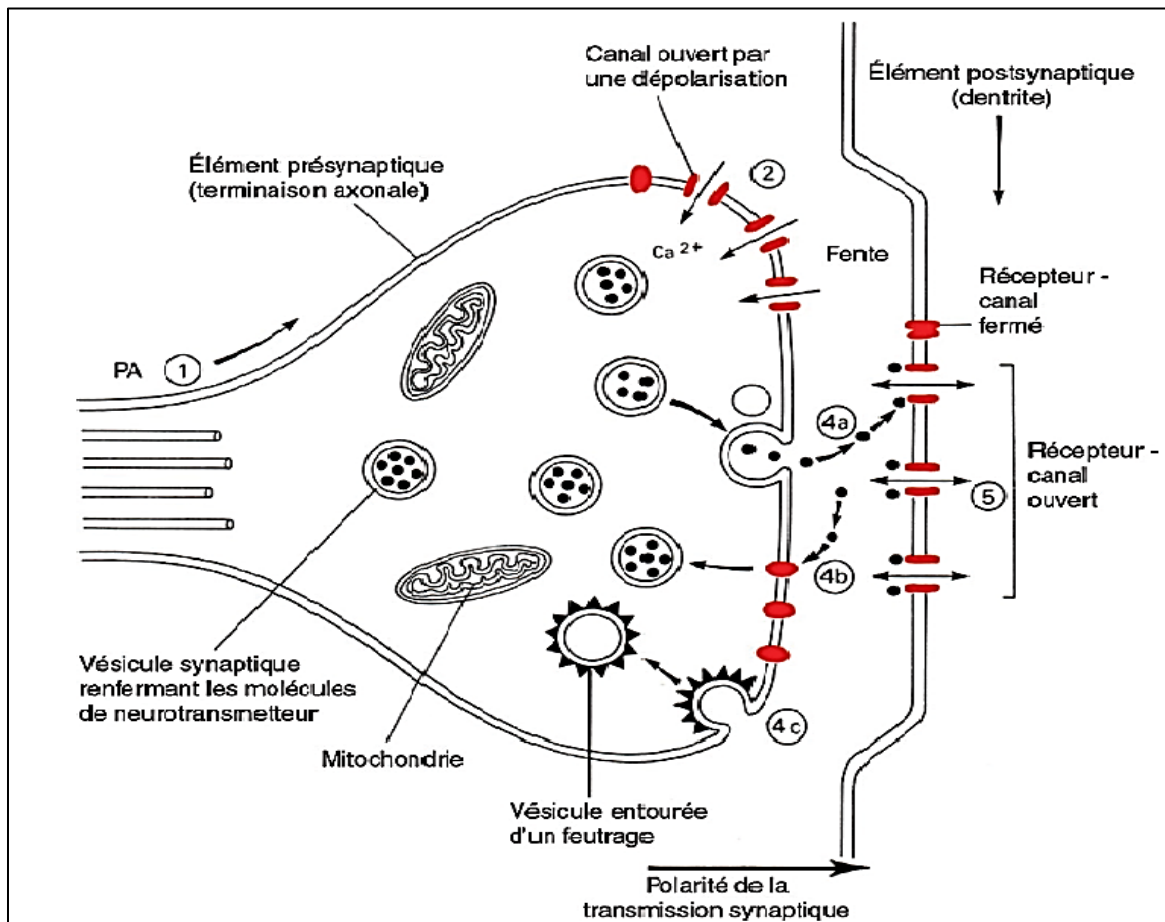


Figure 12. Spécialisation pré- et post-synaptique (Vibert et al., 2011).

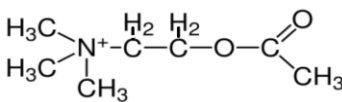
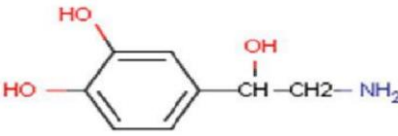
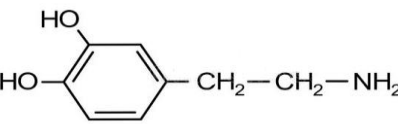
1 : arrivée du potentiel d'action dans le bourgeon axonal. *2* : la dépolarisation entraîne une ouverture de canaux calciques de la terminaison présynaptique. Le calcium entrant favorise la fusion des vésicules à la membrane et l'exocytose du neurotransmetteur. *4a* : fixation au récepteur canaux et flux d'ions entrant ou sortant qui polarise ou dépolarise localement la membrane post-synaptique. *4b* : recapture du neurotransmetteur. *4c* : recyclage des vésicules

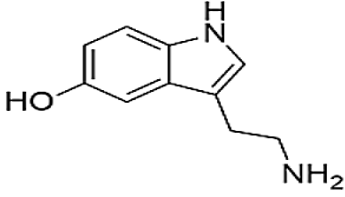
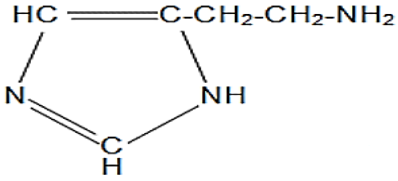
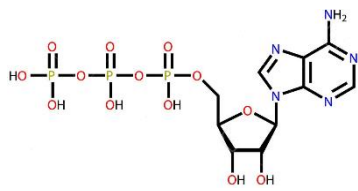
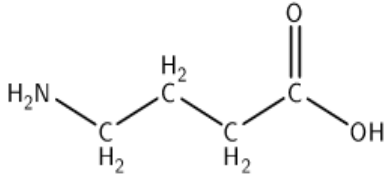
Avec les signaux électriques, les neurotransmetteurs constituent donc le langage du système nerveux, le code qui permet à chaque neurone de communiquer avec les autres afin de traiter et d'envoyer les messages dans le reste de l'organisme. La plupart des facteurs qui influent sur la transmission synaptique agissent en augmentant ou en empêchant la libération ou la dégradation de neurotransmetteurs, ou encore en bloquant leur liaison aux récepteurs.

Plus de 50 substances qui sont ou pourraient être des neurotransmetteurs ont connu ; bien que certains neurones produisent et libèrent un seul neurotransmetteur, la plupart en produisent deux ou plus ils peuvent n'en libérer qu'un ou les libérer tous.

On classe les neurotransmetteurs selon leur structure chimique et selon leur fonction, le tableau 3 présente les principales caractéristiques des neurotransmetteurs.

Tableau 3. Les principales neurotransmetteurs (Marieb, 2008).

Neurotransmetteur	Effet	Site de sécrétion
<p>Acétylcholine</p> 	<p>Excitatrice pour les muscles squelettiques ; excitatrice ou inhibitrice pour les effecteurs viscéraux, selon le récepteur auquel elle se lie.</p>	<p>SNC : noyaux basaux et certains neurones du cortex moteur de l'encéphale, tronc cérébral.</p> <p>SNP : toutes les terminaisons neuromusculaires dans les muscles squelettiques ; certaines terminaisons motrices autonomes.</p>
Amines biogènes		
<p>Noradrénaline</p> 	<p>Excitatrice ou inhibitrice selon le type de récepteur</p>	<p>SNC : tronc cérébral, en particulier le locus cériqueus du mésencéphale ; système limbique ; certaines aires du cortex cérébral.</p> <p>SNP : principal neurotransmetteur des fibres postganglionnaires du système nerveux sympathique.</p>
<p>Dopamine</p> 	<p>Excitatrice ou inhibitrice selon le type de récepteur</p>	<p>SNC : substantia nigra du mésencéphale ; hypothalamus ; principale neurotransmetteur de la voie motrice secondaire.</p> <p>SNP : certains ganglions sympathiques.</p>

Neurotransmetteur	Effet	Site de sécrétion
<p>Sérotonine (5-HT)</p> 	Inhibitrice en général	<p>SNC : tronc cérébral, le mésencéphale en particulier ; hypothalamus ; système limbique ; cervelet ; corps pinéal ; moelle épinière.</p>
<p>Histamine</p> 		<p>SNC : hypothalamus</p>
<p>ATP</p> 	Excitatrice ou inhibitrice selon le type de récepteur	<p>SNC : noyaux basaux, déclenche la propagation d'une onde de calcium dans les astrocytes.</p> <p>SNP : neurones des ganglions de la racine dorsale.</p>
Acides aminés		
<p>Acide gamma aminobutyrique (GABA)</p> 	Inhibiteur en général	<p>SNC : très répandu dans le cortex cérébral ; hypothalamus ; neurones piriformes du cervelet ; moelle épinière ; cellules granuleuses du bulbe olfactif ; rétine.</p>
<p>Glutamate Ç=yri/B</p>	Excitateur en général	<p>SNC : moelle épinière ; abondant dans l'encéphale, ou il constitue le principal neurotransmetteur excitateur.</p>
<p>Glycine</p>	Inhibitrice en général	<p>SNC : moelle épinière et tronc cérébral ; rétine.</p>
Peptides		
<p>Endorphine, dynorphine, enképhalines</p>	Inhibitrice en général	<p>SNC : très abondantes dans l'encéphale ; hypothalamus ; système</p>

		limbique ; hypophyse ; moelle épinière.
Tachykinines : substance P, (exemple représenté), neurokinine A (NKA)	Excitatrices	SNC : noyaux basaux ; mésencéphale ; hypothalamus ; cortex cérébral.
Somatostatine	Inhibitrice en général	SNC : hypothalamus ; rétine et autres parties de l'encéphale
Cholécystokinine (CCK)	Neurotransmetteur possible	Cortex cérébral Intestin grêle)

1.3. Régions du cerveau étudiées

1.3.1. L'hippocampe

1.3.1.1. Anatomie

L'hippocampe est une structure sous-corticale enroulée sur elle-même, ce qui lui vaut son nom. Il appartient au système limbique qui joue un rôle essentiel dans le comportement, en particulier pour les émotions et la mémoire. La structure de l'hippocampe est représentée dans la figure 13. Il est formé de deux structures en forme de U inversés, le gyrus denté et la corne d'Ammon (CA – en référence à la forme des cornes de bélier du dieu Ammon dans la mythologie égyptienne). Les principales connexions internes de l'hippocampe sont organisées en un circuit trisynaptique excitateur. La première connexion synaptique se fait entre la voie perforante qui provient du cortex entorhinal et les neurones granulaires du gyrus denté (Pang et al, 2019). Ces neurones projettent ensuite dans la région CA3 de la corne d'Ammon via des fibres myélinisées (Viard et al., 2017). Ces derniers neurones envoient leurs projections hors de l'hippocampe, vers le subiculum qui contacte en retour le cortex entorhinal, formant ainsi une boucle anatomique, ainsi que certaines régions néocorticales comme le cortex préfrontal. Il existe de nombreuses autres connexions intra-hippocampiques ou afférences et efférences avec d'autres structures cérébrales (Braak et al. 1996).

Différents types de cellules sont présents dans l'hippocampe, les cellules ayant la plus évidente importance physiologique sont les neurones pyramidaux, appelés ainsi à cause de leur forme, ils sont en contact avec diverses cellules de l'hippocampe et du cortex. Ces cellules peuvent avoir un diamètre variable. En effet, les neurones pyramidaux du CA3-CA2 sont nettement plus larges et moins condensés que dans le CA1. Dans le gyrus denté, les neurones principaux sont les cellules granulaires. Plus petites et de forme arrondie, elles ne comportent pas de dendrites basales.

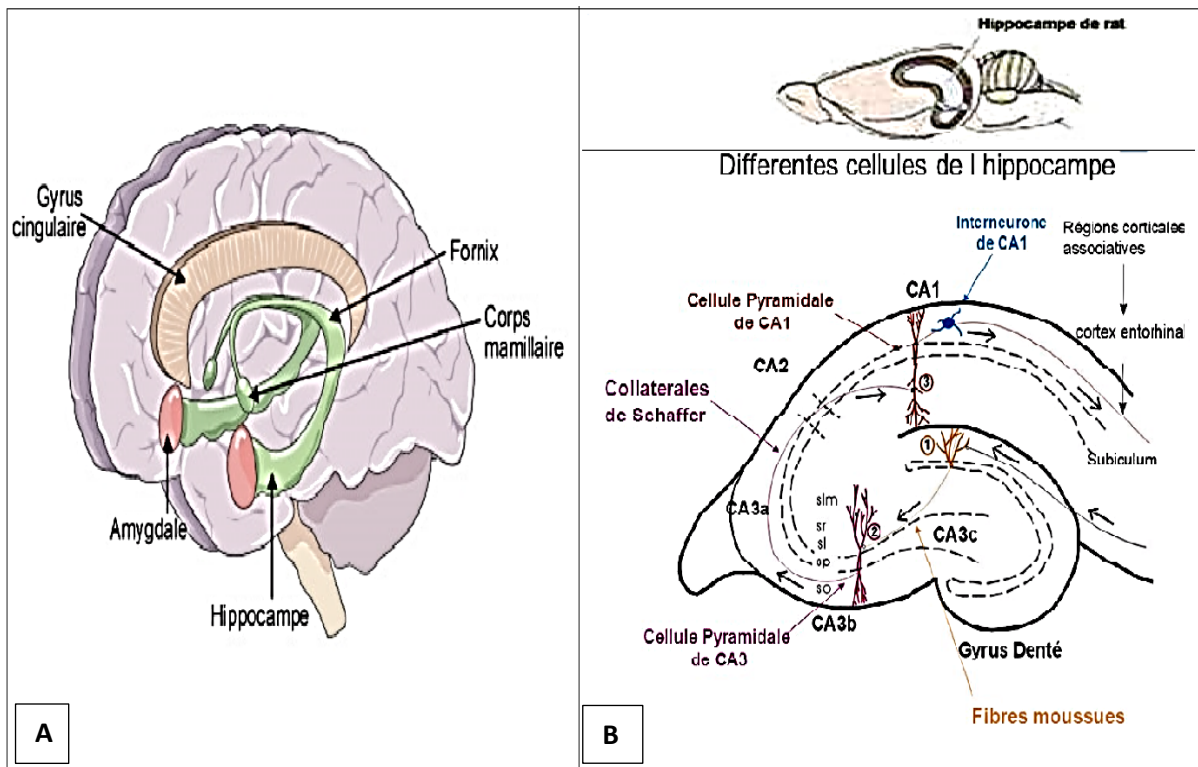


Figure 13. Localisation de l'hippocampe (Marieb, 2008).

A : chez l'homme B : Coupe transversale d'hippocampe chez le rat, représentation de la boucle trisynaptique.

Environ 12% des neurones hippocampaux sont des cellules dites non-pyramidales. La plupart des cellules non-pyramidales ont été décrites comme des interneurons utilisant le GABA comme neurotransmetteur principal et donc exerçant une action inhibitrice sur les réseaux avoisinants. Plusieurs de ces interneurons pourraient également contenir des neuropeptides comme la cholécystokinine, le VIP ou encore la substance P. Signalons également la présence transitoire de neurones non-pyramidaux appelés cellules de Cajal-Retzius. Encore largement méconnues, ces cellules joueraient un rôle dans l'établissement des premières connexions synaptiques de l'hippocampe avec le cortex entorhinal ainsi que dans la migration neuronale.

Quatre types de cellules gliales ont été décrits dans l'hippocampe : les astrocytes, qui représentent environ 75% des cellules non-neuronales, les astrocytes sont en contact avec les vaisseaux sanguins par leurs filopodes et participent ainsi à la constitution de la barrière hémato-encéphalique. On pense qu'ils jouent également un rôle important dans la nutrition des neurones. Les oligodendrocytes sont de larges cellules avec de longues et fines excroissances excessivement ramifiées. Ils sont impliqués dans la myélinisation des plus grosses fibres axonales. La microglie, largement mobile, impliquée dans la phagocytose d'éventuels déchets cellulaires (Caeser et Aertsen, 1991).

1.3.1.2. Physiologie

L'hippocampe un élément essentiel du système limbique, est connu pour jouer un rôle important dans un large éventail de fonctions, y compris la consolidation de la mémoire à court et à long terme, la mémoire spatiale, l'apprentissage et la prise de décision d'évitement d'approche, il a également un rôle important dans la régulation de l'humeur (McEwen et al., 2016 ; Szeszko et al., 2018).

L'induction de la mémoire à long terme n'est pas restreinte aux synapses du gyrus denté de l'hippocampe, elle peut être induite dans les régions CA1 et CA3 mais également dans d'autres régions cérébrales telles que le cortex visuel, le cortex préfrontal, le striatum, le noyau géniculé médian du système auditif, le fimbria-fornix ou plusieurs régions du système limbique (l'amygdale, le cortex entorhinal et le septum). Toutefois, l'hippocampe représente un modèle particulièrement intéressant lorsqu'il s'agit de comprendre les liens entre les mécanismes de plasticité synaptique et ceux de l'apprentissage (Viard et al., 2017).

Le neurotransmetteur caractéristique des synapses excitatrices de l'hippocampe est le glutamate. Dans la fente synaptique, il agit de façon spécifique sur des récepteurs glutamatergiques et le caractère transitoire de l'excitation est contrôlé par sa recapture rapide par les cellules gliales. Il existe deux groupes de récepteurs glutamatergiques, classés en fonction de leur mode d'action : les récepteurs ionotropiques et métabotropiques. Les récepteurs ionotropiques sont des canaux ioniques dont l'ouverture dépend de la liaison du glutamate. Ils comprennent les récepteurs AMPA (activés par le α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate), kaïnate et NMDA (activés par le N-méthyl-D-aspartate). Les récepteurs kaïnate ne sont pas exprimés dans les synapses excitatrices du gyrus denté et de la région CA1 (Jaskolski et al. 2005). En revanche, les récepteurs AMPA et NMDA sont abondamment exprimés dans l'hippocampe et sont impliqués dans la mémorisation. Ces deux types de récepteurs se distinguent par la nature des ions qu'ils laissent entrer dans la cellule. Les récepteurs AMPA permettent une entrée de Na^+ couplée à une sortie de K^+ et ne sont que faiblement perméables au Ca^{2+} , tandis que les récepteurs NMDA sont perméables aux ions Ca^{2+} , ce qui leur confère un rôle prépondérant dans l'induction de la LTP. Les récepteurs métabotropiques sont couplés à des protéines G et à des cascades de messagers secondaires. Ils peuvent être localisés au niveau pré- ou postsynaptique et participent également à l'expression de la mémorisation (Bliss et Collingridge 1993).

L'hippocampe est l'une des régions cérébrales les plus affectées de la maladie d'Alzheimer (MA) qui est un trouble dégénératif progressif et irréversible du cerveau, caractérisé par une perte de mémoire et des troubles cognitifs (Liu et al., 2019).

1.3.2. Le striatum

1.3.2.1. Anatomie

Le striatum est divisé en striatum dorsal et en striatum ventral. Le striatum dorsal est composé du putamen et du noyau caudé (figure 14) (Lago et al., 2017). Chez le rongeur, le putamen et le noyau caudé sont fusionnés. La région dorsolatérale correspond au putamen et la région dorsomédiale correspond au noyau caudé. Le striatum ventral est composé quant à lui essentiellement du noyau accumbens (Joel et Weiner, 2000).

Le striatum reçoit des informations en provenance du cortex de manière topographique. Cette transmission topographique permet d'attribuer aux régions distinctes du striatum des fonctions semblables aux aires corticales qui les innervent. Par conséquent, la région dorsolatérale reçoit des informations des aires prémotrices, du cortex moteur et du cortex somatosensoriel et sera donc impliquée dans des fonctions sensorimotrices telles que l'exécution du mouvement (Parent et Hazrati, 1995). Il est à noter que cette région est organisée de manière somatotopique, c'est-à-dire qu'une cartographie du corps telle qu'elle est représentée au niveau cortical y est retrouvée. La représentation des membres postérieurs, du tronc et des membres antérieurs se situe au niveau dorsal et la représentation de la tête se situe au niveau ventral (Voorn et al., 2004). La région dorsomédiale reçoit des informations des aires corticales associatives (c'est-à-dire cognitives) et sera donc impliquée dans les fonctions cognitives telles que la mémoire ou l'apprentissage. Le striatum ventral reçoit, quant à lui, les informations du cortex limbique et jouera donc un rôle dans les comportements associés aux émotions comme la motivation (Parent et Hazrati, 1995). L'innervation corticale permet donc une organisation fonctionnelle du striatum en différents territoires : le territoire sensorimoteur (région dorsolatérale), le territoire associatif (région dorsomédiale) et le territoire limbique (striatum ventral) (Kim et al., 2009).

1.3.2.2. Physiologie

Au niveau cellulaire, le striatum est composé principalement de neurones épineux GABAergiques de taille moyenne (plus de 90 %) (Maurice et al., 1998). Ces neurones de projection libèrent l'acide γ -aminobutyrique (GABA), le principal neurotransmetteur inhibiteur du cerveau (Parent et Hazrati, 1995). Ils sont séparés en deux populations en fonction de leurs

sites de projection et des molécules qu'ils expriment. D'une part, une population de neurones épineux se projette au niveau du globus pallidus interne et de la substance noire pars reticulata. Cette population de neurones exprime la substance P, la dynorphine et le récepteur dopaminergique D1. Elle constitue la voie directe des ganglions de la base. D'autre part, une population de neurones épineux se projette sur le globus pallidus externe et exprime l'enképhaline et les récepteurs dopaminergiques D2. Elle forme la voie indirecte des ganglions de la base ; il est à mentionner qu'un faible pourcentage de neurones épineux coexprime les récepteurs dopaminergiques D1 et D2 (5 % dans le striatum dorsal) (Matamalas et al., 2009). De plus, le striatum est aussi composé de quatre classes d'interneurones, représentant 5 à 10 % de l'ensemble des neurones : les interneurones cholinergiques, les interneurones GABAergiques exprimant la calrétinine, les interneurones GABAergiques exprimant la parvalbumine et les interneurones GABAergiques exprimant le neuropeptide Y, la somatostatine et l'oxyde nitrique synthase (Parent et Hazrati, 1995).

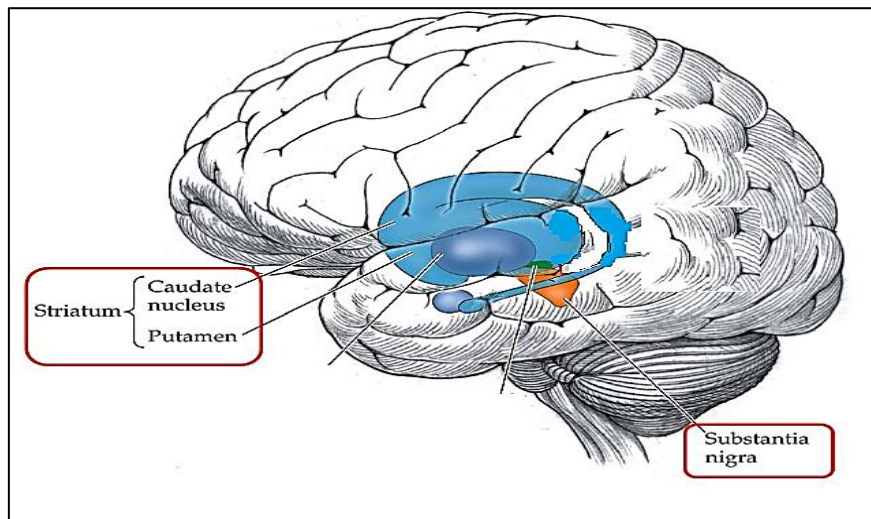


Figure 14. Le striatum (Patel, 2013). La fonction motrice est contrôlée en grande partie par le cerveau. Dans le cerveau, le striatum, représenté en bleu, est le principal relais de la coordination motrice, il est composé du noyau caudé et du putamen. Le striatum est fortement innervé par la Substantia nigra (SN), représentée en orange. Les neurones provenant du SN sont des neurones producteurs de dopamine ou dopaminergiques. Ces neurones forment la voie nigrostriatale.

Le striatum est une structure complexe à plusieurs composants qui contribue à de nombreux processus comportementaux fondamentaux. Plusieurs de ces processus sont impliqués de façon critique dans l'anxiété, notamment : l'attention, l'erreur de conditionnement / prédiction et la motivation (Lago et al., 2017). Le striatum dorsolatéral assure la médiation de l'apprentissage procédural ou stimulus-réponse, tandis que le striatum dorsomédial est impliqué dans l'apprentissage spatial. Cette dernière fonction a également été démontrée pour le striatum ventral (Voorn et al., 2004). Le striatum ne fonctionne pas tout seul. Il fait partie d'un réseau de

noyaux sous-corticaux interconnectés et hautement organisés : les ganglions de la base. Les ganglions de la base sont formés du striatum, de la substance noire pars reticulata (SNr) et pars compacta (SNc), du globus pallidus interne (GPi) et externe (GPe) et du noyau sous-thalamique (STN) (Kim et al., 2009).

Les informations en provenance des différentes aires corticales sont véhiculées de manière ségréguée à travers les ganglions de la base, puis redirigées vers le cortex par le thalamus. De cette manière, les ganglions de la base forment une série de boucles fonctionnant de manière parallèle et ayant des fonctions semblables aux aires corticales qui les alimentent. Cette organisation anatomique permet aux ganglions de la base de ne pas être uniquement impliqués dans des fonctions motrices, comme il fut longtemps considéré, mais de jouer aussi un rôle dans des fonctions comme l'apprentissage, les actions motivées par un but et la formation des habitudes (Kim et al., 2009).

1.3.3. Le cortex

1.3.3.1. Anatomie

Le cortex est une sorte de couche feuilletée de cellules, principalement constitué de substance grise et de substance blanche. Pour pouvoir se loger à l'intérieur du crâne, le cortex, d'une surface de 2000 cm² et d'une épaisseur de 2 à 4 millimètres, présente de nombreuses circonvolutions formant des sillons dont deux sont plus profonds que les autres (Shipp, 2007). Ceux-ci sont appelés scissures qui délimitent les différents lobes : frontal, pariétal, occipital et temporal, le lobe de l'insula est dans la profondeur de la scissure sylvienne, et n'est visible qu'en écartant celle-ci. Les différents lobes sont visibles sur la figure 15, ainsi la scissure de Sylvius ou sylvienne ou latérale, et de la scissure de Rolando ou rolandique ou centrale (Vibert et al., 2011).

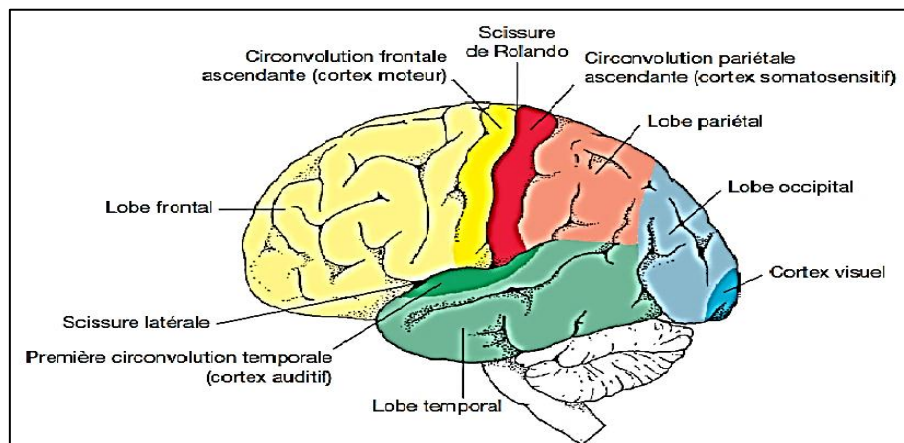


Figure 15. Représentation des principales zones du cortex cérébral (vue latérale de l'hémisphère gauche) (Vibert et al., 2011).

Dans un plan tangentiel, le cortex est subdivisé en couches tandis que dans un plan radial, les neurones sont organisés en colonnes (Schubert et al., 2006) ; le cortex cérébral possède une organisation laminaire en 6 couches (Figure 16) et plus de 40 aires corticales. Les couches corticales sont numérotées de I à VI à partir de la surface du cerveau et elles sont distinctes par leur composition cellulaire et leur épaisseur (Lev et White, 1997).

La couche I (couche moléculaire ou plexiforme) possède une densité cellulaire faible. Elle contient principalement des fibres nerveuses orientées horizontalement, des cellules gliales, mais aussi des cellules de Cajal-Retzius et des neurones étoilés. Cette couche reçoit des afférences de neurones thalamiques qui relaient les informations provenant des ganglions de la base (Kuramoto et al., 2009). La couche II (couche granulaire externe) est constituée de neurones granulaires de petite taille. La couche III (couche pyramidale externe) est formée de cellules pyramidales. Ces 2 couches, II et III, émettent des dendrites dans la couche I, grâce auxquelles elles reçoivent des excitations thalamiques (Hooks et al., 2013). Elles projettent également des axones vers les neurones cortico-spinaux de la couche V (Schubert et al., 2006), vers le cortex controlatéral, ainsi que vers le striatum ipsilatéral et controlatéral (Reiner et al., 2003).

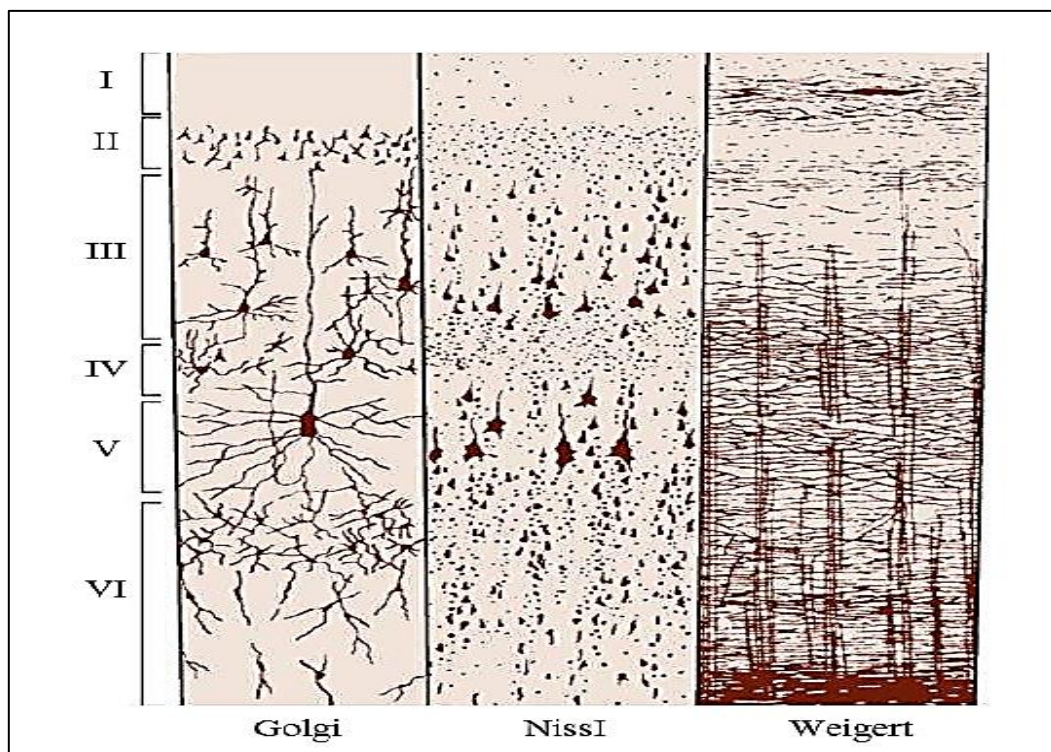


Figure 16. Organisation laminaire du cortex (Kandel et al., 2013).

Les 6 couches corticales sont visualisées et délimitées grâce aux 3 techniques de coloration. La coloration de Golgi montre les corps cellulaires des neurones et les dendrites. La coloration de Nissl révèle les corps cellulaires et les dendrites proximales et la coloration de Weigert permet de visualiser la distribution axonale.

La couche IV (couche granulaire interne) est la couche la moins épaisse du cortex moteur primaire M1. Elle est constituée de neurones étoilés et pyramidaux. Les neurones de cette couche IV forment des connections entre eux (Cowan et Stricker, 2004) mais projettent également les collatérales de leurs axones dans toutes les couches corticales, notamment les couches II et III (Lübke et al., 2000). La couche IV reçoit des afférences du thalamus, et du cortex controlatéral. En ce qui concerne la couche V (couche pyramidale interne), elle contient de larges neurones pyramidaux ou neurones de projection, qui émettent des projections vers des cibles sous-corticales, comme le striatum, le tractus pyramidal (Reiner et al., 2003), ou corticales. La couche VI (couche polymorphe) contient des cellules pyramidales qui projettent vers le thalamus, ainsi que dans d'autres régions corticales. Cette couche reçoit des afférences du thalamus et d'autres régions corticales (Zhang et Deschênes, 1998).

Le cortex cérébral est composé de deux types cellulaires, les neurones et la glie. La majorité des neurones (environ 80%) sont des neurones pyramidaux de type excitateur et utilisent le glutamate comme neurotransmetteur. D'un point de vue morphologique, les neurones pyramidaux corticaux ont un corps cellulaire de forme pyramidale et possèdent une large dendrite apicale qui contacte, majoritairement, la couche I du cortex. Leurs dendrites possèdent de nombreuses épines où s'établissent des contacts synaptiques. Ces neurones pyramidaux sont particulièrement nombreux dans les couches II/III, V et VI, et sont absents dans la couche I. Ils peuvent, soit projeter leur axone localement, soit contacter des cibles corticales et sous-corticales du cortex cérébral et sont alors appelés neurones de projection (Kawaguchi et Kubota, 1997 ; Contreras, 2004).

Le cortex cérébral contient également environ 20% de cellules non-pyramidales inhibitrices qui utilisent l'acide γ -aminobutyrique (GABA) comme neurotransmetteur, et qui sont plus diversifiés dans leur morphologie (Shipp, 2007). Ils constituent des réseaux locaux qui inhibent les neurones de projection. Ce sont des neurones à corps cellulaire ellipsoïdal, et qui, en général, n'ont pas de dendrite proéminente. Ces neurones ont des axones courts projetant localement, d'où leur nom d'interneurones. Ils ne constituent pas une population homogène mais présentent une grande diversité morphologique, électrophysiologique et chimique. Les interneurones GABAergiques ne sont pas distribués de façon aléatoire dans le cortex, ils ont tendance à former de petits amas concentrés dans le tissu cortical (Ciceri et al., 2013). Les cellules gliales constituent la population cellulaire majoritaire du système nerveux central (SNC) des mammifères. Elles regroupent les astrocytes, les oligodendrocytes, et la microglie. Les astrocytes ont généralement une forme étoilée et sont pourvus de nombreux prolongements

en contact direct avec les vaisseaux sanguins, la pie-mère et les neurones. Ils assurent un support structurel, métabolique et trophique pour les neurones moteurs. Des études récentes montrent que les astrocytes fournissent non seulement un rôle de soutien pour les neurones, mais qu'ils régulent également certaines fonctions physiologiques du cerveau (Molofsky et al., 2012 ; Burda et Sofroniew, 2014 ; Sloan et Barres, 2014). Les oligodendrocytes quant à eux, jouent un rôle essentiel dans la formation de la gaine de myéline des axones du SNC favorisant la vitesse de conduction de l'influx nerveux. Cette fonction est assurée par les cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique. La microglie constitue la principale cellule immunocompétente du SNC. En effet, la microglie est activée en réponse à une atteinte du SNC et possède également un rôle de sécrétion de multiples facteurs en fonction des signaux environnementaux (Stadelmann et al., 2019).

1.3.3.2. Physiologie

Puisque le cortex cérébral comprend en volume environ 80 à 85% du cerveau humain adulte, la plupart des neurones du cerveau humain se trouvent dans le cortex, essentiellement dévolu au traitement des fonctions dites supérieures (von Bartheld et al., 2016) ; le lobe frontal est impliqué dans l'action et la planification. Le lobe temporal joue un rôle dans l'audition, la mémoire et la reconnaissance des objets. Le lobe pariétal est impliqué dans les sensations et le traitement de l'espace. Le lobe occipital est essentiel à la vision. Chaque lobe est subdivisé en réseaux de neurones imbriqués les uns dans les autres, et affectés au traitement d'informations précises (OECD, 2007).

Le cortex cérébral joue un rôle primordial dans le cerveau puisqu'il intègre de multiples informations sensorielles et contrôle des fonctions complexes. Pour traiter les informations correctement, il requiert l'activité coordonnée de deux principales classes de neurones : les cellules pyramidales excitatrices de projection - qui transmettent l'information entre les régions corticales et extracorticales - et les interneurons inhibiteurs - qui modulent localement les réponses des cellules pyramidales (Ciceri & Dehorter, 2014).

1.3.4. Le cervelet

1.3.4.1. Anatomie

Le cervelet est présent chez tous les vertébrés. On le trouve chez la plupart des organismes pré-vertébrés primitifs jusque chez les vertébrés les plus avancés. La forme et la morphologie du cervelet sont très variables chez les vertébrés, on se concentre sur la description du cervelet des mammifères dont l'anatomie est similaire chez les différentes espèces, seules les tailles

relatives des différentes sous-parties qui le constitue différent (Voogd et Glickstein, 1998). Malgré son nom latin signifiant « petit cerveau », chez l'homme le cervelet contient plus de cellules que le reste du cerveau tout entier, pour seulement 10 à 15 % de son poids (Manto et Habas, 2013 ; Moreno-Rius, 2019), il occupe la majeure partie de la fosse cérébrale postérieure en se plaçant en arrière du tronc cérébral auquel il est rattaché de manière symétrique par les pédoncules cérébelleux. Le cervelet est donc une structure située en dérivation du tronc cérébral (figure 17), cet emplacement stratégique explique ses modalités d'action sur les grandes voies nerveuses ascendantes et descendantes (Tatu, 2017).

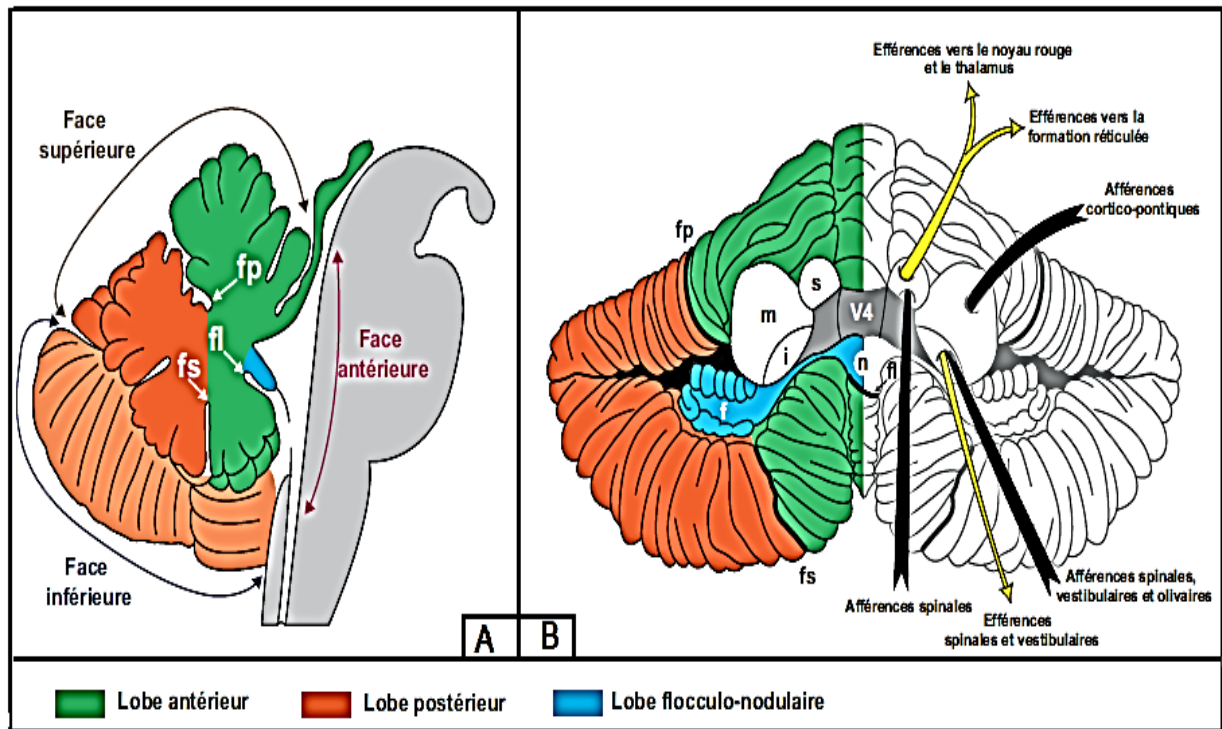


Figure 17. Aspect morphologique du cervelet (Vuillier et al., 2011).

A : Coupe sagittale médiane du tronc cérébral et du cervelet. **B :** Vue ventrale du cervelet après ablation du tronc cérébral, (n : nodule, f : floccule, fp : fissure primaire, fs : fissure secondaire, fl : fissure postérolatérale, V4 : quatrième ventricule).

Le cervelet est classiquement décrit comme constitué de trois parties : le vermis, impair et médian, entouré de part et d'autre par deux hémisphères pairs et symétriques. A sa surface, le cervelet est parcouru par de nombreuses fissures et sillons transversaux, plus ou moins profonds et concentriques, qui contribuent à délimiter des lobes et des lobules, chez les mammifères, on distingue dix lobules numérotés de I à X (Voogd, 2003 ; Moreno-Rius, 2019). La face supérieure du cervelet est séparée des hémisphères cérébraux par une structure dure-mérienne. Sa face inférieure repose dans les fosses cérébelleuses de l'os occipital. Sa face antérieure est appliquée contre la face dorsale du tronc cérébral constituant le toit du quatrième ventricule. Elle comporte les trois paires de pédoncules cérébelleux, supérieurs, moyens et inférieurs, qui

laissent passer des faisceaux afférents et efférents unissant le cervelet aux autres parties du système nerveux central (Vuillier et al., 2011).

Le cervelet se compose d'une substance grise périphérique (un cortex composé de trois couches), d'une substance blanche centrale et d'un ensemble de noyaux profonds pairs et symétriques. Dans la profondeur du vermis, sont localisés de chaque côté les noyaux fastigiaux. Dans les régions hémisphériques attenantes au vermis, aussi appelées paravermis, se trouvent les noyaux emboliforme (ou interposé antérieur) et globuleux (ou interposé postérieur), tandis que, dans les régions hémisphériques latérales, se situent les volumineux noyaux dentelés (Tatu, 2017).

L'anatomie morphologique du cervelet et sa division en lobes et lobules sont bien connues, ces données anatomiques et morphologiques ne suffisent cependant pas à comprendre les fonctions motrices et non motrices du cervelet, ce qui rend la connaissance des voies cérébelleuses et des connexions du cervelet avec les autres structures anatomiques indispensable. L'organisation anatomo-fonctionnelle des trois paires de pédoncules cérébelleux, qui relie le cervelet au reste du névraxe, est en particulier un élément crucial dans le fonctionnement cérébelleux. Les divisions phylogénétiques (archéo, paléo, néocerebellum) du cervelet ont longtemps servi de support à la description des fonctions cérébelleuses. Cette division reste cependant réductrice et peu adaptée à la réalité neuro-fonctionnelle et clinique. La compréhension des fonctions motrices du cervelet nécessite la connaissance d'une organisation neuro-anatomique basée sur les afférences du cervelet et sur son organisation cortico-nucléaire. Cette division sagittale en cervelet médian, intermédiaire et latéral permet d'expliquer les principales fonctions motrices du cervelet à savoir : maintien de l'équilibre, réglage du tonus musculaire, coordination de l'action des muscles durant le mouvement volontaire, programmation du mouvement et apprentissage moteur. Les fonctions non motrices du cervelet sont encore mal connues cependant, les progrès rapides des techniques de neuro-imagerie fonctionnelle permettent de commencer à les appréhender. Un cervelet cognitif et limbique se dessine peu à peu et laisse entrevoir son rôle dans de nombreuses tâches non motrices (Tatu, 2017).

Comme le cerveau, la configuration intérieure du cervelet fait apparaître de la substance grise corticale, ou cortex, de la substance grise centrale, correspondante aux noyaux profonds du cervelet et de la substance blanche (Vuillier et al., 2011). Le cortex cérébelleux est constitué de quatre principaux types de neurones : les cellules granulaires, les cellules de Purkinje qui

sont des cellules principales dans tous les circuits cérébelleux (Reeber et al, 2013), deux types d'interneurones inhibiteurs, les cellules de Golgi et les cellules étoilées / corbeilles, il présente une grande homogénéité cyto-architecturale et structurale, même si des différences de densités et de répartitions cellulaires se rencontrent ici ou là. Il comporte trois couches (figure 18) : la couche moléculaire, la plus superficielle immédiatement au contact de la pie-mère, la couche ganglionnaire intermédiaire (ou couche des cellules de Purkinje) et, la plus interne, la couche granulaire (Voogd et Glickstein, 1998 ; Schilling et al., 2008).

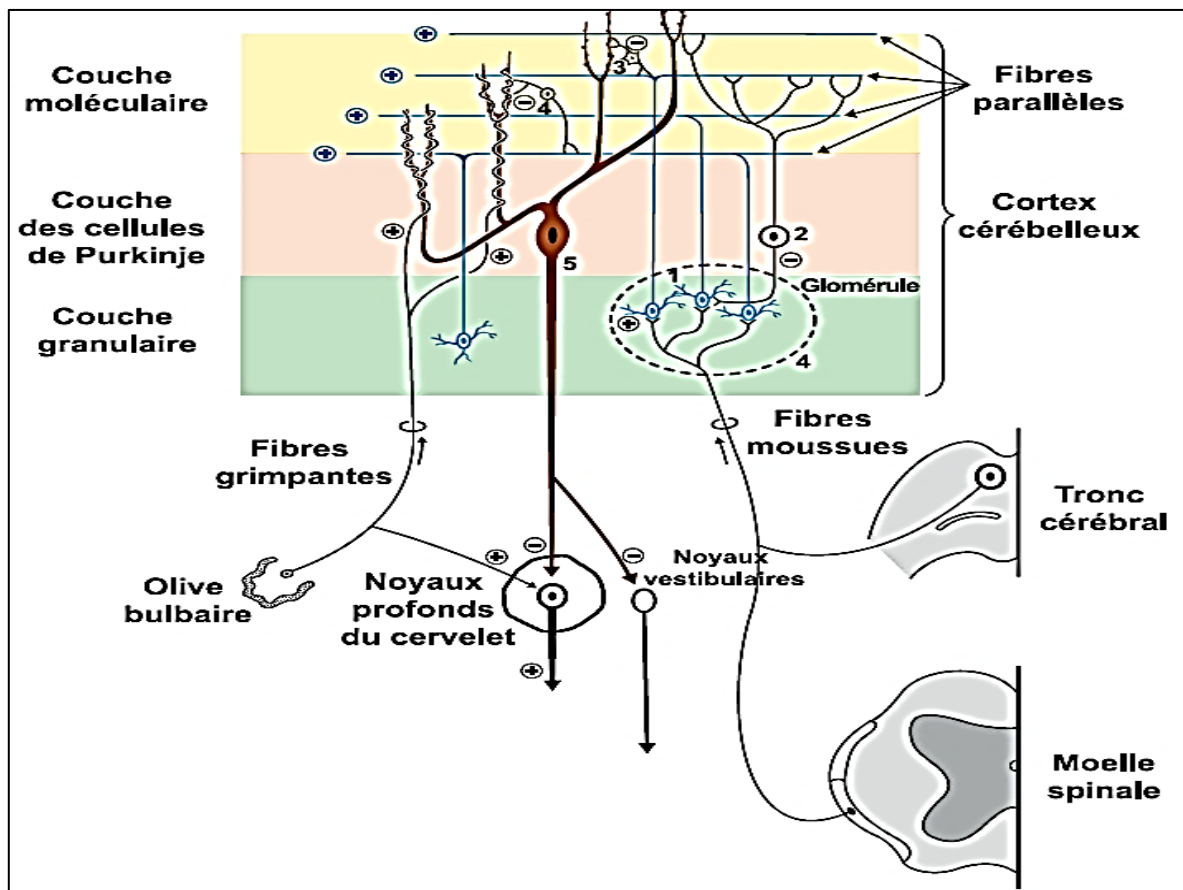


Figure 18. Circuits cellulaires du cervelet (Vuillier et al, 2011). 1 : cellules granulaires, 2 : cellules de Golgi, 3 : cellules étoilées, 4 : cellules à corbeille, 5 : cellules de Purkinje). L'organisation fonctionnelle du cortex cérébelleux est centrée sur la cellule de Purkinje soumise à des influx excitateurs et inhibiteurs. Les influx excitateurs proviennent des fibres grimpantes et des fibres parallèles, elles-mêmes contrôlés par les glomérules. Les effets inhibiteurs sont assurés par les cellules étoilées et les cellules à corbeille. Cette double influence sur la cellule de Purkinje est à l'origine de potentiels d'action dont la seule voie de sortie est représentée par son axone qui projettent vers les noyaux cérébelleux et les noyaux vestibulaires.

1.3.4.2. Physiologie

Au début du 20^{ème} siècle, le cervelet était considéré uniquement comme un modulateur des fonctions motrices, notamment le tonus, la coordination et la production de la parole motrice (Schmahmann et Caplan, 2006), cette idée populaire sur la fonction du cervelet a persisté tout au long du 20^{ème} siècle (De Smet et al., 2013). Ce n'est qu'à partir des années 1990 que des

études de cas, puis, dans les années 2000, que des travaux de recherche mieux systématisés et portant sur des grandes populations, ont permis de mettre en évidence une implication du cervelet dans l'expression des fonctions dites « supérieures ». Des études avec la tomographie par émission de positrons (TEP) ont fourni des preuves, d'une implication cérébelleuse dans les fonctions langagières non motrices, révélant l'activation simultanée des zones linguistiques supratentorielles et de l'hémisphère cérébelleux droit lors des tâches linguistiques (Reeber et al., 2013). De plus, des études neuroanatomiques ont révélé que le cervelet est lié de manière réciproque aux régions autonome, limbique et associative du cortex supratentoriel (Schmahmann, 2019).

Plus précisément, les zones corticales envoient des informations au cervelet *via* les noyaux du pont basilaire, et les noyaux cérébelleux profonds renvoient des informations vers les zones préfrontales par des voies dentato-thalamiques (Schmahmann et Pandya, 1997). Les résultats de ces études ont coïncidé de façon consistante avec la découverte et la description en neuro-anatomie de l'existence de connexions cérébellocorticales reliant les régions postéro-latérales et les régions vermiennes du cervelet avec des aires cérébrales non motrices, hautement impliquées dans la cognition. La description du syndrome cérébelleux cognitivo-affectif CCAS (cerebellar cognitive affective syndrome) a pu être initialement faite en 1998 par le Dr J. Schmahmann ; elle s'est enrichie, au fil des années et des travaux, non seulement par la précision de la nature de l'altération cognitive et affective d'origine cérébelleuse, mais aussi par la localisation des lésions cérébelleuses impliquées dans l'apparition de tels symptômes (Schmahmann et Caplan, 2006). Même si son implication dans les fonctions cognitives est progressivement identifiée, le rôle fonctionnel majeur du cervelet concerne les fonctions motrices, en effet, lorsque la plus grande partie ou la totalité du cervelet est retirée d'un oiseau ou d'un mammifère, l'animal étant, avant l'opération, dans un état parfaitement normal, et aucune autre partie étant blessée, il n'y a aucun phénomène constamment et invariablement observé, sauf certaines modifications des mouvements volontaires... Les mouvements sont toujours excessivement irréguliers et incoordonnés ; l'animal ne peut pas maintenir son équilibre quelles que soient les autres fonctions du cervelet, il agit comme le centre présidant à l'équilibre et à la coordination musculaire générale (Schmahmann, 2019). Tout comme le système des ganglions de la base, le cervelet contribue en effet de manière fondamentale à la motricité. Il n'est pas responsable du déclenchement du mouvement mais supervise les activités motrices déclenchées par d'autres régions cérébrales. Il effectue les corrections indispensables au bon déroulement du mouvement à partir des afférences proprioceptives, vestibulaires ou visuelles. La division fonctionnelle du cervelet la plus pertinente est fondée sur l'origine de ses

afférences et son organisation cortico-nucléaire. Quatre systèmes fonctionnels sont ainsi individualisés : le cervelet médian, le cervelet intermédiaire, le cervelet latéral et le lobe flocculo-nodulaire (Figure 19). Les fonctions motrices du cervelet concernent le maintien de l'équilibre, le réglage du tonus des muscles, la coordination de l'action des muscles durant le mouvement volontaire et la programmation du mouvement. Toute lésion du cervelet s'exprime de manière variable sur l'une de ces fonctions (Tatu, 2017).

Des études de neuroimagerie fonctionnelle ont également révélé que le cervelet semble être impliqué dans les performances cognitives, d'une manière qui ne peut être expliquée uniquement par la fonction motrice. Les tâches de mémoire de travail pour les rongeurs ont souvent une composante spatiale, et l'une des fonctions non motrices les mieux établies du cervelet est la navigation spatiale. La relation entre le cervelet de rongeur et la mémoire de travail n'est pas complètement claire ; dans certains cas au moins, les déficits peuvent s'expliquer par des déficits de navigation spatiale, de flexibilité cognitive, ou peut-être même de simples déficits moteurs ou d'activité. Dans l'ensemble, il semble y avoir des preuves solides d'un rôle cérébelleux dans la mémoire de travail dans les tâches qui impliquent également une composante de flexibilité cognitive, tandis qu'il existe des preuves mitigées pour les tâches de mémoire de travail qui sont plus de domaine pur (Shipman & Green ;2019).

Dans l'ensemble, les preuves ne sont pas solides pour une implication du cervelet de rongeur dans la plupart des types d'apprentissage de la discrimination. Cependant, la conclusion selon laquelle l'apprentissage de la discrimination était altéré par un dysfonctionnement cérébelleux lorsqu'il y avait une brève fenêtre de réponse est un résultat particulièrement intéressant et nouveau, les lésions du cervelet produisent généralement des déficits dans l'apprentissage et / ou la rétention du labyrinthe d'eau de Morris (Shipman et Green ;2019). Donc, l'enseignement traditionnel selon lequel le cervelet est purement un dispositif de contrôle moteur ne semble plus valable, si jamais il l'était. Il est de plus en plus reconnu que le cervelet contribue au traitement cognitif et au contrôle émotionnel en plus de son rôle dans la coordination motrice. Des études anatomiques et physiologiques révèlent qu'il existe une région sensorimotrice primaire du cervelet dans le lobe antérieur (figure 19) et une région sensorimotrice secondaire dans la face médiale du lobe postérieur. En revanche, les zones d'association cérébrale qui ont un comportement d'ordre supérieur sont liées préférentiellement aux hémisphères latéraux du lobe postérieur cérébelleux - dans les boucles à action directe *via* les noyaux du pont de basiliaires et dans les boucles de rétroaction des noyaux cérébelleux profonds *via* le thalamus. Il existe également des liens réciproques entre le cervelet et

l'hypothalamus. Ces voies facilitent l'incorporation cérébelleuse dans les circuits neuronaux distribués régissant l'intellect, l'émotion et la fonction autonome en plus du contrôle sensorimoteur (Schmahmann et Caplan, 2006).

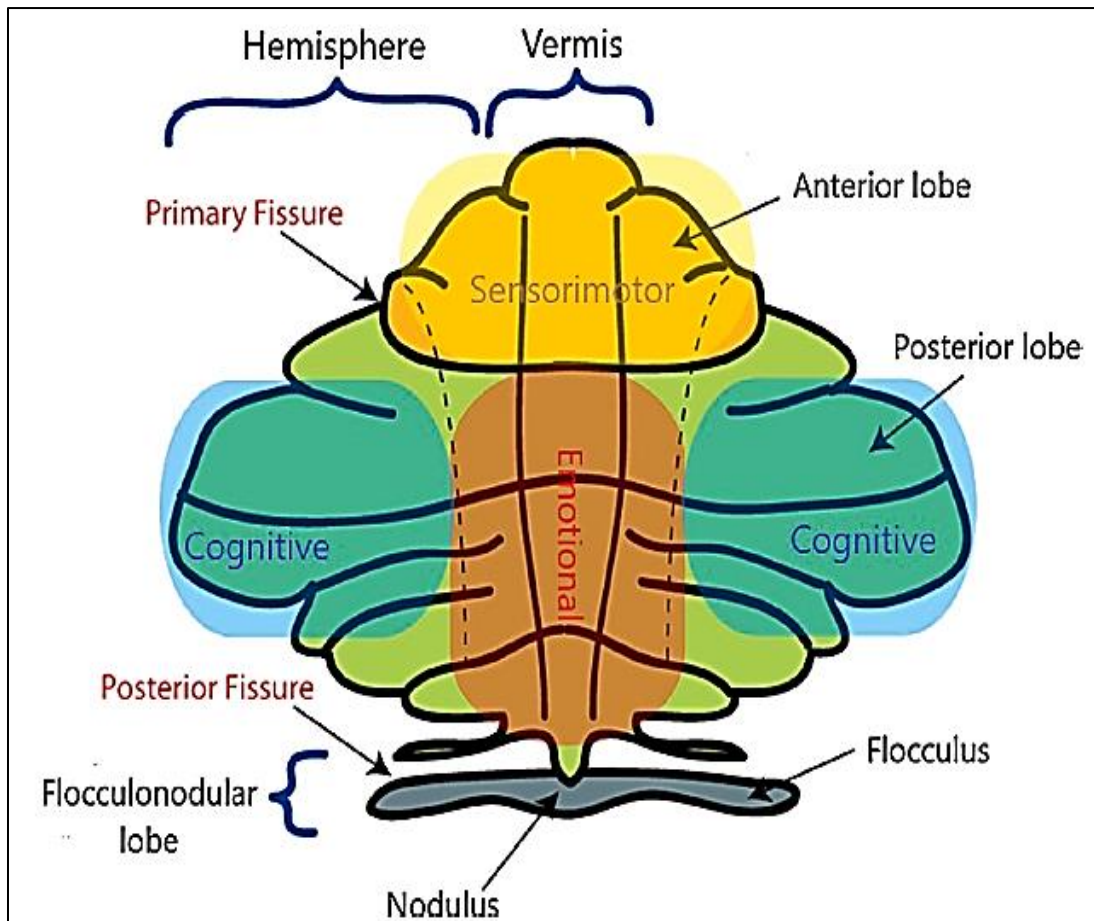


Figure 19. Représentation de la vue cérébelleuse macroscopique et association entre les sous-régions cérébrales et les fonctions (Moreno-Rius, 2019). L'image représente un cervelet déplié, avec des zones ombrées indiquant le type de fonctions auxquelles ces sous-régions sont principalement (non exclusivement) associées.

2. Neurotoxicité des pyréthrinoïdes

Les atteintes du système nerveux central constituent, avec les cancers et les troubles de la reproduction, un des trois axes de recherche majeurs concernant les effets sanitaires des pesticides (Blanc-Lapierre et al., 2012). Les PYRs sont considérés comme des polluants industriels et environnementaux toxiques pour les oiseaux, les animaux, les poissons et les êtres humains vivant dans le même écosystème, une exposition directe ou indirecte entraîne un risque de danger important. Le mécanisme d'action des PYRs, y compris la DLT, et la BF est le même pour les organismes cibles et non cibles. On pense que la DLT agit principalement au niveau du SNC. La mort des insectes semble être due à des dommages irréversibles du système nerveux survenant lorsque l'empoisonnement dure plus de quelques heures (Mani et al., 2017).

2.1. Action des pyrétrinoïdes sur les canaux sodiques

Bien que les PYRs sont considérés généralement comme sans danger pour les mammifères et l'Homme avec une toxicité de 500 à 4500 fois plus faible que celle chez les insectes, car les insectes ont une sensibilité accrue aux niveaux des canaux sodiques, une taille corporelle plus petite et une température corporelle plus basse. De plus, les mammifères sont protégés par une faible absorption cutanée et un métabolisme rapide en métabolites non toxiques (Bradberry et al., 2005). Les examens du courant de sodium voltage-dépendant dans les neurones du cortex cérébral des mammifères suggèrent une forte sensibilité des neurones à la BF (Yang et Li, 2015). En raison de l'absence du groupe α -cyano, la BF se lie de manière transitoire sur les canaux sodiques, ce qui entraîne la production de potentiels ultérieurs et une éventuelle décharge continue des axones, sans affecter le potentiel de repos (Bradberry et al., 2005 ; Khan et al., 2013). La DLT exerce également une neurotoxicité en prolongeant l'ouverture des canaux Na^+ . Cette ouverture prolongée entraîne une dépolarisation persistante, conduisant à des tirs répétitifs et si l'exposition est suffisamment élevée, des convulsions, une paralysie et enfin la mort surviennent (Mani et al., 2017).

Au niveau moléculaire, les canaux sodiques voltage-dépendant (VGSC) des insectes sont des canaux ioniques considérés essentiels pour la plupart des cellules excitables (Bradberry et al., 2005 ; Ray et Fry, 2006), ils sont constitués également de glycoprotéines hétéromultimériques transmembranaires organisées en rosette dans la membrane. Ces canaux ioniques, impliqués dans la genèse de l'activité électrique, sont constitués d'une sous-unité α , qui détermine les propriétés électrophysiologiques des courants sodium, associée à une ou plusieurs sous-unités auxiliaires modulant ces propriétés. La sous-unité principale α comporte quatre domaines transmembranaires répétés, DI à DIV (Figure 20). Chaque domaine transmembranaire comprend six segments notés de S1 à S6. Les domaines sont reliés entre eux par trois boucles intracellulaires (D1-D2, D2-D3 et D3-D4) de taille variable. Les extrémités amino- et carboxy-terminales sont intracellulaires. Au sein de cette sous-unité α , certains résidus d'acides aminés sont à l'origine des propriétés fonctionnelles des VGSC. Le segment S4 de chaque domaine comporte des résidus d'acides aminés chargés positivement (arginine et lysine) agencés régulièrement autour des hélices α des domaines, toutes les trois à quatre positions (Zlotkin, 1999). C'est le segment S4 qui constitue un détecteur de potentiel de la sous-unité α du canal. Les boucles reliant les segments S5 et S6 de chaque domaine (boucles P) se projettent dans le lumen du canal pour former le pore du canal. Ces boucles contiennent des résidus d'acides aminés qui forment le filtre de sélectivité aux ions sodium. Enfin, la boucle

intracellulaire qui relie le segment S6 du DIII au segment S1 du DIV comporte quatre résidus d'acides aminés qui constituent la porte d'inactivation du canal VGSC (Davies et al., 2007). Le processus d'activation des canaux VGSC résulte du déplacement de résidus d'acides aminés chargés positivement du segment S4 sous l'effet de la dépolarisation. Il en résulte la genèse d'un courant sodium entrant qui s'active et qui s'inactive ensuite pendant la dépolarisation grâce à la boucle intracellulaire entre les domaines DIII et DIV (Ray et Fry, 2006).

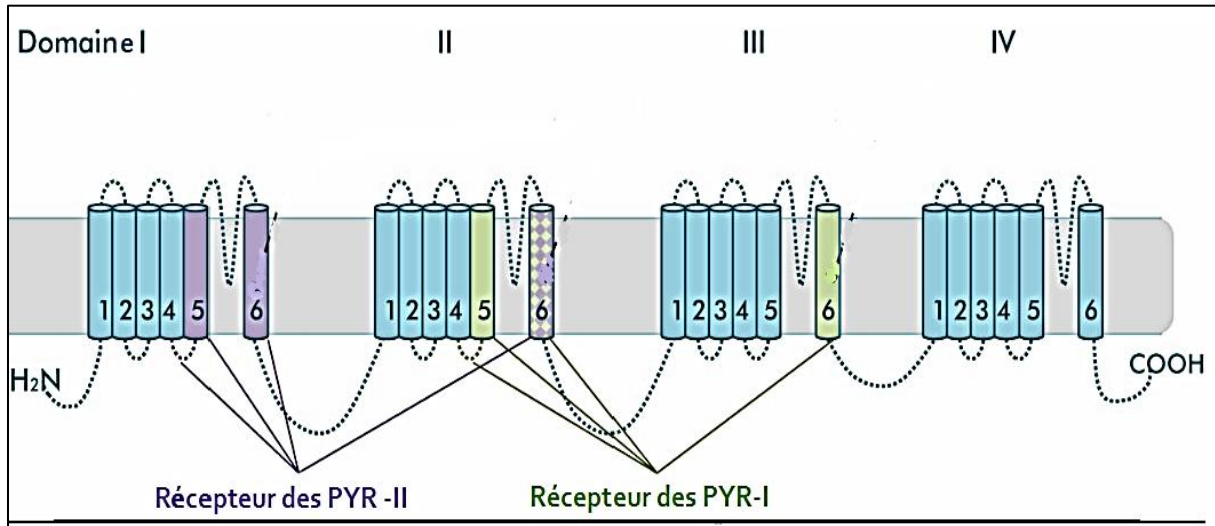


Figure 20. Schéma topologique du récepteur canal sodium voltage-dépendant (VGSC) (Saavedra-Rodriguez et al. 2018). Les segments des domaines et les hélices de liaison formant les sites récepteurs des PYRs sur le sous-unité α du VGSC. En vert le récepteur des PYRs de type I, en violet le récepteur des PYRs de type II.

Le modèle le plus simple pour la fonction du canal sodique postule trois états du canal distincts : fermé ou au repos (disponible pour l'activation) ; ouvert ; et inactivé (fermé mais non disponible pour l'activation). Les transitions entre ces états peuvent être observées au cours de l'application de la technique classique de voltage-clamp, qui est illustrée dans la figure 21A (Soderlund, 2010). Aux potentiels de membrane hyperpolarisés, les canaux sont fermés et disponibles pour l'activation. La dépolarisation de la membrane provoque une ouverture rapide des canaux sodiques, considérée comme un courant entrant. Lorsque la membrane est maintenue à un potentiel dépolarisé, la durée du courant de sodium est limitée à quelques ms par le début de l'inactivation, ce qui rend le canal non conducteur. Le retour de la membrane à un potentiel hyperpolarisé convertit les canaux inactivés en canaux fermés, les rendant à nouveau disponibles pour l'activation. L'activité insecticide des PYRs dépend de leur capacité à modifier la cinétique de déclenchement des VGSC, perturbant ainsi la communication cellulaire normale. Des techniques de voltage-clamp ont été largement utilisées pour documenter les effets des PYRs sur les courants de sodium enregistrés par les neurones des invertébrés et des vertébrés. Les caractéristiques de l'action des PYRs mesurées dans ces

conditions sont un ralentissement de l'inactivation pendant une impulsion dépolarisante et une désactivation retardée, ce qui est évident comme un courant de queue de sodium en décroissance lente élaboré par des canaux qui restent ouverts après un cycle de dépolarisation-repolarisation (Figure 21B) (Soderlund, 2010).

Des études réalisées sur le mode d'action de la BF sur les canaux sodiques dans les neurones corticaux cérébraux du rat nouveau-né, où les effets toxiques sont largement générés. La BF provoque un courant à la fin d'une impulsion dépolarisante, un courant après la repolarisation et une modification de repos significative (25,3% de modification à 10 mM). La BF a également provoqué un changement d'hyperpolarisation dépendant de la concentration dans l'activation et l'inactivation à l'état régulier ainsi, pendant la récupération, la BF a ralenti l'inactivation du canal. La dépolarisation répétitive a augmenté la puissance de la BF avec une fréquence élevée. Ces résultats suggèrent que la BF se lie et modifie les canaux de sodium dans les états fermés (Yang et Li, 2015).

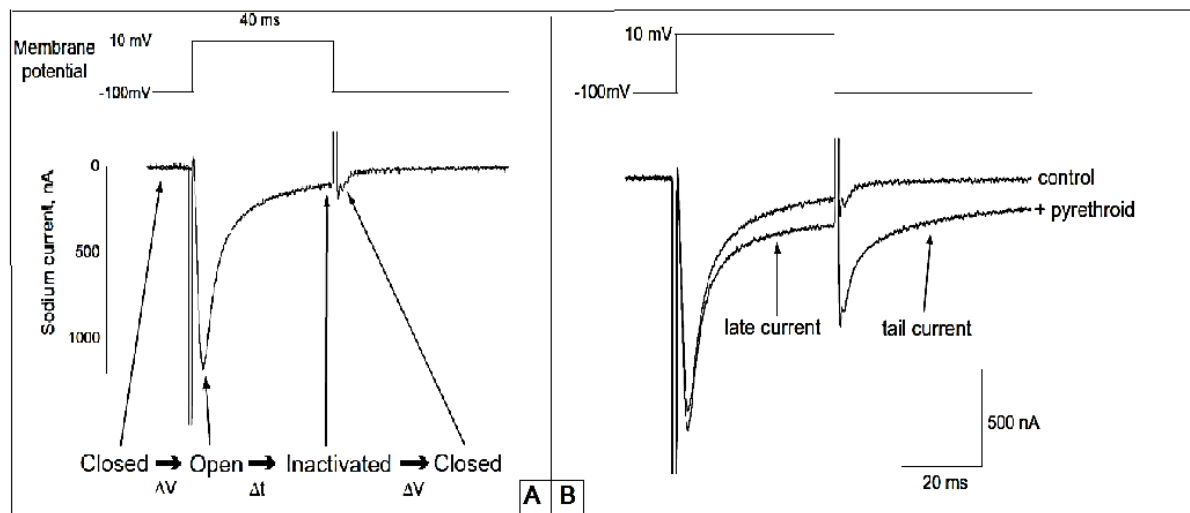


Figure 21. Transitions d'état des canaux sodiques associées à des courants transitoires de sodium mesurés par la technique de voltage-clamp, en absence et en présence de PYR (Soderlund, 2010).

A : en absence de PYRs ; B : Control du courant de sodium modifiés par les PYRs mesurés par la technique de voltage-clamp, illustrant le courant tardif induit par les PYRs pendant une impulsion dépolarisante et un courant de queue après repolarisation.

Les PYRs de synthèse peuvent se fixer également sur les canaux à Na^+ mais sur un site différent, qui dans ce cas provoque soit un trémor et une hyperexcitabilité, soit une incoordination des mouvements (Scollon et al., 2011).

2.2. Action des pyréthriinoïdes sur l'acétylcholinestérase

L'acétylcholinestérase (AChE) représente un biomarqueur de neurotoxicité, c'est une enzyme cholinestérase importante présente dans de nombreux types de tissus conducteurs,

nerfs, muscles, tissus centraux et périphériques, moteurs, fibres sensorielles, fibres cholinergiques et non cholinergiques, jonctions neuromusculaires et synapses du SNC, cela rend son activité un biomarqueur standard de l'empoisonnement aux PYRs. Il a été démontré que les PYRs provoquent une diminution des activités de l'AChE dans les érythrocytes et le SNC des organismes vivants. L'inhibition de l'enzyme AChE a été attribuée à l'occupation de ses sites actifs par une exposition à la DLT qui pourrait conduire à diminuer le métabolisme cellulaire, perturber l'activité métabolique, nerveuse et conduire à des reflux ioniques et à une perméabilité membranaire différentielle, en plus d'augmenter la peroxydation lipidique (LPO). Une inhibition extrême de l'AChE entraîne des dysfonctionnements du SN, des dysfonctionnements métaboliques, des déficits comportementaux, des troubles de l'apprentissage et de la mémoire, qui peuvent conduire à l'anxiété, à la peur, à l'émotion et au stress, enfin à des troubles neurodégénératifs. L'inhibition de l'AChE entraîne une accumulation de l'ACh dans la fente synaptique et une neurotransmission retardée par la suite. Les inhibiteurs irréversibles de l'AChE entraînent une paralysie musculaire, des convulsions, une constriction bronchique et la mort par asphyxie (Mani et al., 2017).

L'AChE pourrait également être inhibée en raison des dommages oxydatifs provoqués par la BF, cette dernière a un potentiel pro-oxydant, mis en évidence par une (LPO) importante, et des altérations dans diverses enzymes antioxydants dans le tissu cérébral. De nombreuses études ont rapporté l'inhibition de l'AChE avec des PYRs types I. Testud et Grillet (2007), ont démontré la propriété lipophile des PYRs comme un mécanisme clé pour interagir avec les groupements aromatiques et hydrophobes de l'AChE en entraînant son inhibition (Dar et al., 2013; Dar et al., 2015). Il est admis également que les PYRs sont des inhibiteurs du métabolisme de l'ACh. En effet, des résultats des travaux antérieurs ont montré que la DLT est une molécule pouvant inhiber l'AChE. Les études structurales de l'AChE indiquent la présence de différents sites de liaison, un site de liaison sélectif des cations aromatiques ; deux sites estérasiques et le troisième est un site de liaison de substrat anionique périphérique. La molécule de DLT interagit à la fois avec le site estérasique et le site anionique, sachant que le site actif de l'AChE est principalement construit par les résidus Phe (338), Trp (86), Ser (203), Glu (327) et His (440) (Figure 22). Le Trp et le Phe constituent le site de liaison cationique et la Ser et l'His constituent le site de liaison estérasique de l'enzyme. L'ACh se lie aux sites estérasiques et anioniques de l'AChE. La présence d'acides aminés aromatiques dans le site actif de l'enzyme crée une région hydrophobe avec laquelle on suppose que les PYRs, y compris la DLT, peuvent interagir et provoquer une inhibition de l'activité AChE (Sharma et al., 2014). Les travaux de Sharma et ses collaborateurs (2014) ont montré que la DLT a causé une toxicité considérable pour le

cerveau du rat Wistar. Cette neurotoxicité est dose-dépendante, elle est induite par la formation de radicaux libres et la réduction des mécanismes de défense antioxydant réduit, ainsi par l'inhibition de l'activité de l'AChE. L'activité inhibitrice de l'AChE provoquée par la DLT peut être le résultat de son interaction avec le site de liaison anionique de l'enzyme (Sharma et al., 2014).

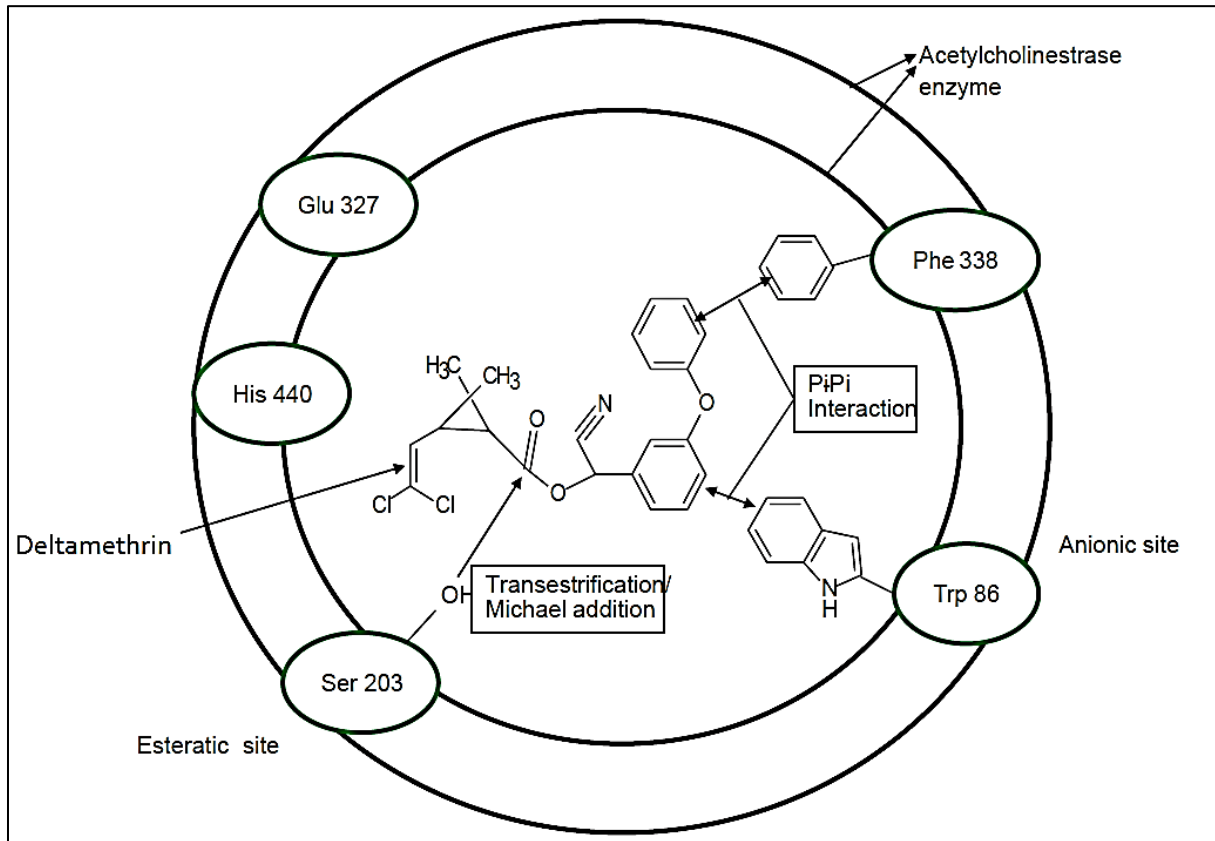


Figure 22. Sites de liaison possibles de la DLT avec l'AChE (Sharma et al., 2014).

2.3. Action des PYRs sur les neuromédiateurs

Les PYRs constituent un groupe de pesticides qui agit sur les isoformes des canaux calciques à voltage dépendants, contribuant ainsi à la libération de neurotransmetteurs et donc à une toxicité induite (Gargouri et al., 2018). Le traitement quotidien continu des rats avec la DLT pendant 10 jours entraîne une diminution de la teneur en dopamine dans le striatum par une inhibition sélective de la synthèse de la dopamine tout en permettant son renouvellement par les dopaminergiques. En outre, les données ont révélé pour la première fois que le traitement par la DLT inhibe l'activité et les expressions de l'ARNm de la tyrosine hydroxylase (TH), responsable de l'accélération de la voie de synthèse nigrostriatale de ce neurotransmetteur (Liu et al., 2018).

En effet, la deltaméthrine bloque l'influx nerveux en modifiant la cinétique des canaux sodiques, des récepteurs GABA, des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine et des récepteurs excitateurs du glutamate (Saoudi et al., 2017). La figure 23 montre des mécanismes d'action supposés par les PYRs.

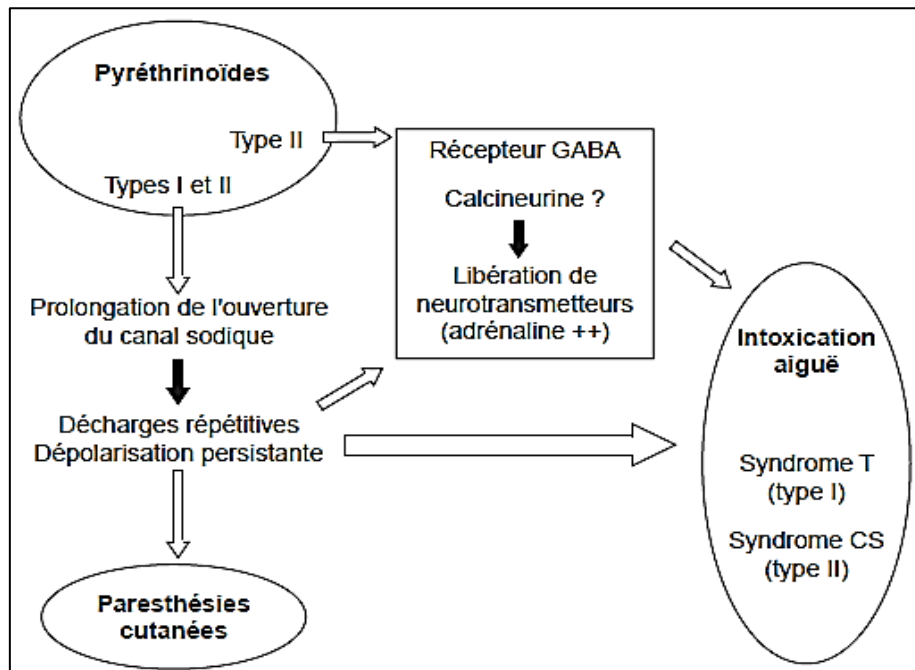


Figure 23. Mécanismes d'action supposés des pyréthrinoides (Testud et Grillet, 2007).

GABA : acide amino-gamma-butyrique.

2.4. Action apoptotique des pyréthrinoides

L'apoptose est l'un des mécanismes moléculaires clé des maladies neurodégénératives, régulée par certaines protéines telles que la Bcl-2 et la Bax qui jouent des rôles respectifs antiapoptotiques et pro-apoptotiques (Hossain et Richardson, 2011 ; Khalatbary et al., 2015). Des études *in vivo* et *in vitro* indiquent que la DLT induit l'apoptose dans le cerveau et les neurones corticaux au niveau moléculaire, par des modifications dans l'expression de p53, Bax et Bcl-2 dans le cerveau du rat (Liu et al., 2018).

En effet, la dose de 12,5 mg / kg *in vivo* de la DLT conduit à l'augmentation persistante de l'ARNm de p53 et de Bax, ce qui peut contribuer à l'apoptose. D'autres travaux de recherches antérieurs ont également montré que la DLT (10, 100 et 1000 nM) a augmenté l'expression de p53 et Bax, alors que l'expression de Bcl-2 a été significativement réduite après 24, 48 et 72 h de l'administration du pesticide, dans les neurones corticaux cérébraux (Kumar et singh, 2015). L'augmentation de la production p53 peut diminuer également l'expression de Bcl-2, conduisant par conséquent à un rapport accru de Bax, induisant donc l'apoptose chez le cerveau du rat (Terunuma et al., 2014). La DLT peut avoir un effet sur l'apoptose via l'altération de

l'expression du cytochrome-c mitochondrial chez les neurocytes de rat (Khalatbary et al., 2015). Cette enzyme est une petite protéine hémique, impliquée dans l'initiation de l'apoptose. Lorsque le cytochrome-c se lie avec la protéine Apaf-1 en présence d'ATP la caspase-9 est activée, conduisant à une cascade de maturation des caspases. Une fois la caspase-3 est maturée elle provoque la mort cellulaire (figure 24) (Yonar et Sakin, 2011).

En plus des voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose, la voie de stress au niveau du réticulum endoplasmique (RE) peut être également impliquée à l'initiation de l'apoptose. En effet, le RE joue un rôle dans l'augmentation de la libération du calcium susceptible d'activer la caspase-12, qui active lui-même la caspase-9 et 3, conduisant à l'apoptose (Kumar et al., 2015).

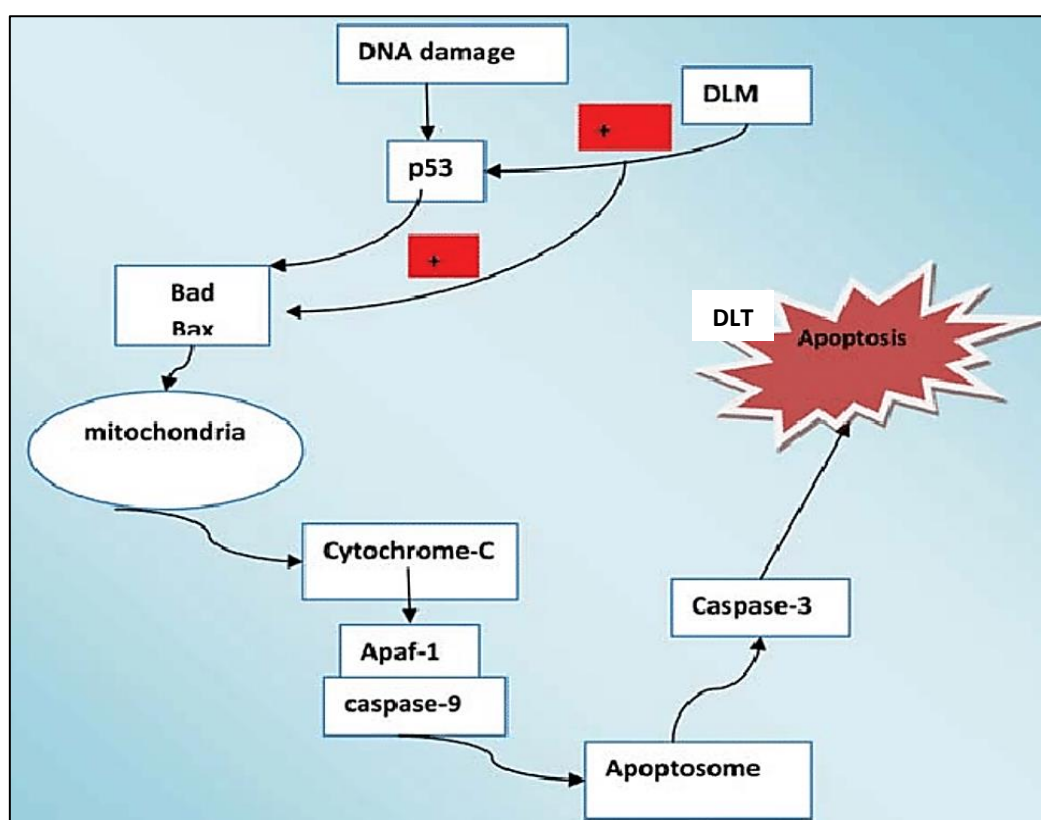


Figure 24. Action de la DLT sur le p53 induisant l'apoptose (Kumar et al., 2015).

Diverses cellules peuvent être également activées par la DLT, ce qui conduit à la mort cellulaire dans les cellules humaines de type neuroblastome SK-N-AS. Ce dernier constat a été rapporté par les travaux de Hossain et ses collaborateurs (2011), qui ont observé que l'influx de calcium est augmenté par la DLT à des doses allant de 100 nM-5 mM, qui activent la voie de stress dans le RE (Hossain et Richardson, 2011). La DLT active la voie de stress du RE par son interaction avec les canaux Na_p et le calcium, conduisant à l'initiation de la cascade apoptotique par activation de la calpain-1 de la caspase-12 (Figure 25).

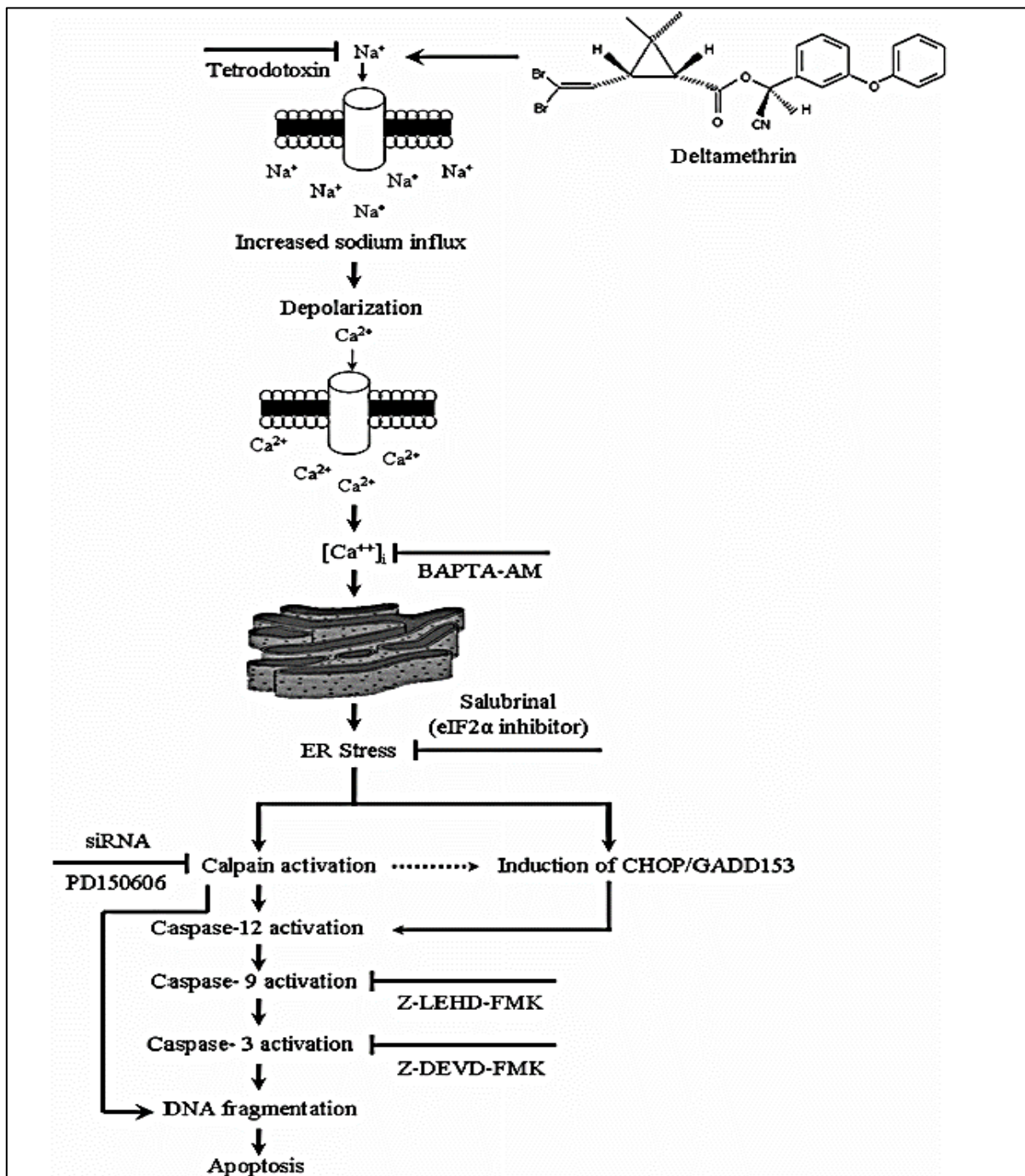


Figure 25. La voie de signalisation de stress par la DLT (Hossain et Richardson, 2011).

L'activation persistante de la voie de stress RE est liée à la perte progressive des neurones entraînant une neurodégénérescence et un dysfonctionnement cognitif, ce qui peut être le résultat de la réduction de la plasticité synaptique et la viabilité neuronale dans l'hippocampe.

Donc l'exposition répétée à la DLT provoque le stress RE de l'hippocampe et des déficits d'apprentissage chez la souris adulte. De plus, ces effets étaient associés à une diminution de la prolifération des cellules dans le gyrus denté (DG) de l'hippocampe, suggérant un effet potentiel sur la neurogénèse hippocampique chez l'adulte (Hossain et Richardson, 2011).

2.5. Action des pyréthriinoïdes sur le statut Redox

L'induction du stress oxydatif est l'un des principaux mécanismes de nombreux PYRs. Lors de l'exposition à la DLT, des espèces réactives d'oxygène (ROS) sont générées et entraînent une oxydation. La peroxydation lipidique entraîne des changements dans la structure des protéines et de l'ADN et une influence sur le système de défense antioxydant (Mani et al., 2014). Des études ont démontré que la DLT induit un stress oxydatif dans des tissus fonctionnellement différents, prouvé par l'augmentation du taux de MDA, accompagnée d'une diminution simultanée des taux d'enzymes antioxydantes, notamment la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion réductase (GR) (Shivanoor et David, 2014). Par ailleurs, l'administration de la DLT à la dose de 15mg / kg a modifié les paramètres biochimiques du foie chez la rate ainsi qu'une régression de l'activité de la cytochrome P₄₅₀ et d'autres molécules antioxydantes (Kumar et singh, 2015).

2.6. Action des pyréthriinoïdes sur le dysfonctionnement mitochondrial

Les mitochondries jouent un rôle important dans le métabolisme énergétique de la cellule, le dysfonctionnement mitochondrial et le stress oxydatif, entraînant divers troubles neurodégénératifs. Les mitochondries se trouvent dans toutes les cellules eucaryotes, elles ont pour rôle de produire de l'énergie cellulaire sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) par phosphorylation oxydative et seraient dérivées évolutivement de la fusion d'organismes procaryotes et eucaryotes (Frey et Mannella, 2000). Elles sont également impliquées dans la régulation de la mort cellulaire par l'apoptose, l'homéostasie du calcium, la biosynthèse de l'hème et la formation et l'exportation de clusters fer-soufre [Fe-S] et interagit également dans le contrôle de la division et de la croissance cellulaires. Après excitotoxicité et autres agressions neurodégénératives, les mitochondries absorbent le calcium, ce qui entraîne une augmentation de la production de ROS. En conséquence, les cellules neuronales sont confrontées à des quantités excessives de ROS. Ces ROS entraînent une réduction de la production d'ATP mitochondrial, une augmentation des mutations de l'ADN mitochondrial, une augmentation des structures anormales des crêtes mitochondriales et une altération du taux de calcium intracellulaire (Reddy et Beal, 2005). L'augmentation de la production de ROS avec dysfonctionnement mitochondrial affecte finalement les neurones et accélère le processus neurodégénératif (Mani et al., 2017).

L'exposition à la DLT a provoqué une altération de l'activité du complexe enzymatique mitochondrial, comme l'indique la diminution des activités du (complexe-I) NADH déshydrogénase (NADH-DH), (complexe-II) succinate déshydrogénase, (complexe-III)

cytochrome-C- oxydase, isocitrate déshydrogénase, α -cétoglutarate déshydrogénase et malate déshydrogénase. Il est bien connu que ces enzymes sont impliquées dans la production d'énergie (ATP), par la phosphorylation oxydative qui se produit dans les mitochondries. Dans les lésions mitochondriales induites par la DLT, les radicaux libres et le stress oxydatif ont un rôle majeur, ainsi la toxicité des ROS induite par les radicaux libres arrête la phosphorylation oxydative mitochondriale et le cycle de Krebs, bloquant la production de l'ATP mitochondrial. La DLT améliore également le niveau de LPO de la bicouche phospholipide mitochondriale dans laquelle la chaîne respiratoire est intégrée. Ainsi, les enzymes du cycle respiratoire auraient pu être affectées par les radicaux libres formés par la DLT. La formation de ROS induit une perte de transition de perméabilité mitochondriale, ce qui conduit à la libération de cyt-C mitochondrial. Une diminution de la concentration de cyt-C entraîne une diminution de l'absorption d'oxygène, entraînant une faible fréquence respiratoire. Ainsi, la réduction de la teneur en cytochromes mitochondriaux entraîne une perte des activités de capacité de phosphorylation oxydative. La diminution induite par la DLT des activités des enzymes NADH déshydrogénase est due à l'épuisement des équivalents réducteurs comme le NADH et le NADPH, qui sont utilisés pour la production de glutathion réduit pour chélater les dommages oxydatifs des composants mitochondriaux. L'atteinte mitochondriale induite par la DLT entraîne également une dys-régulation du Ca^{2+} et une activation de la production d'espèces d'oxyde d'azote (NOS). Cela pourrait être l'un des mécanismes potentiels d'amélioration de l'oxyde nitrique (NO) dans le cerveau vieillissant. Les radicaux libres de NO et d'oxygène réagissent avec le peroxy-nitrite (ONOO^-) pour provoquer des dommages oxydatifs dans les mitochondries. Le dysfonctionnement mitochondrial induit par la DLT conduit à la vulnérabilité du stress oxydatif et donc, le stress déclenche une voie de mort cellulaire en aval qui conduit à l'apoptose neuronale (Mani et al., 2017).

Récemment, Kumar et al. ont également signalé que l'exposition chronique à la DLT peut provoquer des dommages au métabolisme énergétique mitochondrial dans les différentes régions du cerveau du rat (Kumar et al., 2016).

2.7. Action des pyréthrinoïdes sur le stress oxydatif

Le stress oxydatif joue un rôle majeur dans la toxicité induite par la DLT chez les mammifères. Le stress oxydatif est le terme utilisé pour décrire un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et le système enzymatique antioxydant qui conduit à la LPO dans les membranes cellulaires, mitochondriales et nucléaires, ainsi qu'à la dégradation des protéines cytosoliques et les dommages au niveau de l'ADN.

La DLT modifie l'équilibre entre la production de ROS et le système enzymatique antioxydant dans divers tissus et organes. Dans le foie et les reins de souris *albinos* mâles, la DLT à des doses de 5,6 et 18 mg / kg *in vivo* peut induire une peroxydation lipidique significative et fait diminuer les taux des enzymes antioxydantes observés par Rehman et al. (2014).

Dans tous les organes lymphoïdes ainsi dans le plasma des rats, un traitement à la DLT à 3 mg / kg *in vivo* fait diminuer le niveau d'enzyme antioxydante (CAT, GPx) et fait augmenter la peroxydation lipidique. Ensibi et al. (2013) ont également rapporté que la DLT à 0,08, 0,4 et 0,8 µg / L *in vitro* induit un stress oxydatif chez la carpe commune (un poisson).

À partir des résultats des études ci-dessus, nous concluons que le stress oxydatif induit par la DLT entraîne une altération du potentiel de la membrane mitochondriale qui peut entraîner l'activation des voies d'apoptose dépendantes et indépendantes de la caspase, comme le montre la figure 26 (Kumar et al., 2015).

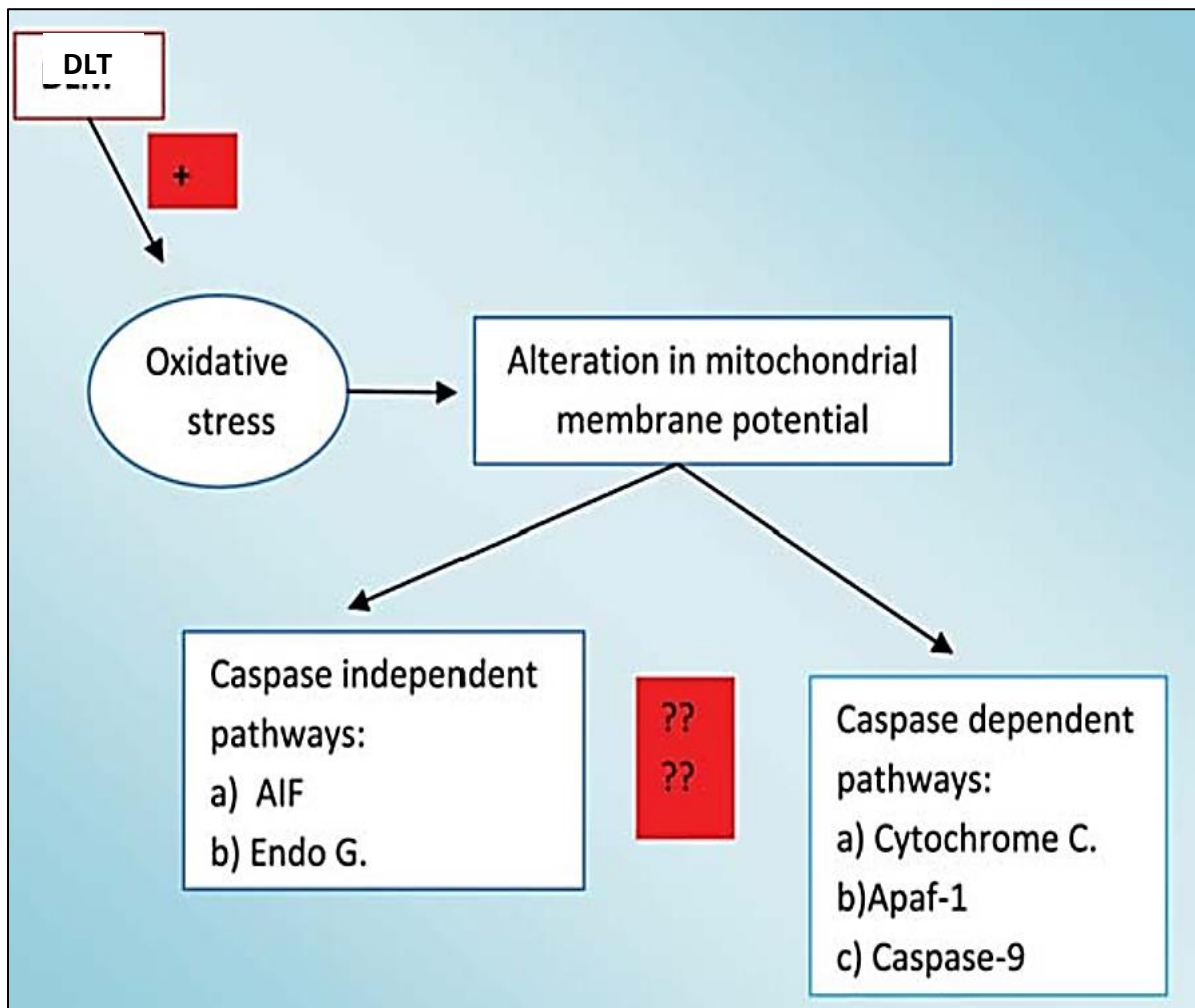


Figure 26. Les voies de signalisation du stress oxydatif induites par la deltaméthrine (Kumar et al., 2015).

3. Effets neurocomportementaux suite à l'exposition aux pyréthrinoïdes

Il a été constaté que l'exposition aux PYRs affecte les performances neurocomportementales, les systèmes de neurotransmetteurs chez l'Homme et les modèles expérimentaux. Des altérations de l'activité motrice et du comportement au cours du test du champ ouvert, ont été rapportées après exposition aux PYRs (Wolansky et al., 2005). Il pourrait exercer un stress oxydatif sur le cerveau impliquant les quatre principales régions cérébrales étudiées, à savoir le cortex frontal, l'hippocampe, le cervelet, et le corps strié qui sont responsables de la régulation des fonctions essentielles telles que l'apprentissage, la mémoire et l'activité locomotrice dans le cerveau adulte conduisant à une augmentation de l'anxiété et de la dépression. Un retard dans le développement des réflexes physiques, une diminution de l'activité motrice, et d'autres comportements associés aux modifications neurochimiques ont été signalés à la suite d'une exposition aux PYRs, conduisant à des altérations neurocomportementales chez les nourrissons et les adultes (Dayal et al., 2003).

La modulation dopaminergique induite par un médicament peut être détectée par les fréquences de locomotion et de redressements observés dans un champ ouvert. L'administration de la BF a altéré l'activité motrice des rats, comme en témoigne la réduction de la locomotion et des fréquences d'élevage en champ ouvert, qui peuvent être corrélées à la neurodégénérescence dopaminergique. Une diminution de la fréquence de ces paramètres indique une diminution du comportement exploratoire et / ou anxiogène. La dopamine est connue pour être un neurotransmetteur anxiolytique ; de faibles niveaux de dopamine peuvent donc être la raison du comportement semblable à l'anxiété observée après administration de la BF per os à 3.5mg/kg et 7 mg/kg pendant 30 jours (Syed et al., 2017).

L'exposition à la DLT provoque une réduction de la mémoire de reconnaissance, une altération de la discrimination pour les objets, une anxiété qui exprime un comportement de peur dans les espaces ouverts dans lesquels ils sont forcés. Elle peut être due aux effets inhibiteurs de la DLT sur le GABA et l'ACHÉ, produisant une augmentation indirecte de la transmission neuronale excitatrice. L'exposition à la DLT provoque également une augmentation des comportements de congélation, de toilettage et de redressement, ce qui suggère que la DLT perturbe le SNC, ce qui augmente l'émotivité et l'activité exploratrice du rat. Donc, la réponse la plus importante à une émotivité accrue au cours du test du champ ouvert est le comportement de congélation, avec une diminution consécutive de la fréquence de locomotion, parallèlement à une augmentation de l'immobilité, ce qui indique une déficience

motrice liée au blocage de la fonction dopaminergique. Des altérations du comportement en plein champ, de l'activité motrice et du comportement opérant ont été signalées suite à une exposition aux PYRs. L'exposition à la DLT provoque des troubles de la marche tels que la réduction de la vitesse de la marche, un angle de pied modifié, des motifs de chevauchement des pieds, une incapacité à marcher sur une piste en grille. Des troubles de la marche sont couramment observés chez les sujets atteints de la maladie de Parkinson résultant d'une dégénérescence des neurones dopaminergiques (DA) dans le substantianigra (SN). Le comportement altéré de la locomotion induit par la DLT est dû à l'inhibition de l'ACHé et à l'accumulation de l'ACh, aux jonctions synaptiques, ce qui perturbe la coordination entre les jonctions nerveuses et musculaires provoquant une neurotoxicité (Mani et al., 2017).

Chapitre 3. La quercétine

Au cours de la dernière décennie, les flavonoïdes ont suscité un intérêt scientifique croissant en raison de leurs fonctions biologiques bénéfiques, telles que les propriétés antioxydantes, antiprolifératives et anti-inflammatoires (Lu et al., 2006 ; Kaur et al., 2019). En fonction de leur structure chimique, les flavonoïdes sont classés en chalcones, dihydrochalcones, auronés, flavones, flavonols, dihydroflavonols, flavanols, flavandiols, anthocyanidines, isoflavonoïdes, biflavonoïdes et autres structures hautement polymérisées (Oteiza et al., 2005). La quercétine (QUER), 3, 5, 7,3', 4'-pentahydroxylflavone (figure 27), est une composante majeure de sous-classe de flavonol et représente 60 à 75% du total apport de flavonoïdes, présente principalement sous forme de glycosides, qui sont particulièrement abondants dans l'oignon (0,3 mg / g de poids frais) et le thé (10–25 mg / L) (Ishisaka et al., 2011). C'est avant tout conjugué à un fragment de glucides et constitue l'épine dorsale d'autres flavonoïdes tels que la rutine, l'héspéridine, la naringinine et la tangéritine (Yao et al., 2012 ; Suganthy et al., 2016). Elle peut exercer des actions bénéfiques sur le SNC telles que la neuroprotection et l'amélioration de l'effet cognitif (Priprem et al., 2008).

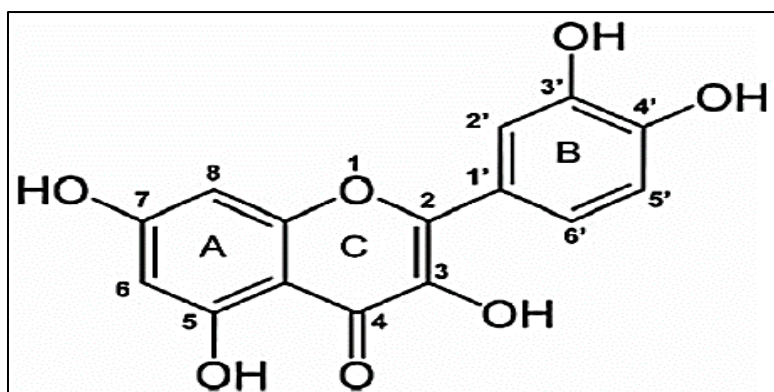


Figure 27. Structure de la quercétine (Ulusoy et Sanlier, 2019).

1. Quercétine : absorption, métabolisme et biodisponibilité

Les mécanismes d'absorption et de métabolisme ne sont pas encore complètement compris, mais semblent être similaires pour tous les flavon-glycosides, c'est-à-dire la déglycosilation dans l'intestin grêle et, après absorption passive, la glucuronidation de la QUER aglycone (Paulke et al., 2006). L'aglycone de la QUER subit des effets importants et des réactions de biotransformation étendues pour former des glucuronides, des sulfates, et des métabolites méthylés, indiquant une implication des enzymes de la phase II : UGT (uridine 5-diphosphoglucuronosyltransferase), SULT (sulfotransférase) et COMT (catechol-O-méthyltransférase) (Halder et al., 2019). Pour tous les flavonoïdes, la flore intestinale joue un rôle crucial dans l'absorption ; la dégradation de la QUER par de nombreuses bactéries (*Eubacterium ramulus*, *Clostridium orbiscindens*, *Eubacterium oxydoreducens*) a été signalée. La QUER se transforme en composés phénoliques de faibles poids moléculaire facilement absorbables tels que l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique, l'acide 3- (3-hydroxyphényl) propionique, l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque et l'acide 4-hydroxybenzoïque (Ulusoy et Sanlier, 2019).

Des études chez les rats et les porcs ont montré que la QUER se distribue dans plusieurs tissus, en particulier le poumon, le rein, le côlon et le foie et avec des niveaux inférieurs dans le cerveau. La QUER totale dérivée de l'alimentation est normalement présente dans le plasma (<100 nM) mais peut augmenter à la faible concentration micro molaire après supplémentation de la QUER l'aglycone ou les glycosides (Babaei et al., 2018).

La demi-vie des métabolites de la QUER varie entre 11 et 28 h, ce qui est considérée élevée. En outre, la QUER a une biodisponibilité élevée par rapport à d'autres composés phytochimiques. La consommation de la QUER à partir de suppléments au lieu d'aliments pendant les repas diminue sa biodisponibilité. En général, la biodisponibilité de la QUER varie considérablement chez les individus, seules des quantités limitées d'aglycone de la QUER sont trouvées après l'ingestion de la QUER, Les métabolites de la QUER se trouvent dans le plasma humain sous forme de glucuronide ou de sulfate (méthylés ou non méthylés, respectivement) (Ulusoy et Sanlier, 2019). Des études ont montré que les métabolites glucuronidés ont des capacités antioxydantes *in vitro* et *in vivo*. Un problème important pour l'utilisation potentielle de la QUER est de savoir si elle traverse la barrière hémato-encéphalique et à quelles concentrations de QUER et / ou de ses métabolites sont présents dans le tissu cérébral. Des études *in vitro* chez le rat indiquent systématiquement que la QUER pénètre dans le cerveau. Lors de l'administration de la QUER *in vivo* aux rats et aux porcs, des niveaux faibles (de

picomolaire à nanomolaire) sont trouvés dans le tissu cérébral (Cho et al., 2006). Les intérêts à cet égard sont intéressants, les récents efforts ont réussi à augmenter la biodisponibilité de la QUER. En particulier, la formulation de la QUER dans les nanoparticules lipidiques augmente considérablement sa pénétration dans le cerveau (Costa et al., 2016). L'excrétion de la QUER se fait par les fèces et l'urine. Elle peut également être éliminée des poumons lorsqu'elle est prise à fortes doses, les produits excréteurs de la QUER sont l'acide 3-hydroxy phénylacétique, l'acide hippurique et l'acide benzoïque (Ulusoy et Sanlier, 2019).

2. Effets neuroprotecteurs de la quercétine

Des épreuves complètes appuient l'idée que les régimes riches en polyphénols et / ou supplémentation avec des composés spécifiques peuvent fournir des effets bénéfiques sur la santé. En particulier, les polyphénols ont montré qu'ils exercent des actions de protection dans plusieurs pathologies telles que les maladies neurodégénératives. Des preuves spécifiques existent sur les effets neuroprotecteurs de la QUER. Plusieurs études montrent que l'administration de la QUER peut exercer une neuroprotection et antagoniser le stress oxydatif *in vivo*. Par exemple, l'administration orale de la QUER (0,5- 50 mg / kg) a été montrée capable de protéger les rongeurs contre le stress oxydatif et la neurotoxicité induite par le chlorpyrifos. L'activité piégeante des radicaux libres de la QUER est due à son nombre élevé de substitutions hydroxyles qui, en outre, est en corrélation avec sa capacité à donner des électrons (Kaur et al., 2019). La QUER a également antagonisé les troubles cognitifs induits par un régime riche en matières grasses chez la souris (Lakroun et al., 2015 ; Costa et al., 2016). La QUER a éventuellement exercé un effet protecteur sur les troubles cognitifs induits par la colchicine et les troubles de la mémoire induits par la streptozotocine intracérébrale chez les animaux en réduisant les paramètres du stress oxydatif (Halder et al., 2019).

Partie expérimentale

Chapitre I : Evaluation régionale du statut redox et l'intégrité des mitochondries du cerveau chez les rats exposés chroniquement à de faibles doses de pyréthrinoides et effet préventif de la quercétine

1. Introduction

Les PYRs n'ont pas seulement une activité biologique naturelle de tuer les insectes (Ding et al., 2012), mais se caractérisent aussi par une biodégradation rapide et une faible toxicité chez les mammifères et l'homme. Malgré cette faible toxicité, leur utilisation abusive et non contrôlée à long terme peut induire des problèmes de santé comme la cancérogénicité, la neurotoxicité, la génotoxicité et la toxicité du développement chez l'homme et l'animal domestique (Sharma et al., 2018). Leur mode d'action dépend de leur pouvoir de se lier aux canaux sodiques voltage-dépendant, de les perturber et de provoquer ainsi l'effet neurotoxique (Soderlund, 2012), Leur effet passe certainement, au moins en partie, par une augmentation du stress oxydatif, une exacerbation de certains processus intracellulaires comme l'agrégation de l' α -synucléine (protéine abondante dans le cerveau humain), et une altération des fonctions énergétiques mitochondriales. Cependant, il est encore très difficile à ce jour de tirer des conclusions sur ces PYRs à utilisation très répandue. Compte tenu des problèmes de santé publique et des polémiques autour de leur usage, il devient urgent de développer des études de toxicité chronique pour identifier les mécanismes précis qui pourraient associer l'exposition aux PYRs et la survenue de pathologies neurodégénératives chroniques.

Sur la base de ces données, cette étude porte sur la recherche d'effet toxique de deux PYRs, très utilisés dans la région agricole de Jijel : la deltaméthrine et la bifenthrine, afin d'évaluer leurs effets neurotoxiques au niveau des différentes régions du cerveau, telles que l'hippocampe, le striatum, le cortex et le cervelet ; et de montrer le lien entre le mécanisme moléculaire en termes de stress oxydatif et l'intégrité mitochondriale, vu que la signalisation apoptotique est très souvent médiée par des perturbations structurales mitochondriales, en plus de chercher le rôle protecteur de la quercétine autant que substance antioxydante.

2. Matériels et méthodes

2.1. Produits chimiques

Les PYRs utilisés dans cette étude étaient deux pesticides : la bifenthrine (BF) à la dose de 1/50 de la DL50 (3,72 mg / kg) et la deltaméthrine (DLT) à la dose de 1/50 de la DL50 également (2,6 mg / kg). Les doses mortelles de BF et de DLT considérées dans ce travail sont

rapportées par Bavoux et al. (2007) et Beausoleil et al. (2009). La majorité des produits chimiques ont été achetés auprès de Sigma Aldrich, Allemagne. Bifenquick® et Deltajet® sont les noms commerciaux des pesticides utilisés, achetés respectivement d'United Phosphorus et Heranba Industries Limited, Inde. Ces pesticides sont en concentré organique-aqueux, solution composée d'essence à 25%, de tétrapropylène benzène sulfonate 1% et de méthylpropanol 1%. Selon les instructions du fabricant, les solutions de pesticides ont été diluées dans l'eau distillée pour obtenir le dosage souhaité des pesticides en quantité suffisante pour une administration quotidienne pendant 6 mois.

En outre, la quercétine a été dissoute et mélangée avec la solution des pesticides car cette solution contient principalement du pétrole où elle est soluble (Nollet et Toldrá, 2012 ; Doshi et Une, 2016) et ensuite, elle a été co-administrée avec les pesticides à des groupes préventifs. En outre, le solvant organique-aqueux a été préparé, sans pesticides, selon sa composition afin d'évaluer sa toxicité chez le rat.

2.2. Choix des doses

Deux insecticides (la bifenthrine et la deltaméthrine) largement utilisés dans les régions agricoles de la wilaya de Jijel en Algérie ont été choisis pour effectuer cette étude. Ils sont utilisés seuls ou en mixture à des doses consécutives de 3,72 mg/kg/jour et 2,6mg/kg/jour administrées chroniquement par voie orale par gavage intra-gastrique, véhiculé par l'huile de maïs, pendant 120 jours, le poids des rats et pris chaque semaine pour adapter la dose administrée avec le poids de chaque rat. Ces doses choisies correspondent à 1/50 de la DL 50 de chaque insecticide évalué chez les rats femelles, elles sont considérées comme des faibles doses selon des études récentes (Arora et al., 2016 ; Mekircha et al., 2018).

Il est à mentionner que ces doses sont très proches à des doses réellement présentes dans l'environnement ; et sont susceptibles de contaminer la population générale, par exemple la teneur des résidus trouvée dans les produits agricoles en France après l'emploi de la BF avec 3 jours à 1 mois varie entre 0,05 et 10 mg/kg, après l'emploi de la DLT avec 3 jours à 3 mois est considérée par 0,02 à 5 mg/kg (Testud et Grillet, 2007). La DL50 de la DLT est 130 mg/kg, et la DL50 de la BF est 186 mg/ kg selon la littérature (Mesters et Mesters, 1992 ; Bavoux et al. 2007 ; EFSA, 2011). Par ailleurs, la dose de la QUER utilisée en traitement préventif des animaux contre la toxicité des pesticides utilisés est choisie selon le poids moléculaire autant que molécule contre molécule, elle était de 5mg/kg/j pour le traitement par un pesticide seul ; et 10 mg/kg/j pour la mixture selon des études récents (Gasmi et al. 2017).

2. 3. Traitement d'animaux

Des rats Wistar femelles pesant entre 200 et 250 g, provenant de l'institut Pasteur (Algérie). À leur arrivée, les rats ont été logés, huit par cage. Les animaux ont été maintenus 12 heures par jour de cycle lumière / obscurité à température constante ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), une valeur relative d'une humidité de $55 \pm 10\%$ et un libre accès à la nourriture et à l'eau. Les rats ont été adaptés pendant 2 semaines avant les traitements indiqués. Tous les tests expérimentaux ont été réalisés conformément aux directives internationales pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire.

Dans cette étude, les animaux ont été divisés en huit groupes de huit rats chacun :

- Groupe témoin recevant de l'eau distillée (1ml).
- Groupe solvant recevant un mélange de solvants (essence 32,5 mg / kg, tétrapropylène benzène sulfonate 1,3 mg / kg et méthylpropanol 1,3 mg / kg)
- Groupe BF recevant 3,72 mg / kg de bifenthrine.
- Groupe DLT recevant 2,6 mg / kg de deltaméthrine.
- Groupe MIX recevant un mélange de bifenthrine et de deltaméthrine ($3,72 + 2,6$ mg / kg).
- Groupe BF + QUER recevant un mélange de bifenthrine et de quercétine ($3,72 + 5$ mg / kg).
- Groupe DLT + QUER recevant un mélange de deltaméthrine et quercétine ($2,6 + 5$ mg / kg).
- Groupe BF + DLT + QUER recevant un mélange de bifenthrine, deltaméthrine et quercétine ($3,72 + 2,6 + 10$ mg / kg), respectivement.

Le traitement est effectué par l'administration des solutions préparées par gavage gastrique en utilisant une sonde attachée à une seringue chaque jour pendant 6 mois.

2.4. Prélèvement des échantillons

2.4.1. Sacrifice des animaux et extraction du cerveau

A la fin de la période d'administration des pesticides et de la quercétine (BF, DLT et QUER) de 04 mois, et après un jeûn d'une nuit, les animaux sont sacrifiés par décapitation. Ensuite les cerveaux ont été rapidement prélevés après ouverture crânienne, rincés par le tampon de lavage à froid, puis séchés à basse température (4°C) par du papier semi-absorbant.

2.4.2. Dissection des cerveaux

Le cerveau est d'abord disséqué en trois sections : l'hémicéphale droit, l'hémicéphale gauche, et la dernière partie qui correspond à la partie inférieure qui est le cervelet et le tronc cérébral, ensuite les 04 régions du cerveau sont enlevées par l'ordre suivant :

- a. Le cervelet :** le cervelet est une imposante structure qui recouvre le tronc cérébral, pour l'isoler, il faut seulement le séparer doucement du tronc cérébral.
- b. L'hippocampe** est disséqué, à partir de la partie médiane inférieure qui se situe entre chaque hémisphère, il a globalement la forme d'un tube courbé, souvent comparé à une corne de bélier dans le repli du lobe temporal au niveau du mésencéphale.
- c. Le striatum :** le striatum correspond au tissu isolé plus profond que l'hippocampe sous le cortex, il se caractérise par un aspect strié et une structure asymétrique, prélevé à partir de chaque hémisphère.
- d. Le cortex :** le cortex est prélevé en faisant une coupe fine superficielle des deux hémicéphales, les tubercules olfactifs sont enlevés du cortex.

Chaque région servira pour extraire les mitochondries pour évaluer le gonflement, et la matrice mitochondriale afin de doser les paramètres du stress oxydatif : GSH, GST, CAT, et MDA.

2.5. Isolement des mitochondries et extraction de la matrice

Après 6 mois d'exposition, les rats ont été sacrifiés par décapitation après anesthésie avec du chloroforme ; les cerveaux ont été ensuite enlevés rapidement et disséqués immédiatement à froid, en quatre régions : l'hippocampe, le striatum, le cervelet et le cortex. Ces quatre régions sont considérées comme la source des suspensions mitochondriales nécessaires pour évaluer l'effet toxique des PYRs et également l'effet préventif de la quercétine sur le statut rédox des mitochondries du cerveau et l'intégrité membranaire de cette organelle subcellulaire. Les différentes zones du cerveau sont utilisées pour l'extraction des fractions mitochondriales selon la méthode décrite par Clayton & Shadel, (2014) avec de légères modifications. En bref, les tissus ont été lavés dans un tampon respiratoire froid, pH 7,4 (Tris 50 mM HCl, saccharose 250 mM, acide méthyl diamine acétique 1 mM (EDTA) 1 mM, 0,2% de BSA), puis hachées et homogénéisées dans trois volumes du même tampon et centrifugés à 3500 g pendant 10 min, ensuite le culot obtenu est resuspendu et recentrifugé dans les mêmes conditions. Les surnageants des deux centrifugations ont été mélangés et centrifugés à 15000 g pendant 20 min. Le culot obtenu a été lavé deux fois avec du tampon PB (Tris-HCl 50 mM, saccharose 250 mM), pH 7.4 dans les mêmes conditions ; les culots mitochondriaux résultants ont été mis en suspension dans 300 µl de tampon PB, la lecture de la DO de la suspension a été faite pour évaluer le gonflement mitochondrial, le reste a été congelé à -20 °C pour une utilisation ultérieure. La matrice mitochondriale a été préparée à partir de la suspension mitochondriale par congélation et décongélation avec des homogénéisations répétées afin d'éclater les mitochondries, suivie par une centrifugation à 10 000 g pendant 10 min, le surnageant obtenu

a été considéré comme la source des indicateurs du statut redox mitochondrial à savoir la CAT, glutathion-s-transférase (GST), le malondialdéhyde (MDA) et le glutathion (GSH).

2.6. Essai du gonflement mitochondrial

L'intégrité et la perméabilité de la membrane mitochondriale étaient évaluées à l'aide de la méthode décrite par Farhi (2015). Brièvement, après extraction des mitochondries à partir de tissus frais des différentes régions du cerveau à 4°C, des volumes de suspension mitochondriale sont distribués dans une cuve en quartz et l'absorbance est mesurée avec la méthode spectrophotométrique à 540 nm. La diminution de l'absorbance indique l'augmentation du gonflement mitochondrial, qui est le résultat de la perte du potentiel de la membrane mitochondriale et l'ouverture des pores de transition de perméabilité mitochondriale (PTP).

2.7. Évaluation du statut redox mitochondrial régional du cerveau

La teneur en protéines a été déterminée par la méthode Bradford (Bradford, 1976), en utilisant l'albumine de sérum bovin (BSA) comme standard (annexe1).

2.7.1. Evaluation de la peroxydation lipidique mitochondriale

La réaction de dosage du malondialdéhyde repose sur la formation en milieu acide et à chaud entre le malondialdéhyde et deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA), d'un pigment absorbant à 532 nm, extractible par les solvants organiques. Le résultat du dosage du malondialdéhyde par l'acide thiobarbiturique est donc la somme du MDA préexistant lié ou non aux molécules biologiques, des peroxydes lipidiques, des produits d'auto-oxydation des acides gras et autres substances qui donnent naissance soit à du MDA, soit à des molécules réagissant avec l'acide thiobarbiturique en milieu acide et à chaud. C'est pourquoi à la notion initiale de dosage du MDA s'est substituée la notion de substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (thiobarbituric acid reactive substances ou TBARS). L'extraction du dérivé MDA-(TBA)₂ est réalisée par le n-butanol à pH acide, cette opération permet d'éliminer en partie les interférents dans la réaction des TBARS. Pour évaluer la teneur mitochondriale en MDA, on a procédé selon la méthode décrite par (Okhawa et al., 1979). Brièvement, 0.5 ml de la fraction mitochondriale est additionné de 0.5 ml de TCA 20% et 0.5 ml de TBA 0.67%. Ce mélange est ensuite incubé pendant 15 min au bain-marie à 100°C, puis refroidi. Lorsque le mélange est froid, il est additionné de 4 ml de n-butanol puis centrifugé à 3000 g pendant 15 min. Le surnageant est ensuite récupéré et son absorbance est mesurée à 530 nm.

Le taux de MDA est déduit à partir d'une droite d'étalonnage préparée dans les mêmes conditions que les échantillons avec de 1, 1, 3, 3-tetraméthoxypropane « TEP ». La concentration en MDA est exprimée en nmol/mg/ml (annexe 2).

2.7.2. Dosage du taux de GSH mitochondrial

La méthode utilisée (Akerboom et Sies, 1981) est basée sur l'évaluation du contenu en groupement -SH par spectrophotométrie. Lors de l'oxydation des protéines, les groupements SH sont oxydés et forment des ponts disulfures S-S (Figure 28).

Le principe du dosage des groupements -SH est basé sur leur réaction avec le réactif d'Ellman, le 5-5'-DiThiobis (2-acide NitroBenzoïque) (DTNB) pour former des quantités stœchiométriques de TNB (thionitrobenzoate), un composé jaunâtre ayant une densité optique maximale à $\lambda = 412$ nm.

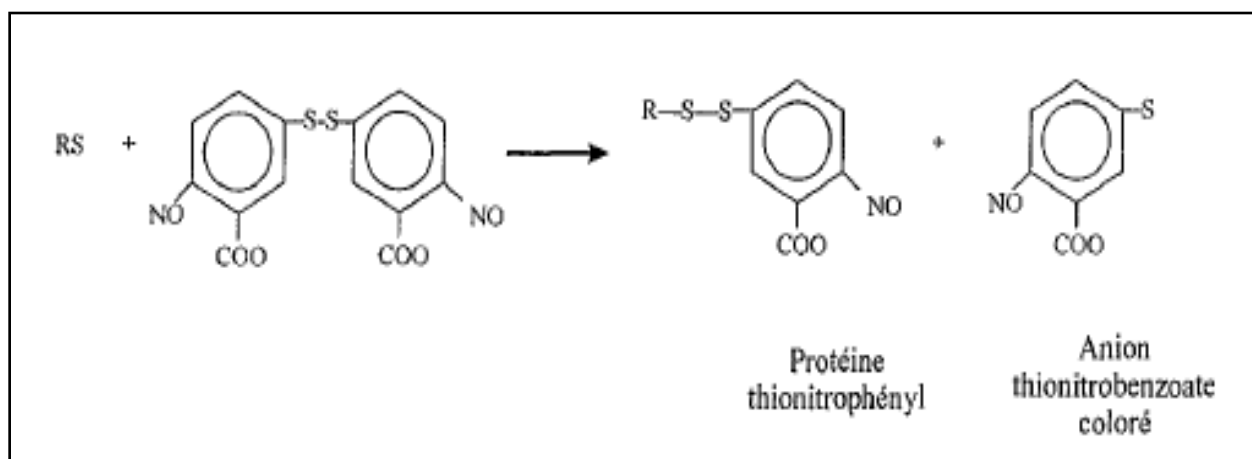


Figure 28. Schéma de la réaction entre le DTNB et les groupements -SH (Akerboom et Sies, 1981).

75 μ l de la fraction cytosolique sont additionnés à 5 ml de tampon phosphate 0.1 M, pH=8. Après agitation, on prélève 2 ml de ce mélange auquel on ajoute 20 μ l de la solution de DTNB 0.01M. Après incubation pendant 15 minutes à température ambiante l'absorbance est lue à 412 nm.

Le taux de GSH est déduit à partir d'une courbe d'étalonnage préparée dans les mêmes conditions (annexe2), et dans laquelle l'absorbance est une fonction linéaire de la concentration en GSH (μ mol/ml). Les résultats sont exprimés en μ mol/mg de protéines.

2.7.3. Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale

L'activité enzymatique de la CAT est déterminée par la méthode de Claiborne (1985). Le principe de cette méthode est basé sur la disparition du H₂O₂ en présence de la source

enzymatique à 25°C. 1 ml de tampon phosphate 0.1 M, pH 7.2 a été additionné de 0.95 ml de peroxyde d'hydrogène 0.019 M et 25 µl fraction cytosolique. Puis l'absorbance a été mesurée par spectrophotométrie à 240 nm pendant 2 minutes.

La cinétique de la CAT n'obéissant pas au model Michaelien, on n'a pas utilisé la loi de Beer-Lambert. La constante de vitesse de la CAT est définie par la relation :

$$K = \frac{2,3033 * \log \left(\frac{A_1}{A_0} \right)}{\Delta t}$$

A₀ : absorbance à 0 min

A₁ : absorbance au moment "t"

Δt : intervalle de temps

K : UI

L'activité enzymatique est exprimée en unités UI/g de protéines.

2.7.4. Evaluation de l'activité de GST mitochondriale

L'activité de la GST a été évaluée selon la méthode de Habig et al. (1974) qui consiste à fournir à l'enzyme un substrat, en général du chlorodinitrobenzène (CDNB), qui réagit facilement avec de nombreuses formes de GST et de glutathion, un mélange de 850 µl de tampon phosphate à 0,1 M de pH 6,5 et de 50 µl de CDNB à 20 mM a été préparé et incubé à 37°C pendant 10 min. La réaction est déclenchée par l'addition à ce mélange de 50 µl d'une solution de GSH à 20 mM et 50 µl de fraction cytosolique. Un contrôle est préparé dans les mêmes conditions avec du tampon phosphate. L'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à 340 nm toutes les minutes pendant 5 min. Les résultats sont calculés selon la formule suivante :

$$\text{Enzyme (UI/ml)} = \frac{(\Delta A_{340}/\text{min test} - \Delta A_{340}/\text{min blanc})}{V_t \times F_d \times 9.6 \times V_e}$$

V_t : volume total (ml) de l'essai.

F_d : facteur de dilution.

9.6 : coefficient d'extinction molaire (mM de glutathion- Chlorodinitrobenzène conjugué à 340 nm).

Ve : volume (ml) de l'enzyme utilisée.

Les résultats sont exprimés en UI/mg de protéines.

2.8. Analyses statistiques

Les résultats obtenus des évaluations et dosages biochimiques des différents paramètres sont exprimés en moyenne \pm SEM (n = 8). Le test de Bonferroni a été utilisé pour la multiple comparaisons. La signification statistique a été fixée à $p < 0,05$. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant Minitab, version 16.

3. Résultats

3.1. Évaluation du gonflement mitochondrial *in vivo*

Dans cet essai, la diminution de l'absorbance à 540 nm indique l'augmentation du gonflement mitochondrial. Les résultats de l'évaluation du gonflement mitochondrial ont montré une diminution significative ($p < 0,001$; $p < 0,01$; $p < 0,05$) de la densité optique des suspensions mitochondriales extraites fraîchement de l'hippocampe et du striatum dans la majorité des groupes traités par les pesticides. Mais, lorsque la QUER a été co-administrée avec les PYRs, ce composé phénolique a empêché la diminution de l'absorbance sauf dans le cas du groupe traité par DTL+QUER dans la région de l'hippocampe, aussi dans le groupe traité par BF+QUER dans la région du striatum et cela par rapport aux groupes témoins et aux groupes solvants.

Dans le cortex, le gonflement des mitochondries a considérablement augmenté ($p < 0,001$; $p < 0,01$), qui se traduit par la diminution de la valeur de l'absorbance dans la suspension mitochondriale dans les deux groupes, BF et Mixture. En même temps, quand la QUER a été co-administrée avec ces pesticides, elle a empêché la perte de la valeur de l'absorbance uniquement dans le groupe traité BF-Que. Et cela par rapport au groupe témoin et au groupe de solvant. Dans le cervelet, l'évaluation du gonflement a enregistré une augmentation significative ($p < 0,05$) uniquement chez le groupe traité par MIX (Tableau 4).

Tableau 4. Le gonflement des mitochondries évalué par la décroissance de la densité optique dans les différentes régions du cerveau (hippocampe, striatum, cortex, cervelet) chez le rat, exposés à long terme à DLT, BF et leurs mixture associés ou non à la QUER.

Traitement	Régions du cerveau			
	Hippocampe	Striatum	Cortex	Cervelet
Témoin	0.973 ± 0.070	0.712 ± 0.074	1.115 ± 0.049	0.661 ± 0.047
Solvant	0.899 ± 0.068	0.75 ± 0.068	1.163 ± 0.051	0.652 ± 0.059
BF	0.672 ± 0.027****a,b	0.48 ± 0.084**a,b	0.981 ± 0.082**a,b	0.675 ± 0.077
BF + QUER	0.904 ± 0.074	0.647 ± 0.055***a,***b	1.082 ± 0.111**a,b	0.67 ± 0.086
DLT	0.485 ± 0.072****a,b	0.597 ± 0.042**a,b	1.169 ± 0.049	0.614 ± 0.075
DLT + QUER	0.652 ± 0.0708****a,b	0.7 ± 0.069	1.29 ± 0.191	0.682 ± 0.075
Mixture	0.508 ± 0.059****a,b	0.476 ± 0.099**a,b	0.781 ± 0.082****a,b	0.754 ± 0.04**a,b
Mixture + QUER	0.893 ± 0.088	0.731 ± 0.092	0.771 ± 0.091***a,b	0.677 ± 0.057

3.2. Évaluation de la peroxydation lipidique *in vivo* dans les mitochondries du cerveau

Les résultats de l'évaluation du taux de MDA mitochondriale dans différentes zones du cerveau, obtenus après une exposition chronique chez le rat sont illustrés par la Figure 29. Dans l'hippocampe et le striatum, le taux de MDA a augmenté de manière significative ($p < 0,001$) chez tous les groupes traités, sauf chez le groupe traité par BF+QUER dans la région de l'hippocampe où il a été maintenu à son niveau normal, en même temps, ce groupe a présenté une diminution significative ($p < 0,001$) de la valeur de MDA dans le striatum. Dans le cortex et le cervelet, les résultats de l'évaluation du MDA dans la matrice mitochondriale ont montré une augmentation significative ($p < 0,001$) chez tous les groupes traités, sauf chez le groupe BF-QUER dans les deux régions par rapport au contrôle. Cependant, les résultats de la présente étude ont enregistré une différence significative entre le groupe témoin et le groupe préventif.

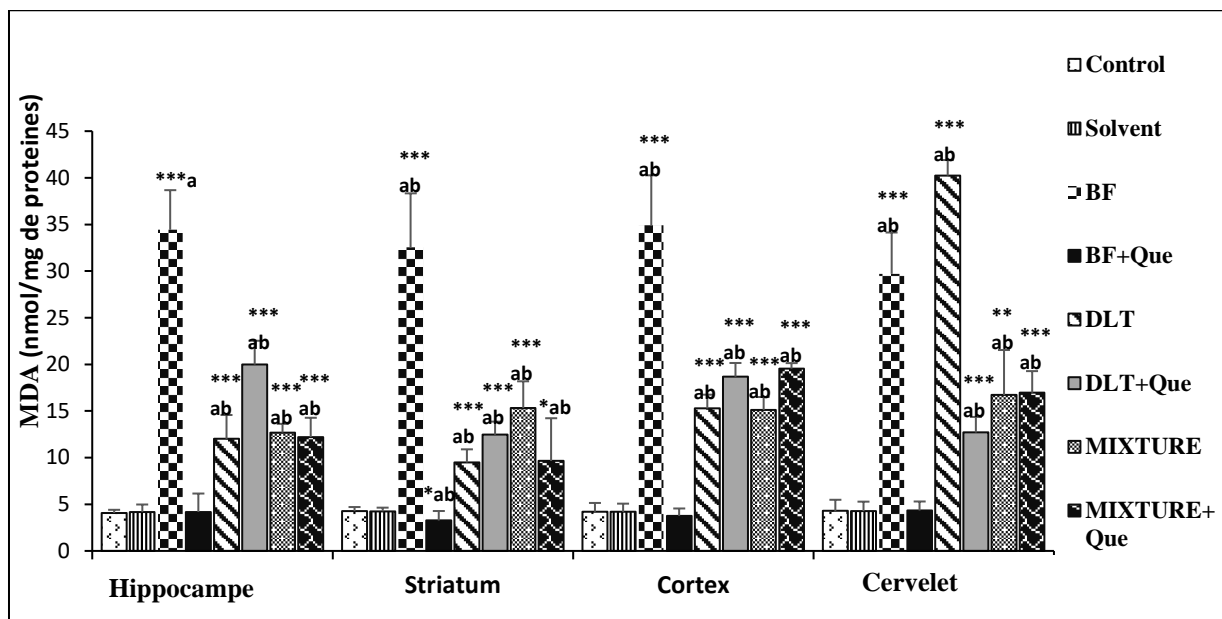


Figure 29. Variation du taux de MDA mitochondrial sous l'effet de BF, DLT et leur mixture associée ou non à la quercétine dans les différentes régions du cerveau des rats (hippocampe, striatum, cortex et cervelet). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ($n = 8$). Le test de Bonferroni a été utilisé pour des comparaisons multiples. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$; statistiquement significatif par rapport au contrôle; **a** la comparaison avec les groupes témoins et traités et **b** la comparaison avec le solvant.

3.3. Evaluation du GSH mitochondrial dans les différentes régions du cerveau

Les résultats de l'évaluation des variations des niveaux de GSH, dans les différentes régions du cerveau suite à l'exposition aux pesticides associés ou non à la quercétine, sont illustrés dans la figure 30. Le GSH mitochondrial de l'hippocampe, a significativement augmenté ($p < 0,001$; $p < 0,01$) dans tous les groupes traités par les pesticides par rapport aux rats solvants et témoins. Mais lorsque la quercétine est coadministrée avec BF et DLT, cet épuisement du GSH n'a pas été empêché, de sorte que les résultats ont montré également une diminution significative ($p < 0,05$) des niveaux de GSH par rapport aux groupes témoin et solvant. En même temps, ce composé phénolique a empêché la variation de la valeur GSH dans le groupe traité par DLT+QUER par rapport au groupe témoin. Au niveau du striatum, le taux de GSH a diminué de façon significative ($p < 0,001$; $p < 0,01$) dans tous les groupes traités par BF, DLT et la mixture, sauf dans les groupes traités par BF et DLT où il a considérablement diminué ($p < 0,01$) mais il a été maintenu à son niveau normal chez le groupe traité par la MIX+QUER et cela par rapport aux groupe témoin et aux groupe solvant. Dans le cortex, le taux de GSH dans la matrice mitochondriale a significativement diminué ($p < 0,01$; $p < 0,05$) dans les groupes traités par BF, DLT et la mixture, mais il a augmenté dans le lot traité par DLT+QUER et la MIX+QUER et cela par rapport aux groupes témoin et solvant. Au niveau du cervelet, les résultats de cette étude ont montré une réduction significative du taux de GSH

($p < 0,01$; $p < 0,05$) dans tous les groupes traités, sauf chez groupe traité par BF+QUER où ce tripeptide a été maintenu à son taux normal par rapport aux groupes solvant et témoin.

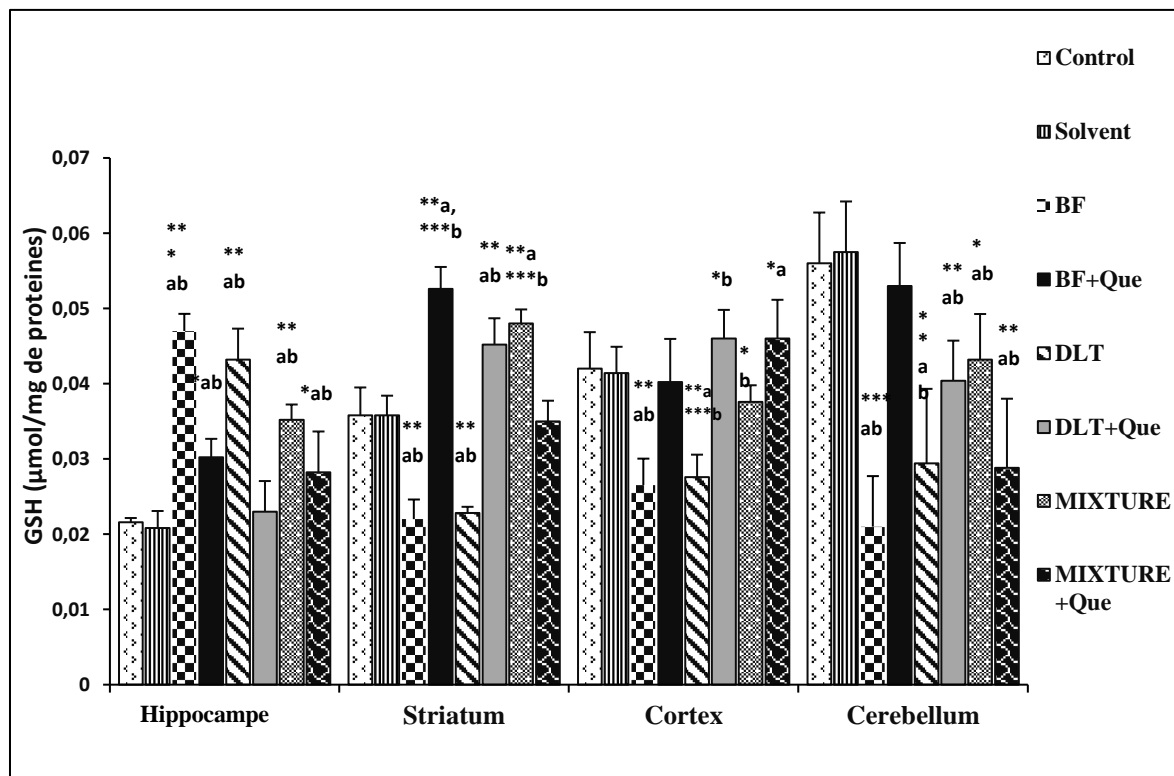


Figure 30. Variation du taux de GSH mitochondrial sous, l'effet de DLT, BF et leur mixture associé ou non à la quercétine dans les différentes régions du cerveau des rats (hippocampe, striatum, cortex et cervelet). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ($n = 8$). Le test de Bonferroni a été utilisé pour des comparaisons multiples. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$; statistiquement significatif par rapport au contrôle ; **a** une comparaison avec le témoin et **b** comparaison avec le solvant.

3.4. Évaluation des enzymes antioxydantes dans les mitochondries cérébrales, CAT et GST

Dans l'hippocampe, l'évaluation de l'activité de la CAT a montré une diminution significative ($p < 0,001$; $p < 0,01$; $p < 0,05$) dans tous les groupes traités aux PYRs, mais lorsque la quercétine est coadministrée avec BF et DLT, il ne produit aucune variation de l'activité de la CAT, sauf dans le groupe traité au DLT+QUER par rapport aux groupes témoins et aux groupes solvants. Dans le striatum et le cortex, l'activité de CAT a significativement diminué ($p < 0,001$; $p < 0,01$). Cependant, quand QUER a été coadministrée avec les PYRs, cette réduction de l'activité enzymatique n'a pas été empêchée, sauf chez les rats exposés à la mixture des PYRs, par contre QUER a pu maintenir cette activité enzymatique à son niveau normal. Dans le cervelet, les résultats de cette étude ont également montré une réduction de l'activité de CAT dans les groupes traités aux pesticides, mais QUER a vraiment fait augmenter cette activité enzymatique dans tous les groupes préventifs par rapport aux groupes contrôle et solvant (Tableau 5).

Tableau 5. L'activité de la CAT mitochondriale dans les différentes régions du cerveau (Hippocampe, Striatum, Cortex et Cervelet) chez les rats traités de façon chronique à DLT, BF et leur mélange associé ou non à la QUER (UI/mg de protéines).

Traitement	Régions du cerveau			
	Hippocampe	Striatum	Cortex	Cervelet
Témoin	0.1632 ± 0.020	06056 ± 0.12	0.2708 ± 0.06	0.0588 ± 0.018
Solvant	0.18 ± 0.041	0.596 ± 0.123	0.278 ± 0.075	0.057 ± 0.0139
BF	0.0317 ± 0.016***a,b	0.0352 ± 0.013***a,b	0.0388 ± 0.016***a,b	0.0946 ± 0.026**a,b
BF + QUER	0.1368 ± 0.04	0.047 ± 0.012***a,b	0.0615 ± 0.022**a,b	0.1516 ± 0.031***a,b
DLT	0.0985 ± 0.013**a,b	0.0695 ± 0.02***a,b	0.0832 ± 0.018***a,b	0.071 ± 0.018**a,b
DLT + QUER	0.118 ± 0.041**a,b	0.0613 ± 0.054***a,b	0.1486 ± 0.029**a,b	0.83 ± 0.012***a,b
Mixture	0.115 ± 0.044**a,b	0.1348 ± 0.075***a,b	0.162 ± 0.05***a,*b	0.0374 ± 0.013**a,b
Mixture + QUER	0.1898 ± 0.076	0.51 ± 0.092**a,b	0.2603 ± 0.085	0.4735 ± 0.081***a,b

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n = 8). Le test t de Bonferroni a été utilisé pour des comparaisons multiples. *** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05 statistique significatif par rapport au contrôle.

^a comparaison avec le contrôle

^b comparaison avec le solvant

L'activité de la GST mitochondriale a également diminué dans toutes les régions du cerveau, sauf dans le cervelet. Les résultats de cette étude ont montré une diminution de l'activité de la GST ($p < 0,001$; $p < 0,01$; $p < 0,05$), chez les groupes traités aux PYRs par rapport au groupe témoin et au groupe solvant. Mais quand la quercétine a été co-administré avec les pesticides, cette diminution a été évitée dans tous les groupes préventifs. Dans le cervelet, l'évaluation de l'activité GST n'a montré aucune variation dans les rats traités par les pesticides et les groupes de prévention, par rapport aux rats témoins et rats solvants (tableau 6).

Tableau 6. L'activité de la GST mitochondriale dans les différentes régions du cerveau (Hippocampe, Striatum, Cortex et Cervelet) chez les rats traités de façon chronique par DLT, BF et leur mélange associé ou non à la QUER (UI/mg de protéines).

Traitement	Régions du cerveau			
	Hippocampe	Striatum	Cortex	Cervelet
Témoin	0.136 ± 0.041	0.144 ± 0.039	0.152 ± 0.021	0.106 ± 0.036
Solvant	0.128 ± 0.031	0.152 ± 0.043	0.149 ± 0.023	0.109 ± 0.035
BF	0.069 ± 0.021 ^{*a,b}	0.081 ± 0.022	0.128 ± 0.013	0.118 ± 0.017
BF + QUER	0.136 ± 0.018	0.138 ± 0.033	0.113 ± 0.017	0.126 ± 0.013
DLT	0.088 ± 0.019 ^{*a,b}	0.096 ± 0.011	0.09 ± 0.023	0.078 ± 0.013
DLT + QUER	0.151 ± 0.036	0.148 ± 0.033	0.163 ± 0.044	0.138 ± 0.029
Mixture	0.088 ± 0.013 ^{***a,***b}	0.105 ± 0.015 ^{*b}	0.08 ± 0.01 ^{***a,b}	0.105 ± 0.018
Mixture + QUER	0.145 ± 0.041	0.13 ± 0.06	0.148 ± 0.039	0.103 ± 0.018

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n = 8). Le test t de Bonferroni a été utilisé pour des comparaisons multiples. *** p < 0,001; ** p < 0,01 ; * p < 0,05 statistiquement significatif par rapport au contrôle.

^a une comparaison avec le contrôle.

^b Comparaison avec le solvant.

4. Discussion

Le stress oxydatif est l'un des principaux mécanismes de toxicité courants, associé à beaucoup de pesticides et de substances persistantes (Lukaszewicz-Hussain, 2008). Dans la présente étude, l'effet des PYRs et de leur mixture sur le taux de GSH dans les mitochondries cérébrales a montré une sélectivité régionale, puisque ce tripeptide a augmenté de manière significative dans l'hippocampe chez tous les groupes traités aux pesticides et exceptionnellement dans le striatum pour le groupe traité par la mixture. Dans ce cas, on remarque la compétence de l'hippocampe à corriger l'épuisement du GSH par la régénération excessive de GSH sous stress oxydatif produit par effet toxique de ces PYRs. En mêmes temps, le GSH a été épuisé dans les autres régions du cerveau chez tous les groupes traités aux pesticides. En effet, le GSH est une molécule cruciale du système antioxydant des neurones (Pathak et Khandelwal, 2006), sachant que l'épuisement du GSH avait été remarqué dans le

cerveau des patients parkinsoniens (Di Monte et al., 1992 ; Sechi et al., 1996) et dans le processus de neurodégénérescence (Franco et al., 2009). Des études antérieures ont également montré une perte de ce tripeptide après exposition à longue durée aux POPs chez le rat (Lahouel et al., 2016). Ce déséquilibre du statut redox pourrait être justifié par le fait que le cerveau est considéré comme particulièrement sensible au stress oxydatif, en raison de sa consommation élevée en oxygène combinée à sa faible performance dans la lutte contre le stress oxydatif, alors que les PYRs s'accumulent souvent dans le cerveau en raison de leur propriété lipophile (Ogaly et al., 2015). Les agents antioxydants, GSH, CAT et GST sont capables de limiter les effets toxiques des ROS sur les cellules et les organites subcellulaires par leur effet de piégeage (Anandakumar et al. 2013). L'épuisement du GSH peut augmenter le stress oxydatif et peut également augmenter les niveaux des molécules excitotoxiques. Les deux types d'action pourraient provoquer la mort des cellules neuronales des différentes régions cérébrales (Bains & Shaw, 1997 ; Uttara et al., 2009).

Dans la présente étude, la matrice mitochondriale du cerveau traité par les deux PYRs et leur mélange des rats a montré une diminution de GSH mitochondrial, par contre, la QUER a fait maintenir ou augmenter les taux de GSH chez les groupes préventifs. Ces résultats peuvent être dus à la synthèse de novo de GSH ou à une régénération du GSH après neutralisation des ROS par les composés phénoliques. Ces résultats sont cohérents avec des études précédentes qui ont montré une diminution des taux de GSH mitochondrial après 21 jours de traitement par différentes doses de PYRs et cette réduction a été expliquée par la production excessive de ROS (Ashar et Muthu, 2012 ; Dar et al., 2013 ; Mani et al., 2014).

Dans cette étude, vu leur réactivité élevée et leur courte durée de vie, les ROS ont été analysés indirectement *in vivo* en mesurant le changement du taux des antioxydants mitochondriaux, tels que la CAT et la GST. La réduction de l'activité de ces deux enzymes a été observée dans les mitochondries après l'administration chronique du BF, DLT et leur mixture chez les rats. En effet, cette étude a montré que les PYRs ont diminué l'activité de la GST et de la CAT chez les mitochondries dans presque toutes les régions du cerveau, sauf dans le cervelet où l'activité de la GST a été maintenue à son taux normal ; ainsi, une résistance particulière a été enregistrée dans cette région du cerveau et ce, contre l'effet toxique de ces pesticides. De plus, la quercétine semble jouer un rôle préventif contre la perte de l'activité de la GST et de la CAT, dans les mitochondries de différentes régions du cerveau, sauf dans le cas du groupe traité par la BF+QUER dans le cortex du rat. Ce composé phénolique augmente aussi significativement l'activité de la CAT dans les mitochondries du cervelet lorsque les animaux

ont été administrés préventivement par les deux PYRs associés avec la QUER. En effet, cette enzyme a le pouvoir de détoxification et de métabolisation de plusieurs xénobiotiques (El-Shenawy, 2010 ; Dar et al., 2013), ce qui permet ainsi la conservation de l'homéostasie du stress oxydant dans les mitochondries cérébrales, supportée par un système endogène : la disponibilité du GSH, qui pourrait être un facteur parallèle à l'activité de la GST qui assure la désintoxication des radicaux libres (Ashar et Muthu, 2012 ; Dar et al., 2013). La CAT est une enzyme piègeante des radicaux libres ; son activité a été réduite dans la matrice mitochondriale à la suite de l'exposition chronique des rats aux PYRs. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans des travaux antérieurs qui montraient directement l'inhibition de cette enzyme par les PYRs ou la perte de son activité sous l'effet néfaste d'une production et accumulation excessive des ROS dans les mitochondries cérébrales (Dar et al., 2013).

En outre, de nombreux chercheurs ont indiqué que la DLT favorise la génération des radicaux libres qui modulent positivement l'expression des gènes codant pour la CAT et la GST (Chavez-Mardones & Gallardo-Escárate, 2014). La réduction du GSH pourrait être le facteur limitant de l'activité de la GST (Ashar et Muthu, 2012), alors que la concentration en O_2^* inhibe l'activité de la CAT (Kono et Fridovich, 1982 ; Abdel-Daim et al., 2016). Cette anomalie dans le taux des différents systèmes antioxydants pourraient être le résultat d'une génération intense des ROS induite par ces PYRs dans les mitochondries du cerveau qui, à leur tour, pourrait entraîner une augmentation des taux de MDA, le produit final de la peroxydation lipidique (Silva et Gammon, 2009 ; Lakroun et al., 2015).

Ainsi, les toxiques environnementaux peuvent attaquer directement les mitochondries induisant la génération des ROS, ce qui peut induire davantage l'épuisement des défenses antioxydantes et médient les réactions d'oxydo-réduction en favorisant les dommages mitochondriaux, la génération de ROS et l'épuisement des molécules antioxydantes dans la cellule (Ahmed et al., 2008 ; Franco et al., 2009). Au niveau de la mitochondrie, la peroxydation lipidique altère le métabolisme et induit l'ouverture des pores de transition de la perméabilité mitochondrial (PTP). En effet, les résultats de la présente étude ont montré en général une augmentation du gonflement mitochondrial chez les rats exposés aux PYRs, conduisant probablement à l'induction de l'ouverture des PTP. Dans des études précédentes, de nombreux travaux ont rapporté que l'apoptose pourrait être induite par des changements de l'équilibre dans le statut redox mitochondrial qui inclut à la fois l'épuisement des systèmes de défenses antioxydantes tels que la GSH, la SOD et la CAT, et l'accumulation des ROS, ce qui peut

entraîner des dégâts directs dans les mitochondries cérébrales (Shi et al., 2004 ; Assefa et al., 2005 ; Baltazar et al., 2014).

L'administration de la QUER associée ou non à BF ou DLT a réduit les niveaux de MDA et a augmenté les taux de la GST, de la CAT et de la GSH. Ces résultats suggèrent qu'il y a une activité antioxydante de ce composé phénolique, cela est en accord avec des résultats obtenus dans des études précédentes, montrant que la QUER est une excellente chélatrice des ROS, qui favorise la restauration de l'activité de l'enzyme perdue lorsque les animaux ont été exposés à des PYRs (Kebieche et al., 2009 ; Ashar et Muthu, 2012 ; Lakroun et al., 2015).

4. Conclusion

À la fin de cette étude, nous pouvons conclure que l'exposition chronique à de faibles doses de BF et de DLT, seules ou dans un mélange, a produit un effet toxique sur les différentes régions du cerveau. Les systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques mitochondriaux ont été altérés par des anomalies dans l'hippocampe, le striatum, le cortex et le cervelet par rapport aux rats témoins ; une telle augmentation importante dans le stress oxydatif et dans le gonflement mitochondrial, signifie la perte du fonctionnement et de l'intégrité structurale des cellules et des mitochondries du cerveau. Cette altération, peut être facilement conduite vers une mort cellulaire et cela pourrait être par conséquent un facteur étiologique des maladies neurodégénératives. De plus, l'administration de la quercétine associée aux pesticides a montré un potentiel puissant contre les ROS et la peroxydation lipidique qui a permis aux mitochondries du cerveau de maintenir l'homéostasie rédox et l'intégrité de leurs membranes.

Chapitre II : Etude de l'impact de l'exposition chronique aux pyréthrinoïdes à faibles doses chez le rat adulte et la prévention par la quercétine : évaluation du stress oxydant cytosolique.

1. Introduction

Il est très connu que la génération des PYRs a remplacé des précédentes générations de pesticides comme les organochlorés et les organophosphorés. Les PYRs initialement sont considérés d'un point de vue environnemental, comme moins toxique et moins persistants, lesquels sont devenus des pesticides de premier choix à utilisation agricole dans plusieurs pays ; néanmoins plusieurs études récentes ont mis en évidence des toxicités diverses de ces composés chimiques (Ogaly et al., 2015 ; Syed et al., 2017 ; Gargouri et al., 2019). Cette présente étude, qui vient après l'évaluation de l'effet délétère de ces pesticides au niveau de la mitochondrie, le site d'action de l'oxygène et l'organite le plus producteur des radicaux libres oxygénés, a pour objectif d'élargir l'évaluation de l'effet toxique de ces pesticides sur d'autres compartimentation cellulaires tel que le cytosol au niveau des différentes régions du cerveau. Pour cela, les paramètres de stress oxydatif enzymatique et non enzymatique sont évalués pour mettre en évidence la généralisation possible de l'impact toxique que l'on a vu au niveau mitochondrial et la possibilité de détecter une disparité d'effet dans les différentes compartimentations cellulaires. Par ailleurs, cette exposition chronique, est associée à la quercétine, connue pour être une puissante molécule antioxydante selon des résultats publiés par notre équipe, afin d'évaluer également son effet cytoprotecteur, contre les effets délétères générés par ces PYRs.

2. Matériel et méthodes

Cette étude expérimentale a été effectuée au laboratoire de Recherche de Phytochimie et de Pharmacologie (LPP), Université de Jijel.

2.1. Produits chimiques

Pour réaliser ce travail, on utilise la quercétine $\geq 95\%$ (HPLC) solide, fournie par Sigma Aldrich, Germany ; les PYRs utilisés sont 02 insecticides : pour la deltaméthrine on utilise Décis[®] 25 EC, fabriqué par Bayer CropScience, Valence, Espagne ; pour la bifenthrine on utilise Bifenquick[®] 100 EC, fabriqué par Protection des Plantes Company, SL Espagne. Pour l'évaluation des paramètres biologiques nous avons utilisé des produits et des réactifs majoritairement provenant de Sigma, Germany.

2.2. Les animaux de laboratoire

56 rat *albinos* Wistar femelles provenant de l'institut Pasteur d'Alger, âgés de 04 à 06 semaines, ayant un poids corporel entre 170g et 190g. Ces rats ont été soumis à une période d'adaptation de 15 jours environ, aux conditions de l'animalerie de la faculté des SNV, université de Jijel, à une température voisine de 25°C et une photopériode naturelle.

Les rats ont été élevés dans des cages en polyéthylène qui sont tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois. Les cages ont été nettoyées et la litière changée 03 fois par semaine jusqu'à la fin de l'expérimentation. Les rats ont été installés par 07 en cages collectives avec un accès libre à l'eau et à la nourriture (ad libitum) standard. Les rats sont répartis en huit (08) lots.

2.3. Traitement des rats

Le traitement des animaux est réalisé par l'administration des solutions de pesticides et de la quercétine aux mêmes doses utilisées dans le premier chapitre. Les solutions administrées aux animaux sont préparées chaque jour et gavées en utilisant une sonde métallique fixée à une seringue et ce, quotidiennement pendant 4 mois, (tableau 7).

Tableau 7 : Répartition et traitement des animaux.

N° de lot	Nombre de rats	Traitement des rats par gavage intra-gastrique chaque jour pendant 120 jours
1 Témoin	7	Animaux témoin recevant une administration de 01 ml d'huile de maïs pour chaque rat.
2 BF	7	Animaux traités recevant une dose de BF de 3,72 mg/kg dissoute dans 1 ml d'huile de maïs.
3 DLT	7	Animaux traités recevant une dose de DLT de 2,6 mg/kg dissoute dans 1 ml d'huile de maïs.
4 MIX	7	Animaux traités par une mixture recevant (BF de 3,72 mg/kg + DLT de 2,6 mg/kg) dissout dans 1 ml d'huile de maïs.
5 QUER	7	Animaux traités recevant une dose de la quercétine de 5 mg/kg dissout dans 1 ml d'huile de maïs.
6 BF+QUER	7	Animaux traités recevant la bifenthrine + la quercétine (BF 3,72 mg/kg + QUER 5 mg/kg) dissout dans l'huile de maïs.
7 DLT+QUER	7	Animaux traités recevant la deltaméthrine + la quercétine (DLT 2,6 mg/kg + QUER 5 mg/kg) respectivement dissout dans l'huile de maïs.
8 MIX+QUER	7	Animaux recevant une mixture + la quercétine (BF 3,72 mg/kg + DLT 2,6 mg/kg + QUER 5 mg/kg) respectivement dissout dans l'huile de maïs.

2.4. Prélèvement des échantillons

2.4.1. Sacrifice des animaux et extraction du cerveau

A la fin de la période d'administration des pesticides et de la quercétine (BF, DLT et QUER) de 04 mois, et après un jeûn d'une nuit, les animaux sont sacrifiés par décapitation. Ensuite les cerveaux ont été rapidement prélevés après ouverture crânienne, rincés par le tampon de lavage à froid, puis séchés à basse température (4°C) par du papier semi-absorbant.

La dissection du cerveau et l'extraction des 04 régions du cerveau se fait comme cité au premier chapitre. Chaque région servira pour extraire le cytosol afin de doser les paramètres du stress oxydatif : GSH, GST, GPx, CAT, SOD et MDA.

2.4.2. Extraction de la fraction cytosolique des tissus nerveux

Chaque région du tissu nerveux a été rincée au PBS, puis broyée en présence de 3 ml du tampon phosphate de lyse (50 mM Tris-HCl ; 150 mM NaCl ; 1% triton x100 ; 5 mM EDTA ; pH 7,4), ensuite centrifugée dans une centrifugeuse Sigma 3-16 PK (made in Germany) à 600 g/15 min à 4°C pour enlever les débris cellulaires, le surnageant est récupéré et centrifugé une deuxième fois à 20000g /30 min à 4°C (figure 31) ; le surnageant constitue la fraction cytosolique qui est récupérée et sa concentration en protéines est évaluée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Ce surnageant est utilisé pour la détermination du taux de MDA, GSH et l'activité enzymatique de GST, GPx, SOD et CAT.

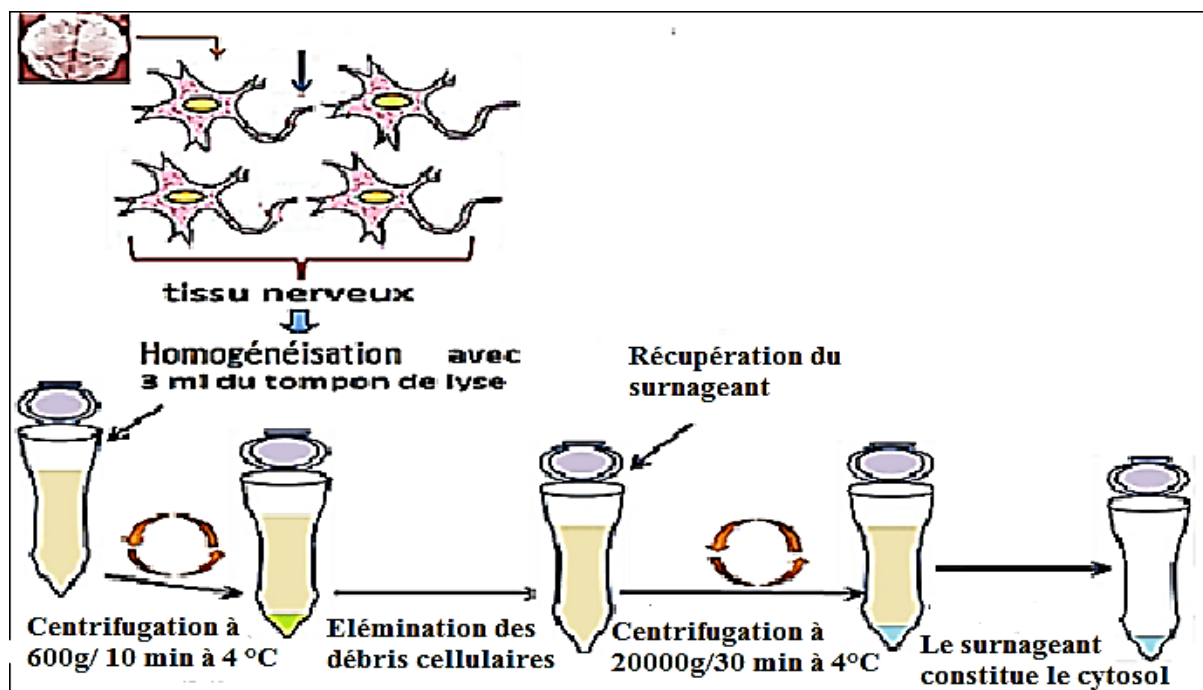


Figure 31. Protocole d'extraction du cytosol à partir du tissu nerveux (Kamat et al. 2014).

2.5. Techniques de dosages des paramètres de stress oxydatif

2.5.1. Evaluation de l'activité enzymatique de la CAT et de la GST cytosoliques et le taux de GSH cytosolique

Les activités de la CAT et de la GST ont été déterminées selon les méthodes décrites par Claiborne (1985) et Habig et al. (1974), respectivement, alors, que les taux de GSH ont été évalués selon l'essai d'Akerboom et Sies (1981).

2.5.2. Dosage du malondialdéhyde cytosolique (MDA)

La peroxydation lipidique au niveau cytosolique est estimée par la mesure du taux de MDA. Ce dernier est mesuré selon la méthode d'Okhawa et al. (1979). Brièvement, on ajoute à 0.5 ml de l'extrait enzymatique, 1,5 ml du milieu réactionnel contenant 5% de l'acide trichloracétique (TCA), 0,125% d'acide thiobarbiturique (TBA) et 0,52% de HCl. Le mélange est chauffé à 100°C pendant 30 min. Après refroidissement, ce mélange a été ensuite soumis à une centrifugation de 10 min à 16000 g et la densité optique a été mesurée dans le surnageant à 530 nm. Le taux de MDA est calculé en utilisant le coefficient d'extinction molaire du MDA $15,6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.5.3. La superoxyde dismutase cytosolique (SOD)

La SOD est une enzyme antioxydante très importante qui permet le maintien d'une basse concentration de l'anion superoxyde. Elle catalyse la dismutation de l' $\text{O}^{\cdot -}_2$ en H_2O_2 et en O_2 selon la réaction suivante :



L'activité enzymatique de la SOD est évaluée selon la méthode de Beauchamp et Fridovich (1971). Le principe de la méthode repose sur la capacité de l'enzyme à inhiber la réaction entre le nitroblu-tétrazolium (NBT) et l'anion superoxyde produit suite à la photo-réaction de l'oxygène et de la riboflavine en présence d'un donneur d'électron comme la méthionine. La réduction de NBT par l'anion superoxyde en Formazan peut être suivie par spectrophotométrie à 560nm. Une unité d'activité de la SOD est définie comme étant la quantité d'enzyme capable d'inhiber 50% de la réduction de NBT. Brièvement, 25 μl de la fraction cytosolique sont additionnés à 1,5 ml du milieu réactionnel (cyanide de sodium 10^{-2} M ; NBT $1,76 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; EDTA $0,066 \text{ M}$; riboflavine $2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$), 0,1 ml de méthionine (10^{-2} M) sont ensuite ajoutés et le mélange est irradié avec une lampe de 15 watts pendant 10 min. L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 560 nm. La SOD est exprimée en UI/mg de protéine. Une unité de

l'activité de la SOD est définie comme étant la quantité d'enzyme requise pour empêcher la réduction du NBT par 50 %.

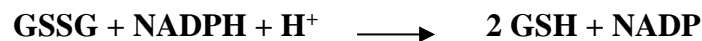
$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\text{Absorbance du contrôle} - \text{Absorbance de l'essai}}{\text{Absorbance du contrôle}} \times 100$$

SOD UI/g protéines = % d'inhibition x 6,35/ g protéines.

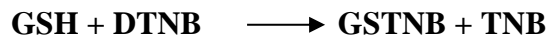
2.5.4. La glutathion peroxydase cytosolique (GPx)

L'activité de la GPx est mesurée par la technique de Flohé et Gunzler (1984) modifiée en utilisant le H₂O₂ comme substrat. La formation de GSH peut être détectée indirectement grâce à l'ajout de l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB). Le groupe sulfhydryl (-SH) du glutathion réagit spontanément avec le DTNB et forme un composé jaune, l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque (TNB).

La glutathion réductase catalyse la réaction suivante :



La formation de GSH peut être détectée indirectement grâce à l'ajout de 5,5'dithiobis (2-acide nitrobenzoïque) (DTNB) :



Le TNB absorbe à 412 nm et permet de quantifier l'activité de la GR. Ainsi, pour chaque molécule de GSH formée, il y aura formation d'une molécule de TNB.

Pour un dosage spectrophotométrique, 1 ml du milieu réactionnel qui contient [0,2 ml tampon phosphate (0,1 M, pH : 7,4), 0,2 ml GSH (2mM), 0,1 ml d'azide de sodium (10mM), 0,1 ml H₂O₂ 1 mM, 0,2 ml cytosol], est laissé agir 10 min à 37°C puis additionné de 500 µl TCA 5 %. Le mélange est ensuite mis dans la glace, puis centrifugé pendant 5 min à 1500xg. 400 µl du surnageant est récupéré et on lui ajoute 500 µl de tampon phosphate et 700 µl DTNB. Ensuite on note l'absorbance mesurée à 412 nm chaque minute pendant 5 min.

L'activité de la GPx est calculée selon la formule suivante :

$$\text{GPx} = \text{Y/X}$$

$$\text{Y} = [\text{DO Blanc} - \text{DO échantillon}] / 6.22$$

X = quantité de protéines dans 200µl de l'échantillon (mg/ml).

L'activité de la GPX est exprimée en nmoles de GSH consommé/min/mg de protéines.

2.6. Analyse statistique

Les résultats obtenus ont été exprimés par la moyenne (moyen \pm SEM ; n = 7), et pour mieux visualiser en utilisant l'office Excel 2016 pour représenter ces résultats sous forme des graphiques et des histogrammes. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Graph Pad Prism 6. Des comparaisons ont été effectuées à l'aide du test de Student et la signification a été fixée à $p < 0,05$, entre tous les groupes et le témoin. La signification de différence entre le lot témoin et les lots traités est vérifiée en utilisant le test t « Student », et les résultats de la comparaison sont évalués 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.

La comparaison entre les différents groupes est évaluée comme suivant :

Comparaison de BF avec BF+QUER : (#) $< 0,05$.

Comparaison de DLT avec DLT+QUER : (Δ) $< 0,05$.

Comparaison de MIX avec MIX+QUER : (£) $< 0,05$.

3. Résultats

3.1. Effets des pyréthrinoïdes et de la quercétine sur le statut redox dans les différentes régions du cerveau

3.1.1. Effets des pyréthrinoïdes et de la quercétine sur le taux de MDA cytosolique

Les résultats de l'effet des PYRs et leurs mixtures associées ou non à la quercétine sur les taux de MDA cytosolique des différentes régions du cerveau sont représentés dans la figure 32.

Au niveau de l'hippocampe : des augmentations significatives au niveau du taux de MDA cytosolique sont constatées chez les groupes traités par BF et DLT ($p < 0,001$) par rapport au témoin et par rapport au groupes BF+QUER et DLT+QUER, respectivement ; une augmentation significative au niveau du groupe MIX par rapport au groupes témoin ($p < 0,05$) et par rapport au groupe MIX + QUER ($p < 0,05$), les autres groupes ne présentent aucune variation significative par rapport au groupe témoin.

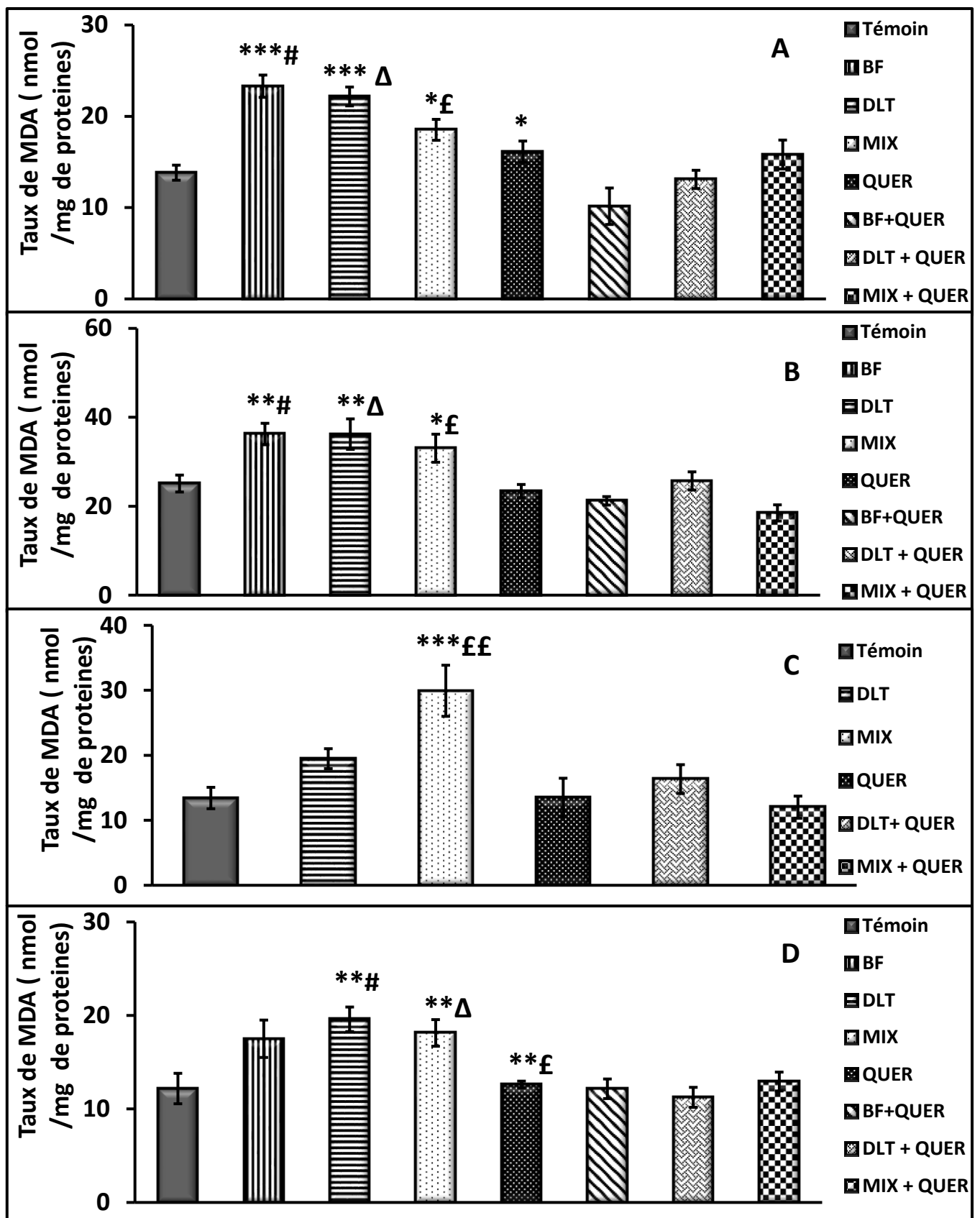


Figure 32. Effet de l'exposition chronique au BF, DLT et leur mixture, seuls ou associés à la quercétine, sur le taux de MDA cytosolique dans les 4 régions du cerveau. A : hippocampe ; B : striatum ; C : cortex ; D : cervelet. Les résultats sont présentés par la moyenne \pm SEM, $n = 7$. Le test de Student a été utilisé pour la comparaison entre les groupes : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. # comparaison de BF par rapport au BF+QUER ; Δ comparaison du DLT par rapport au DLT + QUER ; £ comparaison de MIX par rapport au MIX+QUER.

Au niveau du striatum : le MDA a présenté une augmentation significative, chez les groupes traités par BF et DLT par rapport au témoin ($p < 0,01$), et par rapport au BF+QUER et DLT+QUER respectivement ; d'autres part, une augmentation significative ($p < 0,05$) est retrouvée chez le groupe MIX, par rapport au témoin ainsi, par rapport au groupe MIX+QUER. En revanche, le traitement et le co-traitement avec la quercétine a amélioré le taux de MDA cytosolique dans le striatum, chez tous les groupes co-traités de sorte que le taux de MDA ne présente aucune variation significative par rapport au témoin

Au niveau du cortex : nous avons constaté que seulement le groupe traité par la mixture a présenté une augmentation significative par rapport au témoin ($p < 0,001$) et par rapport au MIX+QUER ($p < 0,01$), alors que le groupe DLT n'a présenté aucune augmentation significative du taux de MDA par rapport au témoin ($p > 0,05$) ; néanmoins tous les autres groupes traités par la quercétine seule ou associée au PYRs ne présentent aucune variation significative du taux de MDA par rapport au témoin ($p > 0,05$).

Au niveau du cervelet : on a constaté une augmentation significative ($p < 0,01$) chez tous les groupes traités par les PYRs seuls ou en mixture par rapport au groupe témoin, le traitement et le co-traitement avec la quercétine a fait diminuer significativement ($p < 0,05$) le taux de MDA cytosolique par rapport aux groupes traités par les pesticides sans quercétine.

3.1.2. Effets des pyréthrinoïdes et de la quercétine sur le taux de GSH cytosolique dans les différentes régions du cerveau

Les résultats de l'effet des PYRs et leurs mixtures associées ou non à la quercétine sur les taux de GSH sont représentés dans la figure 33.

Au niveau de l'hippocampe : les résultats de l'évaluation de GSH dans le cytosol des différentes régions du cerveau ont montré une diminution significative ($p < 0,01$; $p < 0,001$) des taux de GSH chez tous les groupes traités par les pesticides, sauf chez les groupes : BF et BF+QUER, où il y a une augmentation significative ($p < 0,05$) des taux de ce tripeptide.

Au niveau du striatum, le GSH a présenté une augmentation significative ($p < 0,001$) chez tous les groupes d'études sauf chez le groupe BF+QUER où l'augmentation est apparue non significative par rapport au témoin.

Au niveau du cortex : seulement le groupe traité par la mixture a présenté une augmentation significative du taux de GSH par rapport au groupe témoin ($p < 0,01$), et par

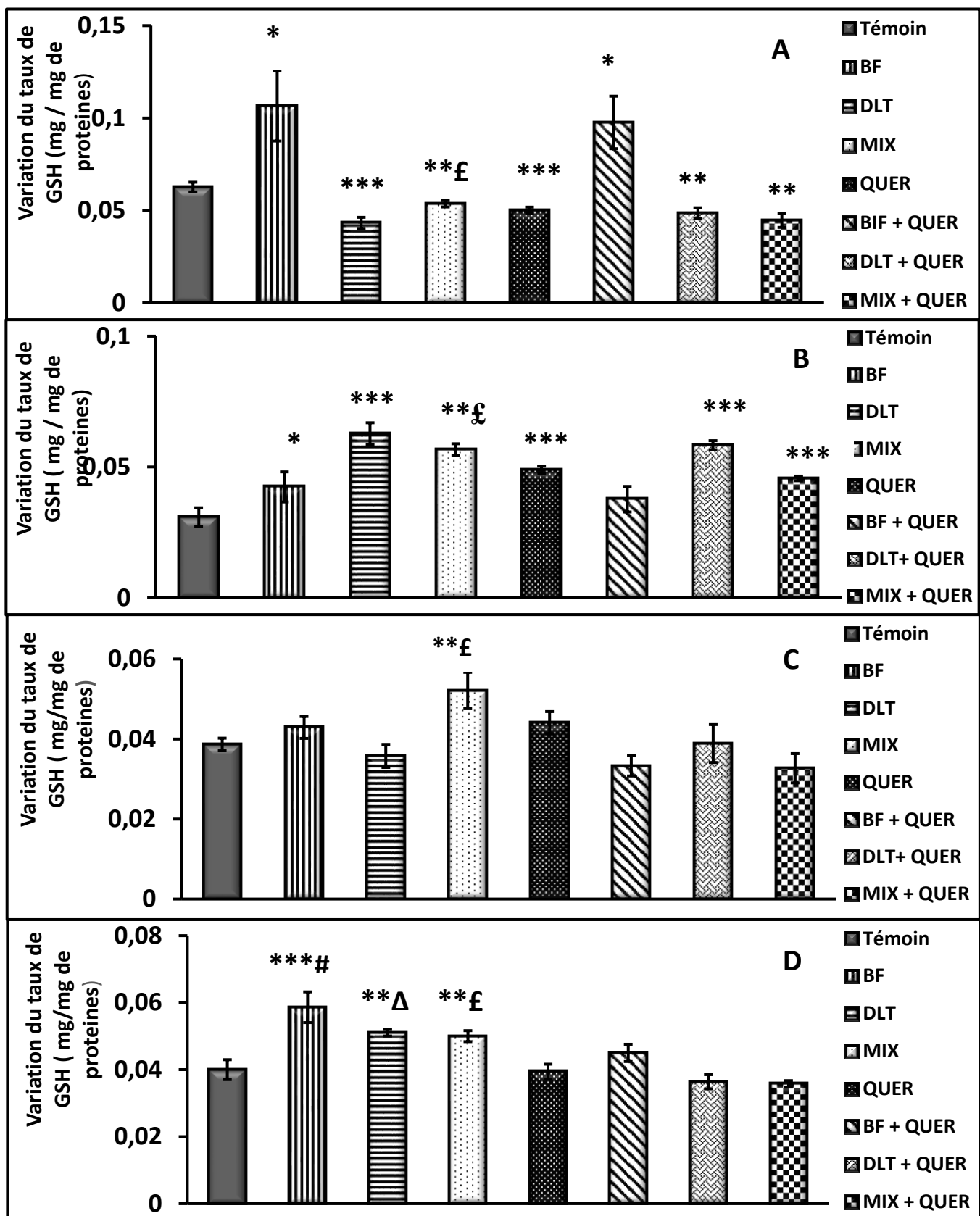


Figure 33. Effet de l'exposition chronique au BF, DLT et leur mixture, seuls ou associés à la quercétine, sur le taux de GSH cytosolique dans les 4 régions du cerveau. A : hippocampe ; B : striatum ; C : cortex ; D : cervelet. Les résultats sont présentés par la moyenne \pm SEM, $n = 7$. Le test de Student a été utilisé pour la comparaison entre les groupes : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. # comparaison de BF par rapport au BF + QUER ; Δ comparaison du DLT par rapport au DLT + QUER ; £ comparaison de MIX par rapport au MIX + QUER.

rapport au groupe MIX+QUER ($p < 0,05$), tandis que les autres groupes ne présentent aucune variation significative.

Au niveau du cervelet : on a constaté une augmentation significative ($p < 0,001$) au niveau du groupe traité par la BF ainsi, une augmentation significative ($p < 0,01$) chez les groupes DLT et MIX par rapport au témoin ; néanmoins, la quercétine fait diminuer significativement ($p < 0,05$) les taux de GSH chez tous les groupes, co-traités par la QUER par rapport au groupes traités par les PYRs seuls.

3.1.3. Effets des pyréthrinoïdes et de la quercétine sur l'activité enzymatique de la catalase cytosolique dans les différentes régions du cerveau.

La variation de l'activité enzymatique de la CAT est illustrée par la figure 34.

Au niveau de l'hippocampe : l'activité de la CAT a augmenté de façon très hautement significative chez le groupe BIF+QUER par rapport au témoin et par rapport au BF ($p < 0,05$). Tandis que les groupes DLT et DLT+QUER ont montré une diminution significative de cette activité ($p < 0,05$) par rapport au témoin, alors qu'aucune variation significative n'a été constatée chez les groupes BF, MIX, QUER et MIX+QUER.

Au niveau du striatum : l'activité de la CAT a augmenté de façon significative suite au traitement par la DLT seule ($p < 0,001$) ou associé à la quercétine ($p < 0,01$) et cela par rapport au témoin, une augmentation significative ($p < 0,05$) est enregistrée également chez DLT par rapport au DLT+QUER. Par contre chez les autres groupes une diminution de l'activité de cette enzyme est très hautement significative ($p < 0,001$) chez le groupe MIX et très significative ($p < 0,01$) chez le groupe MIX+QUER, et non significative ($p > 0,05$) chez les groupes BF, BF+QUER.

Au niveau du cortex : l'évaluation de l'activité de la CAT a montré une réduction significative ($p < 0,01$) chez les groupes : DLT et MIX+QUER. Une augmentation significative ($p < 0,05$) est enregistrée chez le groupe MIX par rapport au groupe MIX+QUER.

Au niveau du cervelet : cette activité présente une diminution significative ($p < 0,05$) au niveau de tous les groupes traités par rapport au groupe témoin, cette diminution est très hautement significative après exposition chronique au PYRs seuls ($p < 0,001$), très significative chez le groupe DLT+QUER ($p < 0,01$), sauf chez les groupes QUER où la diminution est non

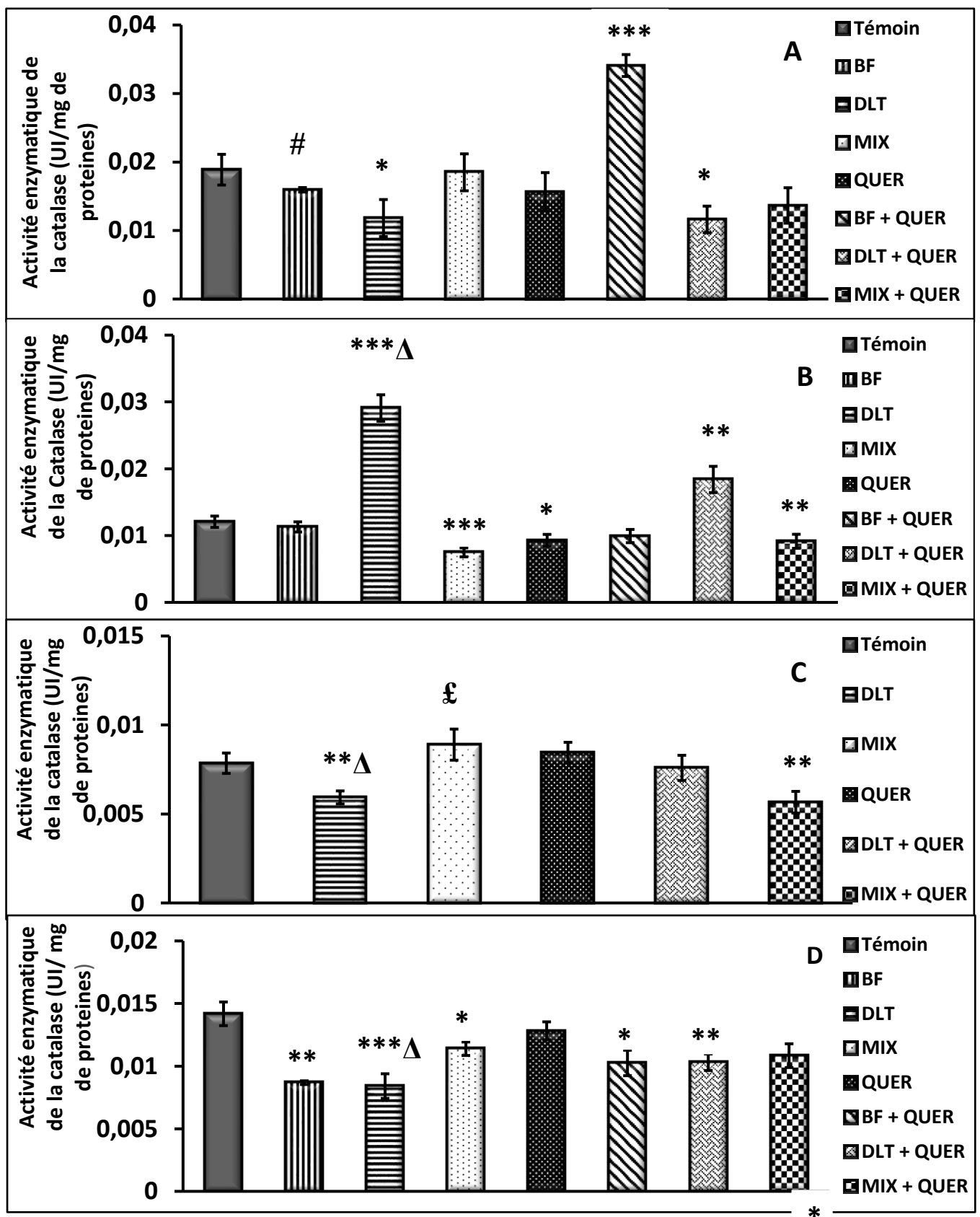


Figure 34. Effet de l'exposition chronique au BF, DLT et leur mixture, seuls ou associés à la quercétine, sur l'activité enzymatique de la catalase cytosolique dans les 4 régions du cerveau. A : hippocampe ; B : striatum ; C : cortex ; D : cervelet. Les résultats sont présentés par la moyenne \pm SEM, $n = 7$. Le test de Student a été utilisé pour la comparaison entre les groupes : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. # comparaison de BF par rapport au BF + QUER ; Δ comparaison du DLT par rapport au DLT + QUER ; £ comparaison de MIX par rapport au MIX + QUER.

significative. Une diminution significative de l'activité ($p < 0,05$) chez le groupe DLT par rapport au groupe DLT+QUER a été également constatée.

3.1.4. Effets des pyréthriinoïdes et de la quercétine sur l'activité enzymatique de la SOD cytosolique dans les différentes régions du cerveau.

Les résultats de l'évaluation de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase suite à un traitement chronique avec les PYRs et la QUER sont représentés dans la figure 35.

Au niveau de l'hippocampe : on a constaté que tous les groupes traités par la BF que ce soit seule ou associée avec la DLT ou avec la QUER ont montré une élévation de l'activité enzymatique très hautement significative ($p < 0,001$) par rapport au témoin, tandis que le groupe MIX+QUER a montré une diminution significative ($p < 0,01$) de cette activité en comparant avec le témoin. Le traitement avec la quercétine chez les groupes traités par la BF ou la MIX a provoqué une diminution significative de l'activité de la SOD par rapport au traitement par BF seul ($p < 0,05$) ou MIX seul ($p < 0,05$). L'activité de la SOD n'a pas mis en évidence aucune variation significative après le traitement par la DLT ou la QUER seuls ou associés.

Au niveau du striatum : l'activité enzymatique de la SOD chez les groupes traités par rapport au témoin a montré une augmentation très hautement significative ($p < 0,001$) chez tous les groupes traités par les PYRs, ainsi que le groupe DLT+QUER, une augmentation de l'activité significative ($p < 0,05$) est enregistrée chez les groupes QUER et MIX+QUER. Une augmentation significative ($p < 0,05$) de l'activité est observée chez le groupe BF par rapport au groupe BF+QUER.

Au niveau du cortex : l'analyse statistique de ces résultats a montré une augmentation très hautement significative ($p < 0,001$) enregistrée chez les groupes MIX et DLT+QUER, ainsi une augmentation très significative ($p < 0,01$) enregistrée chez tous les autres groupes et cela par rapport témoin. En ce qui concerne la comparaison entre les groupes, le groupe MIX+QUER a montré une diminution significative ($p < 0,05$) par rapport au groupe MIX.

Au niveau du cervelet : une augmentation très significative ($p < 0,01$) est observée au niveau du groupe DLT par rapport au témoin ; une diminution très significative ($p < 0,01$) est notée chez le groupe MIX+QUER, alors qu'aucun changement significatif de l'activité de la SOD, par rapport au témoin n'a été observé chez le reste des groupes. Le traitement par la quercétine se traduit par une baisse significative de l'activité chez les groupes DLT+QUER ($p < 0,05$) et MIX+QUER ($p < 0,05$) par rapport au groupes DLT et MIX respectivement.

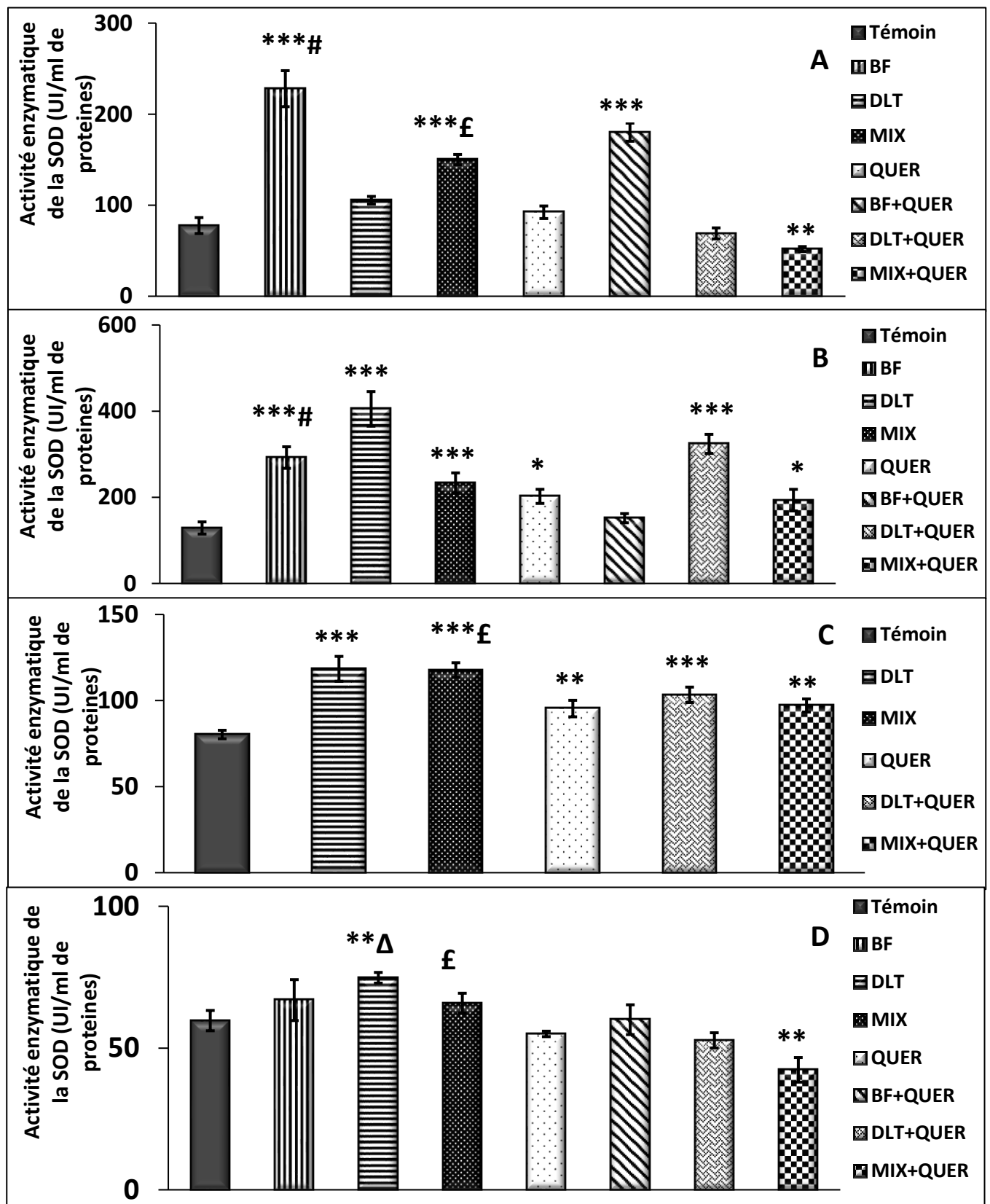


Figure 35. Effet de l'exposition chronique au BF, DLT et leur mixture, seuls ou associés à la quercétine, sur l'activité enzymatique de la SOD cytosolique dans les 4 régions du cerveau. **A** : hippocampe ; **B** : striatum ; **C** : cortex ; **D** : cervelet. Les résultats sont présentés par la moyenne \pm SEM, $n = 7$. Le test de Student a été utilisé pour la comparaison entre les groupes : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. # comparaison de BF par rapport au BF+ QUER ; Δ comparaison du DLT par rapport au DLT + QUER ; £ comparaison de MIX par rapport au MIX+QUE.

3.1.5. Effets des pyréthrinoïdes et de la quercétine sur l'activité enzymatique de la GST cytosolique dans les différentes régions du cerveau.

Les résultats de l'évaluation de l'activité enzymatique du glutathion-s-transférase, suite à un traitement chronique avec les PYRs et la quercétine sont illustrés dans la figure 36.

Au niveau de l'hippocampe : tous les groupes traités par la DLT, MIX seuls ou associés à la quercétine ont montré une diminution très significative par rapport au témoin ($p < 0,01$) de l'activité enzymatique de la GST, alors qu'une diminution non significative est enregistrée chez tous les autres groupes traités BF, QUER et BF+QUER.

Au niveau du striatum : l'activité enzymatique de la GST a augmentée de façon très significative ($p < 0,01$) au niveau des groupes DLT et BF+QUER par rapport au témoin. Cependant, aucune différence significative n'a été enregistrée chez les autres groupes. D'autres part, une augmentation significative de cette activité chez le groupe BF +QUER ($p < 0,05$) par rapport au groupe BF a été également notée.

Au niveau du cortex : une augmentation très significative de l'activité enzymatique de la GST par rapport au témoin a été enregistrée chez le groupe BF ($p < 0,01$), et significative chez le groupe BF+QUER ($p < 0,05$), alors qu'aucune différence significative par rapport au témoin n'a été enregistrée chez le reste des groupes.

Au niveau du cervelet : une augmentation très significative ($p < 0,01$) par rapport au témoin de l'activité enzymatique de la GST a été observée au niveau des groupes BF et BF+QUER, par contre, une diminution significative ($p < 0,05$) a été constaté chez les groupes DLT, MIX, DLT+QUER et MIX+QUER par rapport au témoin, aucun changement significatif n'est observé chez le groupe QUER.

3.1.6. Effets des pyréthrinoïdes et de la quercétine sur l'activité enzymatique de la GPx cytosolique dans les différentes régions du cerveau.

Les résultats de l'évaluation de l'activité enzymatique du GPx suite à une exposition chronique aux PYRs et la quercétine sont illustrés dans la figure 37.

Au niveau de l'hippocampe : l'activité enzymatique du GPx se varie entre les différents groupes par rapport au témoin : on a noté une augmentation de l'activité très significative ($p < 0,01$) chez le groupe BF+QUER et une augmentation significative ($p < 0,05$) chez le groupe

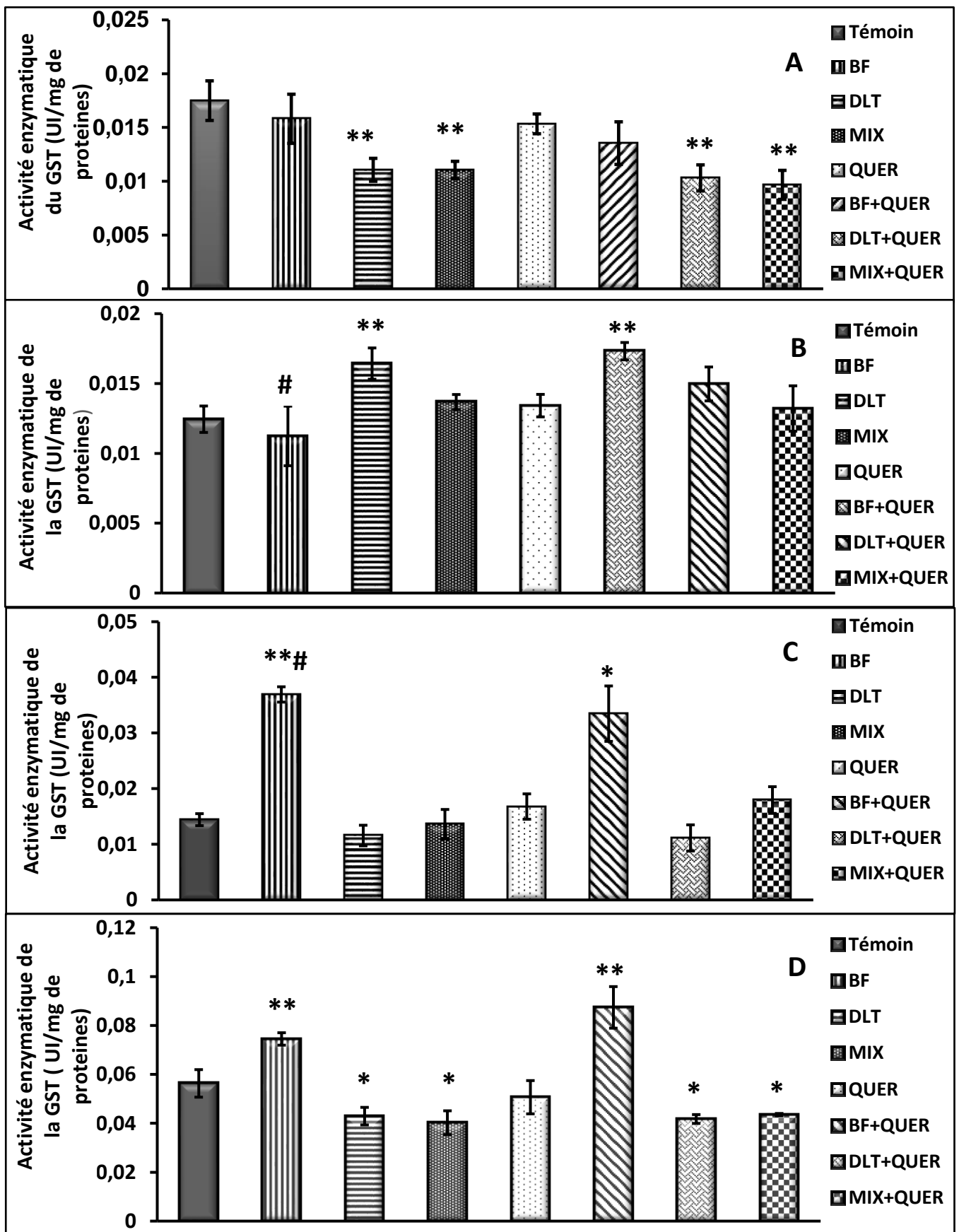


Figure 36. Effet de l'exposition chronique au BF, DLT et leur mixture, seuls ou associés à la quercétine, sur l'activité enzymatique de la GST cytosolique dans les 4 régions du cerveau. **A** : hippocampe ; **B** : striatum ; **C** : cortex ; **D** : cervelet. Les résultats sont présentés par la moyenne \pm SEM, $n=7$. Le test de Student a été utilisé pour la comparaison entre les groupes : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. # comparaison de BF par rapport au BF+ QUER.

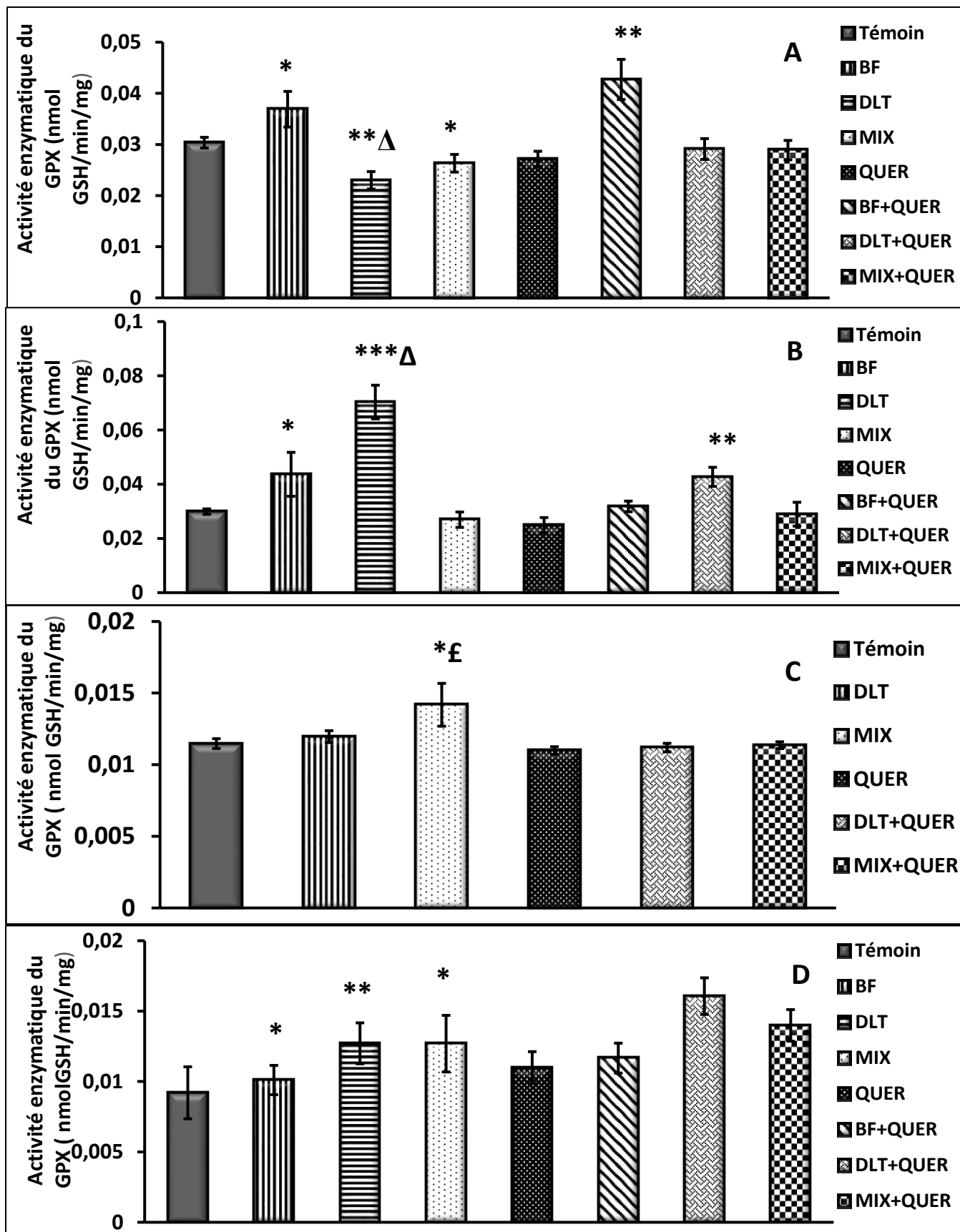


Figure 37. Effet de l'exposition chronique au BF, DLT et leur mixture, seuls ou associés à la quercétine, sur l'activité enzymatique de GPx cytosolique dans les 4 régions du cerveau. **A** : hippocampe ; **B** : striatum ; **C** : cortex ; **D** : cervelet. Les résultats sont présentés par la moyenne \pm SEM, $n = 7$. Le test de Student a été utilisé pour la comparaison entre les groupes : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Δ comparaison du DLT par rapport au DLT + QUER ; \pounds comparaison de MIX par rapport au MIX+QUER.

BF par rapport au témoin ; par contre, les groupes MIX et DLT ont enregistré une diminution significative ($p < 0,05$) et très significative ($p < 0,01$) respectivement par rapport au témoin. Cependant, pour les autres groupes aucun changement significatif de l'activité n'est enregistré. D'autre part, le groupe DLT+QUER a montré une augmentation significative ($p < 0,05$) de l'activité par rapport au groupe DLT.

Au niveau du striatum : les groupes DLT et DLT+QUER et BF ont montré une augmentation très hautement significative ($p < 0,001$), très significative ($p < 0,01$) et significative ($p < 0,05$) respectivement par rapport au témoin ; cependant, les autres groupes n'ont présenté aucun changement significatif de l'activité de GPx par rapport au témoin. Le groupe DLT+QUER a montré une diminution significative ($p < 0,05$) de l'activité par rapport au groupe DLT.

Au niveau du cortex : une augmentation significative ($p < 0,05$) de l'activité enzymatique du GPx a été observée chez le groupe MIX que ce soit par rapport au témoin ou par rapport au MIX+QUER, mais aucun changement significatif ($p > 0,05$) n'a été observé chez tous les autres groupes traités.

Au niveau du cervelet : une augmentation très significative ($p < 0,01$) de l'activité enzymatique de GPx a été constatée chez le groupe DLT+QUER par rapport au témoin ; une augmentation significative ($p < 0,05$) a été également enregistrée chez les groupes BF+QUER et MIX +QUER. Tandis qu'une augmentation non significative ($p > 0,05$) a été enregistrée chez les groupes restants.

4. Discussion

Les PYRs sont des pesticides neurotoxiques agissant sur le voltage des canaux sodiques dans les membranes des neurones. L'intoxication provoque la paralysie et la mort de l'organisme cible. Pendant plus d'un demi-siècle, on croyait que les PYRs n'agissent que par la dérégulation rapide du système nerveux, sans aucun effet cytotoxique significatif. Cependant, il a été prouvé que l'exposition aux PYRs peut entraîner la mort des neurones chez les animaux adultes (Gargouri et al., 2018a), l'inhibition du développement du système nerveux chez les nouveaux-nés des rongeurs et des dommages aux organes internes via les métabolites toxiques. Des études récentes montrent que les PYRs altèrent le fonctionnement des reins, entraînent également une toxicité hépatique (Nieradko-Iwanicka et Borzęcki, 2016), changent la

morphologie du sang (Khan et al., 2013), perturbent le système endocrinien (Mekircha et al., 2018) et conduisent à un stress oxydatif (Nieradko-Iwanicka et Borzęcki, 2015).

Le stress oxydatif est un déséquilibre entre l'oxydation et l'antioxydation *via* la formation d'un excès de radicaux libres et/ou des ROS tels que l'anion superoxyde ($O^{\circ-}$), peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroperoxyde (HOO°) et les espèces réactives de l'azote (RNS), tels que l'oxyde nitrique (NO) catalysé par l'oxyde nitrique synthase (NOS) et le peroxydinitrite (Dringen, 2000 ; Lu et al., 2019), les résidus des PYRs par le biais de la génération des ROS et les RNS peuvent modifier l'expression des gènes et le taux des récepteurs protéiques et des enzymes clés dans les différents tissus, comme le cerveau (Gargouri et al., 2019).

Les PYRs (la BF et la DLT) utilisés dans cette étude sont couramment utilisés par les agriculteurs dans la région de Jijel, Algérie, et dans le monde, pour protéger leurs cultures et leurs récoltes, à cause de leur faible toxicité présumée et leur courte persistance environnementale (Li et al., 2019). Par ailleurs, les familles sont également exposées à ces pesticides lors de leur utilisation pour éradiquer les moustiques (Somade et al., 2014). Les résidus de ces pesticides contaminent très souvent les matrices alimentaires directement ou non, ce qui rend l'homme en exposition continue. Ces pesticides constituent un facteur majeur de risque de troubles neurologiques et maladies neurodégénératives chez l'homme fortement exposé (Gargouri, 2019). Selon la littérature consultée, il existe un manque général d'études toxico-environnementales en ce qui concerne des investigations étudiant une exposition chronique de l'organisme vivant à ces deux pesticides seuls ou notamment en mixture, avec un objectif prospectif sur une population générale exposée à des petites doses de ces produits chimiques.

La présente étude évalue l'impact de DLT et BF et leur mixture, seuls ou associés à la quercétine dans les différentes régions du cerveau *via* la variation du statut redox cytosolique des différentes régions du cerveau et l'intégrité membranaire cellulaire en terme du niveau de la peroxydation lipidique indiquée par le MDA.

La neurotoxicité des PYRs est attribuée principalement à leur action sur les canaux sodiques à voltage dépendant ainsi que les canaux calciques et chloriques (Li et al., 2011 ; Soderlund, 2012). Seulement cette neurotoxicité diffère entre les différentes régions du cerveau (Lahouel et al., 2016 ; Gasmi et al., 2017).

Dans cette étude, l'exposition chronique aux PYRs étudiés et leurs mixtures a induit un état de stress oxydatif cytosolique dans le cerveau. Plusieurs PYRs ont été rapportés pour produire de la peroxydation lipidique dans les différentes régions du cerveau ; le niveau de la peroxydation lipidique est mesuré par le taux de malondialdéhyde dans les différentes régions du cerveau des rats témoins et rats traités (Dar et al., 2019 ; Lu et al., 2019). La présente étude montre que le MDA qui est le produit final de la peroxydation lipidique est augmenté significativement dans le cytosol chez tous les groupes traités par les PYRs seuls ou en mixture, dans les différentes régions du cerveau : hippocampe, striatum et cervelet ; néanmoins le cortex a présenté une résistance contre la peroxydation lipidique après traitement par DLT seul. Le taux élevé de MDA est constaté seulement après traitement par la mixture dans cette région du cerveau. Des résultats similaires indiquant la résistance du cortex contre la peroxydation lipidique induite par l'exposition sont enregistrés chez Syed et al. (2017) mais seulement pendant 15 jours de traitement par BF à 3,5 et 7 mg/kg, alors que le traitement pour 1 mois fait augmenter le taux de MDA significativement dans toutes les régions du cerveau. Cette résistance est révélée par ailleurs, après des traitements chroniques par DLT à 0,32 mg/kg (Gasmi et al., 2017) et par des POPs (pesticides et HAP) (Lahouel et al., 2016).

Étant composé hydrophobe, la BF peut s'accumuler dans les membranes cellulaires et les perturber. Les substances réactives à l'acide thiobarbiturique TBARS sont des produits d'oxydation majeurs des acides gras polyinsaturés peroxydés, leurs niveaux élevés dans le cerveau indiquent une augmentation de la peroxydation des membranes cellulaires et donc de la présence de stress oxydatif inducteur, notamment par l'anion hydroxyle, ce qui peut entraîner une perte de la structure et de la fonction de la membrane, une diminution de la fluidité membranaire, une augmentation de la perméabilité membranaire, une inactivation des enzymes liées à la membrane telles que les ATPases et perte d'acides gras essentiels (Juurink et Paterson, 1998 ; Abdallah et al., 2012). Ces résultats sont corroborés par des études antérieures faisant état de la neurotoxicité des PYRs *via* la production des TBARS chez diverses espèces animales (Abdallah et al., 2012 ; Khan et al., 2013 ; Syed et al., 2017).

En revanche, l'administration de la QUER empêche les cellules membranaires de contracter la toxicité du BF et DLT en réduisant les niveaux de TBARS, niveaux des protéines carbonyles et maintient les activités de l'ATPase près des valeurs normales. Les propriétés antioxydantes de la QUER pourraient résider dans sa capacité à s'insérer dans les membranes cellulaires et à modifier la fluidité des lipides (Nakagawa et al., 2000). Oteiza et al., (2005) ont signalé que dans les membranes biologiques et dans les modèles membranaires, l'interaction

entre les composés phénoliques et la bicouche lipidique entraîne soit la liaison à l'interface ou l'inclusion lipide-eau dans l'intérieur de la bicouche, l'emplacement ou la distribution différente de ces molécules étant déterminée par leurs propriétés chimiques. En outre, il a été suggéré que les flavonoïdes puissent être concentrés près de la surface de la membrane afin de nettoyer les radicaux oxygénés aqueux (Abdallah et al., 2012).

Les taux de GSH cytosoliques enregistrés dans les différentes régions du cerveau étudiées ont montré également une sélectivité régionale, laquelle a été notée également par les travaux de Lahouel et al. (2016). Des taux élevés sont notés dans le striatum et le cervelet après traitement par BF, DLT et MIX. Les taux de GSH dans le cortex sont maintenus normaux, sauf après traitement par la mixture où l'augmentation est significative, tandis que dans l'hippocampe, une variation d'effet sur la teneur de ce tripeptide a été constatée. La BF semble n'avoir aucun effet réduisant pour les taux de GSH dans les différents organes. Dar et al., (2015) ont trouvé les mêmes résultats dans le cerveau. En effet, des concentrations relativement faibles sont enregistrées chez les groupes DLT et MIX dans l'hippocampe, alors que son épuisement dans cette région après traitement par DLT et MIX peut être dû à la production intense des ROS qu'il faut scavenger par GSH qui va être consommé avec le temps (Gasmi et al., 2017). Cet épuisement de GSH neuronal pourrait contribuer à la dégénérescence neuronale, selon plusieurs mécanismes, notamment une altération de la fonction respiratoire mitochondriale, une apoptose accélérée et une altération du balayage des ROS (Reyes et al., 2016). En fait, le système antioxydant de GSH est très important pour la défense contre les ROS par le fait qu'il soit impliqué dans les systèmes de défense antiradicalaire (Dringen, 2000 ; Shivanoor et David, 2014).

Le taux de GSH dépend de deux facteurs : enzymes : GPx et GR. La GR catalyse la réduction du glutathion oxydé (GSSG) sur glutathion réduit (GSH). Il participe à la maintenance du glutathion sous forme réduite (Dringen, 2000 ; Zabaïou et al., 2016). En effet, le cerveau a relativement une faible teneur en GSH qui diffère entre les différentes régions du cerveau, elle varie entre 1-2 $\mu\text{mol/g}$ de poids alors que le foie contient 8-10 $\mu\text{mol/g}$, bien que la plupart du GSH du cerveau se localise dans les astrocytes, ce dernier contient aussi une faible activité de GPx, ainsi une faible activité de GR, ce qui explique le taux faible de GSH en rendant ainsi le cerveau vulnérable vis-à-vis de la production d'un excès de peroxydes (Juurlink et Paterson, 1998 ; Dringen, 2000). La diminution des taux de GSH dans l'hippocampe après exposition aux DLT et MIX est probablement le résultat d'une augmentation de son utilisation par rapport à son turnover, sous les conditions de stress oxydatif cellulaire provoqués par ces PYRs (Khan et

al., 2013 ; Dar et al., 2015 ; Sharma et al., 2018), cette diminution peut déclencher également l'activation de la 1,2 lipooxygénase neuronale qui conduit à augmenter l'afflux de calcium et induit l'apoptose (Kaur et al., 2019), ce qui est le cas avec l'hippocampe dans la présente. Dans le cortex, les résultats ne présentent aucune réduction des taux de GSH par rapport au témoin, cette teneur normale de GSH fait protéger le cortex contre les ROS qui rendent la cellule protégée contre les dommages oxydatifs ce qui se traduit par une peroxydation lipidique réduite, ce qui est le résultat après traitement de cette région par DLT et BF ; sauf que le traitement de ce dernier par la MIX fait augmenter significativement le niveau de GSH, cela est expliqué par une induction de la synthèse de GSH après l'état de stress oxydatif provoqué par l'exposition chronique à la MIX, ce qui se traduit par un niveau significativement élevé de LPO comme le montrent les résultats de MDA dans cette région. Le même cas s'est révélé avec le cervelet, où l'augmentation des taux de GSH après exposition au BF, DLT et MIX est en parallèle avec l'augmentation des taux de la LPO chez les mêmes groupes. La QUER, composé phénolique végétal, est pourvue d'un potentiel antioxydant et cytoprotecteur prouvé, qui est dû à son grand nombre de substitutions d'hydroxyle qui, en outre, est corrélé à sa capacité de donner des électrons (Kaur et al., 2019). Le co-traitement des PYRs utilisés dans cette étude avec la QUER a fait augmenter l'effet antioxydant dans le cerveau se traduisant par un taux normal de GSH dans le cervelet lorsqu'elle est coadministrée avec lesPYRs (Sharma et al., 2018), par contre cette molécule semble n'avoir aucun effet par rapport au taux de GSH dans l'hippocampe.

Le cerveau qui constitue 2% de la masse corporelle, consomme 20% de l'oxygène et le reste est consommé par le corps. La consommation de l'oxygène est proportionnelle à la production des ROS notamment le peroxyde d'hydrogène, d'où vient la nécessité d'un système antioxydant chélateur des ROS. En plus du système utilisant le GSH, toutes les cellules utilisent de multiples stratégies pour gérer ses états de stress oxydatif en particulier le système antioxydant enzymatique (Juurlink et Paterson 1998). Le GSH joue son rôle antioxydant en synergie avec les antioxydants enzymatiques : GPx, GST, CAT et SOD contre la toxicité provoquée par les PYRs (Gasmi et al., 2016 ; Syed et al., 2017).

La GST, une famille d'enzyme de la phase II de biotransformation détoxifie les xénobiotiques en catalysant leur conjugaison avec le GSH pour produire des composés plus hydrosolubles et moins toxiques (Gasmi et al., 2016, Lahouel et al., 2016). L'augmentation de l'activité enzymatique de la GST est observée dans les différentes régions après exposition chronique aux PYRs : dans le striatum après exposition chronique au DLT, BF+QUER, et dans

le cortex et le cervelet après exposition des animaux au BF et BF+QUER. L'augmentation de l'activité observée dans cette étude peut être attribuée à la production excessive des ROS et au taux élevé de MDA. Néanmoins, ces résultats sont en contradictions avec différentes études (Gasmi et al., 2016). Cette augmentation peut être due à une induction de l'expression des gènes de la GST provoquée par les PYRs comme la DLT dont le mécanisme est encore mal connu (Hu et al., 2019 ; Kaur et al., 2019). Dans cette étude une diminution significative de l'activité enzymatique du GST est observée dans l'hippocampe et le cervelet après exposition chronique aux PYRs et leurs mixtures, cette diminution peut être expliquée par l'affinité du GST avec plusieurs xénobiotiques hydrophobes tels que les PYRs (Dar et al., 2015 ; Sharma et al., 2018). De plus, la GST est nécessaire pour la détoxification d'espèces réactives de l'oxygène par conjugaison avec le groupe sulfhydryle du GSH, sa faible disponibilité endogène pourrait être un facteur limitant et influence par conséquent la fonction protectrice de cette enzyme. Par ailleurs, la baisse de l'activité de la GST est naturellement due à l'inhibition de l'activité de la transcription du gène de la GST ce qui est le cas dans l'hippocampe (Khan et al., 2013 ; Kaur et al., 2019).

Les enzymes antioxydants GPx CAT et SOD présentent différentes activités en fonction des types des PYRs ainsi que les parties régionales du cerveau.

L'hippocampe en faveur du stress oxydatif est caractérisée par une chute significative du potentiel antioxydant du GPx après exposition au DLT et MIX, cette diminution de l'activité potentialise la génération de radicaux superoxyde et peroxyde d'hydrogène dans l'hippocampe. Ceci conduit en outre à la peroxydation des lipides dans la membrane, entraînant une augmentation de la peroxydation lipidique observée dans cette étude *via* la teneur élevée de MDA. Ces résultats se concordent avec les études de Dar et al. (2015), Gargouri et al. (2018a), Syed et al. (2017) et Rajawat et al. (2019), une telle diminution est expliquée dans d'autres travaux par le taux massif de radicaux libres générés par la métabolisation des PYRs d'un côté, et de l'autre côté de son épuisement par saturation ou par dégradation (Dar et al., 2015 ; Gasmi et al., 2016). Une telle diminution est révélée par les travaux de Dubey et al. (2012) et Saoudi et al. (2017) après traitement par DLT ainsi par un autre PYR, la cyperméthrine (CYP). Étant donné que l'activité de GPx dépend du niveau de GSH, la diminution des taux de GSH, chez les groupes de cette région est associée à l'utilisation accrue de GPx pour la détoxification des radicaux libres toxiques induits par la DLT et la MIX, et la production de H₂O₂, qui pourrait entraîner une diminution significative de la GPx dans les groupes exposés à ces PYRs (Dubey et al., 2012). Une augmentation de l'activité enzymatique du GPx est également montrée dans

cette étude dans le striatum et le cervelet après exposition aux PYRs, d'après Nieradko-Iwanicka et Borzęcki (2016), dans le stress oxydatif, une régulation des gènes codant pour les enzymes antioxydantes peut se produire. Les GPxs sont des enzymes contenant le sélénium (Se). L'activité de la GPx dans les cellules peut augmenter avec l'apport suffisant de Se fournit par l'alimentation qui maximise l'activité enzymatique. Apparemment, les métabolites de la DLT (3-PBA (d'acide 3-phénoxybenzoïque) et Br2CA) ne présentent pas un risque élevé pour le fonctionnement de ces régions du cerveau, ce qui suggère que le striatum et le cortex pouvaient neutraliser les espèces ROS formées en réponse à une intoxication par la DLT (Nieradko-Iwanicka et Borzęcki, 2016).

La SOD est la première et principale ligne de défense contre l'action de l' $O_2^{\bullet-}$ et d'autres espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les radicaux superoxydes sont produits dans les mitochondries et le réticulum endoplasmique à la suite de l'auto-oxydation des composants de la chaîne de transport d'électrons. La SOD catalyse la dismutation du superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène (Dubey et al., 2012).

L'activité enzymatique de la SOD a diminué dans plusieurs études après traitement par la DLT dans les différents organes, cette diminution est trouvée par Xu et al. (2015) et Nieradko-Iwanicka et Borzęcki (2016) dans le foie, ainsi que par Saoudi et al. (2017) dans les reins et le cerveau et Rajawat et al. (2019) dans les différentes régions du cerveau chez la souris. Cette activité présente une diminution aussi après exposition à la BF (5 mg/kg/jour pour 30 jours) dans le cerveau (Dar et al., 2015) et dans les régions du cerveau, le cortex, le striatum et l'hippocampe après exposition à 3,5 et 7 mg/kg/jour de BF pour 1 mois (Syed et al., 2017). Des résultats similaires sont trouvés dans la présente étude après exposition chronique de l'hippocampe à la DLT.

Néanmoins, des résultats différents sont obtenus de la présente étude où l'activité de la SOD après exposition aux PYRs a présenté une augmentation significative dans les autres régions du cerveau étudiés, cette augmentation peut être expliquée par le pouvoir du cerveau à neutraliser les espèces de ROS formées en réponse à l'intoxication par DEL et BF (Nieradko-Iwanicka et Borzęcki, 2016) à cause de la dose la plus faible et la durée chronique d'exposition par rapport aux études citées. Des résultats similaires sont trouvés lors de l'étude de l'effet de la DLT et la QUER chez les poissons, ils ont trouvé que le traitement par la DLT induit la synthèse de la SOD alors que la combinaison entre la QUER et la DLT provoque sa diminution (Bhattacharjee et Das, 2017).

Une autre étude récente a mentionné également l'induction du système antioxydant enzymatique dans le foie et les reins suite à une intoxication aigue par la DLT à 64,9 mg/kg pour une seule administration, cette augmentation pourrait être en raison de l'induction par le stress oxydatif pour éliminer ou prévenir la formation de radicaux libres (Anitha et al., 2019).

La CAT est une enzyme contenant de l'hème située dans les peroxysomes qui catalyse la dismutation de H_2O_2 en eau et en oxygène. Cette enzyme est importante pour l'élimination du peroxyde d'hydrogène généré par la SOD (Yonar et Sakin, 2011 ; Khan et al., 2017). La diminution de l'activité de la CAT a été rapportée dans différents organes des rats exposés aux PYRs (Khan et al., 2017). La présente étude montre également une diminution de l'activité enzymatique de la CAT après exposition chronique aux PYRs dans toutes les régions du cerveau étudiées, cette réduction de l'activité antioxydante est révélée par plusieurs autres études (Dar et al., 2015 ; Abdel-Daim et al., 2016 ; Syed et al., 2017). La réduction de l'activité de cette enzyme favorise la génération des radicaux superoxyde et peroxyde d'hydrogène dans les différentes régions. Ceci conduit en outre à la peroxydation des lipides dans la membrane, entraînant une augmentation de la peroxydation lipidique qui est révélée dans cette étude. La quercétine et ses métabolites ont une capacité de diffusion plus élevée dans les membranes biologiques et possèdent donc une propriété de piégeage élevée ainsi qu'une propriété de régulation rédox dans le système bicouche lipidique, elle peut traverser la barrière hématoencéphalique et rejoindre le système nerveux central lorsqu'elle est administrée par voie orale (Paulke et al., 2006). La co-exposition des rats aux PYRs associés à la QUER a atténué l'effet toxique de ces PYRs dans les différentes régions du cerveau, ces résultats sont en concordance avec ceux de Gasmi et al. (2017) et Kaur et al. (2019).

5. Conclusion

L'exposition des rats aux PYRs seuls ou en mixture présente un déséquilibre du statut redox au niveau cytosolique dans le cerveau, l'hippocampe et le striatum en faveur du stress oxydatif sont caractérisés par une chute significative du potentiel antioxydant. En effet, la peroxydation lipidique est accentuée et une perte énorme de la teneur cellulaire en GSH et l'activité antioxydases telles que la SOD, CAT, GPx et GST.

L'utilisation de la QUER comme molécule protectrice contre les effets délétères des PYRs a amélioré de façon significative le statut redox cytosolique dans les différentes régions du cerveau, ce qui confirme ses vertus contre le stress oxydant en renforçant indirectement les systèmes oxydants cellulaires ou en scavangeant directement les ROS.

Chapitre III : Variations neurocomportementales chez le rat adulte exposé chroniquement aux pyréthriinoïdes à faibles doses et l'effet de la quercétine.

1. Introduction

L'être humain est le seul animal capable de rapporter verbalement ce qu'il ressent, ce qu'il perçoit et ce qu'il sait. Pour mieux comprendre les processus émotionnels, perceptuels et cognitifs des autres animaux, un scientifique ne peut qu'observer leur comportement (Carter et Shieh, 2015). L'association entre l'exposition aux pesticides et les effets neurocomportementaux et neurodéveloppementaux suscite de plus en plus d'inquiétude. Pendant de nombreuses années, les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson ont été l'un des principaux axes de la recherche en neurosciences pour comprendre les altérations cellulaires et le mécanisme de la physiopathologie. Les PYRs de synthèse semblent avoir un effet direct sur les neurones, et sont souvent utilisés comme modèles induisant le déficit neurocomportemental chez les mammifères et l'homme (Mani et al., 2014 ; Syed et al., 2017). Le but du neuroscientifique du comportement est non seulement de caractériser le comportement d'un animal, mais également d'identifier et de décrire les corrélats génétiques, biochimiques et cellulaires de ce comportement. Par conséquent, les neurosciences comportementales n'existent pas isolément, mais plutôt en combinaison avec des systèmes et des techniques moléculaires (Carter et Shieh, 2015). Les récentes études comportementales ont montré que l'apprentissage et la mémoire sont les plus particulièrement touchés chez les individus suite à une exposition chronique à des xénobiotiques environnementaux. Une des explications à cette observation réside donc dans l'effet d'une telle exposition aux PYRs sur les processus à la base de la mémoire, que l'on tentera d'analyser (Rouvière et Delmas, 2002).

Cette approche est parmi les premières dans notre faculté ayant pour but d'évaluer les effets neurotoxiques induits par l'exposition aux PYRs sur le comportement global des animaux. Toutefois, une batterie de tests d'ordre neurocomportemental est choisie pour évaluer l'état de la dépression, de l'anxiété, de l'activité locomotrice, de l'apprentissage spatial et non spatial et de la mémoire d'une part, et d'évaluer également l'effet protecteur de la quercétine d'autre part. Pour atteindre cet objectif, plusieurs tests ont été élaborés tels que : le test de la piscine de Morris, test d'Open Field, test de labyrinthe en croix surélevée, test de la nage forcée et le test de sucrose (test d'anhédonie).

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériels

L'étude neurocomportementale a été effectuée au niveau de l'animalerie de la faculté des sciences de la nature et de la vie, université de Jijel. 56 rats *albinos* Wistar femelles provenant de l'institut Pasteur d'Alger, âgés de 04 à 06 semaines, ayant un poids corporel entre 170 g et 190 g. Ces rats ont été soumis aux mêmes conditions d'hébergement et de traitement chronique par les pesticides et la quercétine appliquées dans les chapitres précédents.

2.2. Méthodes

Durant 4 mois d'exposition journalière aux PYRs et à la quercétine, plusieurs tests neurocomportementaux ont été réalisés pendant le dernier mois de la période d'exposition, pour évaluer l'effet des pesticides sur la potentialité neurocomportementale des animaux, en l'occurrence la mémorisation, l'apprentissage, l'anxiété et la dépression, en faisant soumettre les rats à des tests standardisés.

2.2.1. Tests de mémorisation et d'apprentissage

2.2.1.1. Test de Morris (Morris water maze) MWM

a. Description générale

L'apprentissage et la mémorisation spatiale ont été testés par l'évaluation des capacités des rats à mémoriser et à gérer l'information spatiale pour échapper à une situation aversive (l'eau tiède d'un bassin) en atteignant un refuge le plus rapidement possible (une plate-forme non visible immergée à 1cm sous la surface) ; selon la procédure de Morris (1981) et de Weitzner et al. (2015) légèrement modifiée. Le labyrinthe aquatique consistait en un bassin circulaire (diamètre 150 cm ; hauteur 50 cm), divisé en quatre quadrants de taille égale. Au cours des tests, la piscine était remplie d'eau à $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Une plate-forme cylindrique (diamètre de 10 cm ; hauteur de 25 cm) a été placée à l'intérieur du réservoir, la partie supérieure étant immergée à 1 cm de la surface de l'eau, au centre de l'un des quatre quadrants du labyrinthe. L'eau était rendue opaque par le lait en poudre. Les animaux ont été soumis à quatre essais par jour pendant six jours consécutifs (séances d'entraînement). Chaque essai a commencé à partir de l'un des quatre points attribués sur différents quadrants arbitraires du réservoir circulaire. La durée maximale de chaque essai était de 60 secondes, chaque essai étant séparé par un intervalle de temps de 60 secondes. Au début de chaque essai, le rat a été placé dans la piscine avec le nez dirigé vers le mur depuis l'une des quatre positions de départ. Si le rat n'a pas localisé la plate-forme dans les 60 s, l'animal a ensuite été

placé sur la plate-forme pendant 20 s. Vingt-quatre heures après la dernière séance d'entraînement ; le niveau d'acquisition de la tâche a été évaluée par un essai avec sonde consistant à nager librement pendant 60 secondes sans la plate-forme d'évasion. Le temps de latence nécessaire pour trouver la plate-forme d'évacuation pendant les séances d'entraînement, ainsi que le temps cumulé dans le quadrant où se trouvait la plate-forme et la fréquence de passage par la zone de la plate-forme pendant le test de la sonde, ont été analysés. Les vidéos enregistrées de toutes les séances des tests sont analysées manuellement par vision directe de la vidéo et la mesure du temps de chaque paramètre se fait en même temps par le chronomètre.

b. Procédure

1. Le bassin est ramené et mis dans un bon endroit pour ne pas déplacer après.
2. Le micro portable avec un logiciel d'enregistrement des vidéos est placé dans un haut endroit de sorte que tout le bassin sera clairement photographié.
3. Le bassin est rempli avec de l'eau du robinet et, à l'aide d'un thermomètre, la température de l'eau est maintenue à environ 21°C tout au long des tests.
4. Des affiches de papier (04) de couleurs différentes sont placées sur les quatre côtés de la piscine à une hauteur de 6 cm afin de ne pas être mouillées, pour aider le rat à déterminer l'emplacement (indices spatiaux).
5. Le rat est placé délicatement dans la piscine, le chronomètre est démarré et l'enregistrement de la vidéo par le micro portable est vérifiée. Le rat a eu le temps de 1 min pour localiser la plate-forme claire. Une fois que le rat a localisé la plate-forme, il attend 20 secondes sur la plate-forme.
6. Si l'animal trouve la plate-forme et saute ou tombe, le rat sera ramassé et replacé sur la plate-forme
7. Si l'animal ne parvient pas à trouver la plate-forme dans 1 minutes, il sera ramassé et replacé sur la plate-forme pendant 20 s.
8. Après 20 secondes sur la plate-forme, le rat est retiré de la plate-forme et passé pour séchage par des serviettes chaudes puis placé dans une cage propre et chaude.
9. Le labyrinthe est nettoyé des débris avec un filet après chaque essai de rat afin de perturber les signaux olfactifs.
10. Ces étapes sont répétées pour chaque rat du groupe. Après que chaque rat ait terminé le premier essai, il change le quadrant de départ pour chercher la plate-forme.
11. Ces procédures sont effectuées pour 4 essais à partir des quatre quadrants différents de départ, pendant les 6 premiers jours de test.

Remarque : un chronomètre manuel est utilisé pour assurer la précision de l'enregistrement des vidéos de suivi.

12. Le test de sonde (test sans plateforme) s'est déroulé après 24h du dernier test d'entraînement (après le sixième jour) :

- La plate-forme est retirée.
- Un rat est relâché à partir d'un point de libération prédéterminé.
- Chaque rat est laissé nager pendant 60 secondes.
- 04 essais de sonde sont effectués en modifiant chaque fois le point de libération.

Au cours des séances d'entraînement : Le premier jour, la plateforme est disposée clairement pour le rat, les jours de 2 à 6 d'habituation : la plateforme est immergée par l'eau rendue opaque par la poudre du lait, le jour 7 était le test de sonde où la plateforme est totalement enlevée et l'eau est restée opaque (figure 38).



Figure 38. Test de la piscine de Morris. (a) Jour 1 : session d'habituation où la plateforme est clairement évidente pour l'animal. (b) Du jour 2 au jour 6 : séances d'entraînement au cours desquelles l'animal apprend à trouver la position de la plate-forme cachée. Le temps de latence pour trouver la plate-forme d'évasion reflète la capacité de l'animal à acquérir les informations. Le temps de latence pendant le même jour reflète la mémoire de travail (c) Jour 7 : essai avec sonde où la plateforme est retirée et l'animal subit une séance de nage libre de 60 s. Le temps cumulé dans le quadrant où se trouvait la plate-forme reflète la rétention de mémoire de l'animal.

c. Paramètres mesurés

Les vidéos enregistrées tout au long des sessions de test, qu'il s'agisse des tests d'entraînement ou du dernier test de sonde servent de référence pour extraire les résultats numériques sous forme de temps, ceci après traitement des résultats en visionnant et en calculant le temps pris par le rat par le chronomètre. Le premier paramètre calculé est le temps de latence en secondes (s), temps

nécessaire au rat pour atteindre la plateforme (il ne dépasse pas 60 s) ; tandis que dans le test de sonde, la force du rappel de la position de la plateforme est évaluée en analysant le temps passé à l'emplacement virtuel de la plateforme, la mémoire de travail est évaluée aussi durant les tests d'entraînement, elle consiste à calculer et comparer le temps de latence entre les 04 essais du même jour pour chaque rat, en choisissant un ou plusieurs jours d'entraînement.

2.2.1.2. Test de Barnes (Barnes maze) BM

a. Description générale

Le test du labyrinthe de Barnes, décrit pour la première fois en 1979 par Carol Barnes dans le but d'évaluer l'apprentissage et la mémoire spatiale chez les rongeurs. Ce test est très bien adapté aux souris et aux rats de par leur tendance à se cacher dans les petits trous de leur environnement (Barnes et al, 1979).

Le labyrinthe de Barnes consiste en une table circulaire de 1,2 mètre de diamètre et 1 mètre de hauteur, percée de 20 trous autour de la circonférence chacun de 10 cm de diamètre et placée dans une pièce avec des repères visuels à la périphérie (Figure 39). Tous les trous sont des faux trous ne permettant pas à l'animal d'entrer dedans, mais un seul trou mène à un tiroir (30 cm x 20 cm x 15 cm), une boîte noire dans lequel l'animal peut se cacher. Un rongeur est naturellement motivé pour éviter les espaces ouverts et les lumières vives et tente donc de trouver le tiroir obscur. Lors des premiers essais, l'animal a été conduit doucement dans le tiroir. Dans les essais ultérieurs, l'animal est placé au centre de la table et doit trouver la boîte de dépôt lui-même. Après quelques essais, les animaux se souviennent généralement du trou dans lequel se trouve le tiroir et procèdent rapidement et directement vers le trou.

b. Procédure

Le test s'est déroulé, au niveau de l'animalerie pendant 07 jours successifs, de 13h à 16h en silence totale.

1. Le premier jour (pré-entraînement), les rats étaient formés pour entrer dans la boîte d'échappement (trou cible) en les plaçant dans le trou pendant 2 min, donc chaque rat sera guidé vers la boîte de secours, où il va rester pendant 2 min. Après cette séance de pré-entraînement, toutes les séances d'entraînement restantes seront filmées.
2. La lumière blanche est allumée (ampoule de 16 watts directement mis au-dessus du labyrinthe), elle est utilisée comme facteur de refuge pour le rat.

3. Les affiches sont placées « ne pas entrer » à l'extérieur de la porte de l'animalerie.
4. La caméra du micro portable est configurée et fixée dans un haut endroit afin qu'elle puisse filmer toute la surface du labyrinthe.
5. Le premier rat est retiré doucement de sa cage d'origine, et placé dans la grande boîte en plastique.
6. La boîte en plastique avec le rat à l'intérieur est placée au centre du labyrinthe pendant environ 10 secondes (figure 39).
7. Le micro portable situé à une distance de ~100 cm du labyrinthe est mis en marche pour enregistrer la vidéo (la vidéo commence par le numéro de rat, de lot et de jour mentionnés dans une feuille pour faciliter le traitement après).
8. L'animal est enlevé doucement de la boîte et placé sur le centre du labyrinthe et le chronomètre est mis en marche.
9. L'enregistrement est arrêté lorsque l'animal a eu ses quatre pattes à l'intérieur du tiroir.
10. Si le rat n'est pas parvenu à entrer dans le tiroir dans les 5 minutes, il aurait guidé doucement vers le tiroir. Le rat est laissé dans le tiroir pendant 2 min.
11. Le rat du tiroir est placé dans une deuxième cage.
12. L'éthanol à 70% est vaporisé sur le dessus du labyrinthe et le tiroir puis essuyé, pour enlever les traces olfactives de passage précédent du rat.
13. Ces étapes sont répétées jusqu'à ce que tous les rats soient testés pendant sept jours consécutifs, chaque rat est testé pour 1 essai / jour.

c. Paramètres mesurés

Le rat est resté sous la boîte fermée 10 s après quoi la boîte est retirée et le rat était libre d'explorer le labyrinthe pendant 5 min au maximum. Pendant ce temps les paramètres mesurés sont :

1. Temps de latence primaire, signifie le temps nécessaire pour que le rat trouve le tiroir.
2. Temps de latence total qui signifie le temps passé pour que le rat entre totalement dans le tiroir.
3. L'erreur primaire signifie le nombre total d'erreurs (essais d'entrer dans des trous incorrects).

4. L'erreur totale signifie le nombre d'erreurs primaire + le nombre d'essai sans entrer dans le bon trou.

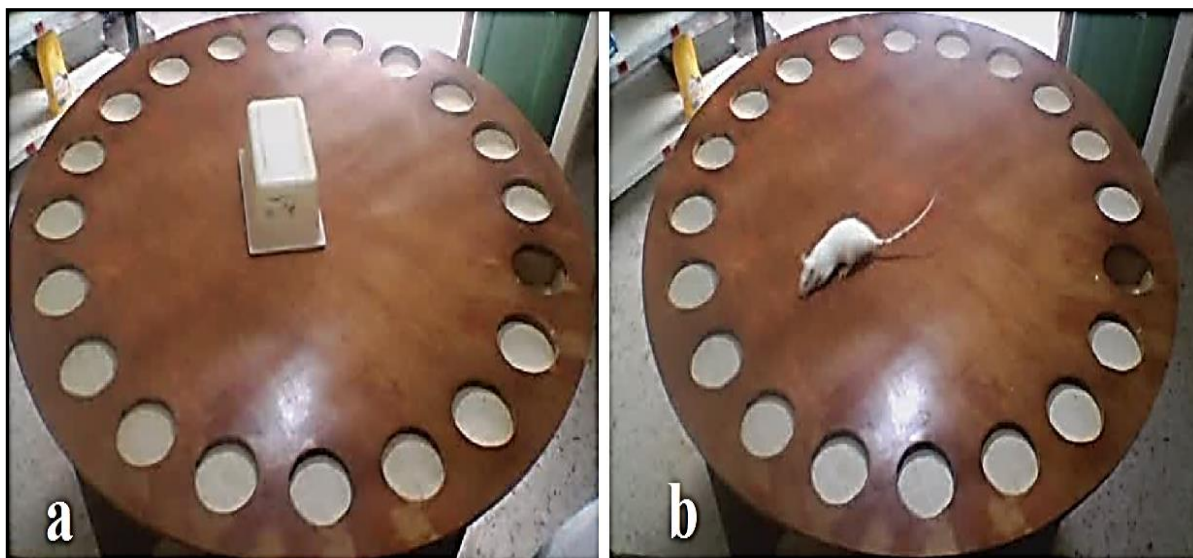


Figure 39. Test de Barnes **a** : début du test , le rat est mis au centre du labyrinthe sous une boîte fermée ; **b** : le rat pendant le test cherche le vrai trou. Le temps de latence total est le temps passé par le rat pour entrer par ces 04 pattes dans le vrai trou. Le temps de latence primaire est le même temps passé mais pour acquérir et trouver le bon trou sans entrer. Le nombre d'erreur primaire est le nombre de tentative d'entrer dans des trous incorrects. Le nombre d'erreur total est le nombre d'erreur primaire plus le nombre de tentative d'entrer dans le bon trou sans entrer.

2.2.1.3. Test de reconnaissance d'objet (novel object recognition) NOR

a. Description générale

Le test de la reconnaissance de nouvel objet (NOR) est un test de mémoire dépendant de l'hippocampe, basé sur la tendance naturelle des rats à explorer un nouvel objet plutôt qu'un objet familier, en présence des deux objets dans un champ ouvert (Sweatt, 2009). C'est un moyen fiable et efficace de tester les différentes phases d'apprentissage et de mémoire chez le rat. Il avait été décrit à l'origine par Ennaceur et Delacour (1988) et était principalement utilisé chez le rat, lequel a été suivi dans cette présente étude avec quelques modifications en suivant les étapes détaillées sur vidéo de Lueptow (2017). Brièvement, le rat est placé dans une enceinte carrée en verre (50 cm de hauteur 50cm de longueur 50 cm de largeur) généralement celle utilisé pour le test du champ ouvert, pendant 10 min. Les expériences sont menées dans une pièce éloignée, faiblement éclairée, dont la température est maintenue à $23\pm 1^\circ\text{C}$ durant toutes les phases du test. Une caméra est placée au-dessus de l'enceinte lors des expériences pour enregistrer les déplacements du rat. Ceci a permis de mesurer ultérieurement l'activité locomotrice des animaux à partir de la bande vidéo prise lors de l'expérience,

b. procédure

Le test s'est déroulé en 03 phases, on a choisi de réaliser le test sur 3 jour, chaque séance est effectuée chaque jour, toutes les séances ont été enregistrées sous forme de vidéo pour chaque rat (Sweatt et al., 2009).

• Séance d'habituat

L'environnement influence le choix de l'animal, la phase d'habituat sert pour familiariser l'environnement du test (l'enceinte) (Antunes & Biala, 2012). Les animaux sont d'abord soumis à une séance de reconnaissance d'enceinte, le rat est déposé dans un coin pour la tâche de reconnaissance spatiale, la tête dirigée vers le coin. La durée de la séance d'habituat était de 10 mn, durant laquelle l'animal explore librement l'enceinte (figure 40a).

• Séance d'entraînement

Dans cette phase appelée aussi de familiarisation, après 24h, le rat est placé dans le même endroit que la séance passée. Les rats ont été présentés avec un pair d'objets identiques de taille, de couleur, de texture, et ayant des formes similaire, égales (15 cm de hauteur 9 cm de largeur 8 cm de longueur) (figure 40 b) qui avaient été placés dans les coins opposés pendant 10 min. L'exploration des objets sont pris en compte lorsqu'un rat présente un comportement d'investigation : reniflement, grignotement, ou pénétration dans une zone de moins de 0,5 cm autour de l'objet.

• Séance du test

La mémoire de reconnaissance d'objet est évaluée le 3^{ème} jour pendant la séance du test, effectuée 24 h après le test d'entraînement, l'un des objets familiers a été remplacé par un autre (nouvel objet de forme différente), et chaque rat a été laissé dans la cage pendant 10 min pour explorer les deux objets non identiques (figure 40c). Le nombre de visites et le temps consacré à l'exploration de chaque objet sont enregistrés. Un animal normal passe plus de temps à enquêter sur le nouvel objet que l'objet restant de la veille, ce qui indique un souvenir pour l'objet familier connu. Les indices d'apprentissage de la reconnaissance d'objet sont exprimés en termes de temps consacré à l'exploration du nouvel objet par rapport au temps consacré à l'exploration d'un objet familier. Le temps d'exploration pour l'objet familier ou le nouvel objet au cours de la phase de test a été chronométré et enregistré.



Figure 40. Test de la reconnaissance de nouvel objet (NOR). *Le test se déroule sur 3 jours, a : le premier jour est l'habituation, dans lequel un rat est autorisé à explorer le champ ouvert pendant 10 min, b : Le jour 2 est l'entraînement, dans lequel le rat a permis d'explorer l'arène avec 2 objets identiques placés sur la diagonale, c : Le test du jour 3 qui aura lieu 24 h après b (cet intervalle de rétention peut être raccourci ou prolongé, en fonction des conditions expérimentales).*

c. Paramètres mesurés

A partir des séances vidéo enregistrées, le temps passé à explorer chaque objet (a_1 , a_2) durant la séance d'entraînement et le temps passé à explorer chacun des deux objets non identiques (a , b) durant la séance du test sont chronométrés. Les paramètres mesurés sont définis par Delacour et Ennaceur (1988) et puis utilisés par de très nombreux auteurs (tableau 8) :

Exploration	Discrimination
$e_1 = a_1 + a_2$ (2 objets familiers)	$d_1 = b - a$
$e_2 = a + b$ (objet familier+ nouvel objet)	$d_2 = d_1/e_2$
	$d_3 = (b/ e_2) \times 100$

Tableau 8. Formules pour l'analyse des données dans le test de NOR. e_1 est le temps total d'exploration pendant l'entraînement. a_1 et a_2 est le temps passé en secondes à chaque objet identique pendant la séance d'entraînement. e_2 est le temps total d'exploration pendant les séances des tests, où a est l'objet familier et b est le nouvel objet.

2.2.2. Tests d'anxiété

2.2.2.1. Test du champ ouvert (Open Field) OP

a. Description générale

L'activité locomotrice, est considérée comme un index d'anxiété chez les rats, elle est mesurée dans le test de l'Open Field (OF) initialement décrit par Hall (1934). Le protocole suivi est celui de Seibenhener et Wooten (2015), avec quelques modifications. Le test consiste à placer l'animal dans une enceinte ouverte (open field) inconnue en verre (le même dispositif du test de

reconnaissance d'objet), observer son comportement et évaluer la capacité exploratoire dans un contexte stressant par un éclairage provenant d'une ampoule de 16 watts centrée 50 cm sous le plan horizontal. Une carte plastifiée de format A3 présentant 25 carreaux fixée sous la paroi de l'enceinte (figure 41). Les expériences sont menées dans une pièce calme sans bruit dont la température est maintenue à $23 \pm 1^\circ\text{C}$ durant toute l'expérience. Chaque rat était initialement placé dans un des quatre coins de l'open-field, la tête orientée vers le coin. Son comportement était observé pendant 5 min (Seibenhener et Wooten, 2015).

b. Procédure

1. L'enceinte utilisé est la même utilisé dans le test de reconnaissance d'objet, mesurant 50 cm de largeur, 50 cm de longueur et 50 cm de hauteur.
2. L'éclairage est allumé, et l'enregistrement de la vidéo sur microordinateur est lancé.
3. Un rat (en affichant le numéro de lot et le numéro de rat) est enlevé de son cage est mis doucement dans l'enceinte, avec direction de la tête vers un coin bien déterminé (pour tous les rats).
4. Le rat est laissé explorer librement l'enceinte pendant 5 min.
5. Après 5 min, l'enregistrement de la vidéo est arrêté, le rat est retiré et retourné à sa cage.
6. Les granulés fécaux sont tous enlevés et les taches d'impureté sont nettoyés ; après l'éthanol 70 % est vaporisé sur le sol et les murs du quadrant de l'enceinte et essuyé avec une serviette en papier propre.
7. Après séchage complet de la solution d'éthanol le rat suivant est testé selon les mêmes étapes.

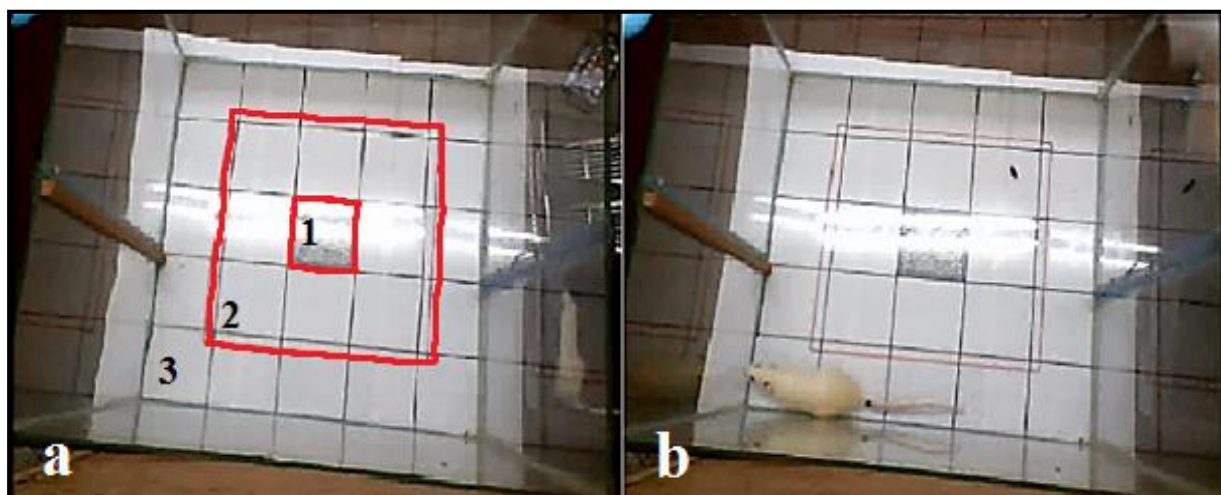


Figure 41. Test du champ ouvert (open field) **a** : l'enceinte est divisée en trois parties : zone centrale (1), zone intermédiaire (2), zone périphérique (3). **b** : le rat explore l'enceinte pendant le test de 5 min.

c. Paramètres mesurés :

- Le nombre de carreaux traversés et le temps passé dans la zone centrale.

- Le nombre de carreaux traversés et le temps passé dans la zone intermédiaire.
- Le nombre de carreaux traversés et le temps passé dans la zone périphérique.
- Le nombre de redressement.
- Le nombre de défécation.

2.2.2.2. Test du labyrinthe en croix surélevée (elevated plus maze test) EPM

a. Description générale

Le labyrinthe en croix surélevée (EPM) permet de mesurer le degré d'anxiété d'un animal selon son aversion spontanée pour le vide. L'expérience exploite le conflit, chez les rongeurs, entre la peur des espaces ouverts et illuminés et le désir d'explorer un nouvel environnement (Belovicova et al. 2017). Les bras fermés représentent la sécurité, alors que les bras ouverts offrent une valeur exploratoire. Un animal anxieux aura naturellement tendance à préférer les espaces clos et sombres aux espaces ouverts et éclairés, donc il aura une tendance proportionnelle à passer moins de temps dans les bras ouverts et plus de temps dans les bras fermés (Sweatt, 2009). Partant de ce principe, l'anxiété comportementale est mesurée par le degré d'évitement des espaces ouverts du labyrinthe. Ce modèle a été initialement décrit par Pellow et al., (1985) chez le rat et réalisé selon le protocole cité par Komada et al., (2008) avec quelque modification. Le labyrinthe est constitué de quatre bras en bois peints en noir (longueur 50 cm, largeur 10 cm) qui communiquent par l'intermédiaire d'une zone centrale (10 x10 cm). Deux bras opposés comportent des parois latérales de 30 cm de hauteur (bras fermés) alors que les deux autres sont dépourvus (bras ouverts) (figure 42). L'ensemble du dispositif est placé à 75 cm du sol et éclairé par une lampe halogène d'une intensité de 16 watts. L'animal est placé en zone central, face à un bras fermé. L'analyse des vidéos permet de mesurer le nombre d'entrées, et le temps passé dans chaque compartiment pendant 5 minutes.

b. Procédure

1. L'éclairage est allumé, et l'enregistrement de la vidéo sur microordinateur est lancé.
2. Un rat (en affichant le numéro de lot et le numéro de rat) est enlevé de son cage est mis doucement dans le labyrinthe dans la zone centrale, face à un bras fermé (tous les rats sont mis par la même façon).
3. Le rat est laissé libre à explorer les bras du labyrinthe pendant 5 min.
4. Après 5 min, l'enregistrement vidéo est arrêté, l'animal est enlevé et le labyrinthe est nettoyé par l'éthanol 95%.

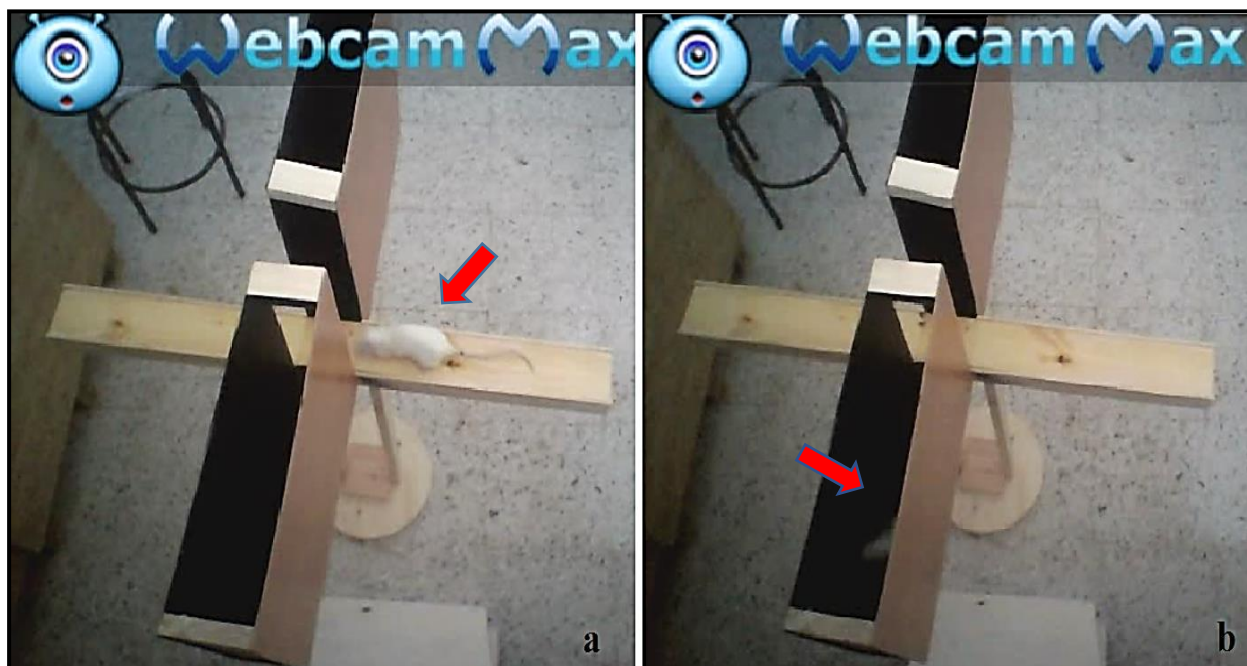


Figure 42. Test de labyrinthe en croix surélevée (elevated plus maze test), **a** : le rat se trouve sur le bras ouvert (moins anxieux) ; **b** : le rat se trouve dans le bras fermé (plus anxieux).

c. Paramètres mesurés :

Les variables mesurées sont :

- Le nombre d'entrées dans les bras ouverts.
- Le nombre d'entrée dans les bras fermés.
- Le temps passé au bras ouvert.
- Le temps passé au bras fermé.
- Le temps passé au centre.

A partir de ces variables, les paramètres calculés sont : le nombre total d'entrées dans les bras qui renseigne sur l'activité locomotrice de l'animal ainsi que le pourcentage d'entrées en bras ouverts [% entrées bras ouverts = (nombre entrées bras ouvertes / nombre total d'entrées) x 100] qui reflète le degré d'anxiété du rat.

2.2.2.3. Test de la chambre claire /obscur (Dark Light Box) DLB

a. Description générale

Ce test a été introduit pour la première fois par Crawley et Goodwin en 1980, il est basé sur l'aversion naturelle des rongeurs envers les espaces éclairés (Belovicova et al., 2017), les rats ont généralement horreur des endroits très éclairés ; ainsi, plus le rat est anxieux, plus il aura moins de tendance à explorer le compartiment clair (Bourin & Hascoët, 2003). Le dispositif de ce test est le même de celui du test de champs ouvert, sauf que la chambre a été séparée en deux compartiments :

le compartiment clair (CC) de dimensions (30 cm x 30 cm x 50 cm) a été laissé transparent, ouvert en haut et bien éclairé par une lumière de 16 watts, et le compartiment obscur (CO), de dimensions (20 cm x 20 cm x 50 cm) a été enveloppé avec une couverture noire, fermé en haut (figure 43). Les deux compartiments sont restés liés entre eux par une petite ouverture qui permet juste l'entrée et la sortie du rat. Les rongeurs ont tendance à éviter le compartiment éclairé donc, les mesures d'exploration dans cette zone (temps, la locomotion et les entrées) sont utilisées comme indices expérimentaux de l'anxiété. Du fait du cloisonnement du CO, seul le comportement de l'animal dans le CC est observable et quantifiable.

b. Procédure

1. L'éclairage est allumé, l'enregistrement de la vidéo sur microordinateur est lancé en plein calme.
2. Le rat a été placé dans le compartiment clair avec la tête orientée vers le trou et laissé libre de l'explorer pendant 5 min.
3. Après 5 min, l'enregistrement de la vidéo est arrêté, le rat est retiré.
4. les deux compartiments (CC et CO) sont nettoyés par l'éthanol 70 %.

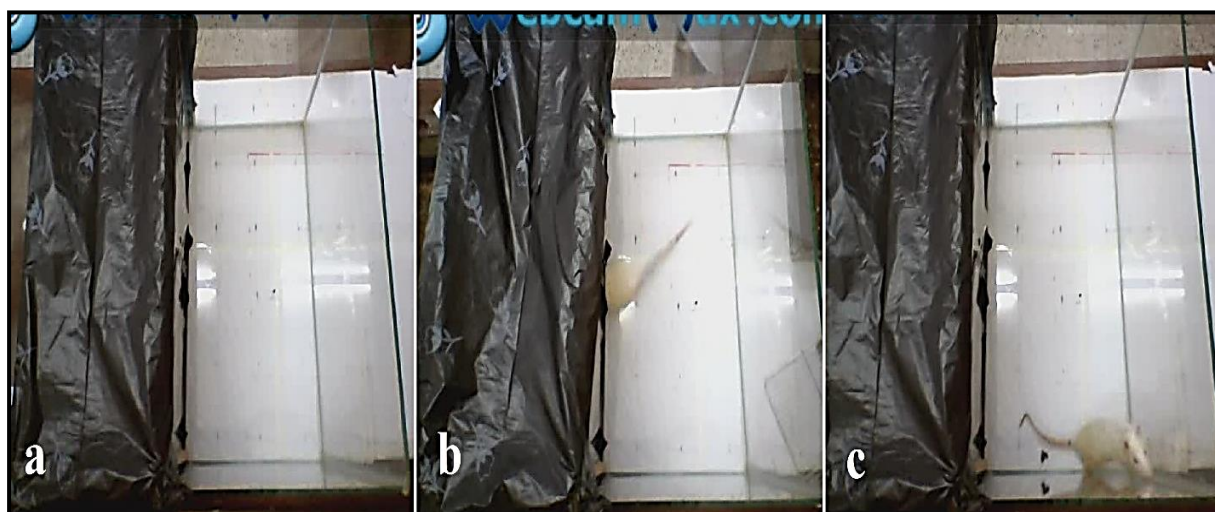


Figure 43. Test de chambre claire/obscur (dark light box) ; **a** : le dispositif de ce test est composé de deux arènes : une arène noire non-éclairée (CO), l'autre blanche et lumineuse (CC), les deux arènes sont liées entre eux par une petite ouverture ; **b** : le rat est mis au centre avec la tête dirigée vers le trou, le test ne débute que lorsque l'animal entre dans le CO. A partir de ce moment, le comportement de l'animal est observé durant 5 minutes ; **c** : le nombre de redressement est compté seulement dans le CC.

c. Paramètres mesurés :

A l'aide d'un chronomètre, les paramètres suivants sont calculés :

Pour révéler le niveau d'anxiété du rat, on mesure :

- Le temps passé au compartiment clair (CC) en secondes.
- Le temps passé au compartiment obscur (CO) en secondes.

- Le temps de latence (s) : le temps mis par l'animal pour passer du CS au CC pour la 1ère fois, pour renseigner sur l'activité locomotrice et exploratoire du rat testé, on mesure :
- Le nombre de redressement.
- Le nombre d'alternance entre le CC et CO.

2.2.2.4. Test des billes (marble burying test) MB

a. Description générale

Le test d'enfouissement du marbre a été utilisé pour mesurer l'enfouissement défensif induit par l'anxiété, l'augmentation de l'anxiété dans ce test est traduite par le nombre de billes enterrées (Lo et al., 2014). Ce test a été réalisé en suivant un protocole modifié de Deacon (2006) et Angoa-Pérez et al. (2013). 15 billes en marbre de 1,5 de diamètre ont été espacées de 5 cm et uniformément placées dans des cages tapissées d'une litière propre et fine de 8 cm d'épaisseur. Le rat est laissé seul à explorer la cage pendant une période de 15 minutes ; après le nombre de billes enterrées aux deux tiers par de la sciure de bois a été compté (figure 44).

b. Procédure

Ce test a été réalisé au niveau de l'animalerie, en absence de toute personne sauf l'expérimentateur, pour assurer le calme.

1. L'éclairage est allumé, et l'enregistrement de la vidéo sur microordinateur est lancé.
2. une cage standard (26 cm x 48 cm x 20 cm) a été remplie d'environ 5 cm de profondeur avec une sciure de bois propre et fine, légèrement tapissée pour obtenir une surface plane et uniforme.
3. 15 billes en marbre uniformes et standard de 1,5 cm de diamètre ont été placées à la surface de la sciure, espacées régulièrement, chacune d'environ 5 cm (figure 44 a).
4. Chaque rat est placé seul dans la cage et laissé libre à explorer la cage avec les billes pendant 15 min définies par un chronomètre.
5. À la fin du test, le rat est enlevé et le nombre de billes enterrées est compté. (La bille est considérée enfouie si 2/3 de sa surface ou plus sont recouverts par la sciure).
6. Pour le test suivant (rat suivant), la sciure de bois est remplacée par une autre propre, les billes sont nettoyées par une serviette contenant de l'éthanol 70 %.

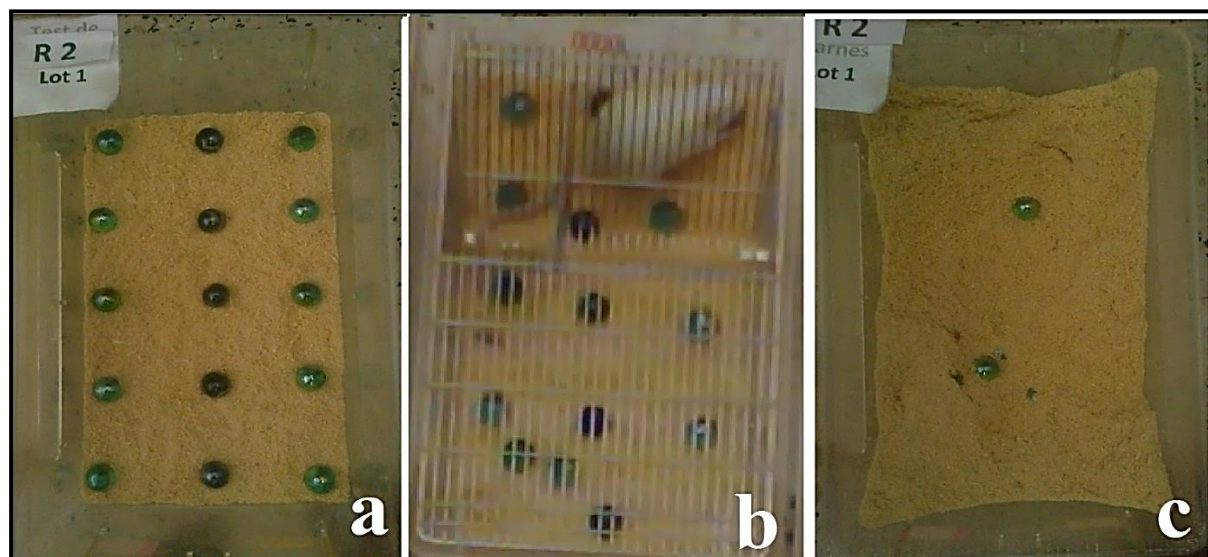


Figure 44. Test des billes enterrées, **a** : début du test, 15 billes sont rangées en trois lignes ; **b** : pendant le test, un seul rat est laissé libre dans la cage contenant les billes pendant 15 min ; **c** : fin du test, le rat est retiré et le nombre des billes enterrées est compté.

c. Paramètres mesurés :

- Nombre de billes enterrées.

2.2.3. Tests de dépression

2.2.3.1. Test de la nage forcée (Forced Swim Test) FST

a. Description générale

Le test de la nage forcée (FST) a été introduit par Porsolt (1977) pour étudier le comportement dépressif chez les rongeurs. La méthode était basée sur l'observation du rat, lorsqu'il est forcé de nager sans possibilité de s'échapper (Belovicova et al., 2017). Les rats ont été soumis à une épreuve de nage forcée d'une durée de 5 minutes (figure 45 b). On a mesuré la durée pendant laquelle l'animal nage activement ou flotte seulement de manière à conserver la tête hors de l'eau (Kahloula et al., 2014). Après s'être débattu dans l'eau, l'animal devient presque immobile, bougeant les pattes de temps à autre pour rester à flot ou retrouver son équilibre. Cette immobilité est interprétée comme étant le reflet d'un « désespoir comportemental », qui survient lorsque l'animal réalise qu'il ne pourrait s'échapper. Cet état d'immobilité comportementale facilement identifiable a été décrit comme un état de « désespoir », lorsque le rat se rend compte que la fuite est impossible et abandonne la nage (désespoir comportemental). Dans le cadre de cette interprétation, l'immobilité est vue comme un comportement dépressif (Porsolt et al., 1977).

b. Procédure

On a suivi ce protocole modifié de Kahloula et al. (2014) et Yankelevitch-Yahav et al. (2015).

- 1- Un récipient transparent cylindrique de 20 cm de diamètre et de 80 cm de hauteur, est rempli d'eau de $22^{\circ}\text{C} \pm 1$ jusqu'à 45 cm de la profondeur (figure 45 a) de façon que les pattes inférieures du rat ne touchent pas le fond, afin d'empêcher le rat de s'échapper.
- 2- L'enregistrement de la vidéo est lancé en indiquant le numéro de rat et de lot.
- 3- Le rat est mis doucement dans le récipient et laissé à nager librement pendant 5 minutes.
- 4- Après 5 minutes, l'enregistrement de la vidéo est arrêté, le rat est retiré et séché par un papier absorbant et laissé dans une cage de séchage.
- 5- Le récipient est nettoyé pour l'essai suivant.

c. Paramètres mesurés :

Après avoir visionné les vidéos en utilisant un chronomètre, les paramètres suivants sont mesurés :

- Le temps d'immobilité (secondes).
- Le temps de latence d'immobilité (secondes)

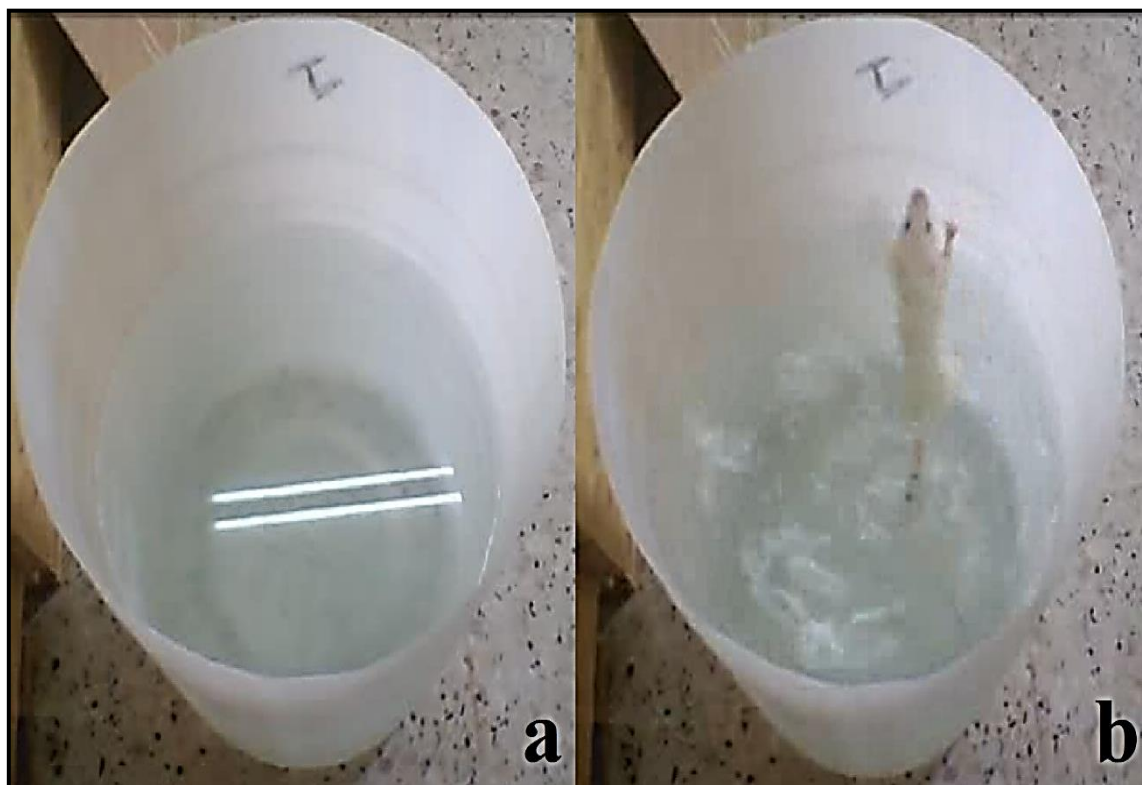


Figure 45. Test de la nage forcée (forced swim test) ; **a** : le récipient de (80 cm x 20 cm) est remplie d'eau à 45 cm de profondeur ; **b** : chaque rat est laissé nager librement pendant 5 min.

2.2.3.2. Test de sucrose (test d'anhédonie)

a. Description générale

L'un des principaux symptômes des troubles dépressifs est l'anhédonie, décrite comme « ... un intérêt ou un plaisir nettement diminué dans toutes ou presque toutes les activités... » (Hoffman, 2015), l'anhédonie est mesurée par un test de préférence de sucrose chez le rat, basé sur un paradigme de choix entre deux bouteilles (Liu et al., 2018), l'une contient de l'eau de robinet, l'autre une solution de saccharose de 2 % (Eagle et al., 2016).

La procédure de choix de deux bouteilles citées par Eagle et al., (2016) avec quelques modifications, permet de comparer la préférence comportementale pour la solution de saccharose dans l'eau de boisson par rapport à l'eau uniquement (figure 46). La préférence est mesurée par le volume ou le poids du liquide consommé quotidiennement, qui est ensuite converti en pourcentage de préférence. La préférence pour le saccharose est atténuée par une diversité de facteurs de stress chroniques (Eagle et al., 2016).

b. Procédure

- Chaque lot a été logé dans une seule cage (07 rats) et a été présenté avec deux bouteilles uniformes de 400 ml de volume, l'une contenant de l'eau de robinet (A), l'autre contenant une solution de saccharose (B) (figure 46).
- la consommation d'eau et de solution de saccharose a été mesurée (en notant le volume de départ – le volume après 24 h) à 14h00 chaque jour pendant 4 jours.
- pendant la même heure (14 h) la position de la bouteille de saccharose (gauche ou droite) a été inversée pour contrôler la préférence latérale.
- Durant les 4 jours du test, et à cause de l'urination fréquente, les cages sont nettoyées et la sciure de bois est renouvelée par une autre propre et sèche chaque jour.
- La préférence de saccharose a été calculée comme le rapport entre la consommation de l'eau sucrée et la consommation totale des liquides (eau de robinet + eau sucrée).

d. Paramètres mesurés :

A partir de ce test, et après la prise des volumes des liquides bus de chaque bouteille pendant 4 jours, on calcule :



Figure 46. Test d'anhédonie (test de sucrose). La mise de 2 bouteilles de choix aux rats, bouteille A contenant l'eau de robinet, bouteille B contenant la solution de sucrose à 2 % (Eagle et al., 2016).

Le volume d'eau sucrée consommé par chaque lot pendant 04 jours.

$$\text{Le pourcentage de sucrose/ liquide total} = \frac{\text{le volume de l'eau sucrée consommée}}{\text{le volume d'eau sucrée} + \text{le volume d'eau de robinet}} \times 100$$

3. Résultats

3.1. Effets des pyréthrinoïdes et de la quercétine sur le neurocomportement des rats

3.1.1. Test de Morris

Un des tests les plus utilisés pour évaluer l'apprentissage spatial chez le rat est le labyrinthe aquatique de Morris. Il s'agissait à l'origine de tester la capacité des rats à apprendre et à mémoriser la position d'une plate-forme immergée dans une piscine d'eau opaque par rapport à des repères visuels extérieurs.

La figure 47 montre les résultats de la moyenne du temps passé, dit temps de latence en seconde, de chaque lot pour retrouver la plateforme pendant les 6 jours d'acquisition du test. On constate une diminution significative ($p < 0,05$) du temps de latence pendant le 2^{ème} jour du test chez les rats traités par la DLT et MIX+QUER par rapport au témoin. Au 3^{ème} jour, une diminution significative du temps de latence est enregistrée chez les groupes DLT, MIX et BIF+QUER après comparaison avec le témoin. Au 4^{ème} jour, une diminution significative est enregistrée chez le groupe BIF, ainsi qu'une diminution très significative ($p < 0,01$) est constatée chez les groupes DLT et BIF+QUER par rapport au témoin. Concernant la comparaison entre les groupes, une diminution significative ($p < 0,05$) est enregistrée chez le groupe DLT lorsqu'il est comparé avec le groupe DLT+QUER pendant le 1^{er} jour et le 6^{ème} jour ; tandis que durant le jour 4, on a noté une diminution très significative ($p < 0,01$).

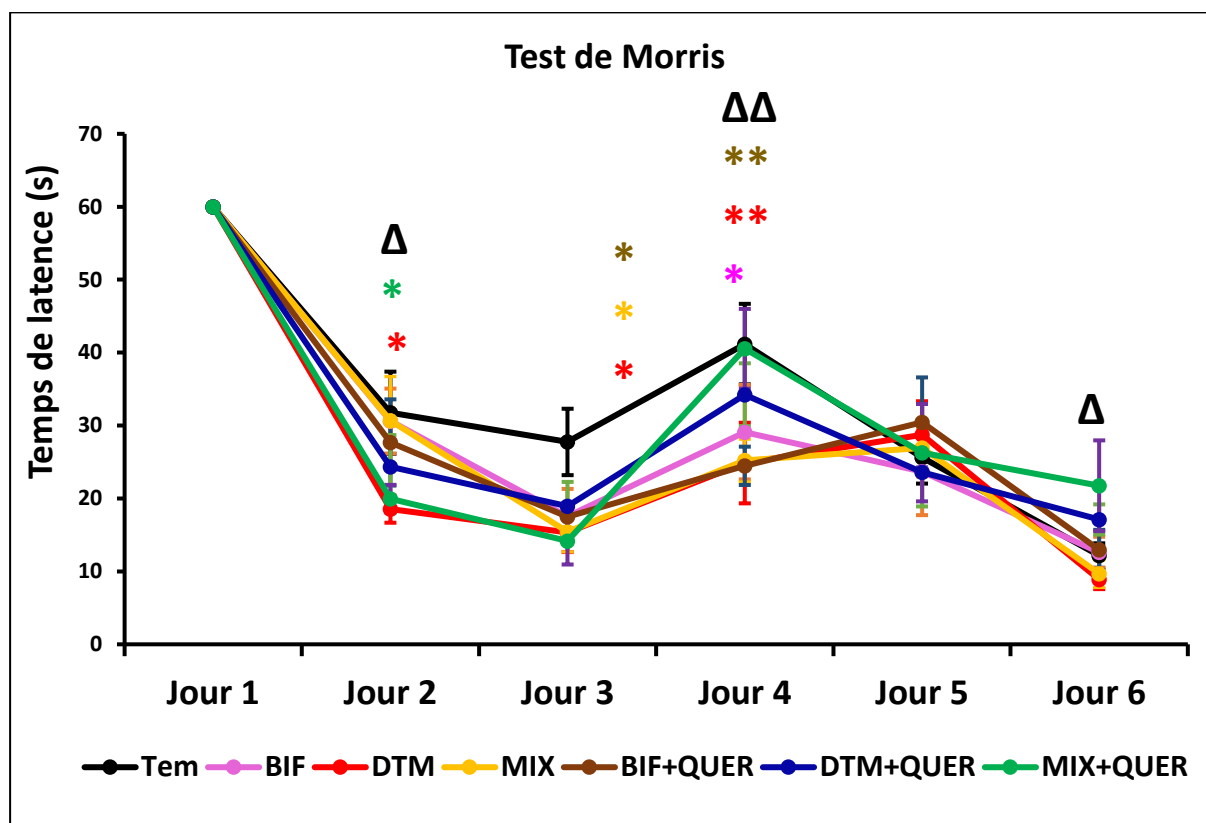


Figure 47. Effet des BF, DLT et leur mixture, seuls ou associés à la quercétine sur le temps de latence du test de la piscine de Morris pendant les séances d'acquisition chez le rat. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, $n=7$. Le test de Student a été utilisé pour la comparaison entre les groupes : (*)comparaison avec le témoin: $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; (Δ) : comparaison de DLT avec DLT +QUER Δ : $p < 0,05$; $\Delta\Delta$: $p < 0,01$.

La figure 48 montre les résultats de la moyenne du temps passé dit temps de latence en seconde de chaque lot pour trouver la plateforme pendant chaque essai (04 essais) pendant le 3^{ème} jour du test de Morris. Ce paramètre est utilisé pour évaluer l'apprentissage à court terme. En comparant les groupes traités avec le groupe témoin pendant le 1^{er} essai de nage du 3^{ème} jour, une diminution significative ($p < 0,05$) du temps de latence chez les rats traités par BIF, ainsi une diminution très significative ($p < 0,01$) du temps de latence chez les groupes traités par DLT et MIX+QUER ont été enregistrés ; tandis que pendant le 2^{ème} essai de la nage, une diminution significative ($p < 0,05$) du temps de latence est notée chez les groupes DLT, MIX, et DLT + QUER par rapport au témoin alors qu'une diminution très significative ($p < 0,01$) est révélée chez le groupe BIF+QUER. Concernant la comparaison entre les groupes, le groupe DLT a présenté une diminution très significative ($p < 0,01$) par rapport au groupe DLT+QUER. Or, aucune différence significative n'a été enregistrée durant le 3^{ème} et le 4^{ème} essai.

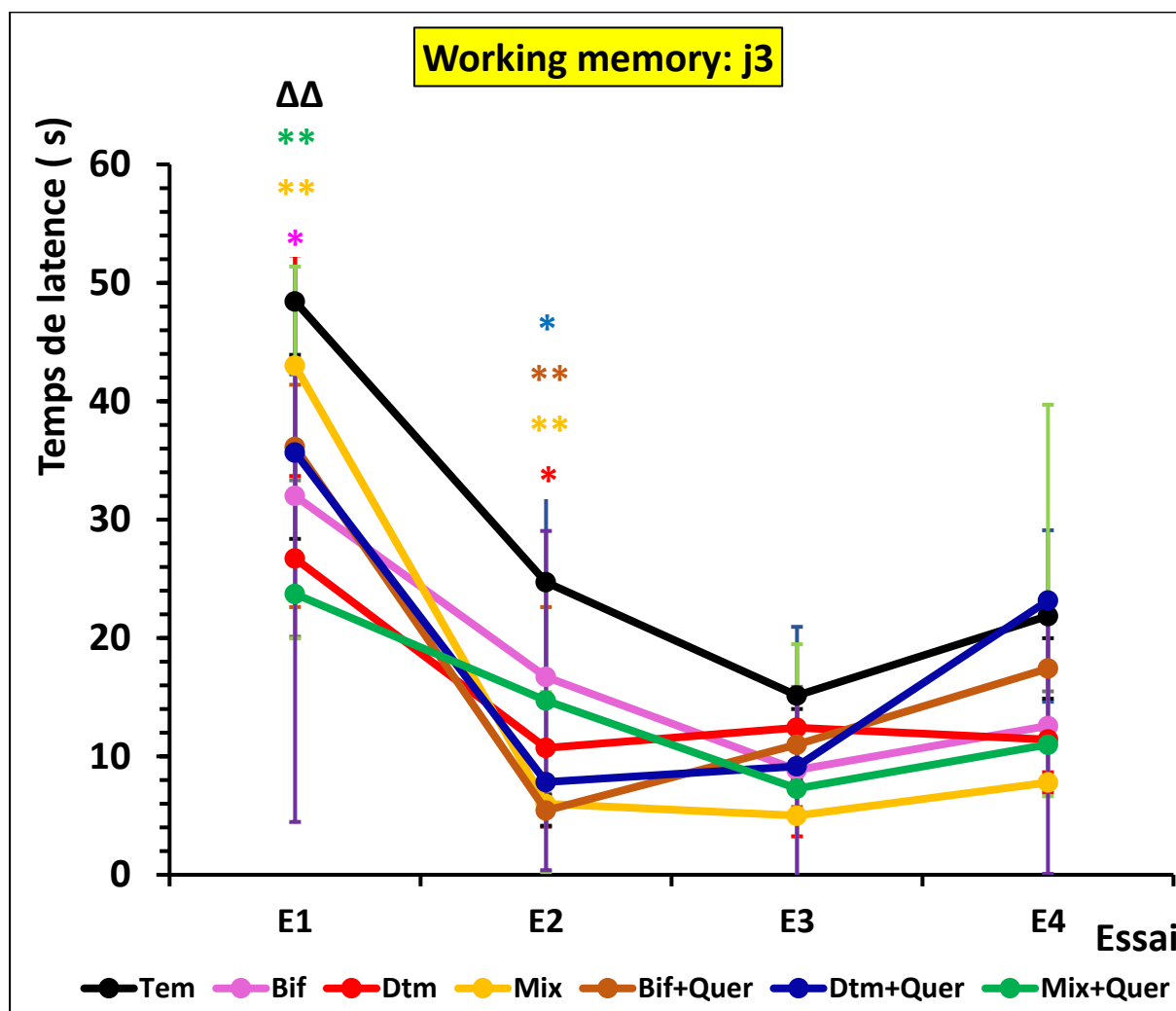


Figure 48. Effet de l'exposition chronique au BF, DLT et leur mixture, seuls ou associés à la quercétine sur le temps de latence des essais du 3^{ème} jour du test de la piscine de Morris (mémoire de travail). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, $n=7$. Le test de Student a été utilisé pour la comparaison entre les groupes : (*)comparaison avec le témoin: $*p < 0,05$; $** p < 0,01$; (Δ) : comparaison de DLT avec DLT + QUER : $\Delta\Delta p < 0,01$.

La figure 49 montre les résultats obtenus après traitement des vidéos du test de sonde. L'analyse statistique a montré que le temps passé dans le quadrant cible est significativement supérieur ($p < 0,05$) chez les rats traités par DLT+QUER et MIX + QUER par rapport à celui des rats témoins, alors qu'aucune variation significative n'est constatée chez les autres groupes traités. Concernant la comparaison entre les groupes, le groupe DLT montre une diminution très significative ($p < 0,01$) par rapport au groupe DLT+QUER ; d'autre part, le groupe MIX a présenté une diminution significative ($p < 0,05$) par rapport au groupe MIX+QUER.

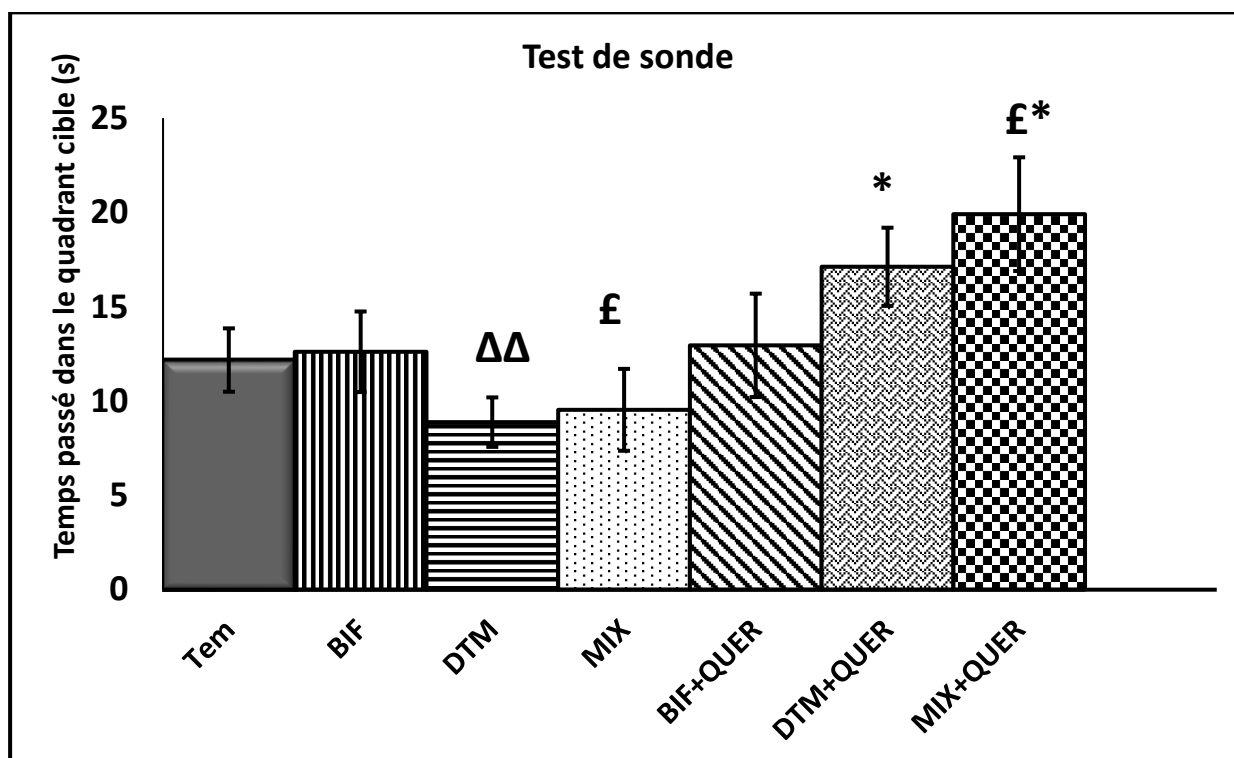


Figure 49. Effet de l'exposition chronique au BF, DLT et leur mixture, seuls ou associés à la quercétine sur le temps passé dans le quadrant cible durant le test de sonde de la piscine de Morris (probe test). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, $n=7$. Le test de Student a été utilisé pour la comparaison entre les groupes : (*)comparaison avec le témoin : ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$; (Δ) : comparaison de DLT avec DLT + QUER (£) : comparaison de MIX avec MIX + QUER : £ $p < 0,05$.

3.1.2. Test de Barnes

Un deuxième test de la mémorisation spatiale, moins stressant à l'animal que le test de la piscine de Morris est le test de Barnes. Ce test met en jeu les capacités de mémorisation spatiale et d'orientation qui sont sous-tendues par la région cérébrale hippocampale (de Toledo-Morrell et al., 1984).

Les résultats obtenus après la réalisation du test et traitement des vidéos sont représentés dans la figure 50. Dans le test de Barnes, les animaux ont présenté une tendance de performance spatiale durant les 7 jours d'acquisition, révélée par une diminution du temps total de latence (figure 50A) (facteur jour : $F_{(5,252)} = 3,692$, $p < 0,01$) ainsi qu'une diminution de l'erreur totale (figure 50B) (jour : $F_{(5,252)} = 4,551$, $p < 0,001$).

Le groupe DLT a présenté une augmentation significative du temps de latence le troisième jour, et une augmentation significative de l'erreur durant les jours 1, 2, 3 par rapport au témoin, ce qui reflète une détérioration de la performance spatiale. D'autre part, le traitement par la quercétine a inversé cet effet où on a constaté une diminution significative du temps de latence

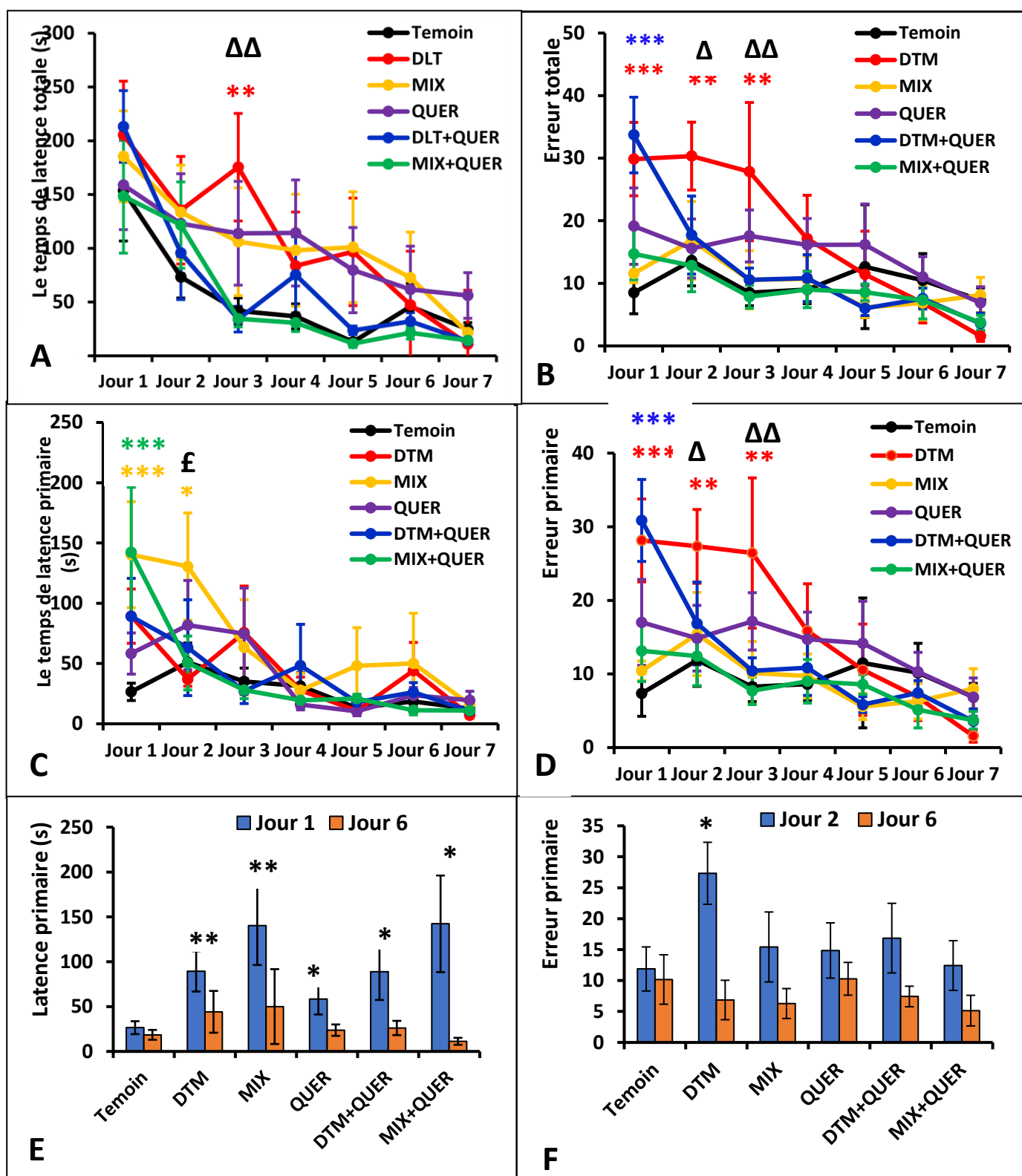


Figure 50. Effet de l'exposition chronique des animaux aux DLT, MIX, seuls ou associés à la quercétine sur la mémorisation spatiale pendant les 7 jours du test de Barnes. **A** : latence totale (en secondes) en fonction des essais (jours) pour trouver le trou cible ($p < 0,01$, facteur jours, $n = 7$; $p < 0,001$, facteurs traitement, $n = 7$). **B** : erreur totale par essai (jours). Une diminution du nombre d'erreur totale en fonction des jours chez tous les groupes ($p < 0,001$, facteur jour, $n = 7$; $p < 0,001$, facteur traitement, $n = 7$). **C** : latence primaire (en secondes) en fonction des essais (jours) pour trouver le trou cible. Les rats ont tous amélioré la recherche du trou cible ($p < 0,05$, facteur temps, $n = 7$; $p < 0,001$, facteur traitement, $n = 7$).

D : erreur primaire par essai (jours). Une diminution du nombre d'erreur primaire en fonction des jours d'essai chez tous les groupes ($p < 0,001$, facteur jour, $n = 7$; $p < 0,001$, facteur traitement, $n = 7$) a été trouvée entre les groupes traités ($p < 0,001$, ANOVA à deux facteurs, $n = 7$). **E** : latence primaire entre le jour 2 et le jour 5. Jour2 : les rats traités passent plus de temps à chercher le bon trou par rapport au témoin (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) ; aucune différence significative n'a été trouvée entre les groupes traités par rapport au témoin au jour5. **F** : erreur primaire entre le jour 2 et le jour 6. Jour2 : le groupe DLT fait plus d'erreurs en essayant de trouver le trou cible par rapport au témoin (* $p < 0,05$) ; jour 6 : aucune différence significative n'a été trouvée entre les groupes traités par rapport au témoin au jour 6. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, $n = 7$. Le test de Student a été utilisé pour la multicomparaison entre les groupes ; (*)comparaison avec le témoin: * $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; (Δ) : comparaison de DLT avec DLT +QUER : $\Delta p < 0,05$; (£) : comparaison de MIX avec MIX +QUER : £ $p < 0,05$.

et l'erreur totale chez le groupe DLT+QUER par rapport au DLT. Le groupe DLT a présenté également une augmentation significative de l'erreur primaire par rapport au témoin, tandis que la QUER a inversé cet effet à partir du deuxième jour du test. La latence primaire a montré une augmentation significative seulement pendant le 1^{er} et le 2^{ème} jour de test ($p < 0,001$; $p < 0,01$) respectivement. Or cette fois, la quercétine n'a pas inversé l'effet exercé par la mixture sur le paramètre de latence primaire ; MIX+QUER ($p < 0,05$) par rapport au témoin.

3.1.3. Test de reconnaissance d'objet

Le test de reconnaissance d'un nouvel objet est un test de mémoire dépendant de l'hippocampe, il repose sur la tendance innée des rongeurs à explorer préférentiellement de nouveaux objets par rapport à des objets familiers lorsque les deux objets sont simultanément présents dans un champ ouvert de leur environnement. La reconnaissance d'un nouvel objet est un test de mémoire dépendant de l'hippocampe, basé sur la tendance naturelle des souris à étudier un nouvel objet plutôt qu'un objet familier. Avant l'évaluations de l'effet des différents traitements, on a constaté que les rats normaux passaient un temps égal à explorer les objets utilisés dans cette étude. Aucune différence significative dans les temps totaux d'exploration des deux objets pour chaque groupe n'a été constatée entre la séance d'habituation (figure 51A) et la séance du test (figure 51B) chez les différents groupes traités (tableau 9). Il faut éliminer les rats qui ont un problème moteur de ce test.

Après une séance d'habitation, les rats sont mis avec 1 paire d'objet identique pendant 5 min (séance d'entraînement), et 24 h après, un test de 5 min a été réalisé dans lequel les rats ont été laissés à explorer l'objet familier précédent et un nouvel objet qui remplace le deuxième objet familier.

Tableau 9. Effet de l'exposition chronique aux DLT, MIX, seuls ou associés à la quercétine sur le temps total passé à explorer les deux objets au cours de la session de formation et de la session du test.

Groupes	Nombre d'animaux	Temps d'exploration d'objet pendant la séance d'entraînement (s)	Temps d'exploration d'objet pendant la séance du test (s)
Témoin	7	91,00 ± 22,16	76,33 ± 23,51
DLT	7	97,50 ± 24,55	61,33 ± 14,42
MIX	7	96,14 ± 26,95	92,57 ± 20,12
QUER	7	133,33 ± 13,77	163,33 ± 26,16
DLT+QUER	7	76,71 ± 15,98	111,57 ± 21,46
MIX+QUER	7	68,57 ± 16,15	86,57 ± 21,44

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, Il n'y a pas de différence significative entre les groupes.

La figure 51A, et 51B, montrent que le groupe QUER passe plus de temps à explorer les objets par rapport aux autres groupes (activité motrice élevée). Cette augmentation est non significative pendant la séance du test (figure 51B), par contre le groupe DLT a montré une exploration réduite non significative par rapport à tous les groupes, et réduite de façon significative par rapport au groupe DLT+QUER ($\Delta p < 0,05$). Tous les groupes des rats ont montré un temps d'exploration élevé passé avec le nouvel objet par rapport à celui passé avec l'objet familier sauf le groupe DLT où le temps d'exploration de l'objet familier est plus prolongé que celui de l'exploration du nouvel objet (figure 51C).

Après l'évaluation de la discrimination permettant de mettre en évidence une éventuelle disparité entre les différents groupes par rapport à la différence des temps d'exploration de nouvel objet et l'objet familier, le groupe DLT présente une discrimination absolue négative, le groupe MIX présente un indice faiblement positif, alors que le groupe QUER présente une discrimination non significative entre l'objet familier et le nouvel objet (figure 51 D).

Le premier indice de discrimination (d_2) entre les deux objets, chez les groupes témoin et mixtures présentent des valeurs plus élevées que la valeur nulle (0), ce qui signifie une préférence envers le nouvel objet, donc ces groupes ont mémorisé l'objet. Le d_2 inférieur à 0 chez le groupe MIX signifie une préférence pour l'objet familier (figure 51 E). La figure 51F, montre un pourcentage $< 50\%$ du temps passé avec le nouvel objet seulement chez le groupe DLT, tandis qu'un pourcentage $> 50\%$ est noté chez tous les autres groupes.

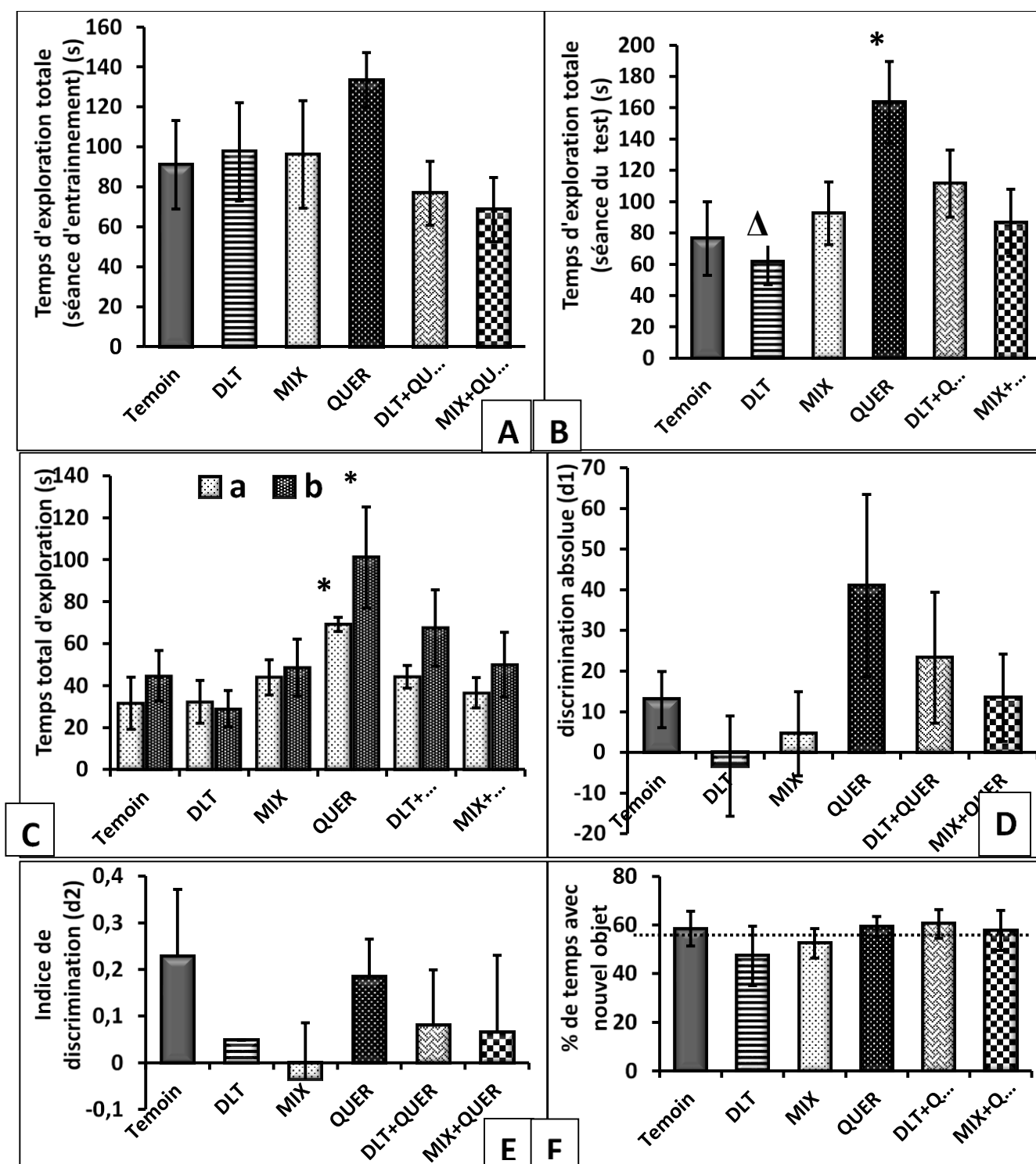


Figure 51. Effet de l'exposition chronique au DLT, MIX, seuls ou associés à la quercétine sur le test de la reconnaissance de nouvel objet. **A** : temps d'exploration totale durant la phase d'entraînement (s) ($e1=a1+a2$). **B** : temps d'exploration totale durant la séance du test (s) ($e2=a+b$). **C** : temps total d'exploration durant la séance du test (s). **D** : indice de discrimination absolue ($d1=b-a$). **E** : indice de discrimination ($d2=d1/(a+b)$). **F** : pourcentage du temps passé avec le nouvel objet ; **a1** : temps passé avec le 1^{er} objet pendant la séance d'entraînement ; **a2** : temps passé avec le 2^{ème} objet pendant la séance d'entraînement ; **a** : temps passé avec le 1^{er} objet familier pendant la séance de test ; **b** : temps passé avec le nouvel objet pendant la séance du test. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, $n=7$. Le test de Student a été utilisé pour la comparaison entre les groupes ; (*)comparaison avec le témoin: $p < 0,05$; (Δ) : comparaison de DLT avec DLT +QUER : $\Delta p < 0,05$.

3.1.4. Test du champ ouvert (open field test)

L'Open Field Test (OFT) est un test couramment utilisé pour mesurer le comportement exploratoire et l'activité générale chez les souris et les rats, où la qualité et la quantité de l'activité peuvent être mesurées (Gould et al, 2009).

La locomotion dans l'open field a été évaluée en relevant l'indice de la locomotion dans la partie périphérique, dans la partie intermédiaire de l'enceinte et dans la partie centrale en fonction du temps ainsi qu'en fonction de carreaux traversés. Ces indices cumulés nous donnent l'indice de locomotion totale dans le dispositif. D'autres paramètres sont mesurés aussi tels que le nombre total de redressements (animal positionné sur ses deux pattes postérieures, droit, en équilibre dans le vide ou contre une paroi), le nombre total de défécations. Le nombre de carreaux traversés et le nombre de redressements reflètent son activité exploratoire et son état émotionnel. Les autres paramètres sont plutôt des indices de son état émotionnel (Kahloula et al., 2014).

Les résultats de cette présente étude ne montrent aucune variation significative du redressement entre les différents groupes, le groupe BF présente le plus faible nombre, alors que BF+QUER présente le nombre le plus élevé des redressements (figure 52).

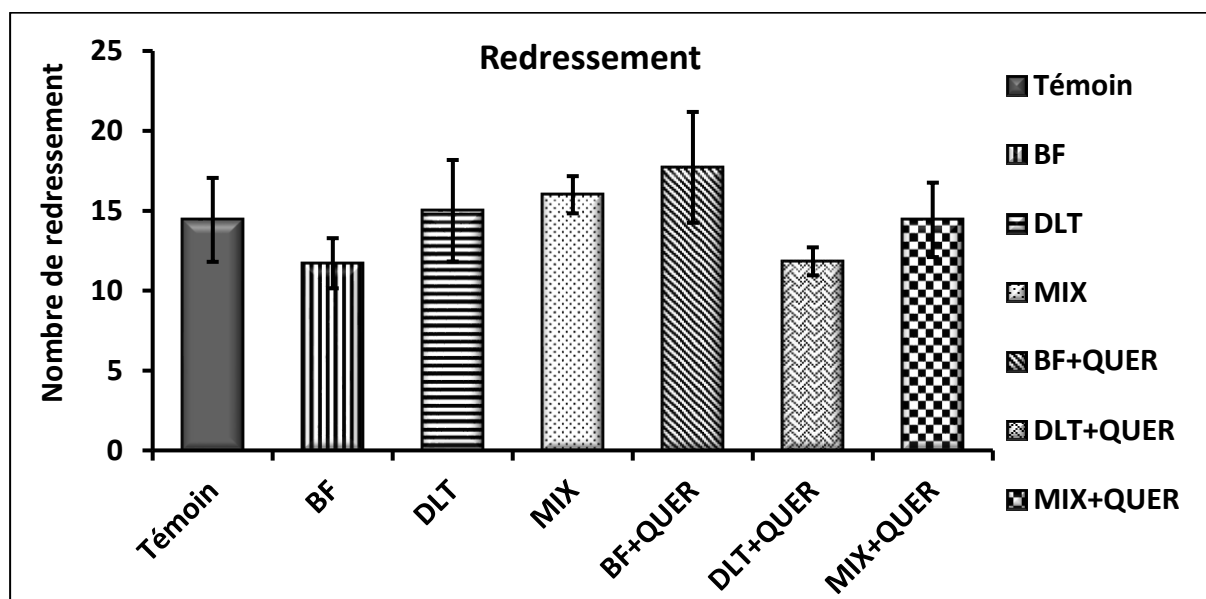


Figure 52. Effet de l'exposition chronique aux BF, DLT et leur mixture, seuls ou associés à la quercétine sur le nombre de redressement dans le test du champs ouvert (open field). *Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, n=7, le test de Student ne révèle aucune différence significative entre les différent groupes.*

Le paramètre de défécation est présenté par la figure 53, le groupe BF+QUER présente un nombre de défécation significativement différent par rapport au groupe témoin ($p < 0,01$) et par rapport au groupe BF ($P < 0,01$).

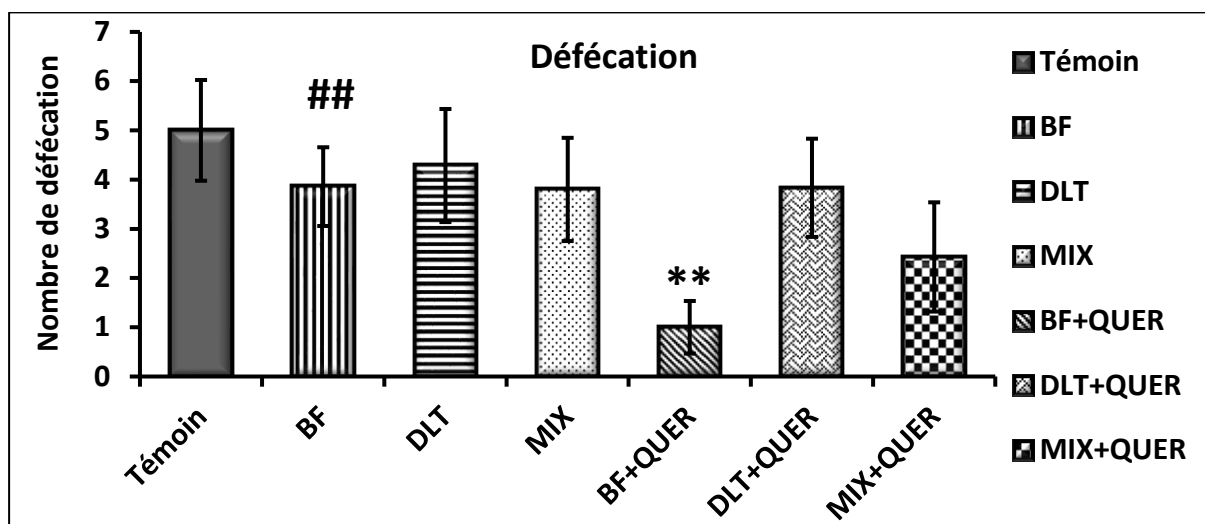


Figure 53. Effet de l'exposition chronique aux BF, DLT et leur mixture, seuls ou associés à la quercétine sur le nombre de défécation dans le test du champs ouvert (open field). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, $n=7$, le test de Student a été utilisé pour la comparaison entre les groupes ; (*)comparaison avec le témoin: ** : $p < 0,01$; (#) : comparaison de BF avec BF +QUER : ## : $p < 0,01$.

Le nombre de carreaux totales traversés évalue la locomotion chez le rat. La figure 54 ne présente aucune variation significative entre les différents groupes ($p > 0,05$), à part le groupe DLT.

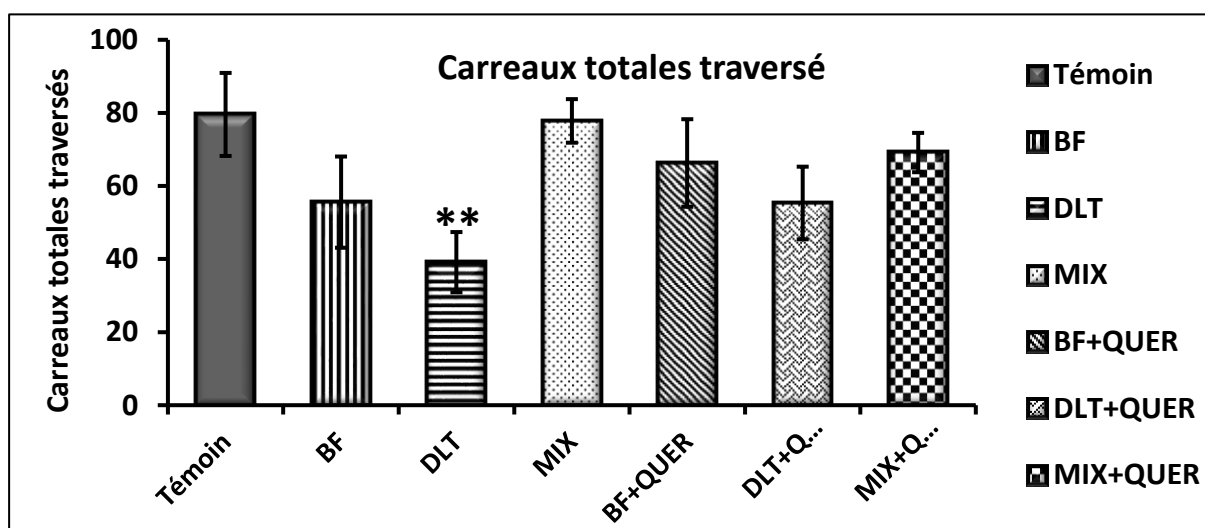


Figure 54. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, $n=7$, le test de Student ne révèle aucune différence significative entre les différents groupes.

La zone de locomotion, renseigne sur l'état émotionnel des rats. La figure 55 présente le nombre de carreaux traversés et le temps passé dans chaque partie du champ ouvert (partie centrale, intermédiaire et périphérique). Le temps passé dans la zone périphérique n'a pas été affecté chez tous les groupes de l'étude, cependant le nombre des carreaux traversés dans la

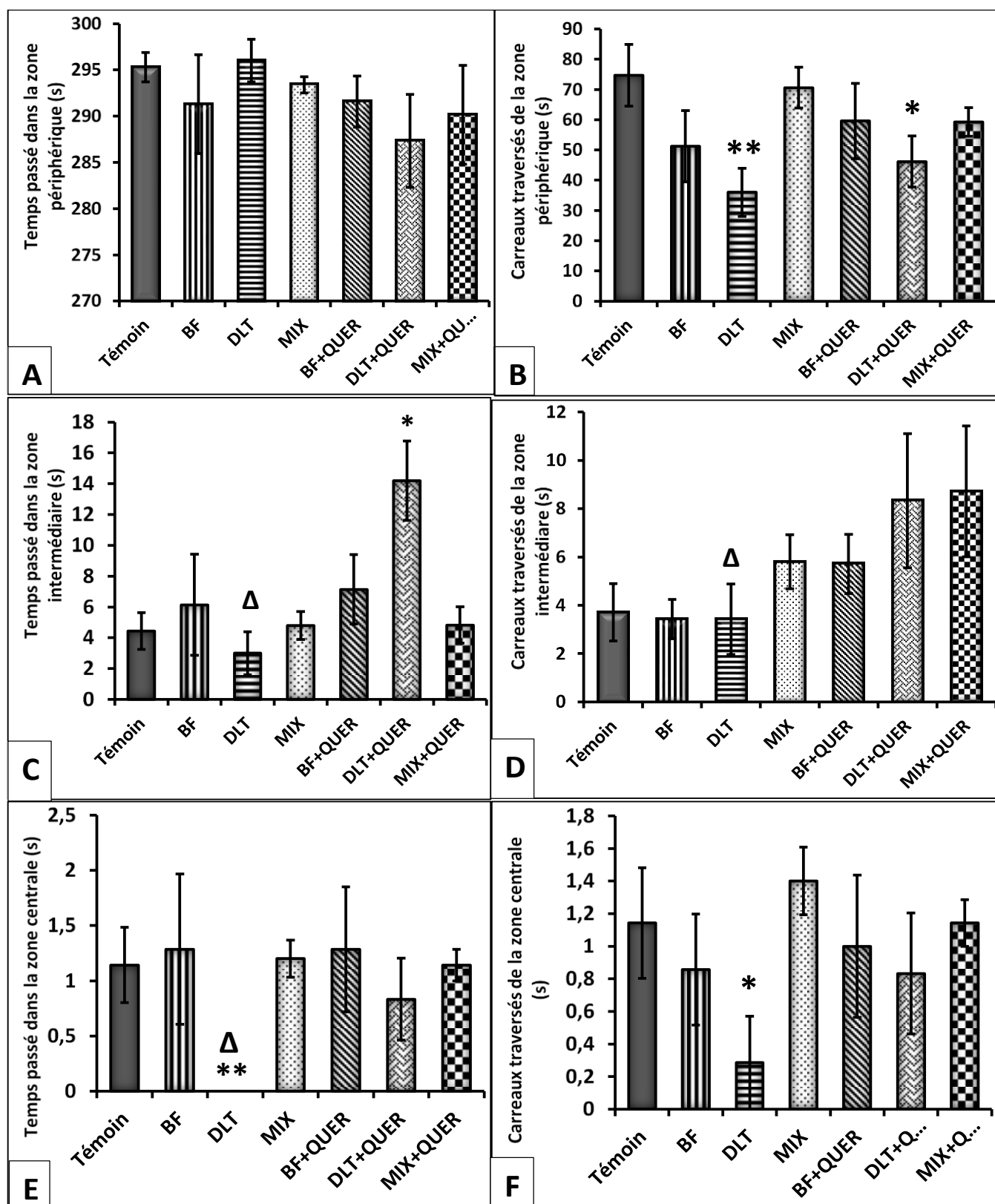


Figure 55. Effet de l'exposition chronique au BF, DLT et leur mixture, seuls ou associés à la quercétine sur le nombre de carreaux et la zone du champ ouvert dans le test de l'open field. **A** : temps passé dans la zone périphérique en secondes. **B** : nombre de carreaux traversés dans la zone périphérique. **C** : temps passé dans la zone intermédiaire en secondes. **D** : nombre de carreaux traversés dans la zone intermédiaire. **E** : temps passé dans la zone centrale en secondes. **F** : nombre de carreaux traversés dans la zone centrale. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, $n=7$, le test de Student a été utilisé pour la comparaison entre les groupes ; (*) comparaison avec le témoin ; ** : $p < 0,01$; (Δ) : comparaison de DLT avec DLT + QUER : Δ : $p < 0,05$.

même zone a été réduit significativement chez le groupe traité par la DLT et la DLT+QUER ($p < 0,05$, $p < 0,01$ respectivement). Le groupe DLT a présenté également une diminution significative du temps passé dans la zone intermédiaire ainsi de nombre de carreaux traversés dans cette zone par rapport au groupe DLT+QUER ($p < 0,05$), tandis que dans la zone centrale le groupe DLT a présenté une diminution significative de temps et carreaux traversés par rapport au groupe témoins ($p < 0,01$ et $p < 0,05$) respectivement.

3.1.5. Test de labyrinthe en croix surélevée (Elevated Plus Maze Test)

Le labyrinthe en croix surélevée est un dispositif qui mesure l'anxiété et l'activité locomotrice chez le rat, il exploite l'aversion des rongeurs pour les espaces vides et la hauteur lors d'une séance d'exploration libre, entre les bras fermés, les bras ouverts et le centre. Cette série d'expérimentation consiste à mesurer le nombre d'entrée et la durée de séjour dans chaque compartiment.

L'analyse statistique ne révèle aucune variation significative entre les différents groupes d'études pour le nombre d'entrée en bras ouvert et fermé (figure 56A), seulement le nombre d'entrée en bras fermé chez les groupes DLT et témoin est supérieur au nombre d'entrée en bras ouvert. Le nombre total d'entrée (figure 56 B) montre une augmentation chez le groupe DLT et une diminution chez le groupe MIX non significatives par rapport au témoin. Le pourcentage d'entrée en bras ouvert (figure 56 C) présente une augmentation significative seulement chez le groupe DLT+QUER par rapport au témoin ($p < 0,05$) et par rapport au DLT ($p < 0,05$). Le temps passé au bras ouvert en secondes (s) a montré une diminution significative chez le groupe Mix par rapport au témoin, tandis que le groupe DLT a montré une diminution non significative par rapport au groupes témoin et DLT+QUER (figure 56 D). Le temps passé au bras fermé (figure 56 E) ne montre aucune variation significative entre les différents groupes, tandis que le temps passé au centre (figure 56 F) a montré une diminution significative chez le groupe DLT par rapport au groupe DLT+QUER et non significative par rapport au témoin.

3.1.6. Test de chambre claire/obscur (Dark Light Box Test)

Ce test met le rat dans un conflit entre la tendance innée à explorer un nouvel environnement qui est le compartiment clair (CC), et la peur d'un milieu aversif lumineux et stressant. Les paramètres mesurés à partir de ce test sont le temps passé dans chaque compartiment, le temps de latence, le nombre de transition et le nombre de redressements. Les résultats obtenus sont mentionnés la figure 57.

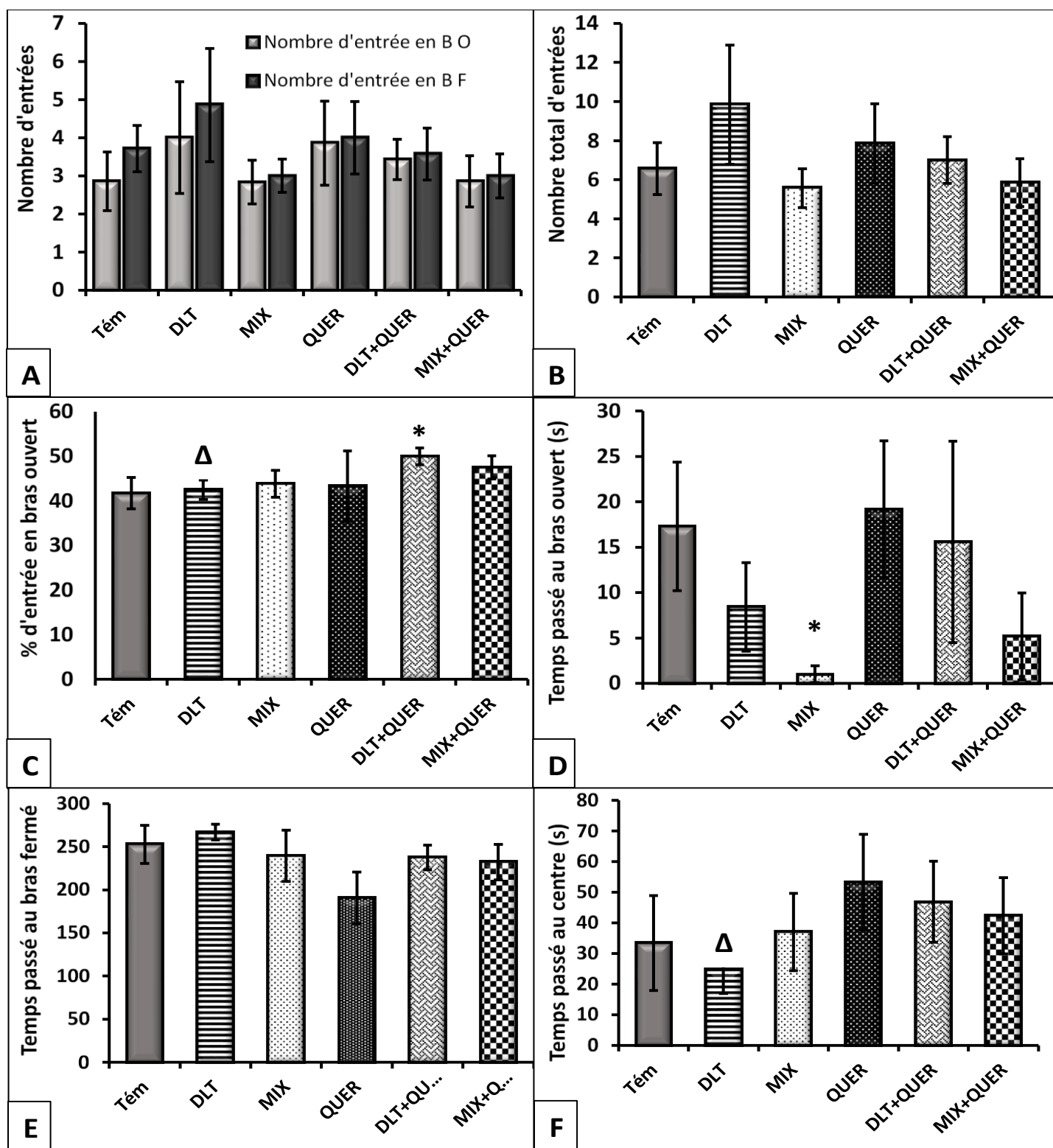


Figure 56. Effet de l'exposition chronique au DLT, MIX, seuls ou associés à la quercétine sur les paramètres du test de labyrinthe en croix surélevée. **A** : nombre d'entrée dans chaque bras (fermés et ouverts) ; **B** : nombre totale d'entrée dans les bras ouverts et fermés ; **C** : pourcentage d'entrée en bras ouvert par rapport au nombre total d'entrée ; **D** : temps passé au bras ouvert en seconde (s) ; **E** : temps passé au bras fermé en secondes ; **F** : temps passé au centre en seconde. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, $n=7$. Le test de Student a été utilisé pour la multicomparaison entre les groupes ; (*)comparaison avec le témoin: $p < 0,05$; (Δ) : comparaison de MIX avec MIX +QUER : $\Delta p < 0,05$; $\Delta\Delta p < 0,01$.

Les résultats enregistrés concernant ce test d'anxiété, montrent que les groupes traités par la mixture et co-traités par la quercétine, présentent un temps de séjour dans le compartiment obscur (CO) significativement élevé par rapport au groupe témoin (figure 57A), et un temps de séjour dans le CC significativement réduit par rapport au témoin (figure 57 B), ce qui reflète un état d'anxiété élevé par rapport au témoin. Cependant, ces mêmes groupes montrent aussi une diminution significative du temps de latence pour entrer dans le compartiment obscur sauf les groupes traités par les pesticides seuls ou en mixture qui prennent une diminution non significative par rapport au témoin (figure 57 C). Le nombre de transition présenté par la figure 57D, montre d'une part une diminution significative chez le groupe MIX+QUER par rapport au témoin, ainsi par rapport au groupe MIX ($p < 0,05$; $p < 0,05$ respectivement), d'autre part une diminution chez le groupe DLT non significative est noté par rapport au groupe témoin ($p > 0,05$) et significative par rapport au DLT+QUER ($p < 0,05$). Les autres groupes ne présentent aucune variation significative. Le nombre de redressements (figure 57 E) présente une diminution significative chez les groupes MIX et MIX + QUER par rapport au témoin ($p < 0,05$; $p < 0,01$) respectivement, BF présente une augmentation significative par rapport au BF+QUER ($p < 0,05$), tous les autres groupes ont présenté une diminution non significative ($p > 0,05$).

3.1.7. Test des billes enterrées

L'enfouissement défensif est un comportement largement observé chez les rats, ils enterrent rapidement les choses nuisibles, tels qu'un mauvais goût et / ou odeur et les objets insolites comme les billes de verre, sous leur literie de sciure. Ce comportement est considéré comme une expression de la défense, certaines formes d'anxiété. L'augmentation de l'anxiété dans ce test se traduit par un nombre élevé des billes enterrées.

Les données de la figure 58 montrent une diminution significative du nombre des billes enterrées chez le groupe QUER ($p < 0,05$) par rapport au témoin, par contre aucune variation significative n'est constatée chez les groupes restants par rapport au témoin. D'autre part, une diminution significative est observée chez MIX par rapport au MIX+QUER ($p < 0,001$) mais non significative par rapport au témoin.

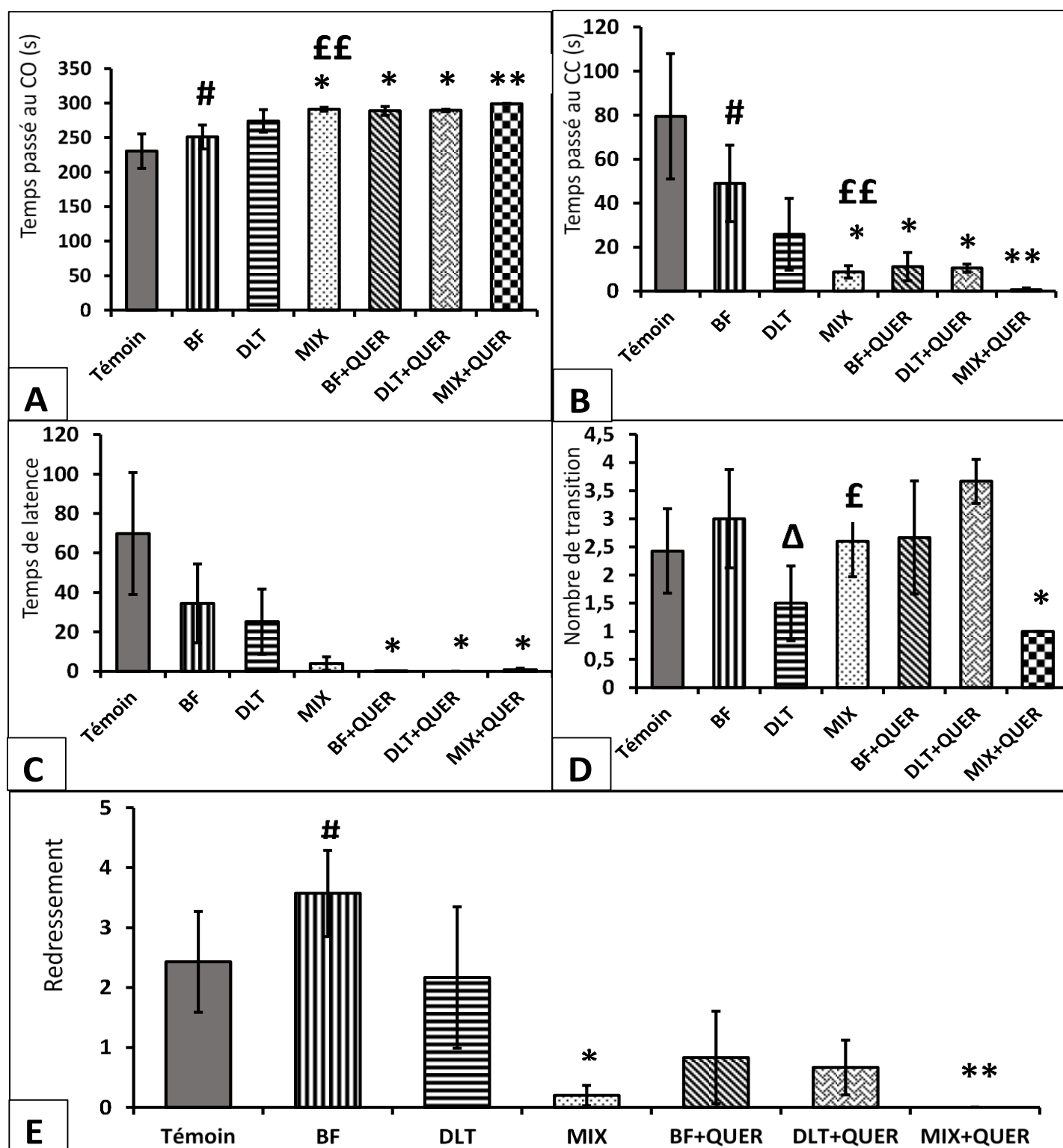


Figure 57. Effet de l'exposition chronique au BF, DLT et leur mixture, seuls ou associés à la quercétine sur les paramètres comportementaux du test de champ clair/obscur chez le rat. **A** : temps passé dans le compartiment obscur (CO) en secondes. **B** : temps passé dans le compartiment clair (CC) en secondes. **C** : temps de latence pour entrer dans le compartiment obscur. **D** : nombre de transition entre (CC) et (CO). **E** : Nombre de redressement (rat positionné sur ses deux pattes postérieures, droit, en équilibre dans le vide ou contre une paroi dans le compartiment clair). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, $n=7$, le test de Student a été utilisé pour la comparaison entre les groupes ; (*) comparaison avec le témoin : * $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; (#) : comparaison de BF avec BF+QUER ; (Δ) : comparaison de DLT avec DLT +QUER : Δ $p < 0,05$; (£) : comparaison de MIX avec MIX+QUER : £ $p < 0,05$; ££ $p < 0,01$.

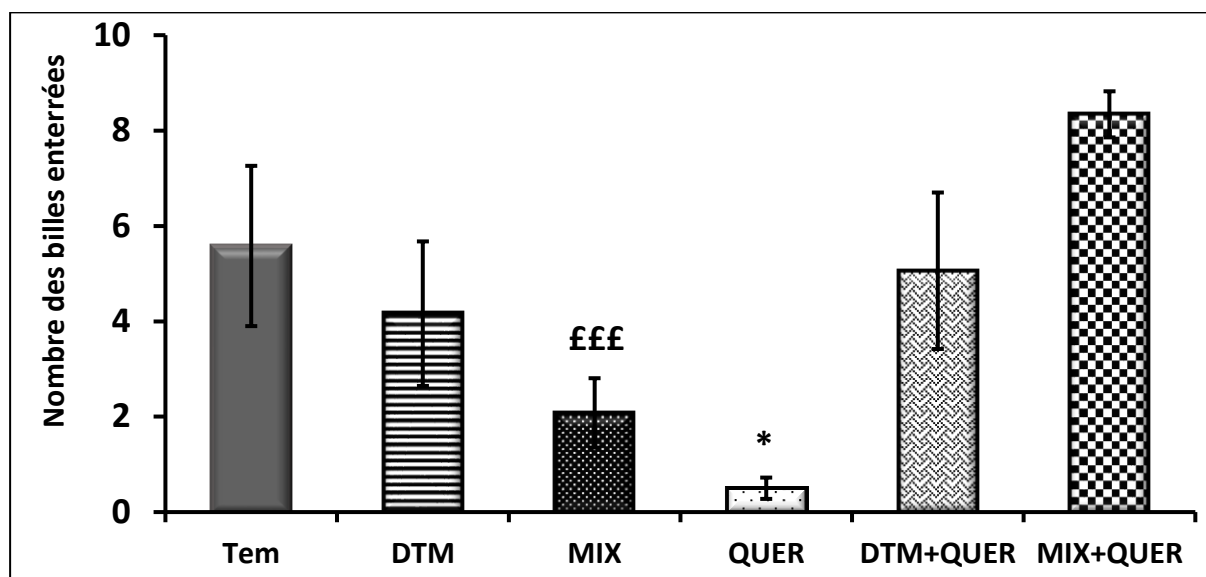


Figure 58. Effet de l'exposition chronique aux DLT, MIX, seuls ou associés à la quercétine sur le nombre des billes enterrées. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm SEM, le test de Student est utilisé pour la comparaison entre les groupes. (*) comparaison avec le témoin: $* p < 0,05$; (£) comparaison de MIX avec MIX+QUER : £££ $p < 0,001$.

3.1.8. Test de la nage forcée

Le test est basé sur l'observation d'un rat forcé à nager pendant 5 min, pour mesurer le temps pris pour cesser à nager (temps de latence) ainsi le temps total d'immobilité, cet état est considéré comme un comportement dépressif.

Les résultats obtenus dans la figure 59A montrent une diminution très significative dans le temps cumulé d'immobilité en secondes (s) chez le groupe DLT+QUER ($p < 0,01$), et très hautement significative chez les groupes DLT, QUER et MIX+QUER par rapport au témoin ($p < 0,001$), tandis que le groupe MIX a présenté une diminution non significative par rapport au témoin ($p > 0,05$), ainsi le groupe DLT a présenté une diminution significative dans le temps d'immobilité par rapport au groupe DLT+QUER ($p < 0,05$), par contre le groupe MIX a présenté une augmentation significative par rapport au MIX+QUER ($p < 0,001$). Les résultats obtenus dans la figure 59 B montrent une augmentation significative du temps de latence chez les groupes DLT, MIX+QUER et DLT+QUER par rapport au témoin ($p < 0,001$; $p < 0,01$; $p < 0,05$) respectivement, par contre aucune variation significative n'a été constatée chez les groupes MIX et QUER par rapport au témoin. D'autre part, le groupe DLT a montré une augmentation significative du temps de latence par rapport au témoin ($p < 0,05$), par contre le groupe MIX a présenté une diminution significative par rapport au MIX+QUER ($p < 0,05$).

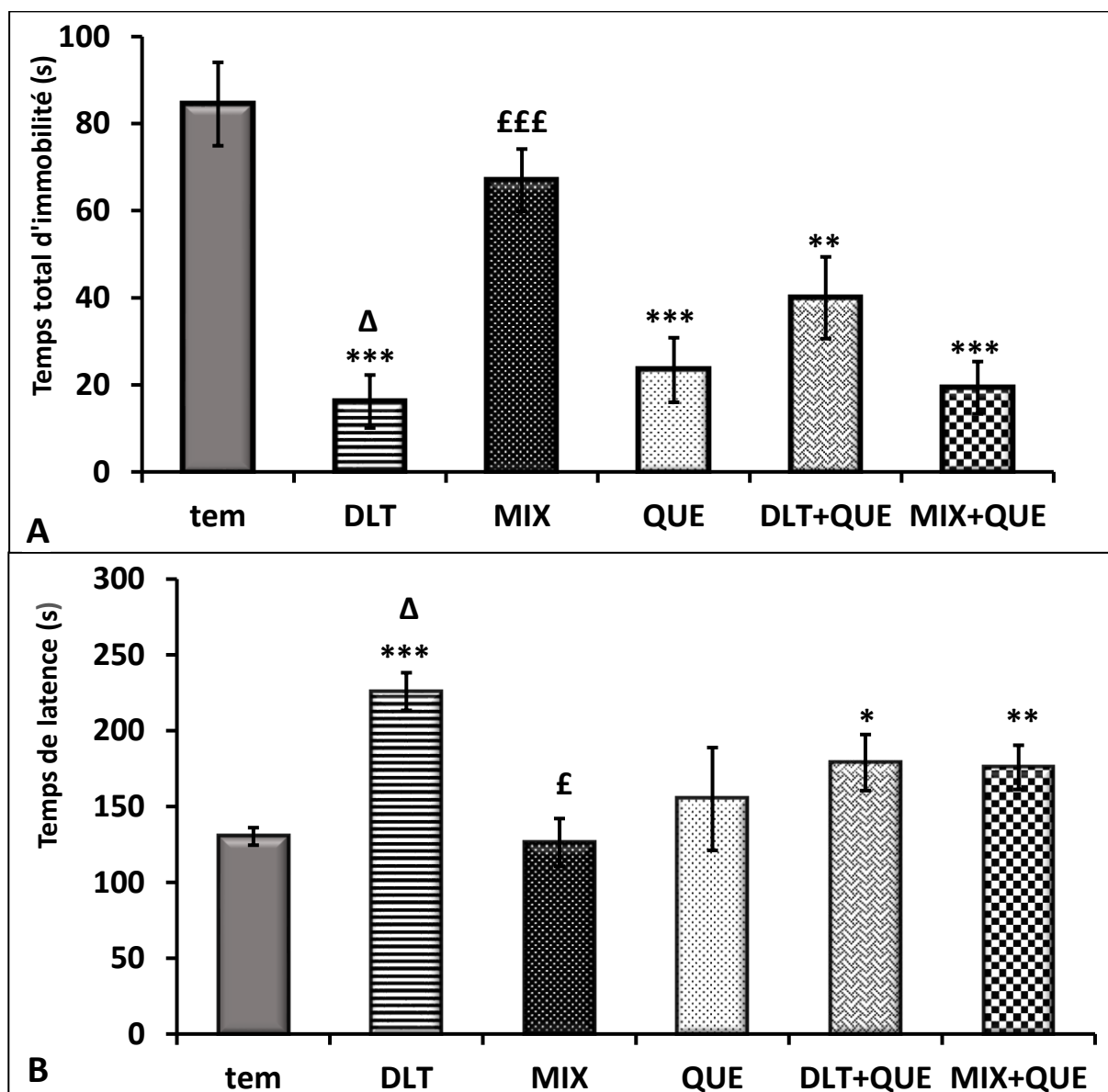


Figure 59. Effet de l'exposition chronique aux DLT, MIX, seuls ou associés à la quercétine dans le test de la nage forcée (forced swim test FS). **A** : le temps total (cumulé) d'immobilité en secondes durant le test de FS. **B** : le temps de latence pour la première immobilité en secondes (s) pendant le test de FS. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm SEM, le test de Student est utilisé pour la comparaison entre les groupes. (*) comparaison avec le témoin: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; (Δ) comparaison de DLT avec DLT+QUER : $\Delta p < 0,05$; (£) comparaison de MIX avec MIX+QUER : £ $p < 0,05$; £££ $p < 0,001$.

3.1.9. Test de sucrose (anhédonie)

Normalement, les rats autorisés de choisir entre deux solutions : une sucrée et l'autre eau de robinet, vont choisir l'eau sucrée. Une consommation réduite de l'eau sucrée est expliquée par un comportement dépressif.

Les résultats exprimés dans la figure 60A, ont montré que le volume de consommation d'eau sucrée est significativement plus élevé chez le groupe BF pendant les 4 jours du test par rapport

au témoin ($p < 0,05$), tandis qu'il y a une diminution significative chez les groupes MIX+QUER ($p < 0,01$), DLT+QUER ($p < 0,05$), MIX ($p < 0,05$). Alors qu'on a enregistré une diminution non significative dans ce volume consommé chez DLT durant les jours 3 et 4 seulement (figure 60 A). La figure 60 B montre le pourcentage d'eau sucrée consommée par rapport au liquide total consommé pendant 4 jours. Les groupes DLT et MIX+QUER ont présenté une diminution significative du pourcentage de sucrose consommé par rapport au témoin ($p < 0,05$), ainsi le groupe DLT a présenté aussi une diminution significative par rapport au DLT+QUER ($p < 0,05$), néanmoins aucune variation significative n'a été observée chez les autres groupes ($p > 0,05$).

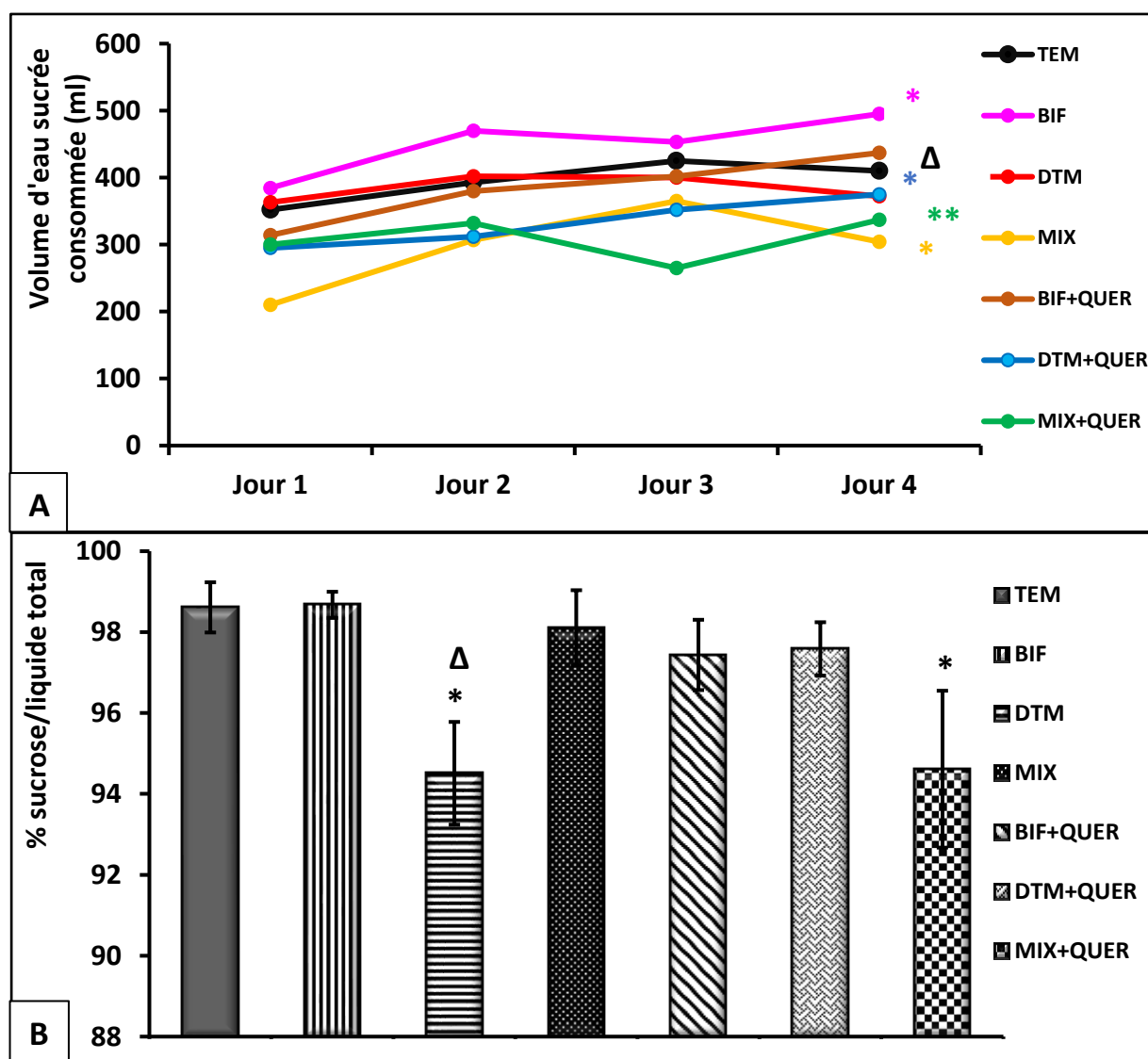


Figure 60. Effet de l'exposition chronique aux BF, DLT et leur mixture, seuls ou associés à la quercétine sur la consommation de sucrose et l'eau sucrée au cours du test de l'anhédonie. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, $n=7$, le test de Student a été utilisé pour la comparaison entre les groupes ; (*)comparaison avec le témoin: * : $p < 0,05$; (Δ) : comparaison de DLT avec DLT +QUER : Δ : $p < 0,01$.

4. Discussion

Cette partie de la thèse avait pour but d'étudier les effets d'une exposition chronique à la DLT et BF et leur mélanges sur les fonctions neurocomportementales des animaux d'une part, et l'association des perturbations de ces dernières avec la quercétine d'autre part, pour évaluer son effet neuroprotecteur. Les tests neurocomportementaux sont des tests standards conçus pour évaluer différents aspects du fonctionnement du système nerveux central, dont la performance motrice, l'apprentissage, la mémorisation, l'anxiété et la dépression.

4.1. Effet de BF, DLT et leur mélange associés ou non à QUER sur l'activité locomotrice chez les rats

La fonction motrice est le critère neurocomportemental de l'intoxication par les PYRs le plus largement étudié, qui ne dépend pas de la voie d'administration ou de type d'espèce ; la majorité des PYRs entraînent une diminution de l'activité motrice générale chez les mammifères (Rajawat et al., 2019). Le nombre de redressements ainsi que le nombre total des carreaux traversés sont évalués dans le test de l'open field comme mesure de l'activité locomotrice, le redressement est considéré comme indicateur de l'activité exploratoire. Le redressement et l'ambulation sont des comportements positivement corrélés. Un taux élevé de ces comportements indique une augmentation de la locomotion et de l'exploration et un niveau bas d'anxiété (Rajawat et al., 2019).

Les résultats obtenus après 16 semaines d'exposition des rats femelles adultes au DLT ont montré une diminution significative de l'activité locomotrice et exploratoire dans le test de l'open field, ces résultats sont conformes avec les résultats précédents aboutis par les travaux de plusieurs auteurs (Ricci et al., 2013 ; Nieradko-Iwanicka et Borzęcki, 2015; Gasmi et al., 2017 ; Zhang et al., 2018), ainsi que les travaux de Pitzer et al. (2019) lors de l'exposition postnatale au DLT qui a provoqué ainsi une diminution spontanée de l'activité motrice chez les souris. Ce déficit locomoteur observé chez les animaux, peut être expliqué par la neurotoxicité de ces PYRs notamment la DLT, agissant en premier lieu sur les canaux sodiques voltage-dépendant des cellules excitables (les neurones et les muscles). Cette altération des canaux sodiques peut causer des ouvertures répétées, puis un blocage dans la dépolarisation des neurones (Seck, 2009 ; Nieradko-Iwanicka et Borzęcki, 2015). Des résultats similaires sont trouvés, après exposition des abeilles à un autre PYR, la cyperméthrine à des faibles doses, qui ne provoquent pas la mort des abeilles mais diminue l'efficacité des tâches réalisées par les abeilles (Collet et Charreton, 2016).

On peut conclure que la DLT altère les capacités locomotrices et exploratoires du rat. L'ACh intervient dans le contrôle des muscles par l'intermédiaire des terminaisons neuromusculaires

apportés en excès au niveau de la plaque motrice, il peut inhiber donc les contractions musculaires consécutives et la stimulation du nerf (Gamet-Payraastre et Lukowicz, 2017). Les paramètres de locomotion dans les différents tests réalisés dans cette étude, le nombre de transition dans le test de chambre claire/obscur, le nombre total d'entrée dans le test de labyrinthe en croix surélevée et le nombre de carreaux totale dans le test du champ ouvert), indiquent une variation par rapport au témoin soit par une hypomotricité, soit par une hypermotricité.

Des études montrent que les PYR exercent une inhibition non spécifique sur les canaux ioniques opérés par le récepteur de l'ACh. On peut proposer ainsi, que les PYRs puissent avoir leur cible au site synaptique en plus des canaux Na axonaux ou du corps cellulaire, ils ne se lient pas au site de liaison de l'ACh ou du GABA pour produire leur effet de blocage, mais se lient dans un autre site à faible affinité différent du site agoniste, pour engendrer une inhibition non spécifique des canaux ioniques (Kiss et Osipenko, 1991). Cependant, il est trouvé que l'administration chronique des PYRs peut induire soit une augmentation de l'activité de l'AChE (Hossain et al., 2005) soit une diminution de cette activité qui peut s'attribuer par l'occupation de son site actif par la DLT (Mani et al., 2017), alors qu'une simple injection de la DLT à la dose de 60 mg/kg (Hossain et al., 2005) ou 10 mg/kg (Habr et al., 2014) n'a aucun effet sur la locomotion ainsi sur l'activité de l'AChE dans n'importe quel région du cerveau testé. Il est évident donc que le changement de l'activité de l'AChE n'est pas impliqué dans les effets aigus des PYRs sur le système cholinergique central (Hossain et al., 2005 ; Habr et al., 2014). Le nombre de carreaux totaux traversés dans cette étude a diminué par rapport au témoin, ces résultats sont en concordance avec Syed et al. (2017) qui trouvent que les niveaux de la dopamine et de ces métabolites sont diminués dans toutes les régions du cerveau. Cette modulation dopaminergique induite par la BF peut être détectée par le niveau de locomotion élevé observé dans le test d'OF (Syed et al. 2017).

L'exposition des rats à la mixture (DLT+BF) ne présente aucune variation significative par rapport au témoin concernant le nombre de carreaux totales traversés, dans le test de l'open field, cela peut être expliqué par un effet antagoniste entre les deux PYRs (Gamet-Payraastre et Lukowicz, 2017). En revanche la BF et la DLT appartiennent à 2 types différents des PYRs, le type 1 comme la BF induit une large dépolarisation post synaptique, générant des signaux nerveux répétitifs. Tandis que le type 2 des PYRs peut produire une dépolarisation de la membrane conduisant à un blocage de l'influx nerveux (Eriksson et Fredriksson, 1991 ; Vester et al., 2019).

La QUER a amélioré le déficit locomoteur induit par les PYRs, par la dose de 5 mg/kg avec la DLT et la BF et la dose de 10 mg/kg avec la MIX, cette amélioration peut être expliquée par la

capacité de la QUER à augmenter la production de l'AChE, d'une part, ainsi par le pouvoir de neutraliser les radicaux libres générés par ces PYRs impliqués dans l'inhibition de l'AChE (Gasmi et al., 2017). Un autre effet de la QUER qui améliore l'activité motrice est l'activation du système dopaminergique ou à des enzymes liées à la synthèse de la dopamine (Kaur et al., 2019).

4.2. Effet de BF, DLT et leur mixture associés ou non à la QUER sur l'apprentissage spatial et mémorisation chez les rats

Un des tests les plus utilisés pour évaluer l'apprentissage spatial chez le rat est le labyrinthe aquatique de Morris. Il s'agissait à l'origine de tester la capacité des rats à apprendre et à mémoriser la position d'une plateforme cachée dans une piscine d'eau opaque par rapport à des repères extérieurs. La présente étude prouve que, d'une part, une intoxication chronique aux PYRs chez des rats Wistar femelles adultes a eu comme conséquence la diminution des performances d'apprentissage spatial au cours du test de piscine de Morris. Et d'autre part, la co-administration chronique de la QUER a amélioré de manière significative les déficits cognitifs notamment chez les rats exposés à la DLT.

L'exposition à la DLT cause une perturbation cognitive chez les rats, cette perturbation se traduit par une diminution d'apprentissage. Ces résultats se concordent avec les résultats de Nieradko-Iwanicka, (2012). Cette réduction est révélée par la diminution de la latence par rapport au témoin avant de trouver la plateforme immergée durant tous les jours du test, la mémoire de travail (mémoire à court terme) testé pendant le 3^{ème} jour du test, présente également une diminution du temps de latence dans chaque essai par rapport au témoin tandis que la comparaison entre les différents essais chez les groupes DLT et MIX montre une perturbation du temps de latence, notamment entre l'E2 et E3, ainsi entre l'E3 et E4. Cette diminution de latence peut être expliquée donc par l'hyperactivité trouvée chez les animaux traités par les PYRs, cette hyperactivité est trouvée aussi même au cours de la manipulation des rats à partir d'un mois et plus de gavage ; le milieu aqueux est un milieu très stressant pour les rats, la mise dans une telle situation aversive provoque les rats à s'enfouir, ou de nager rapidement, la rapidité de la nage laisse l'animal trouver la plateforme dans une latence réduite ; cette hyperactivité peut être expliquée comme cité précédemment, par une inhibition de l'AChE par les PYRs (Gargouri et al., 2018a), ce qui permet de prolonger l'action de l'ACh au niveau de son site d'action et par la suite des contractions musculaires élevées. Donc la diminution du temps de latence ne s'explique pas par une bonne mémorisation spatiale, mais par une hyperactivité de la nage qui facilite de trouver la plateforme. Les mêmes résultats sont trouvés lors du test de sonde, le groupe DLT présente un temps passé dans le quadrant cible le plus réduit, ce qui signifie une faible mémorisation par

rapport aux autres groupes notamment le groupe DLT+QUER, le groupe MIX présente aussi un temps faible, ce test justifie l'effet des PYRs à atténuer la mémorisation spatiale. Les résultats du test de sonde corroborent des résultats récents, montrant également la diminution du temps passé au quadrant cible après exposition chronique à la DLT, mais s'opposent avec le temps de latence pendant les jours du test (Gasmi et al., 2017). La QUER corrige ces atteintes par une augmentation du temps passé au quadrant cible pendant le test de sonde, ainsi elle améliore la mémoire de travail.

L'hyperactivité provoquée par le milieu aqueux se chevauche avec le paramètre de mémorisation. Le test de Barnes est un autre test qui a le même but que le test de Morris mais moins stressant à l'animal, et qui est réalisé pour évaluer également la mémoire spatiale. Les résultats obtenus à partir du test de Barnes révèlent clairement que les rats exposés à la DLT surtout, et à la MIX présentent un déficit des performances concernant la cognition spatiale dépendante de l'hippocampe (Terunuma et al., 2014). Ce déficit d'apprentissage spatial peut s'expliquer par une inhibition extrême après la liaison de la DLT au le site actif de l'AChE. Le récepteur au NMDA(acide N-méthyl-D-aspartique), un type de récepteur au glutamate, présent en grande quantité dans le cortex cérébral et l'hippocampe. Il est impliqué dans de nombreux mécanismes physiopathologiques tels que la locomotion, la douleur (Mohamad et al.,2013) la mémorisation et l'apprentissage (Oliet et Papouin, 2013 ; Zhang et al., 2018) ; en revanche,les NMDARs ont été prévus pour être impliqués dans le processus pathologique de la neurotoxicité induite par les PYRs (Zhang et al., 2018). Une étude récente de Patel et Pitzer (2019) ont montré que l'exposition à long terme à la DLT, fait diminuer l'expression du récepteur de glutamate NMDA.

D'autres études révèlent que les systèmes noradrénergiques, glutamatergique et cholinergiques sont également impliqués dans les mécanismes conduisant à des désordres comportementaux comme l'anxiété, la dépression, l'altération de l'apprentissage et la mémorisation (Gargouri et al., 2018a). La DLT interfère avec les mécanismes de la transmission dopaminergique, par l'inhibition de la synthèse de la dopamine et la réduction de l'enzyme tyrosine hydrolase, ce qui met en œuvre une diminution des niveaux de la dopamine par la suite dans l'hippocampe et le striatum (Souza et al., 2018). L'exposition à la BF induit des dommages neuronaux, altère le statut redox et cause des neuro-inflammations dans l'hippocampe, ce qui conduit à des troubles cognitifs et de la mémoire, bien que les mécanismes associés à ces déficits restent mal connus (Gargouri et al., 2018b). La QUER a différents effets pharmacologiques dans le système nerveux et agit comme neuroprotecteur, elle est connue pour son pouvoir d'améliorer la mémoire d'apprentissage et de reconnaissance, par l'atténuation du dysfonctionnement

mitochondrial indiqué par l'augmentation des niveaux de potentiel de la membrane mitochondrial et de l'ATP et la diminution des ROS (Babaei et al., 2018).

4.3. Effet de BF, DLT et leur mixture associés ou non à la QUER sur l'apprentissage non spatial et la mémorisation chez les rats

Chez les rongeurs, les tâches pour accéder à la reconnaissance de la mémoire d'un nouvel objet sont basées sur la tendance naturelle des animaux à explorer les nouveautés. À partir de l'exploration d'un nouvel objet au détriment de ce qui est déjà connu (Montanha et al., 2016). L'ensemble des résultats obtenus dans la tâche de reconnaissance d'objet confirme les effets des PYRs sur la reconnaissance d'objet. Ils agissent sur les performances de reconnaissances en modulant les mécanismes permettant la conservation de représentations internes des caractéristiques d'un objet pour détecter une nouveauté dans leur environnement, ces représentations sont également appelées traces mnésiques (Ennonceur et Dalcour, 1988).

Cependant, le groupe DLT a montré des déficits de mémoire à court terme dans la nouvelle tâche de reconnaissance d'objet, cette tâche estime la mémoire par le biais du paradigme de reconnaissance, dans lequel l'animal est présenté à deux objets similaires, alloués à des points fixes d'un champ ouvert lors de la session de formation. 24 h plus tard, les mêmes animaux ont été présentés à l'objet déjà connu et à un nouvel objet (Souza et al., 2018), le trouble cognitif est révélé surtout chez le groupe DLT, qui présente un pourcentage de reconnaissance du nouvel objet faible par rapport au témoin. Les informations visuelles et la mémoire de nature spatiale et non spatiale est régulée par des aires associatives du cortex et par l'hippocampe ainsi que par le système du lobe temporal qui transitent par des voies différentes vers les différentes couches de ce complexe (Levin, 2015). Des résultats similaires concernant le déficit de reconnaissance d'objet induit par la DLT est trouvé chez les travaux de Mani et al (2014), la DLT induit une diminution significative du taux de l'AChE dans le cerveau en général, ainsi qu'une diminution plus significative dans l'hippocampe surtout, cette inhibition excessive mène à des mal-fonctionnements du système nerveux, des dysfonctionnements métaboliques, des déficits comportementaux et d'apprentissage (Mani et al., 2014). L'indice de discrimination est calculé en utilisant la proportion de temps que l'animal passe à rechercher un nouvel objet par rapport à celui qui lui est familier.

Un large éventail de preuves obtenues à partir d'études sur des lésions de rongeurs implique le cortex périrhinal en tant que région cérébrale nécessaire à la reconnaissance d'un nouvel objet, basée sur des repères visuels, tandis que la détection d'un nouvel objet basé sur des suggestions nécessite l'utilisation de la fonction hippocampe, para hippocampe, cortex et cortex entorhinal.

Suivant ce raisonnement, les preuves tirées de cette tâche dans nos expériences n'excluent pas une action de la DLT affectant la région du périrhinal du cortex cérébral (Montanha et al., 2016). Le groupe DLT a montré une différence dans le temps passé à explorer les deux objets. Ces résultats suggèrent que la DLT cause une altération de la mémoire de reconnaissance, une discrimination altérée des objets, une anxiété qui fait craindre les espaces ouverts dans lesquels ils sont forcés.

Le GABA et l'ACh, sont connus par leur implication depuis longtemps dans les fonctions cognitives. L'ACh joue un rôle important dans la formation de la mémoire dans l'hippocampe, cela est prouvé par l'altération de l'apprentissage après l'administration d'antagonistes à leurs récepteurs respectifs (Montanha et al., 2016). Cela pourrait être dû à un blocage induit par l'inhibition du GABA et de l'AChE provoquée par la DLT, produisant ainsi une augmentation indirecte de la transmission excitatoire par le neurone, tandis que la diminution de l'exploration et l'augmentation du temps passé près du mur sont des indicateurs d'un comportement semblable à celui de l'anxiété (Mani et al., 2014). La MIX entre DLT et BF semble n'avoir aucun effet additif ou de synergie, la DLT semble avoir plus d'impact sur l'atteinte de la mémorisation chez les rats qui y exposés.

Les résultats de cette étude concernant la co-administration orale de la QUER avec la DLT, ou avec la MIX montre une modification de l'effet des PYRs vers une amélioration de la mémorisation. Ces résultats sont en accord avec des résultats précédents (Gasmi et al., 2017 ; Babaei et al., 2018), il est prouvé que la QUER prévient les troubles de mémoires, et augmente l'indice de reconnaissance, par l'empêchement de la diminution de l'activité de l'AChE dans l'hippocampe (Babaei et al., 2018).

4.4. Effet de BF, DLT et leur mixture associés ou non à QUER sur le comportement anxieux chez les rats

Les rats exposés chroniquement aux PYRs et à la QUER sont testés pour évaluer leur anxiété en utilisant différents tests : open field (OF), light dark box (LDB), elevated plus maze (EPM), et marbles burying (MB) (Patki et al., 2013 ; Belovicova et al., 2017).

Dans le test d'OF, il a été proposé que la réponse à la peur (ou anxiété) de l'animal exposé à une nouvelle menace potentiellement dangereuse de l'environnement est accompagné d'une haute défécation ainsi que par une faible mobilité, en particulier dans la zone centrale (Sestakova et al., 2013). Un niveau élevé d'anxiété conduit généralement à une diminution du rapport du nombre de carrés visités dans le centre pour le nombre de carrés visités à la périphérie (Rajawat et al., 2019).

Sur cette base, les résultats de cette étude ont montré l'installation d'un état d'anxiété chez le groupe intoxiqué par la DLT qui est observé par une baisse significative du nombre de visite au centre comparé au témoin, le groupe exposé à la BF présente également une baisse non significative de ce nombre, cela se produit probablement lorsque les PYRs affectent divers composants du système nerveux (Rajawat et al., 2019). Les rats exposés à la DLT étaient moins actifs dans un nouvel environnement cela est décelé par le nombre faible des carreaux traversés soit au centre soit aux périphériques, ces résultats se concordent avec les résultats de Pitzer et al. (2019) qui expliquent l'atténuation des canaux sodiques voltage-dépendants (VGSC) par l'effet de la DLT (Pitzer et al., 2019).

Les souris mâles exposées à 3 mg / kg de DLT tout au long de la gestation et de la lactation présentent une diminution de l'expression de l'ARNm de sous-unité codant pour les VGSCs mesurée quand elles étaient adultes, mais aucune d'altérations similaires n'est vu dans l'expression du gène VGSC par PCR, ce qui suggère que la différence d'espèces pourraient expliquer cette différence de résultat (Pitzer et al., 2019). Des résultats similaires sont trouvés chez Saoudi et al. (2019), expliquant ces résultats par l'induction de la DLT d'un blocage de l'effet inhibiteur du GABA ainsi que l'inhibition de l'ACh qui sera la conséquence d'une augmentation indirecte de la neurotransmission excitatoire qui provoque l'anxiété (Mani et al., 2014 ; Saoudi et al., 2019).

En plus de l'activité exploratoire, le nombre de redressements dans le test d'OF et DLB reflète aussi l'état émotionnel du rat (Mani et al., 2017); cependant dans la présente étude, il ne montre aucune variation significative entre les différents groupes, tandis que dans le test de DLB il montre un niveau élevé de redressement chez le groupe BF mais un niveau significativement réduit chez le groupe MIX, ces résultats sont en accord avec les résultats de Habr et al. (2014), alors que rien n'indique clairement que le comportement de redressement soit anxiolytique ou anxiogène. Certaines études indiquent que l'augmentation de redressements correspond aux niveaux d'anxiété élevés chez les souris, tandis que d'autres postulent qu'un comportement de redressement réduit indique une anxiété accrue (Seibenhener et Wooten, 2015).

L'effet de l'exposition chronique aux PYRs sur le niveau d'anxiété a été étudié dans 2 autres tests différents : LDB et EPM. Le test de LDB permet d'étudier l'impact des PYRs ou d'autres xénobiotiques sur le comportement anxieux en analysant les préférences de l'animal pour les parties claires et sombres de la boîte (Belovicova et al., 2017). Les rats traités par les PYRs présentent un temps réduit passé au compartiment clair par rapport au autres groupes, qui se traduit

comme un comportement anxiogène. La littérature ne montre aucune expérimentation du traitement par les PYRs réalisant ce test de LDB.

Le test d'EPM, un autre test relatif à évaluer le degré d'anxiété, les résultats montrent que les rats traités par la MIX surtout et par la DLT ont passé moins de temps dans les bras ouverts, alors que le groupe DLT seul passe moins de temps dans le centre, qui semble refléter une aversion envers les bras ouverts, cela est généré par la peur des espaces avec un indice d'anxiété élevée (Belovicova et al., 2017). Ces résultats se concordent avec les résultats de Ricci et al. (2013) qui l'expliquent par la diminution des taux de sérotonine (5-HT) et ses métabolites 5-hydroxy-3-acide indolacétique (5-HIAA) après exposition à la DLT (Ricci et al., 2013) ou après exposition aux PYRs (Rodriguez et al., 2016), ce qui signifie que la synthèse et le métabolisme de la 5-OH, néanmoins son activité n'est pas touchée (Ricci et al., 2013). Selon la même étude, des niveaux faibles de ce neurotransmetteur dans la fente synaptique est fortement corrélée avec l'anxiété. Des lésions de l'innervation du striatum par la 5-HT entraîne des effets anxiogènes modérés dans le test d'EPM (Ricci et al., 2013). Rodriguez et al. (2016) ont mis l'hypothèse qui explique la faible teneur de la dopamine par soit une inhibition de sa synthèse, soit par la diminution de la tyrosine hydrolase (TH), ou bien par la diminution de la synthèse de L-acide amino-décarboxylase aromatique observés après exposition aux PYRs (Rodriguez et al., 2016). Les récepteurs exprimés dans le cerveau des mammifères sont les récepteurs de 5-HT. La dérégulation des récepteurs de 5-HT a été impliquée dans les changements d'état émotionnel (Olivera et al., 2011).

Le test de billes enterrées (MB) présente un nombre des billes enterrées réduits chez les groupes traités par les PYRs en *solo* ou en mixture par rapport au témoin, alors que le groupe QUER présente une diminution significative. En effet, les animaux les plus anxieux, enterrent plus de billes sous leur litière (Carter et Shieh, 2015). Une étude porte sur des rats recevant 3mg/kg de DLT chaque 3 jours pendant 2 semaines ne présentent aucune différence significative dans ce test (Vester et al., 2019). En réalité, ce test dépend de plusieurs autres paramètres, comme le nombre de billes par cage, la texture des billes, la nature de la litière (Homma et Yamada, 2009) ; en outre, les rats n'enterrent pas les marbres de manière spécifique, mais au cours du processus de creusage et de fouissage, les marbres sont recouverts par la litière (Angoa-Pérez et al., 2013).

La présente étude montre l'effet neurocomportemental protecteur de la QUER qui apparait au niveau des différents tests réalisés contre l'effet toxique des PYRs. Ces résultats sont en accord avec les résultats de Gasmi et al. (2017). Plus précisément, les rats exposés à la QUER associé au PYR ont présenté une réponse comportementale active et améliorée dans le test d'OF, ce qui

pourrait être interprété comme une anxiété moins forte et une motivation accrue à explorer, ou comme une sensibilité plus forte aux nouveaux stimuli par rapport aux rats traités par les PYRs (Lu et al., 2006 ; Babaei et al., 2018). Des études antérieures ont montré que la QUER peut traverser la barrière hémato-encéphalique *in vivo* vu son caractère lipophile, et sa faible biodisponibilité, de sorte qu'elle puisse atteindre l'organe cible (le cerveau) et mener des actions neuroprotectrices (Paulke et al., 2006; Babaei et al., 2018).Cependant, la co-administration de la quercétine à des animaux traités par les PYRs a pu réduire l'anxiété, ce qui peut s'expliquer par une régulation positive du système sérotoninergique par la quercétine (Kaur et al., 2019).

4.5. Effet de BF, DLT et leur mixture associés ou non à QUER sur le comportement dépressif chez les rats

Dans le test de la nage forcée (FS), on observe bien que le temps d'immobilité était plus réduit chez tous les groupes traités de cette étude, notamment les rats exposés à la DLT, ce qui ne reflète pas un état de dépression, mais un état d'anxiété. Ces résultats ont été confirmés par le test de LDB dont les rats intoxiqués par la DLT ont resté moins de temps dans le compartiment obscur. Ces résultats sont en accord avec plusieurs travaux trouvant que les pyréthrinoïdes (DLT) ont un effet antidépressif (Lazarini et al., 2001 ; Takasaki et al., 2013). Ces effets sont dus principalement à l'action de la DLT sur la transmission sérotoninergique et glutaminergique dans le cerveau et qui sont impliqués dans la physiopathologie de stress et de dépression (Anitha et al., 2019).

Bien que le test de la nage forcée ne permette pas d'évaluer à lui seul pleinement les symptômes de type dépressif (Liu et al., 2018). Le test de la nage forcée (FS) est généralement associé au test de préférence pour une boisson sucrée qui permet d'évaluer l'état d'anhédonie des animaux, un autre symptôme majeur des troubles dépressifs (Carter et Shieh, 2015). Dans plusieurs modèles de dépression chez les rongeurs, comme l'exposition à des stress chroniques, la préférence pour une solution sucrée est diminuée (Liu et al., 2018).

Le volume d'eau sucrée consommée ne présente aucune variation significative pour la DLT mais un volume consommé élevé significativement d'eau sucrée chez le groupe MIX. Ces résultats ne seront clairs sauf si le pourcentage de sucrose consommé/liquide total est calculé, il révèle que la préférence au sucrose a diminué significativement chez le groupe DLT et MIX+QUER ce qui reflète un état dépressif. Ces résultats sont en accord avec les résultats de Gasmi et al., 2017). Des études récentes montrent que l'administration du DLT au neurone cortical du rat dans une culture cellulaire augmente considérablement l'expression d'ARNm codant pour BNFD (facteur neutrophique issu du cerveau) (Tsai, 2006). L'administration intrapéritonéale de

25mg/kg de la DLT augmente le taux des protéines de BDNF dans le cortex et l'hippocampe, ces résultats indiquent que la DLT est un inducteur de l'expression neuronale du BDNF (Huang et al., 2019), impliqué dans différents mécanismes antidépresseurs ; la perfusion intra-cérébro-ventriculaire de BDNF a été rapportée pour favoriser la germination et la croissance des neurones contenant de la sérotonine dans le cerveau du rat et augmenter les niveaux de noradrénaline dans plusieurs zones du cerveau, y compris l'hippocampe (Takasaki et al., 2013).

Les résultats de cette étude montrent que la QUER a des effets antidépresseurs, se traduisant par l'augmentation du volume de l'eau sucrée lorsqu'elle est administrée avec la DLT. Ces résultats sont en accord avec plusieurs travaux de recherche (Gasmi et al., 2017 ; Babaei et al., 2018). L'effet neuroprotecteur de la QUER est relié à l'activation de la signalisation P13K/AKT par la phosphorylation du récepteur TrKB (Tropomyosin receptor kinase B), à travers ce récepteur le BDNF fait activer plusieurs voies de signalisation cellulaire, incluant l'activation de P13K/AKT qui affecte le développement et le fonctionnement du système nerveux (Yao et al., 2012).

5. Conclusion

Le lien entre le stress oxydatif et le comportement est lié à une anxiété élevée est incontesté. mais la relation de cause et effet n'a pas encore été complètement élucidée. Ici, les effets comportementaux de la DLT et la BF donnés à des rats étaient évalués par une variété de tests neurocomportementaux par rapport aux témoins, durant une exposition chronique (120 jours). Ces PYRs ont affecté les réponses émotionnelles en induisant un comportement anxieux associé à l'hyperactivité et un déficit des capacités d'apprentissage et de mémorisation.

Les antioxydants naturels comme la quercétine peuvent jouer un rôle dans la prévention ou l'atténuation des effets du stress oxydatif qui induit l'anxiété la dépression et le déficit d'apprentissage.

Conclusion générale

Conclusion générale

L'objectif de la présente étude était d'évaluer la neurotoxicité chronique chez le rat après une exposition à deux pesticides nouvellement introduits et largement utilisés en Algérie à savoir la DLT et la BF d'une part, et l'effet préventif de la QUER, un flavonoïde puissant sur cette toxicité d'autre part. A la lumière des résultats obtenus, on peut conclure :

- Le gavage de la BF et la DLT respectivement à la dose de 2,6mg/kg/jour et de 3,72mg/kg/jour chez les rats femelles adultes a induit des perturbations du comportement (test du champ ouvert, test de MWM, test de labyrinthe en croix surélevée, test de la nage forcée) des rats.
- l'exposition chronique à la BF et la DLT a provoqué également des altérations dans le bilan des biomarqueurs du stress oxydatif et d'apoptose cellulaire (gonflement mitochondrial) qui se traduit par une perturbation des taux du GSH et du MDA, l'activité de CAT, SOD, GPx, GST, mitochondriale et cytosolique, dans les quatre régions du cerveau (hippocampe, striatum, cortex et cervelet).
- La quercétine est capable de prévenir ces effets toxiques ; au niveau comportemental et cytologique. L'effet préventif de la quercétine comme antioxydant puissant, prouve que le stress oxydant est le mécanisme principal de la neurotoxicité de la DLT et de la BF.

Sachant que l'utilisation de ces insecticides dans notre pays est considérable, il faut bien rechercher donc sur le niveau moléculaire pour comprendre toutes les formes d'intoxication ou les problèmes sanitaires liées avec ces pesticides, de cet effet, ce travail de thèse peut être complété par des études plus mécanistiques, comme perspectives on propose donc de :

- Déterminer les effets de métabolites finaux de la DLT et de la BF sur l'organisme après une exposition dans les mêmes conditions expérimentales.
- Développer une dose spécifique et plus efficace de la QUER, capable d'être utilisé comme antidotes spécifiques contre les différents types d'intoxication par ces pesticides (hépat, neuro, néphro et pneumo-toxicité).
- Il est intéressant aussi de lancer des études diététiques pour ajuster le type et la dose de ces antioxydants (QUER) et comment les introduire dans le régime alimentaire ou sous forme des traitements préventifs pour les populations vulnérables (sujets âgés, les prédisposés aux maladies neurodégénératives, exposition professionnelle ...)

- Evaluer les paramètres de la neurotransmission notamment l'acétylcholine estérase pour trouver un lien entre les perturbations neurocomportementales et les perturbations motrices.
- Développer le but de cette étude par le dosage des autres biomarqueurs par des autres appareils sophistiqués (HPLC, ELISA, CPG...).
- De compléter cette étude par des tests histologiques des différentes régions du cerveau pour révéler s'il y a une dégénérescence, altération ou mort cellulaire.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abdallah, F. B., Fetoui, H., Fakhfakh, F., & Keskes, L. (2012). Caffeic acid and quercetin protect erythrocytes against the oxidative stress and the genotoxic effects of lambda-cyhalothrin in vitro. *Human & Experimental Toxicology*, 31(1), 92-100.
- Abdel-Daim, M., El-Bialy, B. E., Rahman, H. G. A., Radi, A. M., Hefny, H. A., & Hassan, A. M. (2016). Antagonistic effects of *Spirulina platensis* against sub-acute deltamethrin toxicity in mice: biochemical and histopathological studies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 77, 79-85.
- Abreu-Villaca, Y., & Levin, E. D. (2017). Developmental neurotoxicity of succeeding generations of insecticides. *Environment International*, 99, 55-77.
- Adamsky, A., & Goshen, I. (2018). Astrocytes in memory function : Pioneering findings and future directions. *Neuroscience*, 370, 14-26.
- Ahmed, T., Tripathi, A. K., Ahmed, R. S., Das, S., Suke, S. G., Pathak, R., ... & Banerjee, B. D. (2008). Endosulfan-induced apoptosis and glutathione depletion in human peripheral blood mononuclear cells: Attenuation by N-acetylcysteine. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 22(5), 299-304.
- Aligon, D., Bonneau, J., Garcia, J., Gomez, D., & Le Goff, D. (2010). Estimation des expositions de la population générale aux insecticides : Les organochlorés, les organophosphorés et les pyréthrinoides. *Ecole des Hautes Etudes en santé publique*.
- Ameziane Herzine, (2016) Etudes des effets neurodéveloppementaux induits par l'exposition périnatale à un pesticide, le glufosinate d'ammonium : de la neurogenèse au comportement. Neurosciences [q-bio.NC]. Université d'Orléans. Français. NNT : 2016ORLE2008.
- Anadon, A., Martinez-Larranaga, M. R., Fernandez-Cruz, M. L., Diaz, M. J., Fernandez, M. C., & Martinez, M. A. (1996). Toxicokinetics of deltamethrin and its 4'-HO-metabolite in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 141(1), 8-16.
- Anandakumar, P., Kamaraj, S., Jagan, S., Ramakrishnan, G., & Devaki, T. (2013). Capsaicin provokes apoptosis and restricts benzo (a) pyrene induced lung tumorigenesis in Swiss albino mice. *International Immunopharmacology*, 17(2), 254-259.
- Angoa-Pérez, M., Kane, M. J., Briggs, D. I., Francescutti, D. M., & Kuhn, D. M. (2013). Marble burying and nestlet shredding as tests of repetitive, compulsive-like behaviors in mice. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (82), e50978.
- Anitha, M., Anitha, R., Vijayaraghavan, R., Kumar, S. S., & Ezhilarasan, D. (2019). Oxidative stress and neuromodulatory effects of deltamethrin and its combination with insect repellents in rats. *Environmental Toxicology*.
- Antunes, M., & Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive Processing*, 13(2), 93-110.
- Akerboom, T. P., & Sies, H. (1981). [48] Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. In *Methods in Enzymology* (Vol. 77, pp. 373-382). Academic Press.

- Arora, D., Siddiqui, M. H., Sharma, P. K., Singh, S. P., Tripathi, A., Mandal, P., ... & Shukla, Y. (2016). Evaluation and physiological correlation of plasma proteomic fingerprints for deltamethrin-induced hepatotoxicity in Wistar rats. *Life Sciences*, 160, 72-83.
- Ashar, W. M. P., & Muthu, M. H. S. (2012). Fenvalerate induced hepatotoxicity and its amelioration by quercetin. *International Journal of PharmTech Research*, 4(4), 1391-1400.
- Assefa, Z., Van Laethem, A., Garmyn, M., & Agostinis, P. (2005). Ultraviolet radiation-induced apoptosis in keratinocytes: on the role of cytosolic factors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1755(2), 90-106.
- Aubertot, J. N., Barbier, J. M., Carpentier, A., Gril, J. N., Guichard, L., Lucas, P., ... & Voltz, M. (2007). *Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux. Expertise scientifique collective Inra-Cemagref (décembre 2005)*.
- Babaei, F., Mirzababaei, M., & Nassiri-Asl, M. (2018). Quercetin in Food: Possible Mechanisms of Its Effect on Memory. *Journal of Food Science*, 83(9), 2280-2287.
- Bains, J. S., & Shaw, C. A. (1997). Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Research Reviews*, 25(3), 335-358.
- Baldi, I., Cordier, S., Coumoul, X., & Elbaz, A. (2013). Pesticides, effets sur la santé. Exprtise collective *Inserm*, 8-12.
- Baltazar, M. T., Dinis-Oliveira, R. J., de Lourdes Bastos, M., Tsatsakis, A. M., Duarte, J. A., & Carvalho, F. (2014). Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases—a mechanistic approach. *Toxicology Letters*, 230(2), 85-103.
- Barlow, S. M., Sullivan, F. M., & Lines, J. (2001). Risk assessment of the use of deltamethrin on bednets for the prevention of malaria. *Food and Chemical Toxicology*, 39(5), 407-422.
- Barnes, C. A. (1979). Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 93(1), 74.
- Bavoux, C., Bonnard, N., Jargot, D., Pillière, F., & Serre, P. (2007). Deltaméthrine. *Institut National de Recherche et de Sécurité*, FT, 193.
- Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 276-287.
- Beausoleil, C., Bonnard, N., Falcy, M., & Jargot, D. (2009). Bifenthrine. *Institut National de Recherche et de Sécurité*, FT, 274.
- Belovicova, K., Bogi, E., Csatosova, K., & Dubovicky, M. (2017). Animal tests for anxiety-like and depression-like behavior in rats. *Interdisciplinary Toxicology*, 10(1), 40-43.
- Berger-preieß, E., Preieß, A., Sielaff, K., Raabe, M., Ilgen, B., & Levsen, K. (1997). The behaviour of pyrethroids indoors: a model study. *Indoor Air*, 7(4), 248-262.
- Bhattacharjee, P., & Das, S. (2017). Deltamethrin induced alteration of biochemical parameters in *Channa punctata*, Bloch and its amelioration by quercetin. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 98(6), 763-769.

- Blanc-Lapierre, A., Bouvier, G., Garrigou, A., Canal-Raffin, M., Raheison, C., Brochard, P., & Baldi, I. (2012). Effets chroniques des pesticides sur le système nerveux central : état des connaissances épidémiologiques. *Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique*, 60(5), 389-400.
- Bliss, T. V., & Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory : long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361(6407), 31.
- Bourin, M., & Hascoët, M. (2003). The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology*, 463(1-3), 55-65.
- Bouvier, G., Seta, N., Vigouroux-Villard, A., Blanchard, O., & Momas, I. (2005). Insecticide urinary metabolites in nonoccupationally exposed populations. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 8(6), 485-512.
- Braak, H., Braak, E., Yilmazer, D., & Bohl, J. (1996). Topical review : functional anatomy of human hippocampal formation and related structures. *Journal of Child Neurology*, 11(4), 265-275.
- Bradberry, S. M., Cage, S. A., Proudfoot, A. T., & Vale, J. A. (2005). Poisoning due to pyrethroids. *Toxicological Reviews*, 24(2), 93-106.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Bruni, J. E. (1998). Ependymal development, proliferation, and functions : a review. *Microscopy Research and Technique*, 41(1), 2-13.
- Burda, J. E., & Sofroniew, M. V. (2014). Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron*, 81(2), 229-248.
- Caeser, M. & Aertsen, A. D. (1991). Morphological organization of rat hippocampal slice cultures. *Journal of Comparative Neurology*, 307(1), 87-106.
- Cajal, Y., & Ramón, S. (2002). Structure et connexions des neurones. *Discurso*, 35(4), 433-452.
- Carter, M., & Shieh, J. C. (2015). Guide to research techniques in neuroscience. Academic Press.
- Carter, R. (2019). The human brain book : An illustrated guide to its structure, function, and disorders. Penguin. Pp : 72-73.
- Chavez-Mardones, J., & Gallardo-Escárate, C. (2014). Deltamethrin (AlphaMax™) reveals modulation of genes related to oxidative stress in the ectoparasite *Caligus rogercresseyi*: Implications on delousing drug effectiveness. *Aquaculture*, 433, 421-429.
- Cho, J. Y., Kim, I. S., Jang, Y. H., Kim, A. R., & Lee, S. R. (2006). Protective effect of quercetin, a natural flavonoid against neuronal damage after transient global cerebral ischemia. *Neuroscience Letters*, 404(3), 330-335.
- Ciceri, G., & Dehorter, N. (2014). Organisation des lignées d'interneurones du cortex cérébral. *Médecine/Sciences*, 30(02), 144-146.
- Ciceri, G., Dehorter, N., Sols, I., Huang, Z. J., Maravall, M., & Marín, O. (2013). Lineage-specific laminar organization of cortical GABAergic interneurons. *Nature neuroscience*, 16(9), 1199.

- Claiborne, A. (1985). Handbook of methods for oxygen radical research. *Florida: CRC Press, Boca Raton*. Clayton, D.A., & Doda, J.N. (2001). Isolation of mitochondria from cells and tissues. In: Spector, D.L., Goldman, R., Leinwand, L. (eds) *Cells: a laboratory manual*. Sci., Press, Beijing, pp 356-361.
- Clayton, D. A., & Shadel, G. S. (2014). Isolation of mitochondria from cells and tissues. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2014(10), pdb-top074542.
- Collet, C., & Charreton, M. (2016). Evaluation des capacités locomotrices de l'abeille en laboratoire : une méthode qui permet d'identifier des effets sublétaux après exposition à des pyréthrinoïdes et des néonicotinoïdes. *Innovations Agronomiques*, 53, 105-109.
- Contreras, D. (2004). Electrophysiological classes of neocortical neurons. *Neural Networks*, 17(5-6), 633-646.
- Costa, L. G., Garrick, J. M., Roquè, P. J., & Pellacani, C. (2016). Mechanisms of neuroprotection by quercetin : counteracting oxidative stress and more. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.
- Cowan, A. I., & Stricker, C. (2004). Functional connectivity in layer IV local excitatory circuits of rat somatosensory cortex. *Journal of Neurophysiology*, 92(4), 2137-2150.
- Crawley, J., & Goodwin, F. K. (1980). Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 13(2), 167-170.
- Cycoń, M., Mroziak, A., & Piotrowska-Seget, Z. (2017). Bioaugmentation as a strategy for the remediation of pesticide-polluted soil: a review. *Chemosphere*, 172, 52-71.
- Dar, M. A., Khan, A. M., Raina, R., Verma, P. K., & Sultana, M. (2013). Effect of repeated oral administration of bifenthrin on lipid peroxidation and anti-oxidant parameters in Wistar rats. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 91(1), 125-128.
- Dar, M. A., Khan, A. M., Raina, R., Verma, P. K., & Wani, N. M. (2019). Effect of bifenthrin on oxidative stress parameters in the liver, kidneys, and lungs of rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-6.
- Dar, M. A., Mir, A. H., Raina, R., & Verma, P. K. (2017). Effects on Oxidative Balance and Acetylcholinesterase in Liver and Brain of Rats Dermally Exposed to Bifenthrin. *Toxicology International*, 24(3), 244-248.
- Dar, M. A., Raina, R., Mir, A. H., Sultana, M., & Pankaj, N. K. (2015). Effect of dermal application of bifenthrin on acetylcholinesterase and oxidative stress indices in rat blood, lung and kidney. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 85(2), 431-435.
- Dar, M. A., Raina, R., Mir, A. H., Verma, P. K., Pankaj, N. K., & Sultana, M. (2016). Protective role of L-ascorbic acid in oxidative stress induced by repeated oral administration of bifenthrin in wistar rats. *Journal of Animal Research*, 6(1), 39.
- Davies, T. G. E., Field, L. M., Usherwood, P. N. R., & Williamson, M. S. (2007). DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life*, 59(3), 151-162.

- Dayal, M., Parmar, D., Dhawan, A., Ali, M., Dwivedi, U. N., & Seth, P. K. (2003). Effect of pretreatment of cytochrome P450 (P450) modifiers on neurobehavioral toxicity induced by deltamethrin. *Food and Chemical Toxicology*, 41(3), 431-437.
- de Toledo-Morrell, L., Morrell, F., & Fleming, S. (1984). Age-dependent deficits in spatial memory are related to impaired hippocampal kindling. *Behavioral Neuroscience*, 98(5), 902.
- Deacon, R. M. (2006). Digging and marble burying in mice: simple methods for in vivo identification of biological impacts. *Nature Protocols*, 1(1), 122.
- De Smet, H. J., Paquier, P., Verhoeven, J., & Mariën, P. (2013). The cerebellum : its role in language and related cognitive and affective functions. *Brain and Language*, 127(3), 334-342.
- Ding, G., Shi, R., Gao, Y., Zhang, Y., Kamijima, M., Sakai, K., ... & Tian, Y. (2012). Pyrethroid pesticide exposure and risk of childhood acute lymphocytic leukemia in Shanghai. *Environmental Science & Technology*, 46(24), 13480-13487.
- Di Monte, D. A., Chan, P., & Sandy, M. S. (1992). Glutathione in Parkinson's disease: A link between oxidative stress and mitochondrial damage? *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 32(S1), S111-S115.
- Djellaoui, A., Faugeras, F., Hosseini, H., Seddik, L., Bachoud-Lévi, A. C., & Abdelhedi, J. (2019). Astrocytome anaplasique mimant une encéphalite herpétique : un challenge diagnostique. *Revue Neurologique*, 175, S47.
- Dong, M. H. (1996). Human Pesticide Exposure Assessment (For Section 3 New Product/Use Registration). *Bifenthrin, California EPA*.
- Doshi, G. M., & Une, H. D. (2016). Quantification of quercetin and rutin from *Benincasa hispida* seeds and *Carissa congesta* roots by high-performance thin layer chromatography and high-performance liquid chromatography. *Pharmacognosy Research*, 8(1), 37-42.
- Dringen, R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology*, 62(6), 649-671.
- Dubey, N., Raina, R., & Khan, A. M. (2012). Toxic effects of deltamethrin and fluoride on antioxidant parameters in rats. *Fluoride*, 45(3), 242-246.
- Duce, I. R. (Ed.). (2012). *Neurotox'91 : Molecular Basis of Drug & Pesticide Action*. Springer Science & Business Media.
- Eagle, A. L., Mazei-Robison, M., & Robison, A. J. (2016). Sucrose preference test to measure stress-induced anhedonia. *Bio-protocol* 6(11): e1822. DOI: [10.21769/BioProtoc.1822](https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1822).
- El-Shenawy, N. S. (2010). Effects of insecticides fenitrothion, endosulfan and abamectin on antioxidant parameters of isolated rat hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, 24(4), 1148-1157.
- Elliott, M., Farnham, A. W., Janes, N. F., Needham, P. H., & Pulman, D. A. (1974). Synthetic insecticide with a new order of activity. *Nature*, 248(5450), 710.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82(1), 70-77.

- Ensibi, C., Perez-Lopez, M., Rodríguez, F. S., Miguez-Santiyan, M. P., Yahya, M. D., & Hernández-Moreno, D. (2013). Effects of deltamethrin on biometric parameters and liver biomarkers in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(2), 384-391.
- Eriksson, P., & Fredriksson, A. (1991). Neurotoxic effects of two different pyrethroids, bioallethrin and deltamethrin, on immature and adult mice: changes in behavioral and muscarinic receptor variables. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 108(1), 78-85.
- Erstfeld, K. M. (1999). Environmental fate of synthetic pyrethroids during spray drift and field runoff treatments in aquatic microcosms. *Chemosphere*, 39(10), 1737-1769.
- European Commission. (2002). Review report for the active substance deltamethrin.
- European Food Safety Authority. (2010). 2008 Annual Report on Pesticide Residues according to Article 32 of Regulation (EC) No 396/2005. *EFSA Journal*, 8(7), 1646.
- European Food Safety Authority. (2011). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance bifenthrin. *EFSA Journal*, 9(5), 2159.
- Farajzadeh, M. A., Khoshmaram, L., & Nabil, A. A. A. (2014). Determination of pyrethroid pesticides residues in vegetable oils using liquid-liquid extraction and dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-flame ionization detection. *Journal of Food Composition and Analysis*, 34(2), 128-135.
- F. A. O. (2004). evaluations for agricultural Pesticides. *Malathion, Food and Agricultural Organization of the United States*.
- Farhi, S. (2015). The neurotoxicity study of cadmium on oxidative stress parametres and the protective effect of sélénium on this toxicity in rabbitis. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 29,104-110.
- Flohé, L., & Gunzler W. A. (1984). Analysis of glutathione peroxidase, *Methods in Enzymology*, 105, 114-121.
- Franco, R., Sánchez-Olea, R., Reyes-Reyes, E. M., & Panayiotidis, M. I. (2009). Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: menage a trois. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674(1-2), 3-22.
- Frey, T. G., & Mannella, C. A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(7), 319-324.
- Gamet-Payraastre, L., & Lukowicz, C. (2017). Les effets des mélanges de pesticides. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 52(5), 234-238.
- Gasmi, S., Rouabhi, R., Kebieche, M. (2016). Deltamethrin induced Neurodegeneration and Behavioral Effect by Dysfunction Cytosolic Antioxidant System in Rats Brain. *Algerian journal of Natural sciences*, 1(1),14-22
- Gasmi, S., Rouabhi, R., Kebieche, M., Boussekine, S., Salmi, A., Tualbia, N., ... & Djabri, B. (2017). Effects of Deltamethrin on striatum and hippocampus mitochondrial integrity and the protective role of Quercetin in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(19), 16440-16457.

- Gargouri, B., Bhatia, H. S., Bouchard, M., Fiebich, B. L., & Fetoui, H. (2018 a). Inflammatory and oxidative mechanisms potentiate bifenthrin-induced neurological alterations and anxiety-like behavior in adult rats. *Toxicology Letters*, 294, 73-86.
- Gargouri, B., Yousif, N. M., Attaai, A., Bouchard, M., Chtourou, Y., Fiebich, B. L., & Fetoui, H. (2018 b). Pyrethroid bifenthrin induces oxidative stress, neuroinflammation, and neuronal damage, associated with cognitive and memory impairment in murine hippocampus. *Neurochemistry International*, 120, 121-133.
- Gargouri, B., Bouchard, M., Saliba, S. W., Fetoui, H., & Fiebich, B. L. (2019). Repeated bifenthrin exposure alters hippocampal Nurr-1/AChE and induces depression-like behavior in adult rats. *Behavioural Brain Research*, 370, 111898.
- Giroux, I., & Fortin, J. (2010). *Pesticides dans l'eau de surface d'une zone maraîchère : ruisseau Gibeault-Delisle dans les " terres noires" du bassin versant de la rivière Châteauguay de 2005 à 2007*. Université Laval.
- Gould, T. D., Dao, D. T., & Kovacsics, C. E. (2009). The open field test. In *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice* (pp. 1-20). Humana Press, Totowa, NJ.
- Habr, S. F., Macrini, D. J., Spinosa, H. D. S., Florio, J. C., & Bernardi, M. M. (2014). Repeated forced swim stress has additive effects in anxiety behavior and in catecholamine levels of adult rats exposed to deltamethrin. *Neurotoxicology and Teratology*, 46, 57-61.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.
- Halder, S., Kar, R., Chakraborty, S., Bhattacharya, S. K., Mediratta, P. K., & Banerjee, B. D. (2019). Cadmium level in brain correlates with memory impairment in F1 and F2 generation mice : improvement with quercetin. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(10), 9632-9639.
- Hall, C. S. (1934). Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*, 18(3), 385-403.
- Hammond, C. (2015). *Cellular and molecular neurophysiology*. Academic Press. P : 3.
- Hénault-Ethier, L., Soumis, N., & Bouchard, M. (2016). *Impacts des insecticides pyréthrinoïdes sur la santé humaine et environnementale : ce que l'on sait, ce qu'on ignore et les recommandations qui s'y rapportent*. Équiterre.
- Hoffman, K. L. (2015). Modeling neuropsychiatric disorders in laboratory animals.in chapter 2 : What can animal models tell us 2 about depressive disorders?, *Woodhead Publishing*, p 50.
- Homma, C., & Yamada, K. (2009). Physical Properties of Bedding Materials Determine the Marble Burying Behavior of Mice (C57BL/6J). *The Open Behavioral Science Journal*, 3(1).
- Hooks, B. M., Mao, T., Gutnisky, D. A., Yamawaki, N., Svoboda, K., & Shepherd, G. M. (2013). Organization of cortical and thalamic input to pyramidal neurons in mouse motor cortex. *Journal of Neuroscience*, 33(2), 748-760.
- Hossain, M. M., & Richardson, J. R. (2011). Mechanism of pyrethroid pesticide-induced apoptosis : role of Calpain and the ER stress pathway. *Toxicological Sciences*, 122(2), 512-525.

- Hossain, M. M., Suzuki, T., Sato, I., Takewaki, T., Suzuki, K., & Kobayashi, H. (2005). Neuromechanical effects of pyrethroids, allethrin, cyhalothrin and deltamethrin on the cholinergic processes in rat brain. *Life Sciences*, 77(7), 795-807.
- Hossain, M. M., Suzuki, T., Richardson, J. R., & Kobayashi, H. (2013). Acute effects of pyrethroids on serotonin release in the striatum of awake rats: an in vivo microdialysis study. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 27(2), 150-156.
- Hu, B., Hu, S., Huang, H., Wei, Q., Ren, M., Huang, S., ... & Su, J. (2019). Insecticides induce the co-expression of glutathione S-transferases through ROS/CncC pathway in *Spodoptera exigua*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 155, 58-71.
- Huang, X., Liang, Y., Qing, Y., Chen, D., & Shi, N. (2019). Proteasome inhibition by MG-132 protects against deltamethrin-induced apoptosis in rat hippocampus. *Life Sciences*, 220, 76-83.
- Ikram, M. S., Mehmood, T., Siddique, F., Sattar, I. A., Tabassam, Q., & Jabeen, Z. (2016). Alteration in the blood biochemical parameters and degenerative lesions in Rat liver by a common pyrethroid insecticide (Bifenthrin). *Pure and Applied Biology*, 5(4), 1.
- INRS (2007). Deltaméthrine. Institut National de Recherché et de Sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles établie par les services techniques et médicaux de l'INRS. Paris. Fiche toxicologique 193. p 11.
- Ishisaka, A., Ichikawa, S., Sakakibara, H., Piskula, M. K., Nakamura, T., Kato, Y., ... & Terao, J. (2011). Accumulation of orally administered quercetin in brain tissue and its antioxidative effects in rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(7), 1329-1336.
- Jaskolski, F., Coussen, F., & Mulle, C. (2005). Subcellular localization and trafficking of kainate receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26(1), 20-26.
- Joel, D., & Weiner, I. (2000). The connections of the dopaminergic system with the striatum in rats and primates : an analysis with respect to the functional and compartmental organization of the striatum. *Neuroscience*, 96(3), 451-474.
- Juurlink, B. H., & Paterson, P. G. (1998). Review of oxidative stress in brain and spinal cord injury: suggestions for pharmacological and nutritional management strategies. *The Journal of Spinal Cord Medicine*, 21(4), 309-334.
- Kahloula, K., Adli, D. E. H., Slimani, M., Terras, H., & Achour, S. (2014). Effet de l'exposition chronique au nickel sur les fonctions neurocomportementales chez les rats Wistar pendant la période de développement. *Toxicologie Analytique et Clinique*, 26(4), 186-192.
- Kamat, P. K., Kalani, A., & Tyagi, N. (2014). Method and validation of synaptosomal preparation for isolation of synaptic membrane proteins from rat brain. *Methods X*, 1, 102-107.
- Kandel, E., Schwartz, J., Jessell, T., Siegelbaum, S., & Hudspeth, A. (2013). Principles of Neural Science, Fifth. *Journal of Chemical Information and Modeling*. New York : Mc-Graw Hill Medical, p : 345.
- Kanza, J. P. B., El Ghayati, L., & Moussaïf, A. (2019). Fragmentation de la perméthrine par spectrométrie de masse en tandem en mode électrospray. Mise en évidence d'un ion de structure dibenzofurylium. *Moroccan Journal of Heterocyclic Chemistry*, 18(3), 18-3.

- Kaur, S., Singla, N., & Dhawan, D. K. (2019). Neuro-protective potential of quercetin during chlorpyrifos induced neurotoxicity in rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 42(2), 220-230.
- Kawaguchi, Y., & Kubota, Y. (1997). GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cerebral Cortex (New York, NY : 1991)*, 7(6), 476-486.
- Kebieche, M., Lakroun, Z., Lahouel, M., Bouayed, J., Meraihi, Z., & Soulimani, R. (2009). Evaluation of epirubicin-induced acute oxidative stress toxicity in rat liver cells and mitochondria, and the prevention of toxicity through quercetin administration. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 61(2), 161-167.
- Khalatbary, A. R., Ghaffari, E., & Mohammadnegad, B. (2015). Protective role of oleuropein against acute deltamethrin-induced neurotoxicity in rat brain. *Iranian Biomedical Journal*, 19(4), 247.
- Khan, A. M., Raina, R., Dubey, N., & Verma, P. K. (2017). Effect of deltamethrin and fluoride co-exposure on the brain antioxidant status and cholinesterase activity in Wistar rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 41(2), 123-127.
- Khan, A. M., Sultana, M., Raina, R., Dubey, N., & Dar, S. A. (2013). Effect of sub-acute toxicity of bifenthrin on antioxidant status and hematology after its oral exposure in goats. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 83(4), 545-549.
- Kim, H., Sul, J. H., Huh, N., Lee, D., & Jung, M. W. (2009). Role of striatum in updating values of chosen actions. *Journal of Neuroscience*, 29(47), 14701-14712.
- Kiss, T., & Osipenko, O. N. (1991). Effect of deltamethrin on acetylcholine-operated ionic channels in identified *Helix pomatia* L. neurons. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 39(2), 196-204.
- Knauer, K., Homazava, N., Junghans, M., & Werner, I. (2016). The influence of particles on bioavailability and toxicity of pesticides in surface water. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 13(4), 585-600.
- Komada, M., Takao, K., & Miyakawa, T. (2008). Elevated plus maze for mice. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (22), e1088.
- Kono, Y., & Fridovich, I. (1982). Superoxide radical inhibits catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 257(10), 5751-5754.
- Kumar, A., Sasmal, D., Bhaskar, A., Mukhopadhyay, K., Thakur, A., & Sharma, N. (2016). Deltamethrin-induced oxidative stress and mitochondrial caspase-dependent signaling pathways in murine splenocytes. *Environmental Toxicology*, 31(7), 808-819.
- Kumar, A., & Singh, A. (2015). A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacological Reports*, 67(2), 195-203.
- Kuramoto, E., Furuta, T., Nakamura, K. C., Unzai, T., Hioki, H., & Kaneko, T. (2009). Two types of thalamocortical projections from the motor thalamic nuclei of the rat : a single neuron-tracing study using viral vectors. *Cerebral Cortex*, 19(9), 2065-2077.
- Lago, T., Davis, A., Grillon, C., & Ernst, M. (2017). Striatum on the anxiety map : Small detours into adolescence. *Brain Research*, 1654, 177-184.

- Lahouel, A., Kebieche, M., Lakroun, Z., Rouabhi, R., Fetoui, H., Chtourou, Y., ... & Soulimani, R. (2016). Neurobehavioral deficits and brain oxidative stress induced by chronic low dose exposure of persistent organic pollutants mixture in adult female rat. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(19), 19030-19040.
- Lakroun, Z., Kebieche, M., Lahouel, A., Zama, D., Desor, F., & Soulimani, R. (2015). Oxidative stress and brain mitochondria swelling induced by endosulfan and protective role of quercetin in rat. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(10), 7776-7781.
- Laskowski, D. A. (2002). Physical and chemical properties of pyrethroids. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (pp. 49-170). Springer, New York, NY.
- Lazarini, C. A., Florio, J. C., Lemonica, I. P., & Bernardi, M. M. (2001). Effects of prenatal exposure to deltamethrin on forced swimming behavior, motor activity, and striatal dopamine levels in male and female rats. *Neurotoxicology and Teratology*, 23(6), 665-673.
- Lev, D. L., & White, E. L. (1997). Organization of pyramidal cell apical dendrites and composition of dendritic clusters in the mouse : emphasis on primary motor cortex. *European Journal of Neuroscience*, 9(2), 280-290.
- Levin, E. D. (2015). Learning about cognition risk with the radial-arm maze in the developmental neurotoxicology battery. *Neurotoxicology and Teratology*, 52, 88-92.
- Li, H. Y., Wu, S. Y., Ma, Q., & Shi, N. (2011). The pesticide deltamethrin increases free radical production and promotes nuclear translocation of the stress response transcription factor Nrf2 in rat brain. *Toxicology and Industrial Health*, 27(7), 579-590.
- Li, L., Yang, D., Song, Y., Shi, Y., Huang, B., Yan, J., & Dong, X. (2017). Effects of bifenthrin exposure in soil on whole-organism endpoints and biomarkers of earthworm *Eisenia fetida*. *Chemosphere*, 168, 41-48.
- Li, M., Liu, X., & Feng, X. (2019). Cardiovascular toxicity and anxiety-like behavior induced by deltamethrin in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Chemosphere*, 219, 155-164.
- Lichiheb, N., Bedos, C., Personne, E., & Barriuso, E. (2015). Synthèse des connaissances sur le transfert des pesticides vers l'atmosphère par volatilisation depuis les plantes. 2268-3798.
- Liu, M., Li, F., Yan, H., Wang, K., Ma, Y., Shen, L., ... & Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. (2019). A multi-model deep convolutional neural network for automatic hippocampus segmentation and classification in Alzheimer's disease. *NeuroImage*, 116459.
- Liu, M. Y., Yin, C. Y., Zhu, L. J., Zhu, X. H., Xu, C., Luo, C. X., ... & Zhou, Q. G. (2018). Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. *Nature Protocols*, 13(7), 1686.
- Lo, A. C., De Maeyer, J. H., Vermaercke, B., Callaerts-Vegh, Z., Schuurkes, J. A., & D'hooge, R. (2014). SSP-002392, a new 5-HT₄ receptor agonist, dose-dependently reverses scopolamine-induced learning and memory impairments in C57Bl/6 mice. *Neuropharmacology*, 85, 178-189.
- Lu, J., Zheng, Y. L., Luo, L., Wu, D. M., Sun, D. X., & Feng, Y. J. (2006). Quercetin reverses D-galactose induced neurotoxicity in mouse brain. *Behavioural Brain Research*, 171(2), 251-260.

- Lu, Q., Sun, Y., Ares, I., Anadón, A., Martínez, M., Martínez-Larrañaga, M. R., ... & Martínez, M. A. (2019). Deltamethrin toxicity: A review of oxidative stress and metabolism. *Environmental Research*.
- Lübke, J., Egger, V., Sakmann, B., & Feldmeyer, D. (2000). Columnar organization of dendrites and axons of single and synaptically coupled excitatory spiny neurons in layer 4 of the rat barrel cortex. *Journal of Neuroscience*, 20(14), 5300-5311.
- Lueptow, L. M. (2017). Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (126), e55718.
- Lukaszewicz-Hussain, A. (2008). Subchronic intoxication with chlorfenvinphos, an organophosphate insecticide, affects rat brain antioxidative enzymes and glutathione level. *Food and Chemical Toxicology*, 46(1), 82-86.
- Mader, S. S. & Windelspecht, M. (2009). Biologie humaine. Chenelière education.
- Mani, V. M., Asha, S., & Sadiq, A. M. M. (2014). Pyrethroid deltamethrin-induced developmental neurodegenerative cerebral injury and ameliorating effect of dietary glycoside naringin in male wistar rats. *Biomedicine & Aging Pathology*, 4(1), 1-8.
- Mani, V. M., Gokulakrishnan, A., & Sadiq, A. M. M. (2017). Molecular Mechanism of Neurodevelopmental Toxicity Risks of Occupational Exposure of Pyrethroid Pesticide with Reference to Deltamethrin-A Critical Review. *BAOJ Pathology*, 1(008).
- Manto, M., & Habas, C. (2013). *Le cervelet : de l'anatomie et la physiologie a la clinique humaine*. Springer.
- Marieb, E. N. (2008). Biologie humaine : principes d'anatomie et de physiologie. Pearson Education France, p: 221.
- Matamales, M., Bertran-Gonzalez, J., Salomon, L., Degos, B., Deniau, J. M., Valjent, E., ... & Girault, J. A. (2009). Striatal medium-sized spiny neurons : identification by nuclear staining and study of neuronal subpopulations in BAC transgenic mice. *PloS one*, 4(3), e4770.
- Maurice, N., Deniau, J. M., Glowinski, J., & Thierry, A. M. (1998). Relationships between the prefrontal cortex and the basal ganglia in the rat : physiology of the corticosubthalamic circuits. *Journal of Neuroscience*, 18(22), 9539-9546.
- McGregor, D. B. (2000). Pesticide residues in food 2000: Deltamethrin. *Group*, 4, 14.
- McEwen, B. S., Nasca, C., & Gray, J. D. (2016). Stress effects on neuronal structure : hippocampus, amygdala, and prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*, 41(1), 3.
- Mekircha, F., Chebab, S., Gabbianelli, R., & Leghouchi, E. (2018). The possible ameliorative effect of *Olea europaea* L. oil against deltamethrin-induced oxidative stress and alterations of serum concentrations of thyroid and reproductive hormones in adult female rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 161, 374-382.
- Mestres, R., & Mestres, G. (1992). Deltamethrin: uses and environmental safety. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (pp. 1-18). Springer, New York, NY.

- Mohamad, O., Song, M., Wei, L., & Yu, S. P. (2013). Regulatory roles of the NMDA receptor GluN3A subunit in locomotion, pain perception and cognitive functions in adult mice. *The Journal of Physiology*, 591(1), 149-168.
- Molofsky, A. V., Krennick, R., Ullian, E., Tsai, H. H., Deneen, B., Richardson, W. D., ... & Rowitch, D. H. (2012). Astrocytes and disease : a neurodevelopmental perspective. *Genes & Development*, 26(9), 891-907.
- Montanha, F. P., Machado, F. D., Faria, C. A., Anselmo, F., Lot, R. F. E., Ferioli, R. B., ... & Godinho, A. F. (2016). Lactational exposure to fipronil pesticide in low dose impairs memory in rat offspring. *Journal of Neurological Disorders*.
- Moreno-Rius, J. (2019). The cerebellum under stress. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 100774.
- Morgan, M. K. (2012). Children's exposures to pyrethroid insecticides at home: a review of data collected in published exposure measurement studies conducted in the United States. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9(8), 2964-2985.
- Morris, R. G. (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation*, 12(2), 239-260.
- Nakagawa, K., Kawagoe, M., Yoshimura, M., Arata, H., Minamikawa, T., Nakamura, M., & Matsumoto, A. (2000). Differential effects of flavonoid quercetin on oxidative damages induced by hydrophilic and lipophilic radical generators in hepatic lysosomal fractions of mice. *Journal of Health Science*, 46(6), 509-512.
- Nicholls, J. G., Martin, A. R., Wallace, B. G., & Fuchs, P. A. (2012). *From Neuron to Brain* (Vol. 271). Sunderland, MA : Sinauer Associates. P :10.
- Nieradko-Iwanicka, B. (2012). The influence of synthetic pyrethroids on memory processes, movement activity and co-ordination in mice. In *Insecticides-Advances in Integrated Pest Management*. IntechOpen.
- Nieradko-Iwanicka, B., & Borzęcki, A. (2015). Subacute poisoning of mice with deltamethrin produces memory impairment, reduced locomotor activity, liver damage and changes in blood morphology in the mechanism of oxidative stress. *Pharmacological Reports*, 67(3), 535-541.
- Nieradko-Iwanicka, B., Borzecki, A., & Jodlowska-Jedrych, B. (2015). Effect of subacute poisoning with bifenthrin on locomotor activity, memory retention, haematological, biochemical and histopathological parameters in mice. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 66(1).
- Nieradko-Iwanicka, B., & Borzęcki, A. (2016). How Deltamethrin Produces Oxidative Stress in Liver and Kidney. *Polish Journal of Environmental Studies*, 25(3).
- Nollet, L. M., & Toldrá, F. (Eds.). (2012). *Handbook of analysis of active compounds in functional foods*. CRC Press. London, Newyork, p: 293.
- Ogaly, H. A., Khalaf, A. A., Ibrahim, M. A., Galal, M. K., & Abd-Elsalam, R. M. (2015). Influence of green tea extract on oxidative damage and apoptosis induced by deltamethrin in rat brain. *Neurotoxicology and Teratology*, 50, 23-31.

- Okhawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351-358.
- Oliet, S. H., & Papouin, T. (2013). De l'importance de la localisation des récepteurs du glutamate NMDA. *Médecine/Sciences*, 29(3), 260-262.
- Organisation for Economic Co-operation and Development. (2007). *Comprendre le cerveau : naissance d'une science de l'apprentissage*. Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD).
- Oteiza, P. I., Erlejman, A. G., Verstraeten, S. V., Keen, C. L., & Fraga, C. G. (2005). Flavonoid-membrane interactions: a protective role of flavonoids at the membrane surface? *Journal of Immunology Research*, 12(1), 19-25.
- Pang, C. C. C., Kiecker, C., O'Brien, J. T., Noble, W., & Chang, R. C. C. (2019). Ammon's horn 2 (CA2) of the Hippocampus : a long-known region with a new potential role in neurodegeneration. *The Neuroscientist*, 25(2), 167-180.
- Parent, A., & Hazrati, L. N. (1995). Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Research Reviews*, 20(1), 91-127.
- Patel, M. (2013). Differential aging-related changes of D1, D2, and D3 dopamine receptor expression in the striatum.
- Patel, N., & Pitzer, E. (2019). The effects of developmental Deltamethrin exposure on glutamate and dopamine receptor expression in rats. *Undergraduate Scholarly Showcase Program (Spring 2019)*.
- Pathak, N., & Khandelwal, S. (2006). Influence of cadmium on murine thymocytes: potentiation of apoptosis and oxidative stress. *Toxicology Letters*, 165(2), 121-132.
- Patki, G., Solanki, N., Atrooz, F., Allam, F., & Salim, S. (2013). Depression, anxiety-like behavior and memory impairment are associated with increased oxidative stress and inflammation in a rat model of social stress. *Brain Research*, 1539, 73-86.
- Paulke, A., Schubert-Zsilavec, M., & Wurglics, M. (2006). Determination of St. John's wort flavonoid-metabolites in rat brain through high performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 832(1), 109-113.
- Pellow, S., Chopin, P., & File, S. E. (1985). Are the anxiogenic effects of yohimbine mediated by its action at benzodiazepine receptors? *Neuroscience Letters*, 55(1), 5-9.
- Pfrieger, F. W. (2010). Role of glial cells in the formation and maintenance of synapses. *Brain Research Reviews*, 63(1-2), 39-46.
- Pitoi, M. M., Ariyani, M., Rosmalina, R. T., & Koesmawati, T. A. (2019, May). Simultaneous determination of deltamethrin and 4 other pyrethroids residues in infusion tea: Preliminary study. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 277, No. 1, p. 012021). IOP Publishing.
- Pitzer, E. M., Sugimoto, C., Gudelsky, G. A., Huff Adams, C. L., Williams, M. T., & Vorhees, C. V. (2019). Deltamethrin exposure daily from postnatal day 3-20 in Sprague-Dawley rats causes long-term cognitive and behavioral deficits. *Toxicological Sciences*.

- Porsolt, R. D., Le Pichon, M., & Jalfre, M. L. (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266(5604), 730.
- Priprem, A., Watanatorn, J., Sutthiparinyanont, S., Phachonpai, W., & Muchimapura, S. (2008). Anxiety and cognitive effects of quercetin liposomes in rats. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology and Medicine*, 4(1), 70-78.
- Purves, D. E., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D. E., Hall, W. C., LaMantia, A. S. E., McNamara, J. O., & White, L. E. (2018). Neuroscience. P 15.
- Rajawat, N. K., Soni, I., Syed, F., Verma, R., John, P. J., & Mathur, R. (2019). Effect of β -cyfluthrin (synthetic pyrethroid) on learning, muscular coordination and oxidative stress in Swiss albino mice. *Toxicology and Industrial Health*, 35(5), 358-367.
- Rambourg, M. O. (2011). Expositions aux spécialités phytopharmaceutiques contenant de la BIFENTHRINE.
- Ray, D. E., & Fry, J. R. (2006). A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. *Pharmacology & Therapeutics*, 111(1), 174-193.
- Reddy, P. H., & Beal, M. F. (2005). Are mitochondria critical in the pathogenesis of Alzheimer's disease ? *Brain Research Reviews*, 49(3), 618-632.
- Reeber, S. L., Otis, T. S., & Sillitoe, R. V. (2013). New roles for the cerebellum in health and disease. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 7, 83.
- Reiner, A., Jiao, Y., Del Mar, N., Laverghetta, A. V., & Lei, W. L. (2003). Differential morphology of pyramidal tract-type and intratelencephalically projecting-type corticostriatal neurons and their intrastriatal terminals in rats. *Journal of Comparative Neurology*, 457(4), 420-440.
- Refaie, A. A. E. R., Ramadan, A., & Mossa, A. T. H. (2014). Oxidative damage and nephrotoxicity induced by prallethrin in rat and the protective effect of *Origanum majorana* essential oil. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7, S506-S513.
- Rehman, H., Aziz, A. T., Saggu, S. H., Abbas, Z. K., Mohan, A., & Ansari, A. A. (2014). Systematic review on pyrethroid toxicity with special reference to deltamethrin. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 2(6), 60-70.
- Reyes, R. C., Cittolin-Santos, G. F., Kim, J. E., Won, S. J., Brennan-Minnella, A. M., Katz, M., ... & Swanson, R. A. (2016). Neuronal glutathione content and antioxidant capacity can be normalized in situ by N-acetyl cysteine concentrations attained in human cerebrospinal fluid. *Neurotherapeutics*, 13(1), 217-225.
- Ricci, E. L., JR, V. F., Habr, S. F., Macrini, D. J., Bernardi, M. M., & de Souza SPINOSA, H. (2013). Behavioral and neurochemical evidence of deltamethrin anxiogenic-like effects in rats. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 50(1), 33-42.
- Richou-Bac, L., & Venant, A. (1985). Une nouvelle famille d'insecticides : les pyréthrinoïdes de synthèse. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*.

- Rigoard, S., Wager, M., Buffenoir, K., Bauche, S., Giot, J. P., Maixent, J. M., & Rigoard, P. (2009). Principaux mécanismes impliqués dans la transmission synaptique au sein de l'appareil neuromusculaire. *Neurochirurgie*, 55, S22-S33.
- Rodriguez, J. L., Ares, I., Castellano, V., Martínez, M., Martínez-Larrañaga, M. R., Anadón, A., & Martínez, M. A. (2016). Effects of exposure to pyrethroid cyfluthrin on serotonin and dopamine levels in brain regions of male rats. *Environmental Research*, 146, 388-394.
- Rouvière, H. and Delmas, A. (2002). Anatomie humaine : descriptive, topographique et fonctionnelle, volume : 4, système nerveux central, voies et centres nerveux, 15^{ème} Edition. Elsevier Masson, pp : 411.
- Saavedra-Rodriguez, K., Maloof, F. V., Campbell, C. L., Garcia-Rejon, J., Lenhart, A., Penilla, P., ... & Lozano, S. (2018). Parallel evolution of vgsc mutations at domains IS6, IIS6 and IIIS6 in pyrethroid resistant *Aedes aegypti* from Mexico. *Scientific Reports*, 8(1), 6747.
- Saoudi, M., Badraoui, R., Bouhajja, H., Ncir, M., Rahmouni, F., Grati, M., ... & El Feki, A. (2017). Deltamethrin induced oxidative stress in kidney and brain of rats: Protective effect of *Artemisia campestris* essential oil. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 94, 955-963.
- Saoudi, M., Salem, R. B. S. B., Salem, M. B., Brahmi, N., Badraoui, R., Nasri, M., & El Feki, A. (2019). Beneficial effects of *Crataegus oxyacantha* extract on neurobehavioral deficits and brain tissue damages induced by an insecticide mixture of deltamethrin and chlorpyrifos in adult wistar rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 114, 108795.
- Schilling, K., Oberdick, J., Rossi, F., & Baader, S. L. (2008). Besides Purkinje cells and granule neurons : an appraisal of the cell biology of the interneurons of the cerebellar cortex. *Histochemistry and Cell Biology*, 130(4), 601-615.
- Schmahmann, J. D. (2019). The cerebellum and cognition. *Neuroscience Letters*, 688, 62-75.
- Schmahmann, J. D., & Caplan, D. (2006). Cognition, emotion and the cerebellum. *Brain*, 129(2), 290-292.
- Schmahmann, J. D., & Pandya, D. N. (1997). Anatomic organization of the basilar pontine projections from prefrontal cortices in rhesus monkey. *Journal of Neuroscience*, 17(1), 438-458.
- Schubert, D., Kötter, R., Luhmann, H. J., & Staiger, J. F. (2006). Morphology, electrophysiology and functional input connectivity of pyramidal neurons characterizes a genuine layer Va in the primary somatosensory cortex. *Cerebral Cortex*, 16(2), 223-236.
- Scollon, E. J., Starr, J. M., Crofton, K. M., Wolansky, M. J., DeVito, M. J., & Hughes, M. F. (2011). Correlation of tissue concentrations of the pyrethroid bifenthrin with neurotoxicity in the rat. *Toxicology*, 290(1), 1-6.
- Sechi, G., Deledda, M. G., Bua, G., Satta, W. M., Deiana, G. A., Pes, G. M., & Rosati, G. (1996). Reduced intravenous glutathione in the treatment of early Parkinson's disease. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 20(7), 1159-1170.
- Seck, D. (2009). Stockage, conservation et transformation des récoltes en zones tropicales. *Notes de cours*, 31.

- Seibenhener, M. L., & Wooten, M. C. (2015). Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (96), e52434.
- Sestakova, N., Puzserova, A., Kluknavsky, M., & Bernatova, I. (2013). Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. *Interdisciplinary Toxicology*, 6(3), 126-135.
- Sethi, P., Bruckner, J. V., Mortuza, T., Cummings, B. S., Muralidhara, S., & White, C. A. (2019). Plasma Protein and Lipoprotein Binding of cis-and trans-Permethrin and Deltamethrin in Adult Humans and Rats. *Drug Metabolism and Disposition*, dmd-118.
- Sharma, P., Firdous, S., & Singh, R. (2014). Neurotoxic effect of cypermethrin and protective role of resveratrol in Wistar rats. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 4(2), 104.
- Sharma, P., Khan, I. A., & Singh, R. (2018). Curcumin and quercetin ameliorated cypermethrin and deltamethrin-induced reproductive system impairment in male wistar rats by upregulating the activity of pituitary-gonadal hormones and steroidogenic enzymes. *International Journal of Fertility & Sterility*, 12(1), 72.
- Shi, H., Hudson, L. G., & Liu, K. J. (2004). Oxidative stress and apoptosis in metal ion-induced carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(5), 582-593.
- Shipman, M. L., & Green, J. T. (2019). Cerebellum and cognition : Does the rodent cerebellum participate in cognitive functions ? *Neurobiology of Learning and Memory*, 170, 106996.
- Shipp, S. (2007). Structure and function of the cerebral cortex. *Current Biology*, 17(12), R443-R449.
- Shivanoor, S. M., & David, M. (2014). Protective role of turmeric against deltamethrin induced renal oxidative damage in rats. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 4(4), 543-553.
- Sloan, S. A., & Barres, B. A. (2014). Mechanisms of astrocyte development and their contributions to neurodevelopmental disorders. *Current Opinion in Neurobiology*, 27, 75-81.
- Silva, M. H., & Gammon, D. (2009). An assessment of the developmental, reproductive, and neurotoxicity of endosulfan. *Birth Defects Research part b: Developmental and Reproductive Toxicology*, 86(1), 1-28.
- Soderlund, D. M. (2010). State-dependent modification of voltage-gated sodium channels by pyrethroids. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 97(2), 78-86.
- Soderlund, D. M. (2012). Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. *Archives of Toxicology*, 86(2), 165-181.
- Somade, O. T., Umanah, N. M., Odekunle, A. E., & Oluwasaanu, O. (2014). Brain, lung, and heart oxidative stress assessment of an over-the-counter pyrethroid insecticide product in Nigeria. *Biokemistri*, 26(4), 130-139.
- Souza, M. F., Freire, M. A., Medeiros, K. A., Lins, L. C., Bispo, J. M., Gois, A. M., ... & Marchioro, M. (2018). Deltamethrin Intranasal administration induces memory, emotional and tyrosine hydroxylase immunoreactivity alterations in rats. *Brain Research Bulletin*, 142, 297-303.

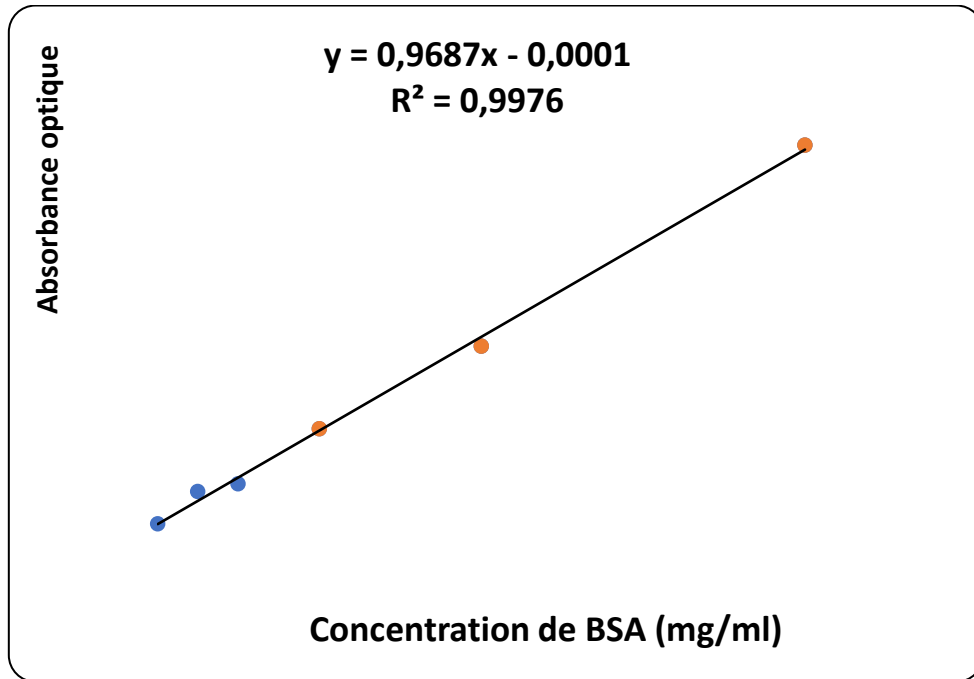
- Stadelmann, C., Timmler, S., Barrantes-Freer, A., & Simons, M. (2019). Myelin in the central nervous system : structure, function, and pathology. *Physiological Reviews*, 99(3), 1381-1431.
- Streit, W. J., Graeber, M. B., & Kreutzberg, G. W. (1988). Functional plasticity of microglia : a review. *Glia*, 1(5), 301-307.
- Suganthi, N., Devi, K. P., Nabavi, S. F., Braidy, N., & Nabavi, S. M. (2016). Bioactive effects of quercetin in the central nervous system : Focusing on the mechanisms of actions. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84, 892-908.
- Sweatt, J. D. (2009). Rodent Behavioral Learning and Memory in Models Mechanisms of memory. Academic Press. P 94.
- Syed, F., Awasthi, K. K., Chandravanshi, L. P., Verma, R., Rajawat, N. K., Khanna, V. K., ... & Soni, I. (2017). Bifenthrin-induced neurotoxicity in rats: involvement of oxidative stress. *Toxicology Research*, 7(1), 48-58.
- Szeszko, P. R., Lehrner, A., & Yehuda, R. (2018). Glucocorticoids and hippocampal structure and function in PTSD. *Harvard Review of Psychiatry*, 26(3), 142-157.
- Takasaki, I., Oose, K., Otaki, Y., Ihara, D., Fukuchi, M., Tabuchi, A., ... & Yamada, M. (2013). Type II pyrethroid deltamethrin produces antidepressant-like effects in mice. *Behavioural Brain Research*, 257, 182-188.
- Tatu, L. (2017). Anatomie du cervelet. *Revue Neurologique*, 173, S183-S184.
- Testud, F., & Grillet, J. P. (2007). Insecticides organophosphorés, carbamates, pyréthrinoïdes de synthèse et divers. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale*, 16, 059-C.
- Terunuma, M., Revilla-Sanchez, R., Quadros, I. M., Deng, Q., Deeb, T. Z., Lumb, M., ... & Moss, S. J. (2014). Postsynaptic GABAB receptor activity regulates excitatory neuronal architecture and spatial memory. *Journal of Neuroscience*, 34(3), 804-816.
- Tewari, A., Bedi, J., Singh, B., & Gill, J. P. S. (2018). Oral exposure of deltamethrin and/or lipopolysaccharide (LPS) induced activation of the pulmonary immune system in Swiss albino mice. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(16), 15436-15448.
- Thatheyus, A. J., & Selvam, A. D. G. (2013). Synthetic pyrethroids: toxicity and biodegradation. *Applied Ecology and Environmental Research*, 1(3), 33-6.
- Tsai, S. J. (2006). The possible role of tissue-type plasminogen activator and the plasminogen system in the pathogenesis of major depression. *Medical Hypotheses*, 66(2), 319-322.
- Ulusoy, H. G., & Sanlier, N. (2019). A minireview of quercetin : from its metabolism to possible mechanisms of its biological activities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-14.
- Underwood E., Mole N. (2016). Effective policy options for reducing environmental risks from pesticides in the UK: *Institute for European Environmental Policy*, p 6.
- Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., & Mahajan, R. T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*, 7(1), 65-74.

- Vandelac, L., & Bacon, M. H. (1999). Perturbateurs endocriniens et polluants organiques persistants : inquiétante érosion de la santé, de la fertilité et des capacités intellectuelles. *Ruptures, Revue Interdisciplinaire en Santé*, 6(2), 237-267.
- Vester, A. I., Chen, M., Marsit, C. J., & Caudle, W. M. (2019). A Neurodevelopmental Model of Combined Pyrethroid and Chronic Stress Exposure. *Toxics*, 7(2), 24.
- Viard, A., Guillery-Girard, B., & Postel, C. (2017). Développement de l'hippocampe durant l'enfance et l'adolescence. *Revue de Neuropsychologie*, 9(1), 53-59.
- Vibert, J. F., Sébille, A., Lavallard-Rousseau, M. C., Boureau, F., & Mazières, L. (2011). *Neurophysiologie : de la physiologie à l'exploration fonctionnelle*. Elsevier Health Sciences.
- Von Bartheld, C. S., Bahney, J., & Herculano-Houzel, S. (2016). The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain : A review of 150 years of cell counting. *Journal of Comparative Neurology*, 524(18), 3865-3895.
- Voogd, J. (2003). The human cerebellum. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 26(4), 243-252.
- Voogd, J., & Glickstein, M. (1998). The anatomy of the cerebellum. *Trends in Cognitive Sciences*, 2(9), 307-313.
- Voorn, P., Vanderschuren, L. J., Groenewegen, H. J., Robbins, T. W., & Pennartz, C. M. (2004). Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends in Neurosciences*, 27(8), 468-474.
- Vuillier, F., de Bustos Medeiros, É., & Tatu, L. (2011). Functional organisation of the cerebellum : a neuroanatomical approach. *Revue Neurologique*, 167(5), 361-369.
- Weisel, C. P. (2020). Indoor and Outdoor Pyrethroid Air Concentrations. DOI: [10.1007/698_2019_434](https://doi.org/10.1007/698_2019_434)
- Weitzner, D. S., Engler-Chiurazzi, E. B., Kotilinek, L. A., Ashe, K. H., & Reed, M. N. (2015). Morris water maze test: optimization for mouse strain and testing environment. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (100), e52706.
- Weston, D. P., & Lydy, M. J. (2010). Urban and agricultural sources of pyrethroid insecticides to the Sacramento-San Joaquin Delta of California. *Environmental Science & Technology*, 44(5), 1833-1840.
- Willemin, M. É. (2014). *Modélisation de la toxicocinétique des isomères cis et trans de la perméthrine et de ses métabolites chez le rat et de leur métabolisme sur hépatocytes humains* (Doctoral dissertation). Université de Technologie de Compiègne, France.
- Wolansky, M. J., Gennings, C., & Crofton, K. M. (2005). Relative potencies for acute effects of pyrethroids on motor function in rats. *Toxicological Sciences*, 89(1), 271-277.
- Yang, L., & Li, L. (2015). Actions of the pyrethroid insecticide bifenthrin on sodium channels expressed in rat cerebral cortical neurons. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 25(1), 63-69.
- Yankelevitch-Yahav, R., Franko, M., Huly, A., & Doron, R. (2015). The forced swim test as a model of depressive-like behavior. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (97), e52587.

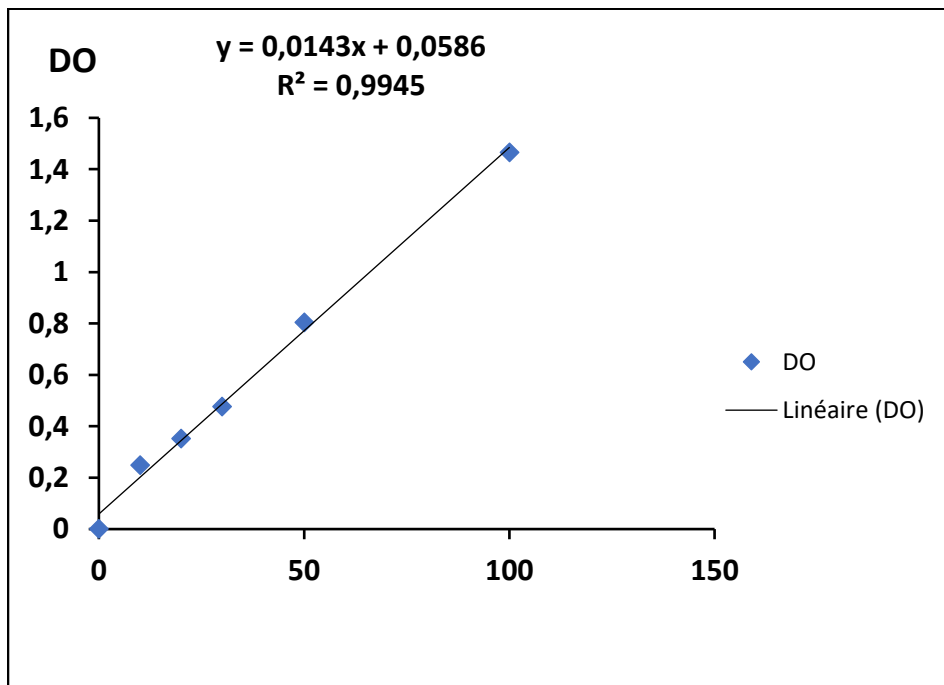
- Yao, R. Q., Qi, D. S., Yu, H. L., Liu, J., Yang, L. H., & Wu, X. X. (2012). Quercetin attenuates cell apoptosis in focal cerebral ischemia rat brain via activation of BDNF–TrkB–PI3K/Akt signaling pathway. *Neurochemical Research*, 37(12), 2777-2786.
- Yonar, M. E., & Sakin, F. (2011). Ameliorative effect of lycopene on antioxidant status in *Cyprinus carpio* during pyrethroid deltamethrin exposure. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99(3), 226-231.
- Zabaiou, N., Mabed, D., Lobaccaro, J. M., & Lahouel, M. (2016). Oxidative stress in benign prostate hyperplasia. *Andrologia*, 48(1), 69-73.
- Zayed J., Panisset M., Mergler D. (2003). Système nerveux In : Environnement et santé publique – fondement et pratiques, pp. 699-712. Gérin M., Gasselin P., Cordier S., Viau C., Quénel P., Dewailly É., rédacteurs. Edisem / Tec & Doc, Acton Vale / Paris.
- Zhang, Y., Lu, M., Zhou, P., Wang, C., Zhang, Q., & Zhao, M. (2015). Multilevel evaluations of potential liver injury of bifenthrin. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 122, 29-37.
- Zhang, C., Xu, Q., Xiao, X., Li, W., Kang, Q., Zhang, X., ... & Li, Y. (2018). Prenatal deltamethrin exposure-induced cognitive impairment in offspring is ameliorated by memantine through NMDAR/BDNF signaling in hippocampus. *Frontiers in Neuroscience*, 12, 615.
- Zhang, Z. W., & Deschenes, M. (1998). Projections to layer VI of the posteromedial barrel field in the rat : a reappraisal of the role of corticothalamic pathways. *Cerebral Cortex (New York, NY : 1991)*, 8(5), 428-436.
- Zlotkin, E. (1999). The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides. *Annual Review of Entomology*, 44(1), 429-455.

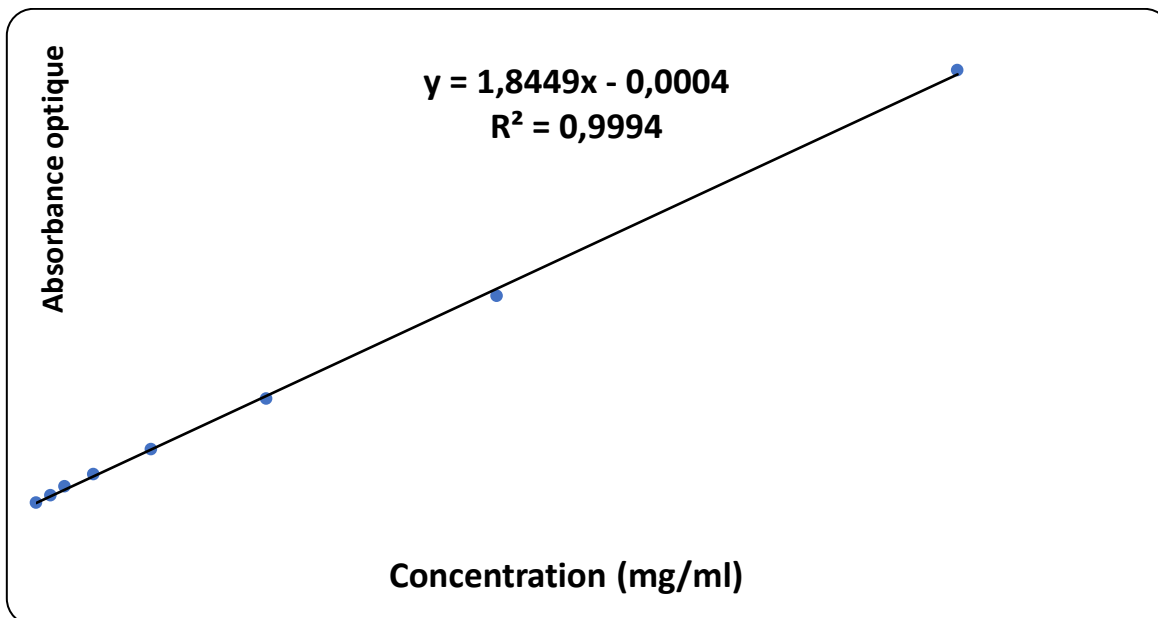
Annexes

Annexe 1. La courbe d'étalonnage des protéines (Bradford, 1979)



Annexe 2. La courbe d'étalonnage du malondialdéhyde (MDA)





Annexe 4. Effets des pyréthriinoïdes administrés seuls ou en mixture associé avec ou sans quercétine après administration chronique par voie orale sur le comportement lié à l'anxiété dans le labyrinthe en croix surélevée.

Lot	Témoin	DLT	MIX	QUE	DLT+QUE	MIX+QUE
Nombre d'entrée en bras ouvert	2,85 ± 0,77	4 ± 1,46	2,83 ± 0,57	3,85 ± 1,1	3,43 ± 0,52	2,86 ± 0,67
Nombre d'entrée en bras fermé	3,71 ± 0,6	4,85 ± 1,48	3 ± 0,43	4 ± 0,95	3,57 ± 0,68	3 ± 0,57
Nombre total d'entrée	6,57 ± 1,32	7,33 ± 3,39	5,57 ± 0,99	7,86 ± 2,02	7 ± 1,19	5,86 ± 1,22
% d'entrée en bras ouvert	41,72 ± 3,51	42,5 ± 2,19 Δ	43,81 ± 3,03	43,26 ± 7,90	50 ± 1,89 *	47,47 ± 2,60
Temps passé au bras ouvert (s)	17,28 ± 7,08	8,43 ± 4,86	1,00 ± 0,92*	19,17 ± 7,57	15,57 ± 11,09	5,17 ± 11,09
Temps passé au bras fermé (s)	252,71 ± 22,09	266,85 ± 9,04	239,43 ± 29,61	190,71 ± 30,09	237,57 ± 14,21	232,28 ± 20,55
Temps passé au centre (s)	33,43 ± 15,52	24,71 ± 7,84 Δ	37 ± 12,63	53,28 ± 15,65	47 ± 13,23	42,28 ± 12,44

Les résultats sont exprimés par la moyenne ± SEM, le test de Student est utilisé pour la comparaison entre les groupes. (*) comparaison avec le témoin : * p < 0,05 ; (Δ) comparaison de DLT avec DLT+QUER : Δ p < 0,05.

Annexe 5. Effet des pyréthriinoïdes seul ou en mixture, associé ou non associé à la quercétine sur la locomotion et l'anxiété des rats traité à long terme (**Dark Light Box test**).

Lot	Temps de latence(s)	Temps passé dans le compartiment clair (s)	Temps passé dans le compartiment obscur (s)	Nombre d'alternance	Redressement
Témoin	69,86 ± 30,9	79,43 ± 28,45	230,43 ± 24,88	2,43 ± 0,75	2,43 ± 0.84
Bif	34,43 ± 19,94	49 ± 17,39	250,86 ± 17,38	3 ± 0,87	3,57 ± 0.71#
DLT	25,17 ± 16,49	25,83 ± 16,33	274,17 ± 16,34	1,5 ± 0,66Δ	2,17 ± 1.18
MIX	4 ± 3,38	8,8 ± 2,79 *£	291,2 ± 2,79*£	2,6 ± 0,63£	0,2 ± 0,17*
Bif+Que	0,17± 0,15*	11,17 ± 6,4	288,83 ± 6,4	2,67 ± 1	0,83 ± 0,77
DLT+Que	0*	10,5 ± 1,83 *	289,5 ± 1,83*	3,67 ± 0,39	0,67 ± 0.45
Mix+Que	0,86 ± 0,7*	0,71 ± 0,71 **	299,14 ± 0,7**	1 *	0**

Les résultats sont exprimés par la moyenne ± SEM, le test de Student est utilisé pour la comparaison entre les groupes. (*) comparaison avec le témoin: * p < 0,05 ; (#) comparaison de BF avec BF+QUER : # p < 0,05 ;(Δ) comparaison de DLT avec DLT+QUER : Δ p < 0,05 ; (£) comparaison de MIX avec MIX+QUER : £ p < 0,05.

Résumé

Les maladies neurodégénératives sont d'une étiologie multifactorielle faisant intervenir des facteurs environnementaux, alimentaires et génétiques. Des études épidémiologiques et toxicologiques ont montré que la plupart de ces maladies sont associées à une exposition chronique aux produits phytosanitaires. Dans cette étude nous nous sommes intéressés à l'évaluation de la neurotoxicité due à l'exposition chronique à deux pyréthrinoïdes (PYRs), la bifenthrine (BF) et la deltaméthrine (DLT) seules ou en mixture sur un modèle animal (rats Wistar *albinos*), femelles adultes d'une part et à l'étude de l'effet préventif et cytoprotecteur de la quercétine (QUER), contre cette toxicité d'autre part. L'approche expérimentale de la présente étude est divisée en trois axes ; le premier axe consiste à l'étude du statut redox mitochondrial dans les différentes régions du cerveau en l'occurrence l'hippocampe, le striatum, le cervelet et le cortex cérébral et l'intégrité structurale des mitochondries, chez le rat exposé chroniquement aux PYRs ; le deuxième axe s'intéresse à l'évaluation du stress oxydatif cytosolique -régional afin de mettre en évidence le degré et la portée du déséquilibre redox dans les autres compartiments cellulaires à savoir le cytosol au-delà des mitochondries ; et finalement l'étude neurocomportementale afin de mettre en évidence la portée des altérations sur les facultés cognitives et comportementales de l'animal. Les résultats obtenus dans cette étude ont montré une neurotoxicité induite par les deux PYRs utilisés (BF et DLT), à travers la perturbation du statut redox dans les mitochondries et le cytosol, phénomène ayant provoqué un gonflement mitochondrial qui est susceptible d'altérer l'intégrité fonctionnelle et structurale de cette organelle. En effet, l'évaluation du stress oxydatif a révélé d'importants effets toxiques des deux PYRs se manifestant *via* une augmentation du taux du malondialdéhyde (MDA) cytosolique et mitochondrial ; une diminution de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) mitochondriale et cytosolique sauf dans le striatum où il y a une augmentation suite à l'exposition à la DLT ; le taux de glutathion (GSH) augmente dans le cytosol du cervelet, du striatum et diminue dans les mitochondries du cortex et du cervelet et s'altère significativement dans les autres régions. L'activité de la superoxyde dismutase (SOD) cytosolique s'induit par les PYRs dans toutes les régions ; l'activité de la glutathion-s-transférase (GST) diminue dans les mitochondries et le cytosol de l'hippocampe et s'altère dans le cytosol des autres régions ; l'activité de la glutathion peroxydase (GPX) est altérée dans le cytosol et l'hippocampe et est induite dans le cytosol des autres régions. Les tests neurocomportementaux révèlent surtout chez le groupe DLT : une hypomotricité, une altération de la mémorisation spatiale et non spatiale provoquée, une installation d'un état d'anxiété, une dépression évaluée par le test de sucrose. Sur un autre plan, nous avons évalué les effets préventifs de la QUER sur les paramètres étudiés après le traitement par les PYRs. Les résultats ont démontré que la QUER diminue le taux de MDA cytosolique, elle élimine l'altération des enzymes antioxydants provoquée par la DLT et la mixture, mais non de la BF. Sur le plan neurocomportemental, la QUER a un effet antidépresseur, améliore le déficit locomoteur, la mémorisation et l'apprentissage et réduit le niveau d'anxiété.

Mot clés : pyréthrinoïdes, stress oxydant, régions du cerveau, comportement, neurotoxicité

Abstract

Neurodegenerative diseases have a multifactorial etiology involving environmental, dietary and genetic factors. Epidemiological and toxicological studies show that most of these diseases are associated with chronic exposure to plant protection products. In this study, we were interested in the evaluation of the neurotoxicity of two pyrethroids (PYRs), namely the bifenthrin (BF) and the deltamethrin (DLT) on an animal model (Wistar *albinos* rats), on the one hand, and the study of the preventive and cytoprotective effect of the quercetin (QUER), against this toxicity on the other hand. The experimental approach of this study is divided into three axes; the study of the mitochondrial redox status in the different regions of the brain, in this case the hippocampus, the striatum, the cerebellum and the cerebral cortex and the structural integrity of the mitochondria, in adult female Wistar *albinos* rats chronically exposed to PYRs; evaluation of the neuro-regional cytosolic oxidative stress in order to highlight the degree and the range of the redox imbalance in the other cellular compartments namely the cytosol beyond the mitochondria; and finally the neurobehavioral study in order to highlight the extent of alterations on the cognitive and behavioral faculties of the animal. The results obtained in this study show a neurotoxicity induced by the two PYRs used (BF and DLT), through the disturbance of the redox status in the mitochondria and the cytosol, a phenomenon that has caused mitochondrial swelling which is likely to alter the functional and structural integrity of this organelle. In fact, the evaluation of oxidative stress revealed significant toxic effects of the two PYRs manifesting an increase in cytosolic and mitochondrial malondialdehyde (MDA); a decrease in the mitochondrial and cytosolic catalase (CAT) enzyme activity except in the striatum where there was an increase following exposure to DLT. The level of glutathione (GSH) increased in the cytosol of the cerebellum, striatum and decreased in the mitochondria of other regions. Cytosolic superoxide dismutase (SOD) activity was induced by PYRs in all regions; glutathione-s-transferase (GST) decreased in the mitochondria and cytosol of the hippocampus and was altered in the cytosol of other regions; glutathione peroxidase (GPX) was altered in the cytosol of the hippocampus and was induced in the cytosol of other regions. The neurobehavioral tests revealed especially in the DLT group: a hypomotricity, an alteration of the spatial and non-spatial storage caused an installation of a state of anxiety, and depression as revealed by the sucrose test. On another level, we evaluated the preventive effects of quercetin (QUER) on recent parameters after PYRs treatment. The results of this study demonstrated that QUER decreased the level of cytosolic MDA, prevented the alteration of antioxidant enzymes caused by DLT and the mixture, but not the effects induced by BF. On the neurobehavioral level, QUER has an anti-depressive effect, improved locomotor deficit, memorization and learning and reduced the level of anxiety.

Key words: Pyrethroids, oxidative stress, brain regions, behaviors, neurotoxicity.

المخلص

للأمراض التنكسية العصبية أسباب متعددة العوامل تشمل العوامل البيئية، الغذائية والجينية. تبين الدراسات الوبائية والتسمية أن معظم هذه الأمراض مرتبط بالتعرض المزمن لمبيدات الآفات النباتية. في هذه الدراسة، اهتمنا بتقييم التسمم العصبي لاثنتين من البيريثرينويدات (PYRs)، وهما البيفنترين (BF) و الدلتامترين (DLT) على نموذج حيواني (فئران ويستار البيونوس) من ناحية، ودراسة التأثير الوقائي الخلوي للكركيتين (QUER)، ضد هذا التسمم من ناحية أخرى. ينقسم المنهج التجريبي لهذه الدراسة إلى ثلاثة محاور؛ دراسة حالة الأكسدة والارجاع للميتوكوندريا في مناطق مختلفة من الدماغ، في هذه الحالة الحصين، المخيط، والمخيخ والقشرة المخية والسلامة الهيكلية للميتوكوندريا، في الفئران المعرضة بشكل مزمن للبيريثرينويدات؛ تقييم الإجهاد التأكسدي العصبي الخلوي في مناطق الدماغ من أجل تسليط الضوء على درجة ونطاق اختلال الأكسدة في الأجزاء الخلوية الأخرى وهي السيتوزول بعد الميتوكوندريا؛ وأخيراً دراسة السلوك العصبي من أجل تسليط الضوء على مدى التغيرات في القدرات المعرفية والسلوكية للحيوان. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة أن التسمم العصبي ناجم عن اثنتين من البيريثرينويدات المستخدمة (البيفنترين والدلتامترين)، من خلال اضطراب حالة الأكسدة في الميتوكوندريا والسيتوزول، وهي ظاهرة تسببت في انتفاخ الميتوكوندريا والتي من المحتمل أن تغير من السلامة الوظيفية والهيكلية لهذه العضية. في الواقع، كشفت تقييم الإجهاد التأكسدي عن آثار سامة معتبرة لكلا المبيدتين تتجلى في زيادة في كمية MDA الخلوي والميتوكوندري/انخفاض في نشاط إنزيم الكاتالاز في الميتوكوندريا والسيتوزول إلا في المخيط حيث توجد زيادة بعد التعرض للدلتامترين؛ يزداد مستوى GSH في سيتوزول المخيط، المخيط والتناقص في ميتوكوندريا القشرة والمخيخ ويتناقص بشكل معتبر في المناطق الأخرى. يتم ارتفاع نشاط إنزيم SOD الخلوي بواسطة البيريثرينويدات في جميع المناطق؛ انخفاض GST في الميتوكوندريا والسيتوزول من الحصين ويتم تغييره في سيتوزول المناطق الأخرى؛ يتناقص في سيتوزول الحصين ويتزايد في سيتوزول المناطق الأخرى. تكشف الاختبارات السلوكية العصبية خاصة في مجموعة الدلتامترين: نقص في الحركة، وتغير مستحدث في الذاكرة المكانيّة وغير المكانيّة، ظهور حالة من القلق، والاكنتاب الذي تم تقييمه بواسطة اختبار السكرورز. على مستوى آخر، قمنا بتقييم الآثار الوقائية للكركيتين على المؤشرات السابقة بعد العلاج بالبيريثرينويدات. أظهرت نتائج هذه الدراسة أن الكركيتين يقلل من مستوى MDA السيتوزولي، يقضي على تغيرات نشاط الإنزيمات المضادة للأكسدة التي تسببها الدلتامترين والخليط، ولكن ليس من طرف البيفنترين. على مستوى السلوك العصبي، الكركيتين له تأثير مضاد للاكتئاب، يحسن النقص العضلي الهيكلي، الحفظ والتعلم ويقلل من مستوى القلق.

الكلمات المفتاحية: البيريثرينويدات، الإجهاد التأكسدي، مناطق الدماغ، سلوك عصبي.