

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université A.MIRA-BEJAIA



جامعة بجاية  
Tasdawit n Bgayet  
Université de Béjaïa

Faculté Sciences de la Nature et la Vie  
Département Sciences alimentaires  
Laboratoire de Biomathématiques, Biophysique, Biochimie et Scientométrie

# THÈSE

## EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT

Domaine : Sciences de la Nature et la Vie      Filière : Sciences Biologiques  
Spécialité : Bio-ressources, Environnement et Technologie Agroalimentaire

Présentée par  
**HADDAD Souhila**

*Thème*

**Contribution à l'étude de la neurotoxicité régionale des pesticides  
(Imidaclopride et Cyperméthrine) chez le rat**

Soutenue le : 13/01/2024

Devant le Jury composé de :

Nom et Prénom	Grade		
Mr MADANI Khodir	Professeur	Univ. de Béjaia	Président
Mr KEBIECHE Mohamed	Professeur	Univ. de Batna 2	Rapporteur
Mme ACHAT Sabiha	MCA	Univ. de Béjaia	Examineur
Mme TOUIL-BOUKKOFA Chafia	Professeur	Univ. USTHB	Examineur
Mme GUEMGHAR Hayate	Professeur	Univ. de Béjaia	Examineur

Année Universitaire : 2023/2024

## Résumé

La population générale est exposée aux pesticides de façon chronique, le plus souvent à de faibles doses. En effet, ces produits chimiques sont largement répandus dans l'air, l'eau, le sol et même dans les matrices alimentaires. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet neurotoxique des pesticides sur le statut redox mitochondrial, l'intégrité structurale et fonctionnelle de cette organelle, la fonction cholinergique, la fonction cognitive et les perturbations histologiques. La première partie de cette présente étude s'est focalisée sur l'effet direct d'une exposition orale de 90 jours à l'IMID (1,2 mg/kg/jour) et le rôle protecteur de la catéchine (20 mg/ kg/jour) chez les rats mâles adultes. Ajoutant à cela, une deuxième partie qui s'est concentrée sur l'effet d'une exposition des rates pendant la gestation et l'allaitement à des doses réelles d'IMID (1,2 mg/kg) et de CYP (6,7 mg/kg), soit seuls ou en mixture, sur les ratons et les adultes de la première et de la deuxième génération. L'exposition chronique à l'IMID chez le rat adulte, a entraîné des diminutions significatives de gain de poids corporel, du taux de glutathion (GSH) mitochondrial et de l'activité de la CAT, SOD et du GPx, tandis que l'activité de la GST, le taux de MDA et de  $ca^{+2}$  cytosolique, la perméabilité et le gonflement mitochondrial ont augmenté d'une manière significative. En outre, l'évaluation de la fonction cholinergique a révélé une diminution de l'activité de l'AChE, des troubles comportementaux et cognitifs tels que la faiblesse musculaire, l'anxiété, la perte de mémoire et la capacité d'apprentissage. Des perturbations histologiques ont été également enregistrées. En revanche, ces résultats ont montré que la catéchine protège les régions cérébrales des dommages mitochondriaux, cognitifs et histologiques causé par l'IMID. Les résultats de la deuxième partie, exposition gestationnelle et lactationnelle, ont montré que l'IMID et la CYP, seuls ou en combinaison, une diminution de gain de poids corporel, une altération des performances neurocomportementales et une inhibition de l'AChE. Les marqueurs du stress oxydatif, y compris le niveau de GSH et les activités SOD, CAT, GST et GPx, ont diminué significativement. Or, la peroxydation lipidique évaluée par le dosage de MDA, le niveau de calcium cytosolique, le gonflement et la perméabilité mitochondriale ont enregistré une augmentation significative. En conclusion, la perturbation de l'homéostasie redox mitochondriale et la présence de troubles neurocomportementaux même dans la progéniture de la génération F2 suggèrent que l'exposition indépendante et combinée à l'IMID et au CYP pendant une période critique du développement a des effets neurotoxiques durables.

**Mots clés :** Neurotoxicité, Rats, IMID, CYP, Catéchine, Déficits comportementaux, Stress oxydant.

## Abstract

The general population is chronically exposed to pesticides, usually at low doses. Indeed, these chemicals are widely distributed in air, water, soil and even food matrices. The aim of this study was to assess the neurotoxic effect of pesticides on mitochondrial redox status, the structural and functional integrity of these organelles, cholinergic function, cognitive function and histological perturbations. The first part of the present study focused on the direct effect of a 90-day oral exposure to IMID (1.2 mg/kg/day) and the protective role of catechin (20 mg/kg/day) in adult male rats. In addition, a second part focused on the effect of exposure of rats during gestation and throughout lactation to real doses of IMID (1.2 mg/kg) and CYP (6.7 mg/kg), either alone or in mixtures on first- and second-generation pups. Chronic exposure to IMID resulted in significant decreases in body weight gain, mitochondrial glutathione (GSH) levels and CAT, SOD and GPx activity, while GST activity, cytosolic MDA and  $Ca^{2+}$  levels, mitochondrial permeability and swelling were significantly increased. In addition, assessment of cholinergic function revealed decreased AChE activity, behavioral and cognitive disturbances such as muscle weakness, anxiety, memory loss and learning ability. Histological disturbances were also recorded. In contrast, these results showed that catechin protects brain regions from mitochondrial, cognitive and histological damage caused by IMID. The results of the second part showed that IMID and CYP, alone or in combination, induced decreased body weight gain, impaired neurobehavioral performance and AChE inhibition. Markers of oxidative stress, including GSH levels and SOD, CAT, GST and GPx activities, showed a significant decrease. In contrast, lipid peroxidation assessed by MDA assay, cytosolic calcium level, swelling and mitochondrial permeability recorded a significant increase. In conclusion, the disruption of mitochondrial redox homeostasis and the presence of neurobehavioral disorders even in F2 generation offspring suggest that independent and combined exposure to IMID and CYP during a critical period of development has a persistent neurotoxicity effects.

**Key words:** Neurotoxicity, Rats, IMID, CYP, Catechin, Behavioral deficits, oxidative stress.

## ملخص

يتعرض عامة السكان بشكل مزمن لمبيدات الحشرات وغالبا بجرعات صغيرة . في الواقع , يتم انتشار هذه المواد الكيميائية على نطاق واسع في الهواء . الماء , و التربة و حتى في المواد الغذائية . الهدف من هذه الدراسة هو تقييم الأثر السمي العصبي لمبيدات الحشرات على حالة الأوكسدة الارجاعية في الميتوكوندريا , السلامة البنيوية و الوظيفية لهذه العضية , الوظيفة الكولينرجية , الوظيفة الإدراكية و الاضطرابات النسيجية . ركز الجزء الأول من هذه الدراسة على تأثير التعرض المباشر ل IMID (1.2مغ/ كغ / يوم ) لمدة 90 يوم و الدور الوقائي للكاتيشين (20مغ/ كغ / يوم ) عند الفئران الذكور البالغة . إضافة إلى ذلك , ركز الجزء الثاني على تأثير تعرض الفئران أثناء الحمل و طوال فترة الرضاعة لجرعات حقيقة من IMID (1.2مغ/ كغ / يوم ) و CYP (6.7 مغ / كغ / يوم ) بصورة فردية أو على شكل خليط على الجرذان والفئران البالغين للجيل الأول و الثاني .

أدى التعرض المزمن لل IMID إلى إنخفاض ملحوظ في زيادة وزن الجسم , مستويات الجلوتاديون في الميتوكوندريا ( GSH ) , نشاط CAT , SOD , و GPx , بينما زادت مستويات GST , MDA ,  $Ca^{2+}$  , نفاذية الميتوكوندريا و تورمها . بالإضافة إلى ذلك , كشف تقييم الوظيفة الكولينرجية عن انخفاض نشاط AChE , الضعف السلوكي و المعرفي مثل ضعف العضلات , القلق , فقدان الذاكرة و القدرة على التعلم , كما تم تسجيل اضطرابات نسيجية .

من ناحية أخرى , أظهرت هذه النتائج أن مادة الكاتيشين تحمي مناطق الدماغ من الضرر المعرفي و النسيجي الناتج عن IMID . أظهرت نتائج الجزء الثاني أن التعرض لل IMID و CYP , بصورة فردية أو على شكل خليط تسبب في انخفاض زيادة وزن الجسم , ضعف الأداء السلوكي العصبي , تثبيط AChE , ظهور علامات الإجهاد التأكسدي بما في ذلك انخفاض مستوى GSH و نشاط SOD , CAT , GST , و GPx . من ناحية أخرى , أظهرت هذه النتائج ارتفاع ملحوظ في مستوى  $Ca^{2+}$  , MDA , نفاذية الميتوكوندريا و تورمها . في الختام , إن اختلال الأوكسدة الارجاعية في الميتوكوندريا و وجود اضطرابات سلوكية عصبية حتى في نسل  $F_2$  يشير إلى أن التعرض لل IMID و CYP , بصورة فردية أو على شكل خليط خلال فترة النمو له تأثيرات عصبية دائمة .

**الكلمات المفتاحية:** السمية العصبية , الجرذان , IMID , CYP , Catechin , العجز السلوكي , الإجهاد التأكسدي .

## **Remerciement**

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

*Je remercie en premier lieu ALLAH le tout puissant pour toute la volonté et le courage qu'il  
m'a donné pour l'achèvement de cette thèse.*

*Je tiens tout particulièrement à exprimer mes plus vifs remerciements et ma profonde  
gratitude à mon encadreur **M. KEBIECHE Mohamed**, professeur à l'université de Batna.*

*Qui m'a fait l'honneur d'assurer la direction de ce travail.*

*Merci pour vos précieux conseils, remarques et critiques pertinentes et constructives qui  
m'ont guidée tout au long de ces années.*

*Je tiens à remercier vivement **M. MADANI Khodir** professeur à l'université de Bejaia, pour  
avoir accepté de présider ce jury.*

*J'exprime aussi toute ma gratitude à **Mme ACHAT Sabiha** maitre de conférence à  
l'université de Bejaia, pour l'intérêt et l'attention qu'elle a accordé à ce travail de thèse, et  
pour avoir accepté de faire partie de ce jury.*

*Mes remerciements s'adressent également à **Mme GUEMGHAR Hayate** professeur à  
l'université de Bejaia de m'avoir accordé le privilège de participer à ce jury et d'examiner  
avec soin cette thèse.*

*Ma plus grande gratitude va à **Mme TOUIL-BOUKKOFA Chafia** professeur à l'USTHB  
pour avoir accepté de faire partie de ce jury.*

*Je remercie également ma famille pour leur soutien psychologique et leur motivation durant  
ces longues années. Vous avez été présents à chaque moment, merci pour tout.*

*Mes sentiments de reconnaissance et de remerciements vont également à toute personne qui a  
participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail en particulier Zineb, Dounia, Mr*

*HACHEMI, Mr HANFER, Safa, Mme BECHAH Leila, Mme METLEF Leila et Asma.*

*A tous mes collègues et amis de l'Université de Bejaia en particulier la promo BETA.*

*A tous mes amis de la Tunisie et du laboratoire GMGM (Strasbourg).*

*Je vous remercie pour l'ambiance chaleureuse et conviviale et pour l'aide que vous m'avez  
apporté dans le cadre de ce travail.*

*Un grand merci à une personne très spéciale, merci d'avoir toujours été là dans les moments  
difficiles, merci de m'avoir supporté ! Tu as fait preuve d'une patience infinie.*

## Liste des abréviations

<b><math>\alpha</math>-syn</b>	$\alpha$ -synucléine
<b>AChE</b>	Acétylcholinestérase
<b>Apaf – 1</b>	Apoptosis activating factor 1
<b>APP</b>	Amyloid protein precursor
<b>A<math>\beta</math></b>	Protéine bêta-amyloïde
<b>BACE</b>	Bêta-sécrétase
<b>Bcl-2</b>	B-Cell Lymphoma 2
<b>BHE</b>	Barrière hémato-encéphalique
<b>Casp</b>	Caspase
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CDNB</b>	1-Chloro2,4-dinitrobenzène
<b>cIAP</b>	Cellular inhibitor of apoptosis proteins
<b>CTF-<math>\beta</math></b>	Beta-carboxyl-terminal fragment
<b>CYP</b>	Cypermethrine
<b>Cyt C</b>	Cytochrome C
<b>DTNB</b>	Acide 5,5`-dithio-bis-2-nitrobenzoïque
<b>EDTA</b>	Acide Ethylène-Diamine-Tétraacétique
<b>FADD</b>	Fas-associated death domain
<b>Fas</b>	Cell Surface Death Receptor
<b>FASL</b>	Fas ligand
<b>GABA</b>	Acide gamma-aminobutyrique
<b>GD</b>	Gyrus denté
<b>GFAP</b>	Fibres gliales
<b>GPx</b>	Glutathion peroxydase
<b>GR</b>	Glutathion réductase
<b>GSH</b>	Glutathion
<b>GSK3<math>\beta</math></b>	Glycogène synthase kinase-3 $\beta$
<b>GS-SG</b>	Glutathion oxydé
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène
<b>HB-EGF</b>	Heparin-related epidermal growth factor
<b>Iba1</b>	Ionized calcium-binding adaptor molecule 1 nNOS
<b>IL</b>	Interleukine

<b>IMID</b>	Imidaclopride
<b>ACh</b>	Acétylcholine
<b>LC3</b>	Light chain
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>MA</b>	Maladie d'alzheimer
<b>mAChR</b>	Récepteurs muscariniques d'acétylcholine
<b>MAO-B</b>	Monoamine oxydase B Enzyme
<b>MH</b>	Maladie de Huntington
<b>MLKL</b>	Mixed lineage kinase domain-like protein
<b>MP</b>	Maladie de Parkinson
<b>mPTP</b>	Mitochondrial permeability transition pore
<b>nAChR</b>	Récepteurs nicotiniques d'acétylcholine
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Astrocytic nuclear factor kappa B
<b>NO</b>	Nitric oxide
<b>Nox</b>	NADPH oxydase
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anion superoxyde
<b>OH<sup>·</sup></b>	Radical hydroxyle
<b>p38MAPK</b>	Protéines kinases activées par les mitogènes p38
<b>PS1 et PS2</b>	Composants de la $\gamma$ -sécrétase,
<b>p-tau</b>	Phospho protéine
<b>RE</b>	Réticulum endoplasmique
<b>RIP</b>	Receptor-interacting serine-threonine kinase 3
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>SNC</b>	Système nerveux central
<b>SNP</b>	Système nerveux périphérique
<b>TNF-A</b>	Tumor necroses factor A
<b>TRAIL</b>	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
<b>ULK1</b>	Unc-51-like kinase 1
<b>VGCC</b>	Canaux calciques voltage-dépendants,
<b>XO</b>	Xanthine oxydase

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Développement et organisation du système nerveux au cours de la phase embryonnaire .....	2
<b>Figure 2:</b> Noyaux sous-corticaux.....	4
<b>Figure 3:</b> Représentation de certaines régions limbiques.....	5
<b>Figure 4:</b> Structure du neurone .....	7
<b>Figure 5:</b> Les cellules gliales du SNC.....	8
<b>Figure 6:</b> Transmission de l'influx nerveux .....	9
<b>Figure 7:</b> Système cholinergique .....	10
<b>Figure 8:</b> Le mécanisme moléculaire régissant la Cyperméthrine (CYP) dans l'induction de l'agrégation irrégulière de $\beta$ -amyloïde et de p-tau.....	12
<b>Figure 9:</b> Les interactions entre le mauvais repliement et l'agrégation de l' $\alpha$ -syn, la neuro-inflammation et les facteurs environnementaux sont des éléments clés de la pathogenèse de la MP .....	14
<b>Figure 10:</b> Voies de signalisation de l'apoptose : intrinsèque et extrinsèque .....	17
<b>Figure 11:</b> La voie de la nécroptose .....	18
<b>Figure 12:</b> Mécanisme d'autophagie .....	19
<b>Figure 13:</b> Implication des pesticides dans la génération mitochondriale des ROS et la détérioration des cellules neuronales .....	20
<b>Figure 14:</b> Neurotoxicité causée par les pesticides : mécanismes et effets.....	25
<b>Figure 15:</b> Classification des différents types de pesticides.....	26
<b>Figure 16:</b> Devenir des pesticides dans les différents compartiments de l'environnement .....	27
<b>Figure 17:</b> Effets moléculaires des pyréthroïdes .....	29
<b>Figure 18:</b> Structure de la CYP .....	30
<b>Figure 19:</b> Pyréthriinoïdes et leurs métabolites.....	31
<b>Figure 20:</b> Présentation schématique du rôle de la famille miR-200 dans l'apoptose des cellules PC12 induite par la CYP .....	32
<b>Figure 21:</b> Structures chimiques de la nicotine et des insecticides néonicotinoïdes.....	34
<b>Figure 22:</b> Structure de l'IMID .....	35
<b>Figure 23:</b> Principaux mécanismes de neurotoxicité des néonicotinoïdes.....	36
<b>Figure 24:</b> Structure de base des catéchines.....	38
<b>Figure 25:</b> Schéma récapitulatif du protocole expérimental (fenêtre adulte).....	39
<b>Figure 26:</b> Schéma récapitulatif du protocole expérimental (fenêtre pré et postnatal) .....	40
<b>Figure 27:</b> Test de retournement (surface righting).....	41
<b>Figure 28:</b> Cliff aversion.....	42
<b>Figure 29:</b> Negative geotaxis .....	43
<b>Figure 30:</b> Test de suspension (force musculaire) .....	44
<b>Figure 31:</b> Test de champ ouvert (open field) .....	45
<b>Figure 32:</b> Test d'Elevated Plus Maze (EPM) .....	46
<b>Figure 33:</b> Test de reconnaissance de nouveaux objets (NOR).....	47
<b>Figure 34:</b> Test de la nage forcée .....	47
<b>Figure 35:</b> Test de konziela's inverted screen.....	48



<b>Figure 36:</b> Préparation de la suspension et extraction de la matrice mitochondriale.....	<b>49</b>
<b>Figure 37:</b> Réaction du réactif d'Ellman avec le glutathion .....	<b>51</b>
<b>Figure 38:</b> Réactions en chaîne de la peroxydation lipidique et ses produits terminaux .....	<b>52</b>
<b>Figure 39:</b> Principe du dosage du MDA.....	<b>52</b>
<b>Figure 40:</b> Dégradation du peroxyde d'hydrogène par la CAT .....	<b>53</b>
<b>Figure 41:</b> dismutation de l'anion superoxyde par la SOD.....	<b>54</b>
<b>Figure 42:</b> les différentes étapes d'une étude histologique .....	<b>55</b>
<b>Figure 43:</b> Evolution du gain du poids corporel des rats après 3 mois de traitement par l'IMID et la catéchine .....	<b>57</b>
<b>Figure 44:</b> Évaluation du niveau d'anxiété chez les rats exposés de manière chronique à une faible dose d'IMID et le rôle préventif de la catéchine à l'aide du test Open Field (fréquence d'ambulation et de rearing).....	<b>58</b>
<b>Figure 45:</b> Evaluation de la mémoire de travail et de la capacité d'apprentissage chez les rats exposés de manière chronique à une faible dose d'IMID et le rôle préventif de la catéchine à l'aide du test NOR .....	<b>59</b>
<b>Figure 46:</b> Evaluation du temps d'immobilité des rats exposés de manière chronique à une faible dose d'IMID et le rôle préventif de la catéchine à l'aide du test de la nage forcée .....	<b>61</b>
<b>Figure 47:</b> Evaluation de la force musculaire des rats exposés de manière chronique à une faible dose d'IMID et le rôle préventif de la catéchine à l'aide du test KIS .....	<b>61</b>
<b>Figure 48:</b> Activités d'AChE dans le striatum et l'hippocampe chez les rats exposés chroniquement à une faible dose d'IMID et le rôle préventif de la catéchine .....	<b>62</b>
<b>Figure 49:</b> Niveaux de ca <sup>2+</sup> cytosolique dans le striatum et l'hippocampe chez des rats exposés de manière chronique à une faible dose d'IMID et le rôle préventif de la catéchine .....	<b>63</b>
<b>Figure 50:</b> Niveaux de GSH dans les mitochondries du striatum et de l'hippocampe chez les rats exposés de manière chronique à une faible dose d'IMID et rôle préventif de la Catéchine .....	<b>65</b>
<b>Figure 51:</b> Evaluation du produit final de la peroxydation lipidique (MDA) dans les mitochondries du striatum et de l'hippocampe chez des rats exposés de manière chronique à de faibles doses d'IMID et rôle préventif de la catéchine .....	<b>65</b>
<b>Figure 52:</b> Activités CAT dans les mitochondries du striatum et de l'hippocampe chez des rats exposés de manière chronique à une faible dose d'IMID et rôle préventif de la catéchine. ....	<b>66</b>
<b>Figure 53:</b> Activités SOD dans les mitochondries du striatum et de l'hippocampe chez des rats exposés chroniquement à une faible dose d'IMID et rôle préventif de la catéchine .....	<b>67</b>
<b>Figure 54:</b> Activités GPx dans les mitochondries du striatum et de l'hippocampe chez des rats exposés de manière chronique à une faible dose d'IMID et rôle préventif de la catéchine .....	<b>67</b>
<b>Figure 55:</b> Activités GST dans les mitochondries du striatum et de l'hippocampe chez les rats exposés de manière chronique à une faible dose d'IMID et rôle préventif de la catéchine .....	<b>68</b>
<b>Figure 56:</b> Histologie du cerveau après 3 mois de traitement : (A) et (B) : groupes contrôle et catéchine respectivement ; (C) : groupe traité par IMID et (D) : groupe IMID+C .....	<b>69</b>

<b>Figure 57:</b> Effets de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur la prise de poids des nouveau-nés de la première et de la deuxième génération.....	<b>75</b>
<b>Figure 58:</b> Effets de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur l'ouverture des yeux chez les rats de la première et de la deuxième génération.....	<b>76</b>
<b>Figure 59:</b> Effets de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur le réflexe de redressement de surface chez les rats de la première et de la deuxième génération.....	<b>77</b>
<b>Figure 60:</b> Effets de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur l'évitement des falaises chez les rats de la première et de la deuxième génération.....	<b>77</b>
<b>Figure 61:</b> Effets de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur le développement du réflexe chez les rats de la première et de la deuxième génération.....	<b>78</b>
<b>Figure 62:</b> Effets de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur la coordination, le développement et la force motrice chez les rats de la première et de la deuxième génération .....	<b>79</b>
<b>Figure 63:</b> Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur l'activité de l'AchE dans le striatum l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 21 jours (phase juvénile) .....	<b>79</b>
<b>Figure 64:</b> Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur les niveaux du $Ca^{2+}$ cytosolique dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 21 jours (phase juvénile) .....	<b>80</b>
<b>Figure 65:</b> Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur l'activité de la CAT dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 21 jours (phase juvénile) .....	<b>82</b>
<b>Figure 66:</b> Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur l'activité de la SOD dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 21 jours (phase juvénile) .....	<b>83</b>
<b>Figure 67:</b> Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur l'activité de la GST dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 21 jours (phase juvénile) .....	<b>83</b>
<b>Figure 68:</b> Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur l'activité de la GPx dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 21 jours (phase juvénile) .....	<b>84</b>
<b>Figure 69:</b> Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur les niveaux de GSH dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 21 jours (phase juvénile) .....	<b>84</b>
<b>Figure 70:</b> Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur les niveaux de MDA dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 21 jours (phase juvénile) .....	<b>85</b>

<b>Figure 71:</b> Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur le niveau d'anxiété des rats de la première et de la deuxième génération à l'aide du test Open Field (fréquence d'ambulation et du rearing), observés à l'âge .....	<b>86</b>
<b>Figure 72:</b> Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur la mémoire de travail et de la capacité d'apprentissage des rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 2 mois (phase adulte) .....	<b>87</b>
<b>Figure 73:</b> Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur le temps d'immobilité des rats de la première et de la deuxième génération à l'aide du test de la nage forcée, observés à l'âge de 2 mois (phase adulte) .....	<b>88</b>
<b>Figure 74:</b> Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur la force musculaire des rats de la première et de la deuxième génération à l'aide du test de KIS, observés à l'âge de 2 mois (phase adulte) .....	<b>89</b>
<b>Figure 75:</b> Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur l'activité de l'AchE dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 2 mois (phase adulte) .....	<b>89</b>
<b>Figure 76:</b> Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur les niveaux du $Ca^{2+}$ cytosolique dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 2 mois (phase adulte) .....	<b>90</b>
<b>Figure 77:</b> Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur l'activité de la CAT dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 2 mois (phase adulte) .....	<b>92</b>
<b>Figure 78:</b> Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur l'activité de la SOD dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 2 mois (phase adulte) .....	<b>92</b>
<b>Figure 79:</b> Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur l'activité de la GST dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 2 mois (phase adulte) .....	<b>93</b>
<b>Figure 80:</b> Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur l'activité de la GPx dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 2 mois (phase adulte) .....	<b>93</b>
<b>Figure 81:</b> Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur les niveaux de GSH dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 2 mois (phase adulte) .....	<b>94</b>
<b>Figure 82:</b> Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur les niveaux de MDA dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 2 mois (phase adulte) .....	<b>94</b>
<b>Figure 83:</b> Schéma récapitulatif de la neurotoxicité des pesticides étudiés et l'effet préventif de la catéchine .....	<b>101</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Classification des pesticides en fonction de leurs mode d'entrée.....	<b>26</b>
<b>Tableau 2 :</b> Evaluation de l'anxiété chez les rats exposés de manière chronique à une faible dose d'IMID à l'aide du test EPM et rôle préventif de la catéchine.....	<b>60</b>
<b>Tableau 3:</b> Evaluation du gonflement mitochondrial dans le striatum et l'hippocampe, chez des rats exposés chroniquement à une faible dose d'IMID et le rôle préventif de la catéchine	<b>63</b>
<b>Tableau 4:</b> Evaluation de la perméabilité mitochondriale dans le striatum et l'hippocampe, chez des rats exposés chroniquement à une faible dose d'IMID et le rôle préventif de la catéchine .....	<b>64</b>
<b>Tableau 5:</b> Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur le gonflement des mitochondries dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 21 jours (phase juvénile).....	<b>81</b>
<b>Tableau 6:</b> Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur la perméabilité mitochondriale dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 21 jours (phase juvénile).....	<b>81</b>
<b>Tableau 7:</b> Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélangesurl'anxiétédesratsdelapremièreetdeladeuxième générationà l'aide dutest EPM .....	<b>87</b>
<b>Tableau 8:</b> Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur le gonflement des mitochondries dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération observés à l'âge de 2 mois (phase adulte).....	<b>91</b>
<b>Tableau 9:</b> Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur la perméabilité des mitochondries dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération observés à l'âge de 2 mois (phase adulte).....	<b>91</b>

## Sommaire

**Résumé**

**Remerciement**

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Introduction**

<b>Chapitre I: Anatomio-physiopathologie du cerveau</b> .....	1
1. Généralités sur le système nerveux .....	1
2. Neurogenèse.....	1
3. Divisions de base du système nerveux central.....	3
Cerveau.....	3
Cortex cérébral .....	3
Noyaux sous-corticaux .....	3
✓ Striatum.....	3
Système limbique.....	4
✓ Hippocampe.....	4
Moelle épinière .....	6
4. Composition cellulaire du système nerveux central .....	6
Neurone .....	6
Les cellules gliales .....	7
5. Fonctionnement du système nerveux .....	8
Neurotransmetteurs.....	9
Acétylcholine .....	9
Sérotonine ou <i>5-hydroxytryptamine</i> (5HT).....	10
Dopamine .....	10
Adrénaline .....	11
6. Principales pathologies neuronales .....	11
Maladie d'Alzheimer.....	11
Maladie de Parkinson (MP).....	13
7. Mort des cellules neuronales dans les maladies neurodégénératives.....	14
Apoptose.....	14

✓ Voie intrinsèque ou voie dépendante des mitochondries .....	15
✓ Voie extrinsèque ou voie du récepteur de la mort .....	15
Necrose .....	16
Autophagie .....	17
8. Stress oxydatif.....	18
Généralités.....	18
Stress oxydant et maladies neurodégénératives.....	20
Système oxydant-antioxydant .....	21
Système antioxydant enzymatique .....	21
Système antioxydant non enzymatique .....	21
Antioxydants d'origine exogène .....	21
<b>Chapitre II : Pesticides.....</b>	<b>23</b>
1. Généralités.....	23
Définition.....	23
Classification .....	23
Classification selon la structure chimique des pesticides.....	24
Classification en fonction des organismes ciblés.....	24
Classification selon le mode d'entrée .....	24
Modes d'exposition aux pesticides .....	24
Devenir des pesticides dans l'environnement.....	26
2. Pyréthrinoïdes .....	28
Généralités.....	28
Classification.....	28
Exemple des pyréthrinoïdes : Cypermethrine (CYP).....	30
Toxicocinétique de la CYP .....	30
Neurotoxicité de la CYP .....	31
Neurotoxicité développementale de la CYP .....	32
3. Néonicotinoïdes .....	33
Généralités.....	33
Exemple de neonicotinoides : Imidaclopride (IMID) .....	34
Toxicocinétique de l'IMID .....	35
Neurotoxicité de l'IMID.....	35
Neurotoxicité développementale de l'IMID .....	37

## Partie pratique

### I. Matériels et méthodes

1. Produits chimiques.....	38
2. Entretien des animaux.....	38
3. Traitement des animaux .....	38
Partie I: Altérations cognitives et mitochondriales dans le striatum et l'hippocampe de rats exposés à l'imidaclopride : rôle protecteur des catéchines .....	38
Partie II: Etude neurocomportementale et évaluation des troubles mitochondriaux dans les régions cérébrales de la progéniture (F1, F2) après exposition de rates gestantes et allaitantes à de faibles doses d'imidaclopride et de cyperméthrine .....	40
4. Analyse comportementale.....	42
Tests de développement sensori-moteur.....	42
Évaluation du développement locomoteur .....	42
Le réflexe de retournement (surface righting) .....	42
Cliff aversion .....	43
Negative geotaxis .....	43
Test de suspension (force musculaire).....	44
Tests du comportement à l'âge adulte.....	45
Test Open Field (OF).....	45
Test d'Elevated Plus Maze (EPM) .....	46
Test de reconnaissance de nouveaux objets (NOR).....	47
Test de la nage forcée.....	48
Konziela's inverted screen (KIS).....	49
5. Analyses biochimiques .....	49
Séparation de la matrice mitochondriale du striatum et de l'hippocampe.....	50
Détermination de l'activité de l'ACHé et du calcium cytosolique .....	51
Évaluation du gonflement et de la perméabilité mitochondriale .....	51
Évaluation des marqueurs du statut redox dans les mitochondries du striatum et de l'hippocampe.....	51
Détermination du taux de glutathion (GSH).....	51
Détermination du taux d'acide malondialdéhyde (MDA).....	52
Détermination de l'activité de la CAT.....	53

Détermination des activités SOD .....	54
Détermination de l'activité GPx.....	55
Détermination de L'activité de glutathion-s-transférase (GST) .....	55
6. Etude histologique .....	56
7. Analyse statistique .....	56

## II. Résultats

**Partie I:** Altérations cognitives et mitochondriales dans le striatum et l'hippocampe de rat exposés à l'imidaclopride : rôle protecteur des catéchines

1. Effet de l'IMID et de la catéchine sur le gain de poids.....	57
2. Étude comportementale .....	57
Test d'Open Field.....	57
Test de reconnaissance de nouveaux objets (NOR) .....	58
Test de la nage forcée.....	59
Test d'Elevated plus maze (EPM).....	59
Konziela's inverted screen.....	60
3. Détermination de l'activité de l'ACHé et du calcium cytosolique.....	62
4. Évaluation du gonflement et de la perméabilité mitochondriale.....	62
5. Évaluation des marqueurs du statut redox dans les mitochondries du striatum et de l'hippocampe.....	64
6. Etude histologique .....	68

### Discussion des résultats (Partie I)

1. Effets de l'IMID et de la catéchine sur le poids corporel des animaux.....	69
2. Effets de l'IMID et de la catéchine sur l'Activité d'ACHé et le neuro-comportement des animaux.....	70
3. Effets de l'IMID et de la catéchine sur les niveaux du $Ca^{+2}$ cytosolique et l'intégrité structurale et fonctionnelle des mitochondries .....	71
4. Effet de l'IMID et de la catéchine sur le statut redox mitochondrial .....	72
5. Effets de l'IMID et de la catéchine sur l'histologie cérébrale .....	73

**Partie II:** Etude neurocomportementale et évaluation des troubles mitochondriaux dans les régions cérébrales de la progéniture (F1, F2) après exposition de rates gestantes et allaitantes à de faibles doses d'imidaclopride et de cyperméthrine

<b>Phase juvénile</b> .....	75
1. Étude comportementale .....	75
Tests de développement sensori-moteur .....	75
Evaluation du développement locomoteur.....	76



2. Evaluation de l'activité de l'AChE et des niveaux de calcium cytosolique chez les rats de la génération F1 et F2 .....	78
3. Evaluation du gonflement mitochondrial et de la perméabilité membranaire .....	80
4. Evaluation du status redox mitochondrial dans le striatum et l'hippocampe des rats de la génération F1 et F2.....	81
<b>Phase adulte .....</b>	<b>85</b>
1. Étude comportementale .....	85
Test d'Open Field .....	85
Test de reconnaissance de nouveaux objets (NOR) .....	86
Test d'Elevated Plus Maze (EPM) .....	87
Test de la nage forcée.....	88
Konziela's inverted screen .....	88
2. Evaluation de l'activité de l'AChE et des niveaux de calcium cytosolique chez les rats de la génération F1 et F2 .....	88
3. Evaluation du gonflement mitochondrial et de la perméabilité membranaire .....	90
4. Evaluation du status redox mitochondrial dans le striatum et l'hippocampe des rats de la génération F1 et F2.....	90
<b>Discussions des résultats (Partie II)</b>	
1. Effets de l'IMID et de la CYP sur la prise de poids des rats .....	95
2.Effets de l'IMID et de la CYP sur l'activité d'AChE et le neuro-comportement des animaux.....	95
3.Effets de l'IMID et de la CYP sur le niveau de $Ca^{+2}$ cytosolique et l'intégrité structurale et fonctionnelle des mitochondries.....	97
4. Effet de l'IMID et de la CYP sur le statut redox mitochondrial.....	98
<b>III. Discussion générale .....</b>	<b>99</b>

## **Conclusion et perspectives**

## **Références bibliographiques**

## **Annexes**

# Introduction

### Introduction

Le développement des différentes sociétés et la démographie mondiale galopante s'est accompagné d'une production croissante de produits animaux et agricoles susceptibles de satisfaire le besoin alimentaire de population humaine. Cela ne peut être réalisé sans l'utilisation des phytosanitaires, antibiotiques et antiparasitaires afin de protéger et conserver les grandes cultures et la production animale afin d'atteindre un rendement en adéquation avec les besoins alimentaires croissants. En effet, les grandes cultures à dimension industrielle nécessitent l'utilisation des pesticides pour multiplier les quantités des produits agricoles. Cependant, l'utilisation excessive de ces composés chimiques n'est pas sans danger pour la santé humaine. Il faut noter que le début des années 50 a marqué l'apparition des premiers rapports scientifiques sur la contamination chimique des aliments ce qui a rendu l'exposition humaine aux contaminants alimentaires un problème de santé public. Plusieurs études suggèrent la présence d'un lien entre notre alimentation et l'apparition de certaines maladies en raison de la persistance de certains produits chimiques dans les différents compartiments de l'environnement ce qui conduit à leur accumulation dans la chaîne alimentaire. En plus d'être une source d'énergie et de nutriments, les aliments sont également un vecteur de composés potentiellement toxiques dont font partie les pesticides, qui sont des composés principalement issus de l'activité anthropique et qui contribuent à la contamination de nombreux écosystèmes (**Comtet-Marre et al., 2020**). L'omniprésence des pesticides dans les milieux domestiques et agricoles a augmenté la probabilité que le consommateur est exposé à un mélange de ces produits chimiques même à des doses considérées non toxique, le cocktail de ces contaminants a la capacité d'interagir entre eux en synergie provoquant ainsi une toxicité supérieure à celle attendue (**Gamet-Payraastre, 2020**), ce qui suscitent d'importantes inquiétudes de la part du public en matière de sécurité. Ces molécules présentent potentiellement la particularité de provoquer des perturbations à cause d'une exposition répétée même à de faibles concentrations (**Taghizadeh et al., 2019**). 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. En effet, dans le but de protéger l'environnement et pallier à la forte toxicité des organophosphorés et organochlorés, l'agriculture verte a visé, à priori, l'utilisation des pyréthrinoïdes et les néonicotinoïdes qui sont considérés comme des pesticides moins toxiques pour les organismes non ciblés et efficacement dégradables (**Zeljezic et al., 2017**). Néanmoins, ces classes de pesticides de synthèse se sont avérées d'une toxicité non négligeable pour la santé humaine et

notamment pour le système nerveux central. A long terme, les effets de ces pesticides de synthèse se manifestent par un dysfonctionnement cognitif et psychiatrique (trouble d'humeur, anxiété et dépression), ainsi que des effets neurodégénératifs tels que la maladie de Parkinson et maladie d'Alzheimer (**Blanc-Lapierre et al., 2012**). La littérature scientifique a même signalé que la période prénatale ainsi que néonatale constituent des fenêtres de sensibilité particulières aux agents toxiques durables (**Laugeray et al., 2017**). Il est admis aujourd'hui que le fœtus est exposé à ces produits phytosanitaires à cause de l'exposition de la maman durant la période de développement in utero et même durant l'allaitement par son environnement mais aussi par son alimentation. En effet, de nombreuses études ont prouvé que ces substances sont capables de traverser la barrière placentaire et de s'accumuler dans l'organisme du fœtus provoquant ainsi des altérations permanentes aux conséquences désastreuses (**Svingen et al., 2018; Hassouna, 2020**). Il est important de noter que l'imidaclopride, le plus ancien néonicotinoïde et faisant partie des pesticides les plus utilisés en Algérie, est interdit dans la plupart des pays développés en particulier l'Union Européen à cause de sa toxicité. Des études récentes comme les travaux de **Sano et ses collaborateurs (2016)** ont mentionné que l'exposition prénatale à cette classe de pesticides affecte la formation des circuits neuronaux au niveau de plusieurs régions du cerveau qui sont impliquées dans la régulation de la dépression, l'anxiété, la mémoire et l'apprentissage. La conception de la mixture de pesticides est justifiée par la présence d'un cocktail de composés chimiques dans les matrices alimentaires consommées, pouvant être une source redoutable de la toxicité des organismes vivants. Le mélange de néonicotinoïde avec d'autres familles comme les pyréthrinoïdes ont la capacité de perturber les processus métaboliques et de cibler divers organes chez les mammifères et d'autres organismes non ciblés (**Zhao et al., 2020**). Les pyréthrinoïdes, de par leur nature hydrophobe, peuvent s'accumuler dans les tissus adipeux, ce qui entraîne leur persistance dans les chaînes alimentaires pendant de longues périodes (**Mahmood et al., 2016**). **Meijer et ses collaborateurs(2014)** ont signalé qu'un cocktail contenant l'imidaclopride, l' $\alpha$ -cyperméthrine, et deux autres pesticides ont une influence sur l'homéostasie du calcium, un paramètre essentiel pour la fonction neuronale.

Cette présente étude serait constituée de deux parties : la première s'est focalisée sur l'évaluation des effets neurotoxiques d'une dose réelle d'IMID (1,2 mg/kg/jour) chez des rats mâles adultes exposés pendant une durée de 90 jours. Cette étude évaluera le potentiel

neurocomportemental, l'intégrité de la membrane mitochondriale et son statut redox, ajoutés à cela les perturbations histologiques et l'effet cytoprotecteur et préventif de la catéchine.

La deuxième partie concernera l'évaluation de la toxicité de l'IMID et de la CYP, soit seuls ou en mélange, en examinant leurs effets sur le développement neuromoteur, l'intégrité mitochondriale et les dommages oxydatifs dans le striatum et l'hippocampe des ratons et des adultes des générations F1 et F2, en essayant d'appréhender la question qui a été souvent posée : Est-ce que la toxicité est transgénérationnelle, d'une mère, exposée à ces pesticides, durant sa gestation et son allaitement aux générations futures ?

# Chapitre I : Anatomopathologie du cerveau

## 1. Généralités sur le système nerveux

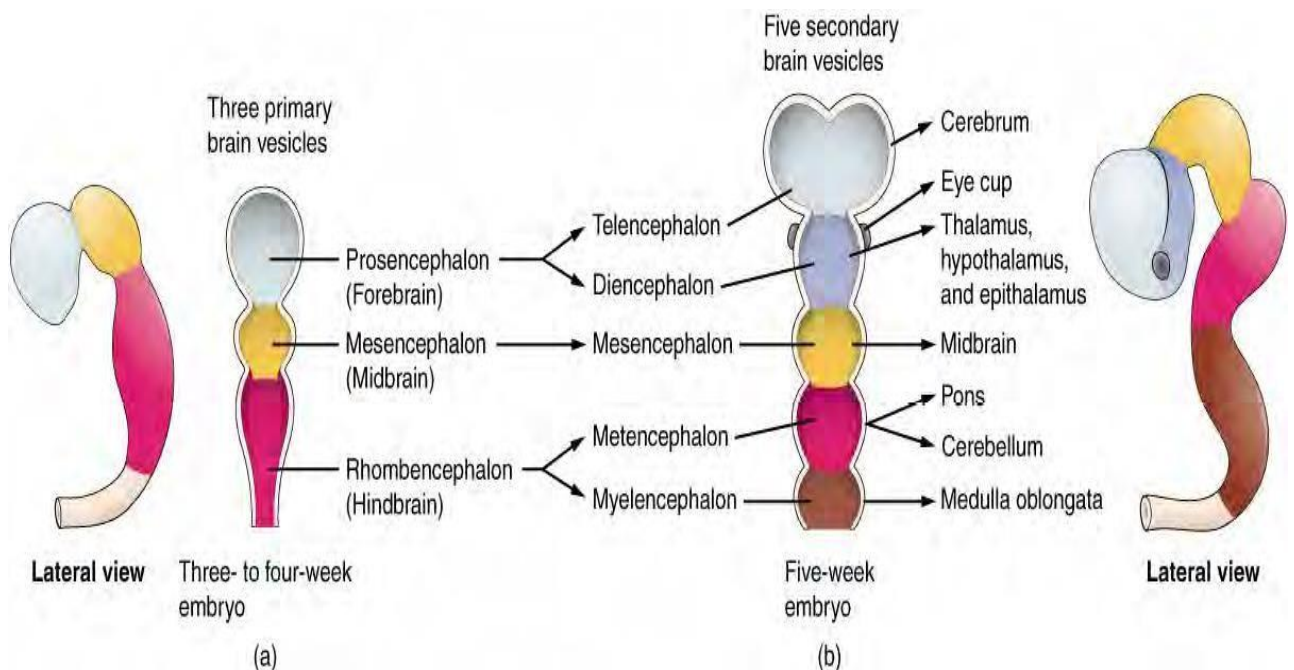
Le système nerveux est le principal système responsable de la coordination des actions entre les différentes parties du corps et les conditions extérieures. Il est impliqué dans la génération des réponses à des informations provenant de l'environnement qui nous entoure. D'un point de vue anatomique, ce système se divise en deux systèmes principaux, le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique (SNP). La moelle épinière et le cerveau constituent le SNC, qui est chargé d'obtenir des informations du corps et d'envoyer des instructions. Le SNP est constitué de tous les nerfs qui transmettent les informations sensorielles au SNC et les commandes motrices de ce dernier à l'organe cible (**Brodal, 2004**). En termes de fonctionnalité, le système nerveux peut être divisé en régions responsables des sensations, celles responsables de l'intégration et celles qui génèrent des réponses. Toutes ces zones fonctionnelles se retrouvent dans l'anatomie centrale et périphérique (**Betts et al., 2013**). Cependant, l'intégrité anatomophysiologique de ce système est prépondérante non seulement à son développement mais aussi à la pérennité de son fonctionnement durable. En effet, étant donné que la chimie des neurones est le socle de base de ce fonctionnement, ainsi toutes expositions de ce système à des molécules xénobiotiques pourraient impacter le bon fonctionnement neuronal avec des conséquences neuropathologiques.

## 2. Neurogenèse

La structure majeure du système nerveux central et périphérique se développe au cours des premiers mois de grossesse (**figure 1**). Dans les premières semaines qui suivent la fécondation, l'embryon est constitué de 3 feuillets ectoderme, mésoderme et endoderme. Par la suite, Chaque feuillet donnera naissance à différents tissus et organes. La peau et le système nerveux vont naître du même feuillet appelé ectoderme (**Donovan and Cascella, 2020**). La partie centrale de ce dernier devient la plaque neuronale qui formera par la suite le tube neural par le processus de neurulation. Le tube neural se forme au début du développement et sert comme précurseur embryonnaire du SNC, il constitue le premier dérivé du cerveau et de la moelle épinière (**Silbereis et al., 2016**). De la cinquième à la huitième semaine, le tube neural se dilate en vésicules, qui sont les précurseurs embryologiques des différentes structures du cerveau. Ces vésicules sont le prosencéphale (Le cerveau antérieur), le mésencéphale (cerveau moyen), qui est une région ne se différenciant pas en divisions plus fines comme les autres, et le rhombencéphale (cerveau postérieur).

✓ Le prosencéphale se développe ensuite en télencéphale et en diencephale, ce dernier donnera naissance aux thalamis, à l'hypothalamus, aux coupes optiques et à la neurohypophyse. Le télencéphale, comprenant deux expansions latérales, les futurs hémisphères cérébraux vont s'ébaucher dès la 12<sup>ème</sup> semaine de gestation et une paire de vésicules qui bourgeonne à la face ventrale de ces hémisphères cérébraux, donnant naissance aux bulbes olfactifs et entraînant le développement des structures qui y sont associées, notamment l'hippocampe. Aux environs de la 6<sup>ème</sup> semaine, les parois basales du cerveau antérieur s'épaississent pour former les corps striés et le noyau amygdalien. Enfin, à partir de la 7<sup>e</sup> semaine, le cortex cérébral commence à se former à partir du néopallium télencéphalique, par prolifération et migration de vagues successives de neurones, et sa mise en place coïncide avec la fin de la période embryonnaire.

✓ Rhombencéphale donne naissance au myélocéphale, qui correspond à la structure adulte connue sous le nom de bulbe rachidien et au métencéphale, dont la partie dorsale donne naissance au cervelet qui acquiert son aspect typique dès la 17<sup>ème</sup> semaine (Fotos et al., 2011).



**Fig. 1:** Développement et organisation du système nerveux au cours de la phase embryonnaire (Betts et al., 2013).



### 3. Divisions de base du système nerveux central

#### 3.1. Cerveau

Le cerveau est un réseau complexe et interconnecté. Il se divise en deux hémisphères, tronc cérébral et cervelet (**Rosenow, 2018**). Il comprend la substance blanche, constituée principalement d'axones myélinisés, et entourée de la matière grise qui est composée principalement de corps cellulaires neuronaux, et représente le cortex cérébral, les noyaux sous-corticaux et le système limbique, Cette matière grise est responsable du traitement et de l'interprétation des informations (**Rea, 2015**).

##### 3.1.1. Cortex cérébral

Il est subdivisé en plusieurs lobes : frontal, temporal, pariétal et occipital. La pensée rationnelle, la résolution de problèmes, la planification sont associés au lobe frontal. Le lobe temporal contient le cortex auditif primaire et joue également un rôle important dans l'apprentissage et la gestion de la mémoire. Le lobe pariétal est impliqué dans les fonctions sensorielles (**Rosenow, 2018**). Le lobe occipital, est la partie la plus petite et la plus caudale de l'hémisphère cérébral, sachant que cette partie est principalement impliquée dans les fonctions visuelles (**Suryadevara et al., 2018**).

##### 3.1.2. Noyaux sous-corticaux (figure 2)

Ce sont des noyaux profonds qui appartiennent à trois groupes fonctionnels : le globus pallidus, le striatum, le noyau sous-thalamique et la substantia nigra. Outre que leur implication dans nos mouvements volontaires, ces noyaux sont impliqués dans nos fonctions émotionnelles et cognitives et dans le développement de nos habitudes (**Rea, 2015**). Parmi ces noyaux, il faut noter que le striatum est une région de choix dans cette présente étude.

##### ✓ **Striatum**

Le striatum, un circuit neuronal impliqué dans le contrôle cognitif des fonctions motrices, il aide à moduler les mouvements volontaires. C'est la plus grande partie des noyaux gris-centraux, lui-même est composé du Putamen et du noyau caudé (**Khakh, 2019**). Il reçoit des afférences du cortex cérébral, de l'amygdale, de l'hippocampe et de la substantia nigra (**Báez-Mendoza et Schultz, 2013**). C'est une région particulièrement vulnérable lors d'agressions aiguës telles que l'hypoxie et l'hypoglycémie. Une altération du métabolisme énergétique et une stimulation excessive des récepteurs du glutamate ont été proposés comme des facteurs importants dans la pathogenèse des dommages neuronaux dans le striatum (**Calabresi et al.,**

2000). De nombreuses maladies neurologiques et psychiatriques impliquent le dysfonctionnement striatal, notamment la maladie de Parkinson (MP), la maladie de Huntington (MH), les troubles déficitaires de l'attention avec hyperactivité et les troubles obsessionnels compulsifs (Khakh, 2019).

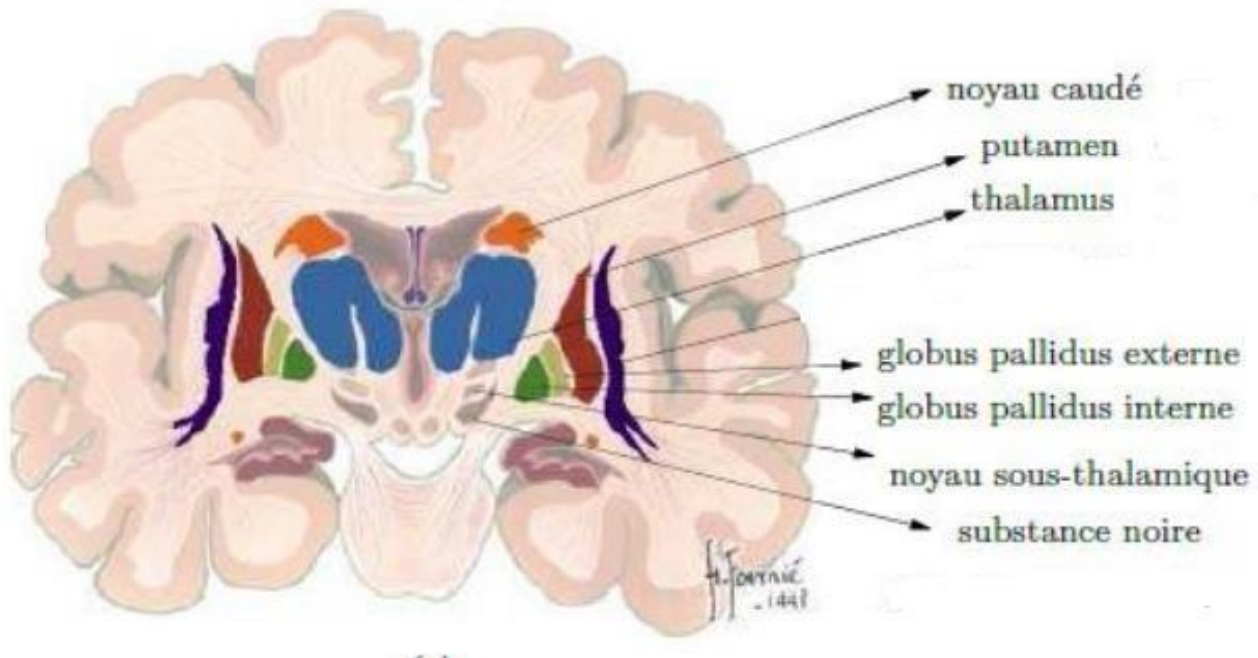


Fig.2: Noyaux sous-corticaux (Caillaud, 2017)

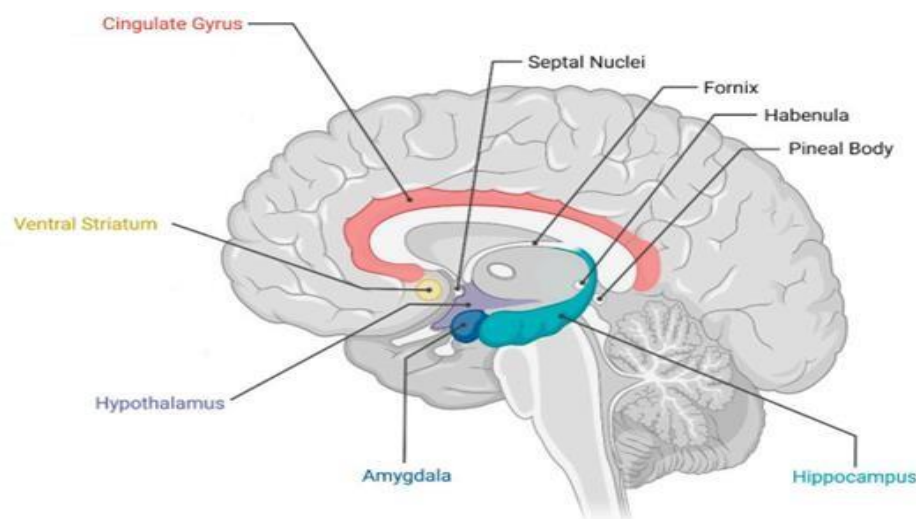
### 3.1.3. Système limbique

C'est un ensemble de structures (**figure 3**), à savoir l'hippocampe, l'amygdale, le gyrus cingulaire et l'hypothalamus, qui sont les plus associées au comportement émotionnel et à la formation de la mémoire (Banwinkler et al., 2022). Parmi ces structures, l'hippocampe est une région plus accessible sur le plan expérimental et histologique, c'est pourquoi cette région neuronale a été ciblée par les expérimentations de cette présente étude.

#### ✓ Hippocampe

L'hippocampe est sans doute la région sous-corticale la plus étudiée, on peut le distinguer extérieurement comme une couche de neurones qui s'enroule en une structure sous forme de la lettre S. Cette région fait partie du système limbique ; dont elle est interconnectée aux autres régions cérébrales à savoir, l'amygdale et le cortex (McEwen et al., 2016). Il est à noter que les personnes souffrant de lésions de l'hippocampe peuvent être capables de se

souvenir d'événements qui ont eu lieu des années avant le début de leur lésion cérébrale. Cette préservation des souvenirs lointains a conduit à la notion de consolidation systémique, d'où l'idée que les souvenirs deviennent indépendants de l'hippocampe à mesure qu'ils se consolident dans d'autres régions (vraisemblablement le cortex) (Knierim, 2015). Chez l'adulte, le volume de cette région de chaque côté du cerveau est d'environ 3 à 3,5 cm<sup>3</sup>, contre 320 à 420 cm<sup>3</sup> pour le volume du cortex. L'hippocampe est l'une des régions du cerveau où la neurogenèse se poursuit même à l'âge adulte, le gyrus denté (GD) est le sous-champ hippocampique qui a cette capacité de générer de nouveaux neurones chez le jeune adulte (Anand et Dhikav, 2012). Le dysfonctionnement de l'hippocampe se distingue par des déficiences de mémoire et d'attention. Sur le plan pathologique, la perte de volume de l'hippocampe est une constatation courante que la personne est atteinte de la maladie d'Alzheimer, d'épilepsie, des troubles cognitifs légers et de vieillissement normal, cette perte peut atteindre 50% chez les patients atteints de la MA modérée (Kotkowski et al., 2018). D'autre part, des études ont démontré que le syndrome métabolique (Anand et Dhikav, 2012), le diabète de type 2 et l'obésité (Stranahan, 2015), signalent également une atrophie de l'hippocampe.



**Fig. 3 :** Représentation de certaines régions limbiques (Banwinkler et al., 2022).

### 3.2. Moelle épinière

La moelle épinière est située à l'intérieur du canal vertébral, elle est entourée de trois couches appelées méninges. Contrairement au cerveau, la matière grise de la moelle épinière est située à l'intérieur et est entourée par la matière blanche (Rea, 2015). La substance grise est constituée des corps cellulaires des neurones moteurs et sensoriels, des interneurons et

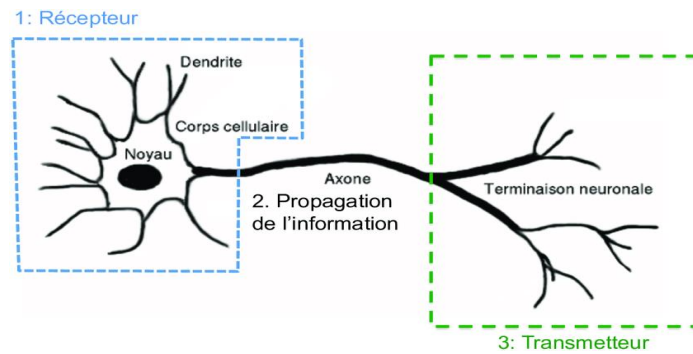
des neuropiles (cellules de la neuroglie et axones non myélinisés pour la plupart). En revanche, la substance blanche est composée des axones sensoriels et moteurs myélinisés. Les trois principaux rôles de la moelle épinière sont l'envoi des commandes motrices du cerveau au corps, l'envoi des informations sensorielles du corps au cerveau et la coordination des réflexes (**Harrow-Mortelliti et al., 2019**).

#### **4. Composition cellulaire du système nerveux central**

Le tissu nerveux contient deux grands types de cellules, les neurones et les cellules gliales. Les neurones sont les cellules responsables de la communication par le biais de signaux électriques. Les cellules gliales sont des cellules de soutien, qui maintiennent l'environnement autour des neurones.

##### **4.1. Neurone**

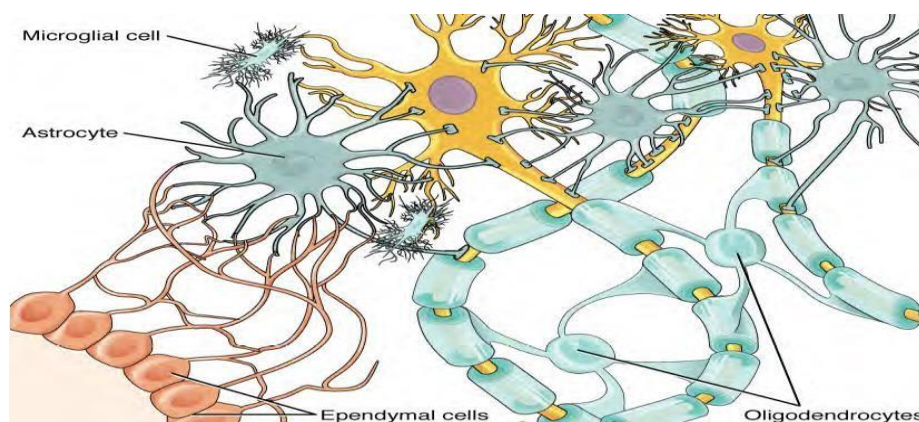
Le neurone est l'unité structurelle et fonctionnelle du SNC (**figure 4**). Il a la propriété de détecter, recevoir et conduire l'influx nerveux vers diverses parties du corps. Les signaux sont reçus au niveau des dendrites, transmis le long du corps cellulaire et se propagent le long de l'axone vers la cible, qui peut être un autre neurone, un tissu musculaire ou une glande. Certains axones transmettent le signal plus rapidement que d'autres, cette variable qui augmente la vitesse de conduction est due à la présence de feuilles de myéline autour des axones (**Raz et Perouansky, 2019**). Les neurones peuvent être classés en trois catégories : les neurones sensoriels, moteurs et inter neurones. Les neurones sensoriels permettent de recevoir des informations du monde extérieur par le biais de nos sens et d'envoyer les signaux au cerveau. Les interneurones se trouvent uniquement dans le cerveau et la moelle épinière, ces neurones comparent les données qu'ils ont reçues et prennent une décision. Cette décision est envoyée par les motoneurones à un effecteur qui pourrait être un muscle (**Willerth, 2017**).



**Fig. 4 :** Structure du neurone (Hébert, 2012)

#### 4.2. Les cellules gliales

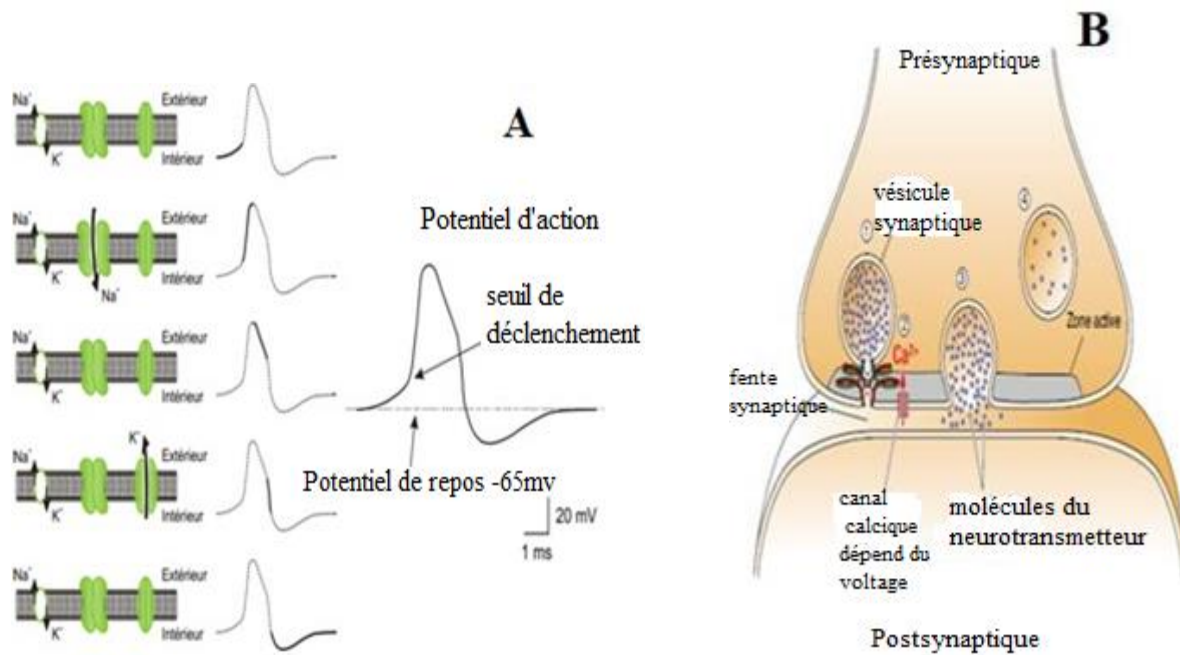
Les cellules gliales ne sont pas directement impliquées dans le traitement de l'information mais elles sont essentielles pour apporter un soutien aux neurones. Dans le SNC, on trouve les astrocytes, les oligodendrocytes, les microglies et les cellules épendymaires (**figure 5**). Les astrocytes jouent un rôle important dans le maintien de l'environnement chimique autour du neurone et sont essentiels à la régulation de la barrière hémato-encéphalique (BHE) en empêchant les substances potentiellement toxiques présentes dans le sang de pénétrer dans le cerveau. Les oligodendrocytes sont les cellules gliales myélinisantes du SNC. Les microglies agissent comme des phagocytes et jouent un rôle dans la surveillance immunitaire ; elles nettoient les cellules mortes et les débris cellulaires, elles libèrent également des protéines appelées cytokines telles que les interleukines (Mihailoff et Haines, 2018). Les cellules épendymaires sont chargées de former le liquide céphalo-rachidien, un liquide circulatoire qui remplit certaines des fonctions du sang dans le cerveau et la moelle épinière en raison de la BHE (Nelles et Hazrati, 2022).



**Fig. 5 :** Les cellules gliales du SNC (Betts et al., 2013).

## 5. Fonctionnement du système nerveux

La transmission d'informations au sein du système nerveux se fait par le biais de signaux électriques et chimiques transmis entre les neurones. Lorsque le neurone reçoit un signal d'un autre neurone ou d'un récepteur sensoriel, ce signal provoque une brève dépolarisation du potentiel de la membrane où l'intérieur de la cellule devient plus positif à cause de l'entrée massive des ions  $\text{Na}^+$ . Lorsque le potentiel membranaire atteint le seuil, les canaux potassique s'ouvrent et les ions  $\text{K}^+$  sortent rapidement de la cellule, on parle de la phase de repolarisation. Avant que les concentrations d'ions reviennent aux niveaux de repos et la cellule revient à  $-70 \text{ mV}$ , la fin du potentiel d'action marque une hyperpolarisation puisque les canaux potassiques restent ouverts un peu trop longtemps (**figure 6A**). L'arrivée du potentiel d'action à l'extrémité de l'axone déclenche l'ouverture de canaux calciques. Les ions  $\text{Ca}^{+2}$  pénètrent alors dans le terminal, provoquant la fusion des vésicules synaptiques contenant des messagers chimiques appelés neurotransmetteurs avec la membrane pré-synaptique et la libération de leur contenu dans la fente synaptique (**figure 6B**). Ces neurotransmetteurs se lient ensuite aux récepteurs du neurone post-synaptiques, déclenchant ainsi un nouveau signal électrique (**Patri, 2019**). Après un potentiel d'action, la concentration d'ions  $\text{Na}^+$  à l'intérieur de la cellule est plus élevée qu'à l'extérieur, tandis que la concentration d'ions  $\text{K}^+$  à l'extérieur de la cellule est plus élevée qu'à l'intérieur. Pour maintenir le gradient de concentration de ces ions, La pompe sodium-potassium, une enzyme qui hydrolyse de l'ATP, travaille pour ramener ces concentrations à leur état de repos, en faisant sortir de la cellule trois ions  $\text{Na}^+$  pour deux ions  $\text{K}^+$  qui y sont introduits. Ce processus est nécessaire pour que le neurone génère un autre potentiel d'action (**Bear et al., 2016**).



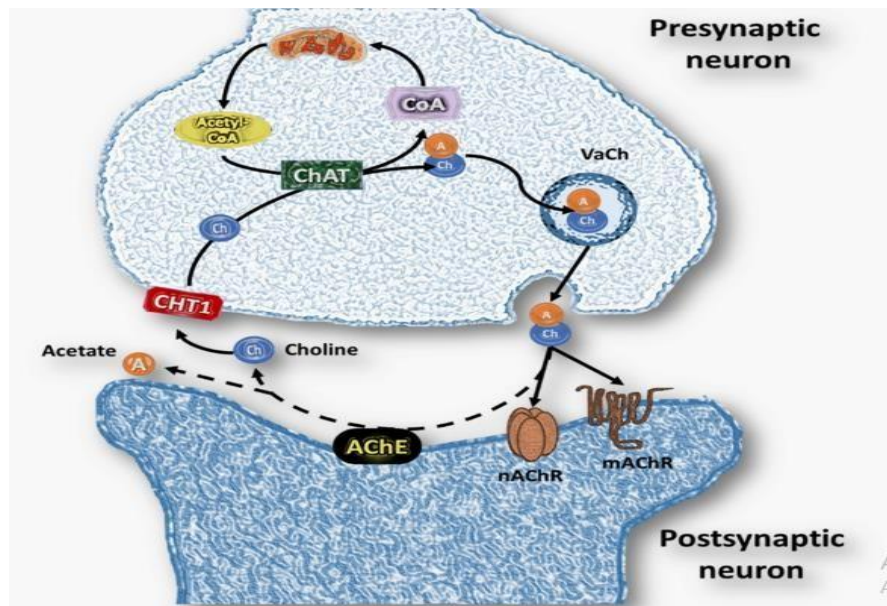
**Fig. 6 :** Transmission de l'influx nerveux (A: Saïghi, 2004. B: Bear et al., 2016).

### 5.1. Neurotransmetteurs

Les neurotransmetteurs sont des messagers chimiques qui transmettent une impulsion électrique entre les neurones ou entre les neurones et d'autres cellules, telles que les cellules musculaires ou glandulaires. À la suite d'une stimulation électrique, les neurotransmetteurs sont libérés dans la fente synaptique par exocytose afin d'activer les récepteurs post-synaptiques et de déclencher une réponse (Pradhan et al., 2014). Il existe plusieurs catégories de neurotransmetteurs, notamment :

#### 5.1.1. Acétylcholine

Première molécule identifiée comme neurotransmetteur, il doit son nom aux deux substances utilisées pour le synthétiser : la choline et l'acétyl coenzyme A. Les neurones qui contiennent de l'acétylcholine (ACh) sont dites cholinergiques. L'ACh agit sur deux familles de récepteurs ; récepteurs nicotiques (nAChR) de l'ACh car la nicotine se lie également à ces récepteurs et les active, et leur activation entraîne généralement l'excitation du neurone ; récepteurs muscariniques (mAChR). L'action de l'ACh dans la synapse est interrompue par l'acétylcholinestérase (AChE) une enzyme qui décompose l'ACh en acétate (A) et en choline (Ch). L'ACh est le principal neurotransmetteur utilisé au niveau des jonctions neuromusculaires, et il est responsable de la contraction musculaire ; il joue un rôle important dans la mémoire et l'attention. La perte d'ACh est associée à la MA (figure 7) (Caudle, 2018).



**Fig.7** : Système cholinergique (Camacho-Pérez et al., 2022).

*ChAT* : choline acétyltransférase ; *VaCh* : vésicules d'ACh

### 5.1.2. Sérotonine ou 5-hydroxytryptamine (5HT)

Neurotransmetteur dérivé de l'acide aminé tryptophane, les neurones à sérotonine se trouvent principalement dans le tronc cérébral. Il est généralement lié à l'humeur et aux émotions, à l'appétit et au sommeil. De faibles niveaux de ce neurotransmetteur sont associés à la dépression et aux troubles obsessionnels compulsifs (Caudle, 2018). C'est un neuromodulateur majeur des comportements moteurs (Bacqué-Cazenave et al., 2020).

### 5.1.3. Dopamine

Elle est dérivée de l'acide aminé tyrosine. Les neurones dopaminergiques sont concentrés dans plusieurs zones du cerveau, les plus importantes étant la substantia nigra. Ils sont également présents dans l'hypothalamus et se projettent vers l'hypophyse où ils ont pour fonction d'inhiber la libération de prolactine et d'hormones stimulant les mélanocytes. Selon la littérature, la dopamine joue des rôles essentiels dans la régulation des neurones moteurs, de la fonction de mémoire spatiale, de la motivation, de l'éveil, de la récompense et le plaisir. La dopamine est associée à plusieurs troubles neurologiques dont la schizophrénie et la maladie de Parkinson qui est liée à la perte de ce neurotransmetteur (Klein et al., 2019).



#### 5.1.4. Adrénaline

Neurotransmetteur catécholamine, également connu sous le nom d'épinéphrine. Il est libéré par le système nerveux sympathique et la médulla en réponse au stress ou au danger. L'adrénaline aide l'organisme à répondre aux situations de stress en augmentant le rythme cardiaque, la pression artérielle et la respiration. Il déclenche également la libération de glucose par le foie, fournissant à l'organisme l'énergie nécessaire pour faire face à l'agent stressant. Il est couramment utilisé dans les traitements médicaux pour traiter les arrêts cardiaques par exemple (Álvarez-Diduk et Galano, 2015).

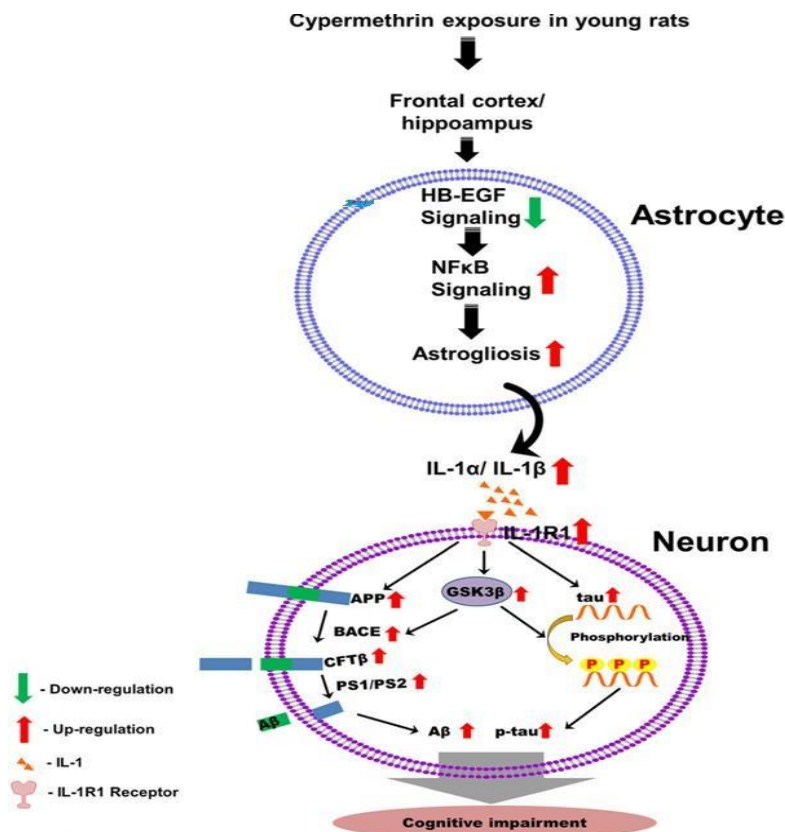
### 6. Principales pathologies neuronales

Les maladies neurodégénératives sont des troubles dans lesquels le système cellulaire subit progressivement un dysfonctionnement jusqu'à la mort, provoquant ainsi une symptomatologie complexe qui affecte les systèmes nerveux central, périphérique et même les muscles (Radi et al., 2014).

#### 6.1. Maladie d'Alzheimer

C'est la forme la plus courante des maladies neurodégénératives, elle est classée comme un type de démence, un terme qui désigne une catégorie de troubles cérébraux impliquant une perte de mémoire et des troubles cognitifs. La mémoire épisodique, sémantique et de travail sont les types de mémoire les plus affectés chez les personnes atteintes de la MA, tandis que la mémoire à long terme reste préservée dans les premiers stades de la maladie (Sheppard et Coleman, 2020). Dans la MA, le cortex et l'hippocampe sont les régions les plus gravement touchées par une perte de synapses et une atrophie neuronale (Tang et Taghibiglou, 2017). Une hypothèse populaire appelée "dissociation hippocampo-corticale" a proposé que les lésions précoces de l'hippocampe provoquent une "dissociation" entre l'hippocampe et le cortex cérébral, entraînant un défaut d'enregistrement des informations émanant de l'hippocampe (Anand et Dhikav, 2012). L'un des signes distinctifs de la MA est le repliement et l'agrégation irrégulière des protéines à l'intérieur et à l'extérieur des neurones. L'une de ces protéines, la protéine  $\beta$ -amyloïde, se trouve dans l'espace extracellulaire autour des neurones. Les formes mal repliées de la  $\beta$ -amyloïde s'agglutinent en dépôts appelés plaques amyloïdes. Ces plaques bloquent la signalisation et, par conséquent, la communication entre les cellules. Une autre protéine appelée protéine Tau (p-tau), qui est normalement formée à l'intérieur des neurones et qui participe au maintien de la structure neuronale, se retrouve également mal

repliée dans la MA. Elle s'accumule à l'intérieur des neurones en formant des agrégats hyperphosphorylés appelés enchevêtrement neurofibrillaire. L'agrégation irrégulière de ces deux protéines peut être déclenchée après une exposition chronique à des pesticides tels que la Cyperméthrine (**figure 8**) (Wang et Zheng, 2019).

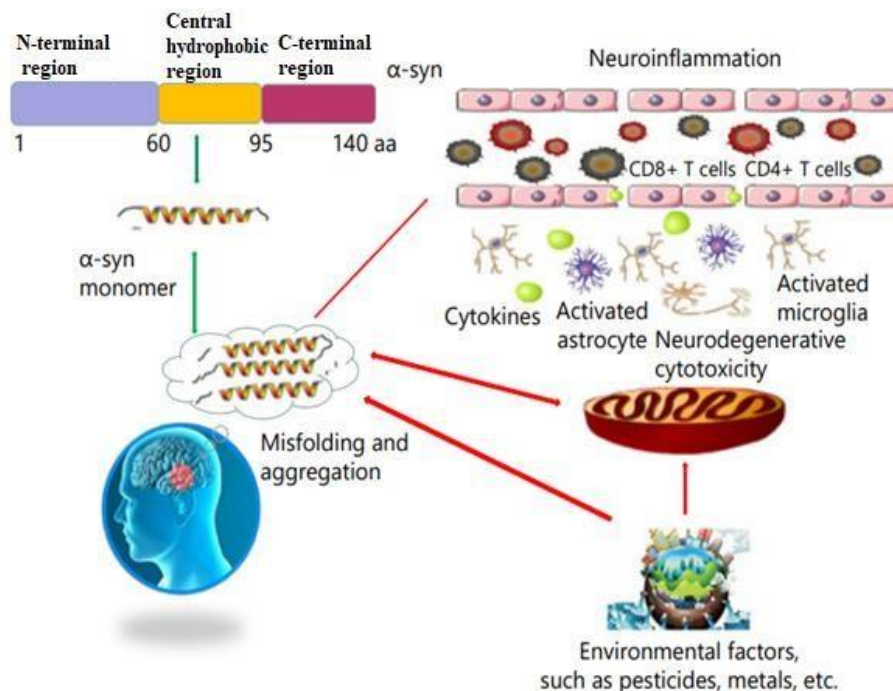


**Fig. 8 :** Le mécanisme moléculaire régissant la Cyperméthrine (CYP) dans l'induction de l'agrégation irrégulière de  $\beta$ -amyloïde et de p-tau (Maurya et al., 2016).

La CYP induit l'apoptose des astrocytes en bloquant le HB-EGF, ce dernier fonctionne comme un agent neuroprotecteur endogène qui régule la mémoire et les performances cognitives. Ce pesticide a comme effet de diminuer la signalisation HB-EGF ce qui va augmenter la signalisation du  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  astrocytaire, qui joue un rôle important dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer, et l'astroglie dans le cortex frontal et l'hippocampe. L'activation gliale stimule la génération d'interleukines,  $\text{IL-1}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  et  $\text{IL-1R1}$  neuronal, l'augmentation de l'IL-1 stimule l'induction d'APP et de la GSK3 $\beta$ , qui est le principal inducteur de p-tau. L'APP subit une transformation amyloïdogène via une augmentation séquentielle de l'activité de BACE, du CTF- $\beta$  et des niveaux de PS1 et PS2 pour générer de la protéine bêta-amyloïde ( $\text{A}\beta$ ). La GSK3 $\beta$  provoque la phosphorylation de tau pour générer p-tau et stimule l'activité de BACE pour favoriser l'induction d' $\text{A}\beta$ . L'élévation de la protéine  $\text{A}\beta$  et de la p-tau dans le cerveau conduira à des troubles cognitifs.

## 6.2. Maladie de Parkinson (MP)

Un trouble neurodégénératif progressif du mouvement musculaire qui se caractérise par des tremblements, une rigidité musculaire et une bradykinésie qui signifie la lenteur du mouvement. Cette maladie peut également provoquer des symptômes non liés au mouvement tels que des changements d'humeur et de comportement, des troubles cognitifs et des troubles du sommeil (Hayes, 2019). La MP est corrélée à de faibles niveaux de dopamine causés par la mort des neurones dopaminergiques dans la substantia nigra, le globus pallidus, le putamen et le noyau caudé et la formation d'agrégats de protéines intra-neurales appelés corps de Lewy. Un composant caractéristique de ces corps est une protéine mal repliée,  $\alpha$ -synucléine ( $\alpha$ -syn), une protéine qui se localise normalement aux terminaisons pré-synaptiques des neurones. La formation des protofibrilles de  $\alpha$ -syn est stimulée par des modifications traductionnelles qui se produisent dans des conditions de stress oxydatif (Surmeier, 2018). Les causes de cette maladie peuvent être déclenchées par l'exposition à des toxines comme les pesticides (figure 9) et il existe également certains facteurs de risque comme l'âge (les personnes développent la maladie vers 65 ans ou plus) et le sexe (les hommes ont un risque plus élevé par rapport aux femmes) (Fantini et Yahi, 2015).



**Fig.9** : Les interactions entre le mauvais repliement et l'agrégation de l' $\alpha$ -syn, la neuro-inflammation et les facteurs environnementaux sont des éléments clés de la pathogenèse de la MP (He et al., 2021).

*Le mal repliement d' $\alpha$ -syn active les astrocytes et les microglies dans le SNC. Cela provoque la libération de cytokines, qui endommagent la BHE et incitent les cellules immunitaires périphériques à pénétrer dans le cerveau, entraînant une inflammation. De plus, la dysfonction mitochondriale peut entraîner des modifications covalentes de l' $\alpha$ -syn, provoquant un changement de conformation et une agrégation. D'autres parts, certains facteurs environnementaux tels que les pesticides peuvent également induire ce mal repliement de l' $\alpha$ -syn.*

## 7. Mort des cellules neuronales dans les maladies neurodégénératives

Au cours du développement du SNC, la neurogenèse s'accompagne souvent d'une perte massive de neurones, un élément nécessaire pour que le système nerveux soit plus efficace dans la coordination des fonctions corporelles et mentales. Malgré des événements de mort occasionnelle ou organisée, une perte neuronale importante se produit rarement dans le SNC mature. Cependant, dans de nombreux cas, la perte de neurones est due à l'accumulation de protéines anormales dans le cerveau, qui peuvent former des agrégats toxiques et endommager les cellules nerveuses. Le stress causé par ces facteurs peut alors avoir des effets cytotoxiques, notamment un nombre accru de radicaux libres (ROS), le dysfonctionnement mitochondrial et synaptique, le stress du réticulum endoplasmique (RE) et les lésions d'ADN, ce sont tous des défis majeurs pour les neurones. Cependant, la mauvaise gestion de ces facteurs déclenchera par la suite la mort de ces neurones qui va se faire par l'une des principales voies de mort cellulaire, l'apoptose, l'autophagie ou la nécrose (**Chi et al., 2018**).

### 7.1. Apoptose

L'apoptose est un processus de mort cellulaire étroitement régulé qui se produit naturellement dans les cellules, il joue un rôle crucial dans le développement normal des organismes multicellulaires et dans l'élimination des cellules endommagées ou anormales. C'est un processus contrôlé permettant l'élimination des cellules mourantes avec un minimum de dommages pour les cellules environnantes. Elle se distingue par le rétrécissement de la cellule, la condensation de la chromatine et la fragmentation du noyau. Par la suite, la cellule se brise en fragments appelés corps apoptotiques qui seront absorbés par les phagocytes (**Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016**). Outre que les facteurs pathologiques (tels que les toxiques environnementaux) qui pourront induire la mort cellulaire programmée, l'apoptose est également un mécanisme homéostatique, où des éléments régulateurs forment un équilibre qui détermine le nombre des neurones qui vont subir une apoptose. L'étape cruciale de l'apoptose est l'activation protéolytique des caspases exécutrices (casp 3, 6 et 7) par les caspases initiatrices (casp 8, 9 et 10) (**Dekkers et al., 2013**). Chez les mammifères,

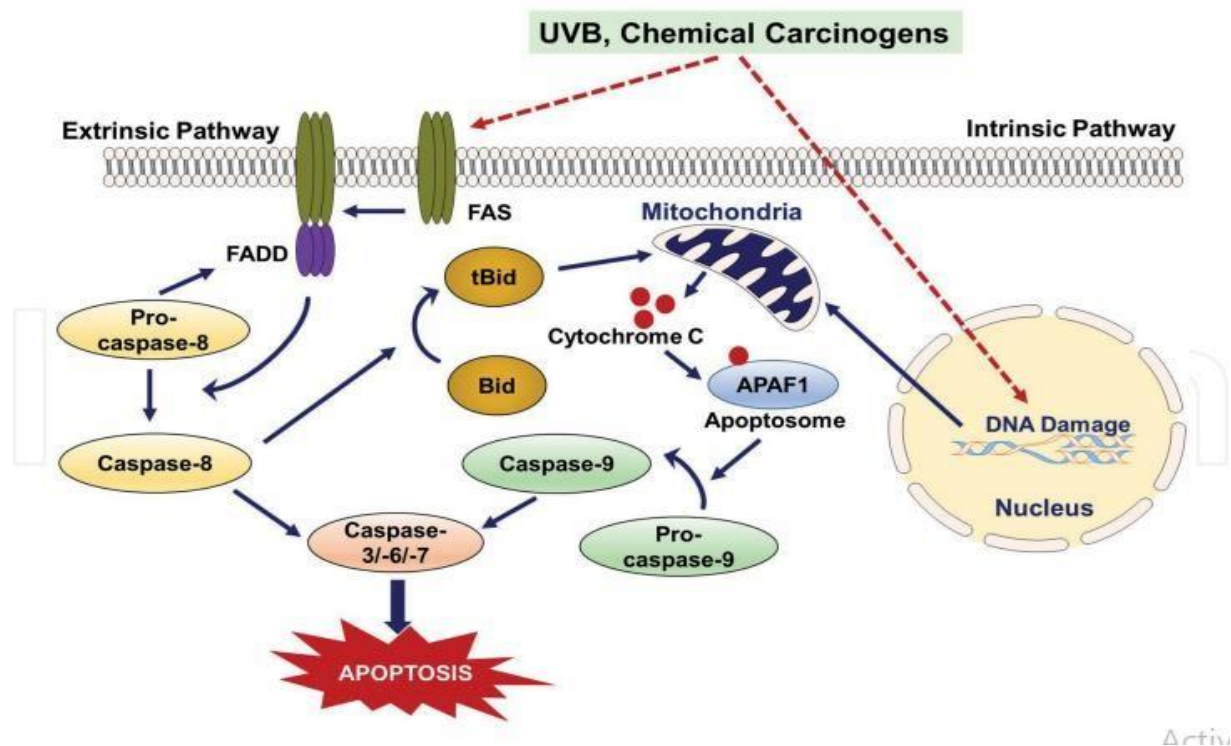
l'activation des caspases exécutrices est régulée par deux cascades protéiques distinctes : **(figure 10)**

✓ **Voie intrinsèque ou voie dépendante des mitochondries**

Dans la voie intrinsèque qui semble être dominante pour l'apoptose neuronale, les mitochondries présentent des fuites et laissent échapper le cytochrome C (Cyt c), qui est un signal essentiel déclenchant la phase finale de l'apoptose. Habituellement, le cytoplasme et la membrane mitochondriale abritent des protéines appelées Bcl-2 et Bcl-x, qui sont anti-apoptotiques et préservent l'intégrité de la membrane mitochondriale, empêchant ainsi les protéines apoptotiques comme le Cyt c de s'échapper dans le cytoplasme. Cependant, en condition anormales et stressantes, comme l'absence d'un signal de croissance, ou des dommages dus aux ROS ou à un mauvais repliement des protéines. Les protéines de stress Bim, Bid et Bad, bloquent la fonction de Bcl-2 et Bcl-x, ces protéines activent ensuite deux effecteurs pro-apoptotiques appelés Bax et Bak, qui créent des canaux dans la membrane de la mitochondrie, permettant aux protéines intra-mitochondriales comme le cytochrome C de fuir dans le cytoplasme et se lier à une protéine appelée Apaf - 1 (Apoptosis activating factor 1) pour former un complexe appelé "apoptosome". Ce complexe activera par la suite une caspase initiatrice (casp 9) qui à son tour activera les caspases exécutrices comme (casp3 et 7). L'activation de ces caspases provoquent la dégradation de l'ADN chromosomique ainsi que la dégradation des protéines du cytosquelette ce qui entrainera des changements morphologiques **(Franklin, 2011; D'arcy, 2019)**.

✓ **Voie extrinsèque ou voie du récepteur de la mort**

Cette voie implique la liaison d'une protéine adaptatrice, appelée Fas-associated death domain (FADD), à la protéine Fas. Par la suite ce complexe se lie à la caspase initiatrice (casp8), qui activera à son tour les caspases exécutrices (casp3, 6 et 7). Ce qui entrainera par la suite le clivage de nombreux substrats cellulaires, provoquant directement la mort de la cellule **(Franklin, 2011; D'arcy, 2019)**. Il est important de noter qu'au cours de l'apoptose, la membrane cellulaire garde son intégrité et ne provoque pas d'inflammation, contrairement à la nécrose qui est associé à la lésion de la cellule. En effet, les corps apoptotiques ont une membrane plasmique intacte et empêchent tout contenu de s'échapper dans l'espace interstitiel et ils sont rapidement reconnus par les phagocytes et éliminés **(D'arcy, 2019)**.

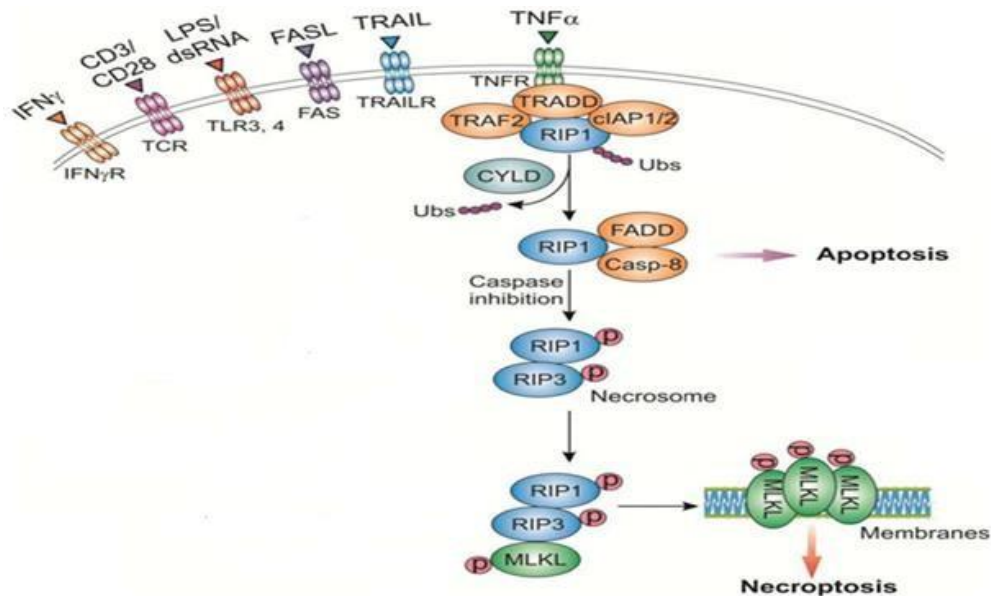


**Fig. 10:** Voies de signalisation de l'apoptose : intrinsèque et extrinsèque (Hafeez et al., 2021).

## 7.2. Necrose

La nécrose était à l'origine considérée comme une forme accidentelle de mort cellulaire. Ce type de mort cellulaire se traduit par un gonflement de la cellule, suivi de l'endommagement de multiples organites, la perte de l'intégrité de la membrane cellulaire, l'hydrolyse de l'ADN et une libération du contenu cellulaire dans l'espace environnant déclenchant une réaction inflammatoire et endommageant davantage les cellules voisines (Orrenius et al., 2015 ; Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016). La défaillance énergétique et la surcharge de  $\text{Ca}^{+2}$  intracellulaire sont des processus clés impliqués dans la mort nécrotique. Ceci, à son tour, peut stimuler diverses enzymes cataboliques dépendantes du  $\text{Ca}^{+2}$ , comme les phospholipases, les protéases et les endonucléases (Orrenius et al., 2015). La nécrose est une forme de mort cellulaire qui se produit en réponse à des lésions importantes et qui n'implique généralement pas l'activation des caspases. Bien qu'elle ne soit pas normalement impliquée dans le développement normal des tissus, il existe des formes de mort nécrotique programmée, telles que la nécroptose, qui peut jouer un rôle important dans le développement et l'homéostasie tissulaire normale. La nécroptose est une forme plus physiologique et programmée de mort nécrotique et partage plusieurs processus clés avec l'apoptose et l'autophagie. Cette voie de

signalisation est généralement déclenchée par des membres de la famille du facteur de nécrose tumorale (TNF), nécessite l'inhibition de la caspase 8 et l'assemblage du nécrosome (complexe RIP1-RIP3), (**figure 11**), (**Khalid et Azimpouran, 2020**).



**Fig. 11:** La voie de la nécroptose (**Zia et al., 2021**).

Lors de la stimulation par le  $TNF-\alpha$ , le récepteur  $TNF$  activé ( $TNFR$ ) interagit avec  $RIP1$  et recrute  $cIAP1$  et  $cIAP2$  pour former un complexe associé à la membrane plasmique, ce qui entraîne la polyubiquitination de  $RIP1$ .  $RIP1$  se lie alors à  $FADD$  et à la procasp-8 pour former un complexe qui active la Casp-8 et conduit à l'induction de l'apoptose. Si l'activité de la casp-8 est inhibée,  $RIP1$  se lie à  $RIP3$  pour former un nécrosome et favorise l'auto-phosphorylation de  $RIP3$ , ce qui permet à  $RIP3$  de recruter et de phosphoryler  $MLKL$ . Il en résulte une oligomérisation de  $MLKL$ , l'insertion membranaire des oligomères de  $MLKL$ , la perturbation du plasma et des cellules intracellulaires et la mort par nécroptose. D'autres stimuli nécroptotiques, notamment  $FASL$ ,  $TRAIL$ ,  $LPS$ ,  $ARNdb$  et interféron  $\gamma$  ( $IFN\gamma$ ), peuvent stimuler leurs récepteurs respectifs pour activer  $RIP1$  et/ou  $RIP3$  afin de provoquer la mort nécrotique.

### 7.3. Autophagie

L'autophagie est un processus d'auto-dégradation en réponse à divers stimuli tels que la carence en nutriments et la présence accrue des ROS, en formant des vacuoles à double membrane appelées autophagosomes qui sont ensuite dégradées par des enzymes lysosomales (**figure 12**). Il s'agit d'un processus par lequel la cellule dégrade son contenu cytoplasmique (protéines, agrégats macromoléculaires et organites endommagés) dans le cadre d'une stratégie de survie ; les métabolites générés sont réutilisés pour produire de l'énergie et des molécules essentielles à la croissance et à la survie de la cellule (**Patil et al., 2020**). La

dérégulation de l'autophagie a été associée à plusieurs maladies, notamment le cancer, les maladies cardiaques et neurodégénératives (Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016).

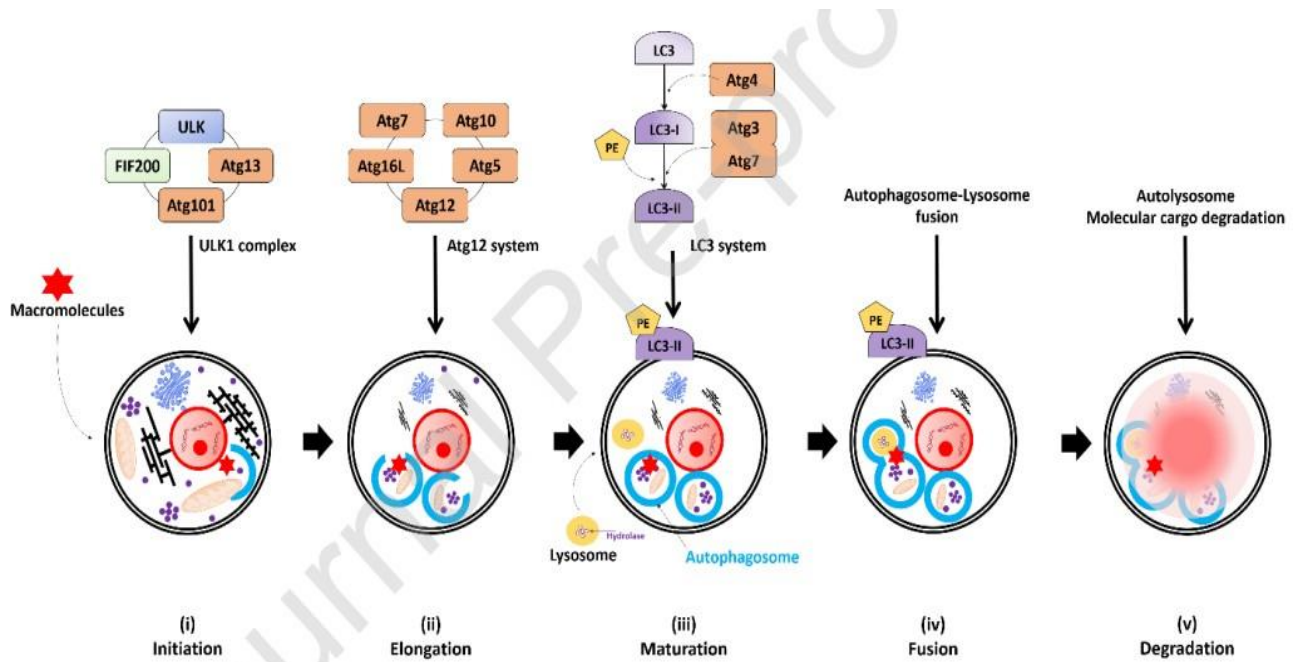


Fig. 12: Mécanisme d'autophagie (Patil et al., 2020).

Le processus d'autophagie comprend cinq étapes: l'initiation, au cours de laquelle les macromolécules ciblent l'autophagosome à double membrane, qui s'active par le complexe ULK1. Ensuite, il y a l'élongation et la maturation de l'autophagosome, qui impliquent deux systèmes de conjugaison : Atg12 et LC3. A la fin, l'autophagosome mature fusionne avec un lysosome pour former un autolysosome. Dans ce dernier, les organites endommagés tels que les protéines, les lipides et les acides nucléiques sont hydrolysés.

Il est conclu par plusieurs résultats de travaux de recherche en toxicologie environnementale que les xénobiotiques sont des générateurs de ROS dans les cellules et les organelles subcellulaires et que le stress oxydatif conséquent est impliqué dans les différents types de mort cellulaire (Samet et Wages, 2018).

## 8. Stress oxydatif

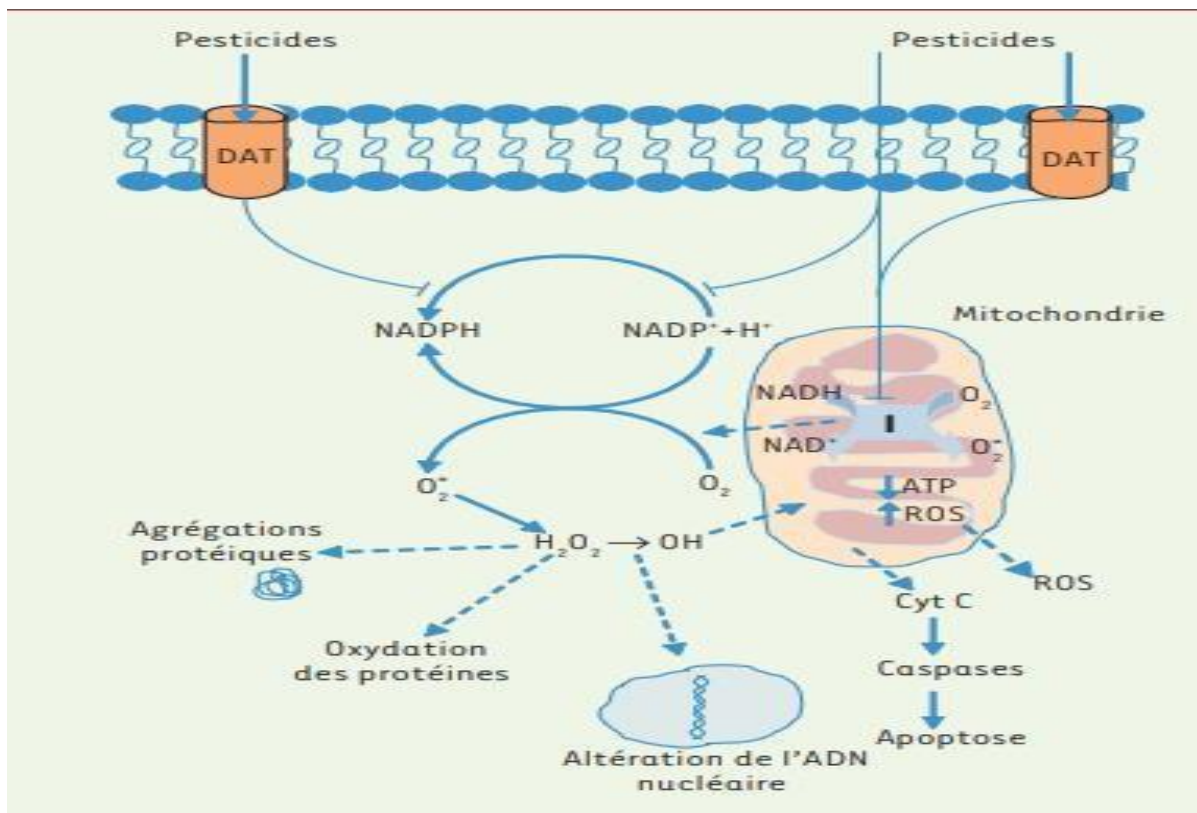
### 8.1.Généralités

Tout déséquilibre en faveur des systèmes pro-oxydants contre les systèmes antioxydants, génère un stress oxydatif se caractérisant par un niveau élevé des ROS, ces derniers sont susceptibles de causer des dommages aux composants cellulaires, notamment les protéines, les lipides et l'ADN. Cela conduit à la perte de leur fonction, donnant ainsi plusieurs



pathologies telles que le diabète, le cancer, les troubles cardiovasculaires et neurodégénératifs (Chandra et al., 2016).

Les radicaux libres se définissent comme des espèces chimiques qui contiennent un électron non apparié sur l'orbite externe, ce qui les rend instables et hautement réactifs et leurs permet d'enlever des électrons aux molécules voisines qui perdent leurs structures natives et donc leurs fonctions, cela favorise des lésions cellulaires. Les ROS sont générés dans des conditions physiologiques normales, comme lors de la phosphorylation oxydative, un processus très important dans nos cellules pour la production d'ATP. Or, ces radicaux libres peuvent être produits suite à l'exposition aux divers facteurs nocifs, notamment les rayons ultraviolets (UV) et les toxiques environnementaux tels que les pesticides (figure 13). Les ROS peuvent également être formées au niveau intracellulaire par l'action de différentes enzymes oxydantes telles que la NADPH oxydase (Nox) qui est très abondante dans les phagocytes, la xanthine oxydase (XO) et les oxydases peroxysomales (Chaitanya et al., 2016).



**Fig. 13:** Implication des pesticides dans la génération mitochondriale des ROS et la détérioration des cellules neuronales (Thany et al., 2013).

## 8.2. Stress oxydant et maladies neurodégénératives

Chaque maladie neurodégénérative est corrélée à l'accumulation de protéines spécifiques tel que  $\beta$ -amyloïde et protéine *Tau* dans le cas de la MA et  $\alpha$ -synucléine pour la MP. Au fil du temps, cette accumulation entraîne une dégénérescence irréversible de la population neuronale sélective (Angelova et Abramov, 2018). De nombreuses études antérieures ont prouvé qu'il existe une relation étroite entre les dommages oxydatifs et les maladies neurodégénératives. Selon Xiang et ses collaborateurs (2013), le stress oxydatif favorise l'agrégation de l' $\alpha$ -syn dans les neurones dopaminergiques, et que l' $\alpha$ -syn génère en outre des ROS intracellulaires. Les ROS et le stress oxydatif jouent également un rôle important dans la MA en ayant un effet délétère sur les biomolécules, en particulier les protéines. L'accumulation d'agrégats de  $\beta$ -amyloïde joue un rôle central dans le déséquilibre oxydatif, ce qui entraîne un dysfonctionnement mitochondrial et une défaillance énergétique, conduisant ainsi à des lésions neuronales (Singh et al., 2019). Les principales caractéristiques qui renforcent la vulnérabilité du cerveau et font de cet organe une cible facile pour les dommages oxydatifs sont sa demande énergétique élevée et son utilisation élevée d'oxygène (~ 20 %), sa richesse en acides gras polyinsaturés qui sont très sensibles à l'oxydation et sa faible capacité anti-oxydante (Garbarino et al., 2015).

## 8.3. Système oxydant-antioxydant

Pour prévenir les effets délétères des ROS, les organismes disposent de deux catégories de molécules antioxydantes : (figure 13)

### 8.3.1. Système antioxydant enzymatique

Les systèmes enzymatiques tels que la SOD existent chez l'Homme sous trois formes: la Cu, Zn-SOD cytosolique (SOD-1), la Mn-SOD (SOD-2) mitochondriale et la SOD extracellulaire (EC-SOD) (Matés et al., 2012). En général, la SOD dismute rapidement l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), ce dernier peut réagir avec  $Fe^{2+}$  par la réaction de Fenton pour former le radical le plus dangereux ( $OH^{\cdot}$ ). Afin d'éviter la concentration létale de peroxyde d'hydrogène, les cellules disposent de CAT et de GPx, d'autres enzymes de piégeage, qui catalysent la conversion de  $H_2O_2$  en molécules inoffensives ( $H_2O$  et  $O_2$ ) (Kim et al., 2015).

### 8.3.2. Système antioxydant non enzymatique

La deuxième catégorie de molécules antioxydantes concerne le groupe non enzymatique, qui comprend le GSH qui fait partie de la défense naturelle de l'organisme ; on sait qu'il joue un rôle central dans le contrôle de l'homéostasie redox. Le GSH est un tripeptide (L- $\gamma$ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine) qui possède un groupe thiol réactif qui lui confère la capacité de piéger les radicaux libres, cette réaction génère le glutathion oxydé (GS-SG), qui peut être recyclé à l'état réduit par la glutathion réductase (GR) dépendante du NADPH (**Pocernich et Butterfield, 2012**).

### 8.3.3. Antioxydants d'origine exogène

Pour prévenir complètement les dommages oxydatifs, la défense antioxydante endogène n'est pas toujours suffisante. Par conséquent, la source exogène est inévitable (**Akhtar et al., 2017**). De nombreuses études démontrent que l'antioxydant naturel est la stratégie la plus sûre pour éliminer les xénobiotiques. La vitamine C et E font également partie de la catégorie non enzymatique antioxydante. Ces vitamines sont connues pour être les meilleurs antioxydants ayant une origine exogène (**Peng et al., 2014**). Elles participent à l'élimination des radicaux libres par le transfert d'électrons et en agissant comme cofacteur pour les enzymes antioxydantes, comme elles protègent les membranes cellulaires contre la peroxydation lipidique (**Kim et al., 2015**). Cependant, plusieurs travaux de recherches ont montré que les phyto-substances ont parfois une activité anti-oxydante remarquable, en l'occurrence on peut citer les polyphénols (**Li et al., 2014 ; Maragò et al., 2015 ; Di Mauro et al., 2019**).

## Chapitre II : Pesticides

## 1. Généralités

### 1.1. Définition

Les pesticides constituent un groupe important de produits chimiques et se retrouvent plus fréquemment dans les cultures agricoles, les produits animaux et même l'environnement. Dans notre vie quotidienne, on est exposé chroniquement d'une manière directe ou indirecte à un mélange de ces produits chimiques par le biais de la consommation d'aliments et d'eau contaminés (**Taghizadeh et al., 2019**). Selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), le terme pesticide désigne tout agent chimique, biologique ou mélange d'agents utilisé pour prévenir, contrôler ou éliminer tout organisme nuisible à la production, à la transformation, au stockage, au transport ou à la commercialisation des produits agricoles (**Kalliora et al., 2018**). L'utilisation intensive des pesticides dans l'agriculture pour répondre à la demande alimentaire soulève des inquiétudes quant à la sécurité du consommateur. Outre que les avantages immédiats offerts par la méthode de lutte chimique, il existe des inconvénients à long terme, notamment l'accumulation de résidus dans les cultures, le développement d'une résistance chez les organismes ciblés, des effets néfastes sur les organismes non ciblés, ainsi que des risques pour l'environnement et la santé humaine (**Yigit et Velioglu, 2020**). Des études récentes ont établi un lien entre les pesticides et les aberrations chromosomiques, le stress oxydatif et la modification de l'activité des enzymes impliquées dans l'apoptose, ce qui pourrait accroître le risque de plusieurs maladies, à savoir les dysfonctionnements cognitifs et les maladies neurodégénératives(**figure 14**), (**Iqubal et al., 2020**).

### 1.2. Classification

Il existe trois catégories principales pour classer les pesticides : Classification selon la structure chimique, classification basée sur les organismes nuisibles qu'ils ciblent et la troisième se base sur le mode d'entrée (**Alengebawy et al., 2021**).

#### 1.2.1. Classification selon la structure chimique des pesticides

La méthode la plus répandue et la plus utile pour classer les pesticides consiste à les répertorier en fonction de leur structure chimique et de la nature de leurs matières actives. Cette catégorie est basée sur les caractéristiques physiques et chimiques du pesticide. Elle permet de déterminer la méthode d'application appropriée, le dosage et les précautions à prendre lors de l'application. Chaque classe chimique contient plusieurs sous-classes qui sont

répertoriées en fonction de leurs propriétés toxicologiques et de leur composition chimique (Yadav et Devi, 2017).

### 1.2.2. Classification en fonction des organismes ciblés

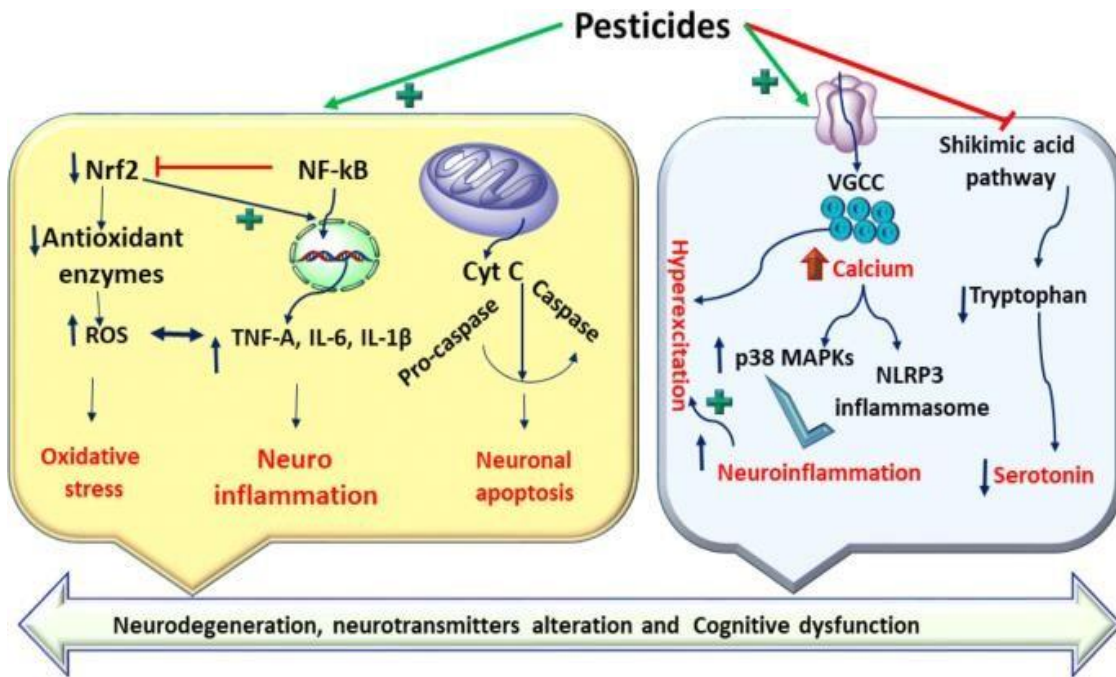
Ce type de classification désigne les pesticides par des noms distincts qui décrivent leurs actions. Les noms de cette catégorie proviennent du terme latin "cide", qui signifie "tueur" et qui est ajouté au nom de l'organisme nuisible ciblé (**figure 15**) (Hassaan et El Nemr, 2020).

### 1.2.3. Classification selon le mode d'entrée

Les modes de pénétration font référence aux différentes méthodes par lesquelles les pesticides entrent en contact avec la cible. Cette catégorie comprend les pesticides systémiques, de contact stomacaux, les fumigants et les répulsifs (**tableau 1**) (Yadav et Devi, 2017).

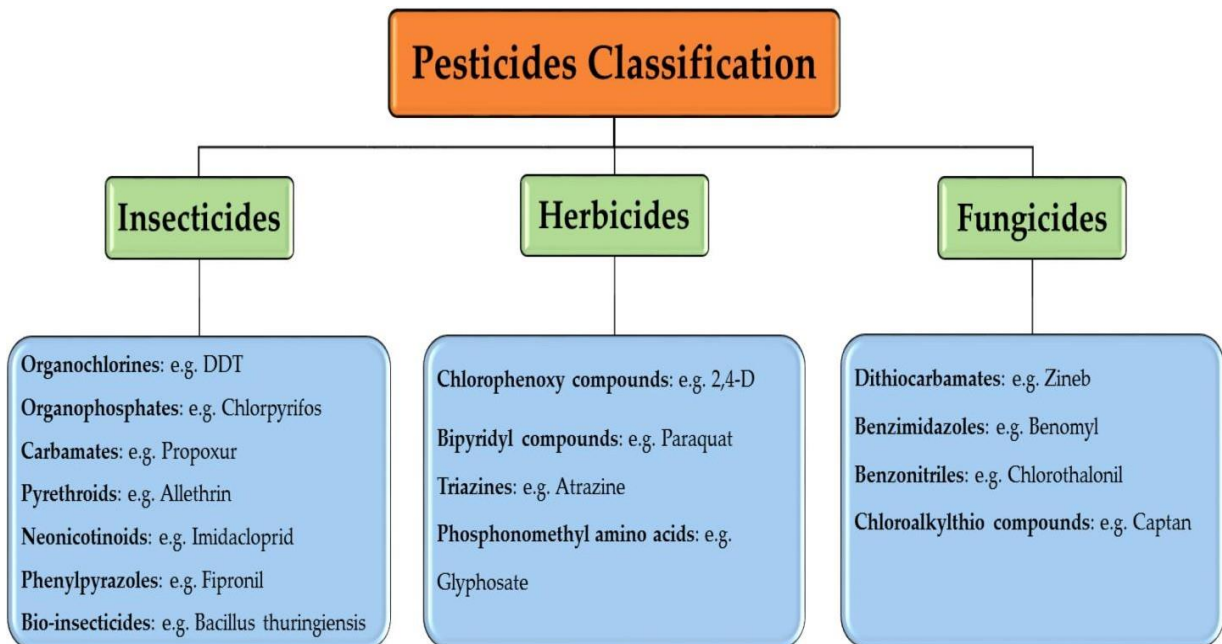
## 1.3. Modes d'exposition aux pesticides

L'exposition aux pesticides implique plusieurs voies. En effet, ces substances peuvent pénétrer dans l'organisme par contact cutané, ingestion et inhalation. La voie respiratoire ou cutanée étant celle à laquelle sont essentiellement exposés les professionnels, producteurs et utilisateurs. A ces deux voies se rajoute la pénétration par voie orale qui est due à l'ingestion d'aliments ou de boissons contenant des résidus de pesticides, elle peut être également liée au fait de manger, de boire ou de fumer avec des mains contaminées. Les cultures sont souvent traitées avec plusieurs types de pesticides pour protéger contre une variété de ravageurs, ce qui rend plus probable l'exposition de la population générale à un mélange de résidus (**Bourbia-Ait Hamlet, 2013**). Par conséquent, l'effet combiné de ce cocktail peut entraîner une interaction conjointe entre les produits chimiques modifiant ainsi l'absorption, la biotransformation, la distribution et l'élimination de l'un sur les autres et provoquant par la suite l'apparition de nouveaux métabolites qui pourront être plus dangereux en comparaison avec la préparation de base, ce qui rend la question du risque pour l'écologie et la santé humaine encore plus grave (**Aouey et al., 2017**).



**Fig. 14 :** Neurotoxicité causée par les pesticides : mécanismes et effets ((Iqubal et al., 2020).

L'exposition aux pesticides entraîne une diminution de Nrf2, un facteur qui contrôle l'expression des gènes antioxydants, une augmentation de NF-kB (protéine impliquée dans la réponse immunitaire et la réponse au stress cellulaire) et l'ouverture des canaux calciques. Ce qui provoquera par la suite le stress oxydatif, la neuro-inflammation, l'apoptose neuronale et la réduction des niveaux de sérotonine. TNF-A facteur de nécrose tumorale.



**Fig. 15 :** Classification des différents types de pesticides (Alengebawy et al., 2021).

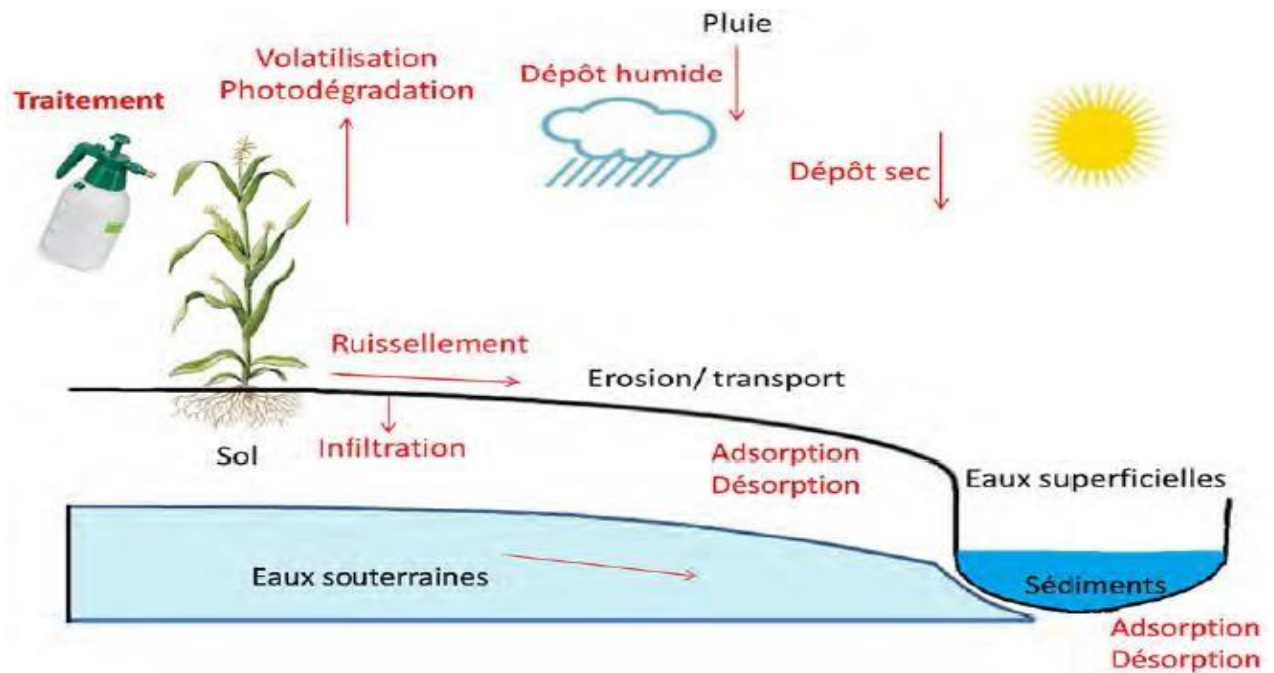
**Tab.1:** Classification des pesticides en fonction de leurs mode d'entrée (Yadav et Devi, 2017 ; Alengebawy et al., 2021).

Mode d'entrée dans la cible	Définition	Exemple
Pesticides systémiques	Pesticides absorbés puis acheminés via la sève vers toutes les parties de la plante non traitées.	Imidaclopride
Pesticides de contact	Pesticides non systémiques, ils agissent seulement lorsqu'ils entrent en contact direct avec les organismes nuisibles ciblés.	Paraquat
Empoisonnement de l'estomac	Ils pénètrent dans l'organisme ciblé via son système digestif provoquant ainsi sa mort par empoisonnement.	Malathion
Les répulsifs	Ils n'ont pas d'effets mortels, ils font que repousser les ravageurs.	Methylantranilate
Les fumigants	un type de pesticide qui fonctionne en générant des vapeurs. Lorsqu'ils sont appliqués, ils produisent des gaz nocifs qui peuvent pénétrer dans l'organisme visé via son système respiratoire, entraînant ainsi sa mort par empoisonnement.	1,3-dichloropropene

#### 1.4. Devenir des pesticides dans l'environnement

Les pesticides sont largement utilisés dans l'agriculture moderne car ils jouent un rôle crucial dans la protection des cultures (Kushwaha et al., 2016). Cependant, plusieurs études ont montré que leur utilisation présente un risque potentiel pour l'environnement en raison de leur capacité à s'accumuler dans différents compartiments tels que l'eau, le sol, l'air et les plantes, ainsi que de leur persistance et de leurs effets à long terme sur les organismes vivants. Lors du traitement des cultures, une partie considérable du pesticide est volatilisée dans l'atmosphère et peut ensuite être décomposée sous l'effet des rayons solaires, pour se retrouver de nouveau à la surface de la terre. En fonction des propriétés physico-chimiques des pesticides appliqués, tels que la solubilité, le coefficient de distribution octanol/eau ( $K_{ow}$ ) et la demi-vie, ainsi que des conditions météorologiques, les métabolites de ces produits chimiques peuvent contaminer le sol, les eaux de surface et les eaux souterraines et s'accumuler dans les plantes et les graisses animales, marquant ainsi leur présence tout au long de la chaîne alimentaire (figure 16), (Andreu et Picó, 2012).





**Fig. 16:** Devenir des pesticides dans les différents compartiments de l'environnement (Bonvallot, 2014).

## 2. Pyréthrinoïdes

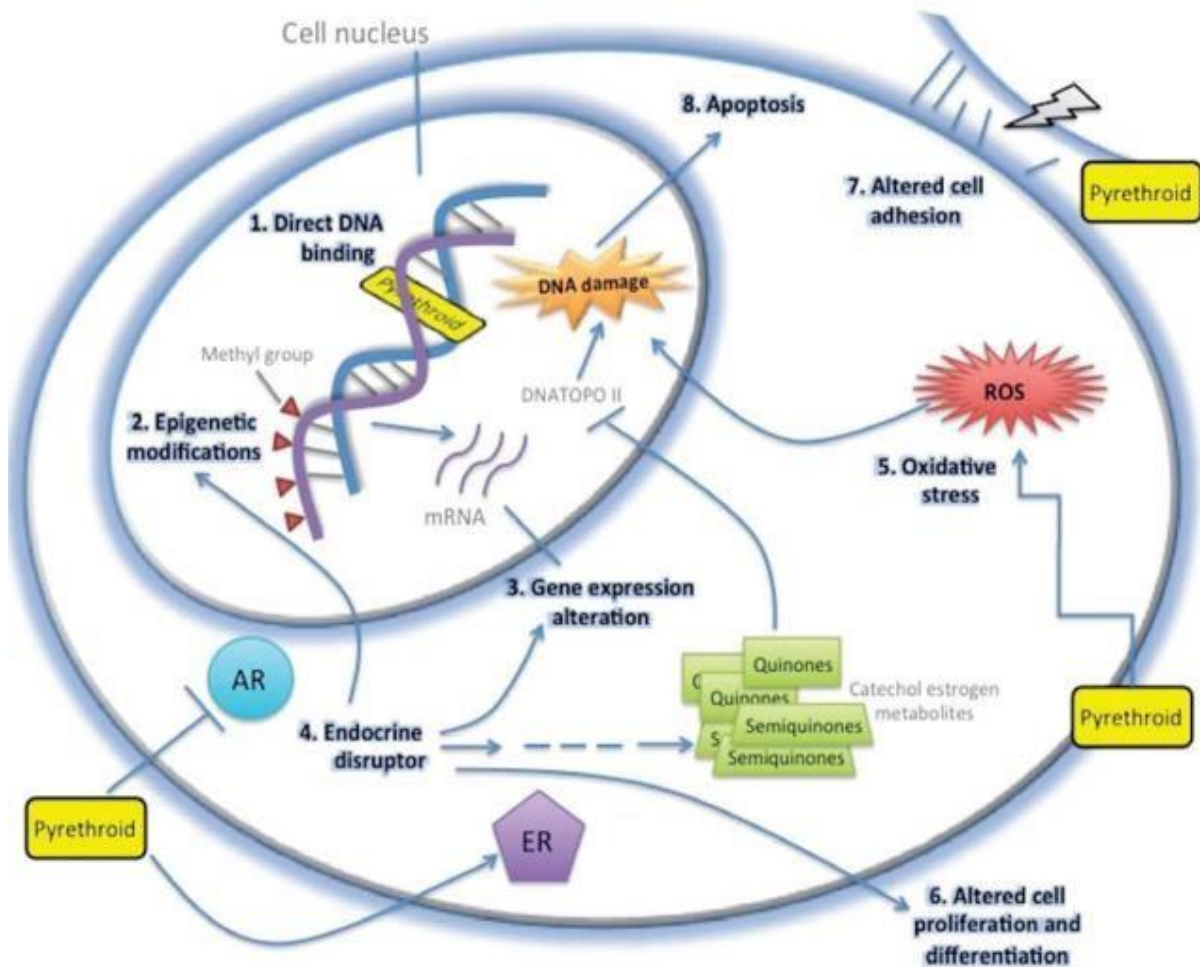
### 2.1. Généralités

Parmi les différentes classes de pesticides, les insecticides ont été accusés d'avoir le plus d'effets délétères sur la santé humaine car ils sont conçus pour cibler les récepteurs tels que les canaux ioniques et les enzymes des insectes qui sont très similaires à ceux que l'on trouve chez l'Homme (Igho et Afoke, 2014). Les pyréthrinoïdes, insecticides organiques synthétiques, utilisés depuis les années 80 (Tang et al., 2018), ils sont des dérivés des pyréthrines, que certaines plantes produisent naturellement, comme le *Tanacetum cinerariaefolium* et le *Chrysanthemum cinerariifolium*. Chimiquement parlant, ils dérivent des acides et des alcools de l'acide de chrysanthemum (ethyl 2,2-dimethyl-3-(1-isobutenyl) cyclopropane-1-carboxylate). Ces insecticides sont connus par la rapidité de se dégrader dans l'environnement à des températures, des niveaux de lumière et d'humidité appropriés, ce qui fait de cette classe une alternative prometteuse des pesticides conventionnels (Frag et al., 2021). Bien que ces pesticides aient un potentiel de pollution plus faible que les pesticides

classiques, mais ils peuvent toujours pénétrer par le processus de bioamplification dans le corps des animaux, où ils sont absorbés par les tissus adipeux et restent persistants dans la chaîne alimentaire pour de longues périodes (**Mahmood et al., 2016**). La présence des pyréthrinoïdes ne se limite pas au domaine agricole, mais ces produits chimiques sont également présents dans les shampooings et les crèmes pour la peau. Selon une étude récente, les pyréthrinoïdes altèrent un large éventail de fonctions biologiques, l'exposition chronique à cette classe de pesticides, même à faible dose, peut avoir des effets toxiques sur différents systèmes, notamment le système nerveux, immunitaire, et cardiovasculaire (**Tang et al., 2018**). En plus de se lier directement à l'ADN, ces produits chimiques créent des changements épigénétiques, perturbant la fonction endocrinienne et augmentant le stress oxydatif (**figure 17**). Ces réponses biologiques pourraient être liées aux propriétés cancérigènes de ces insecticides (**Navarrete-Meneses et Pérez-Vera, 2019**).

## 2.2. Classification

La classe des pyréthroïdes se divise en deux groupes; les pyréthrinoïdes de type I (dépourvus du groupement cyano) tels que la perméthrine et l'alléthrine, ce groupe est moins persistant dans l'environnement avec une demi-vie de quelques heures en surface ; les pyréthrinoïdes de type II, ce type est de la deuxième génération, doté d'un groupement alpha-cyano, tels que la cyperméthrine, le fenvalérate et la deltaméthrine, ce groupe est conçu pour améliorer la photostabilité avec une demi-vie de dizaines à des centaines de jours. Les pyréthrinoïdes sont classés comme des neurotoxiques visant les axones du système nerveux central et périphérique en interagissant avec les canaux sodiques des insectes (**Zhu et al., 2020**).



**Fig. 17:** Effets moléculaires des pyrèthroïdes (Navarrete-Meneses et Pérez-Vera, 2019).

1. Interagissent directement avec l'ADN. 2. induisent des modifications au niveau d'ADN tels que la méthylation, ainsi que d'autres altérations épigénétiques. 3. Modifient l'expression des gènes. 4. Interfèrent avec les récepteurs d'œstrogène (ER) et d'androgène (AR), entraînant la production de quinones et de semiquinones susceptibles d'endommager l'ADN. 5. Génèrent des ROS. 6. Perturbent la prolifération et la différenciation, probablement en perturbant les récepteurs AR et ER. 7. Affectent l'adhésion cellulaire. 8. Déclenchent l'apoptose par une augmentation des dommages à l'ADN.

### 2.3. Exemple des pyrèthrinoïdes : Cyperméthrine (CYP)

Au cours des deux dernières décennies, la CYP ((R,S)-alpha-cyano-3-phenoxybenzyl(1R)-cis,trans-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-diméthylcyclopropane-carboxylate) a été l'un des pesticides les plus utilisés dans le monde (Farag et al., 2021). Ce pyrèthrinoïde contient des atomes de chlore (figure 18) qui améliorent son activité insecticide et sa stabilité. Par conséquent, la présence de cet halogène dans ce produit chimique augmente le risque d'effets négatifs sur l'environnement (Richterova et al., 2015).

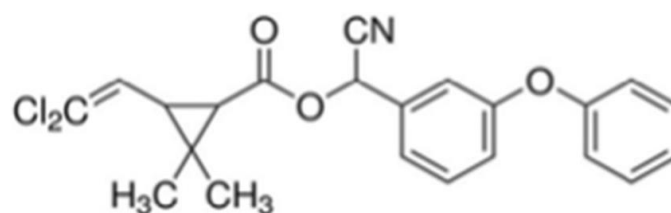
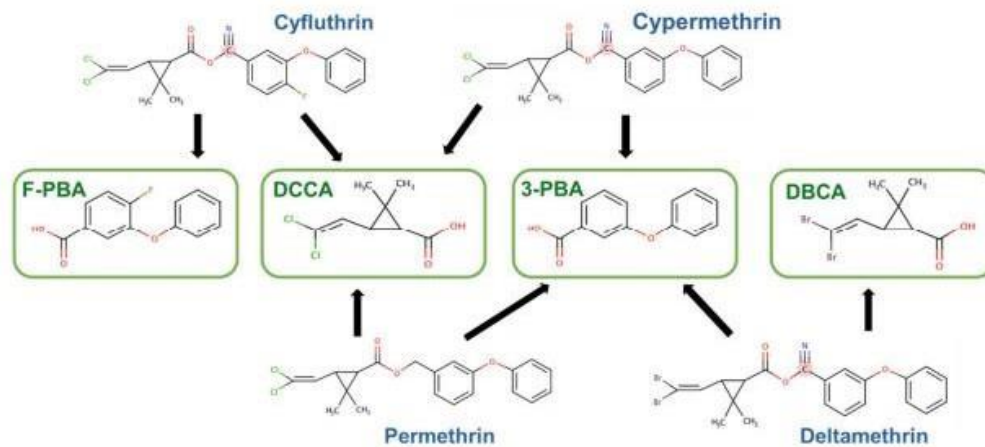


Fig. 18 : Structure de la CYP (Kanyika-Mbewe et al., 2020).

### 2.3.1. Toxicocinétique de la CYP

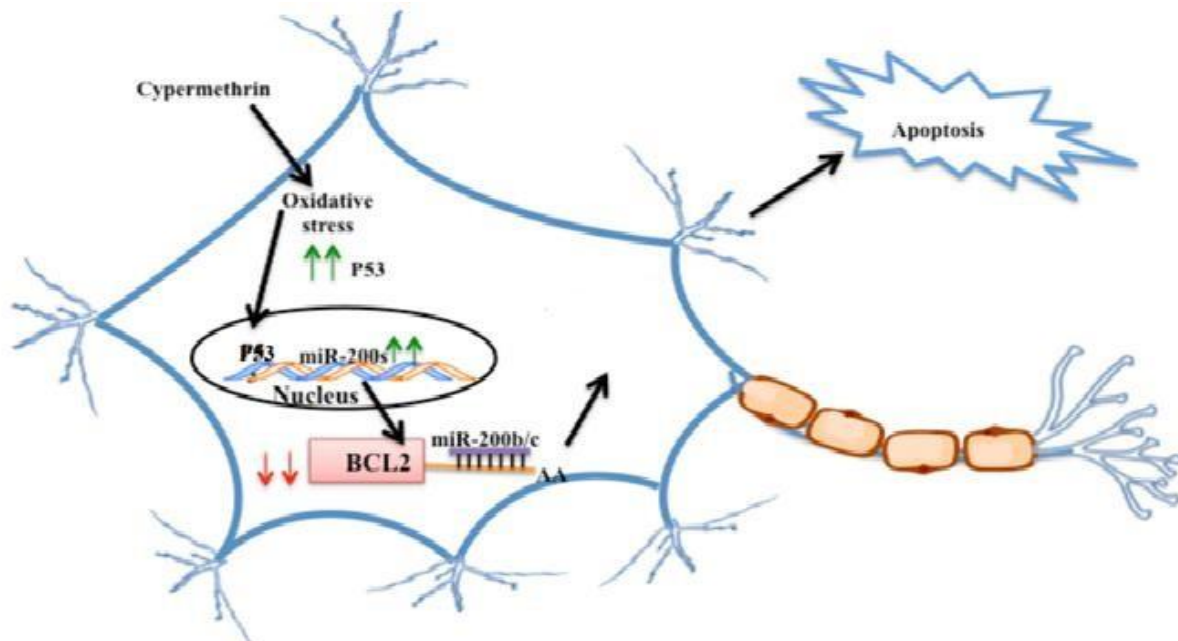
En raison de sa nature lipophile, la CYP a tendance à s'accumuler dans le système nerveux et le tissu adipeux (Eraslan et al., 2017). Comme elle a également la capacité de traverser la barrière placentaire (Hassouna, 2020) et d'être excrétée dans le lait maternel (Laugeray et al., 2017). L'hydrolyse des esters et l'oxydation représentent les principales voies métaboliques des pyréthroïdes, qui sont toutes deux assurées par des carboxyl estérases et plusieurs isoformes de la famille du cytochrome P<sub>450</sub> (Navarrete-Meneses et Pérez-Vera, 2019). Généralement, la présence de pyréthrinoïdes est évaluée en analysant les niveaux de cinq métabolites excrétés dans les urines. Ces métabolites (figure 19) sont l'acide 3-phénoxybenzoïque (3-PBA), l'acide cis- et trans-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-diméthylcyclopropane-1-carboxylique (cis-DCCA et trans-DCCA), l'acide 4-fluoro-3-phénoxybenzoïque (F-PBA) et l'acide 3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-diméthylcyclopropane carboxylique (DBCA) (Tang et al., 2018). Selon des études in vitro menées sur des cellules animales et humaines, le métabolisme de la CYP se fait dans le foie et donne naissance au cis- et trans-DCCA, ainsi que le 3-PBA. Le moment de l'apparition de ces métabolites et leur élimination de l'organisme dépend de la voie d'exposition. En cas d'ingestion, les pics des niveaux de métabolites devraient être observés environ 8-9 heures après exposition, et l'élimination qui est majoritairement urinaire devrait être pratiquement complète après 48-72 heures. En cas d'inhalation, les concentrations maximales devraient se produire plus rapidement et la majeure partie de la CYP absorbée (plus de 75 %) devrait être éliminée au bout de 2 à 3 jours (Ratelle et al., 2015).



**Fig. 19:** Pyréthriinoïdes et leurs métabolites (Quindroit et al., 2021).

### 2.3.2. Neurotoxicité de la CYP

La lipophilie de la CYP lui permet de traverser facilement la barrière hémato-encéphalique ce qui renforce la plausibilité d'effets sur le cerveau en provoquant des dommages oxydatifs par la production des radicaux libres et la réduction du pouvoir antioxydant (Farag et al., 2021). Les pyréthriinoïdes sont connus pour avoir des effets indésirables sur les neurones en inhibant l'AChE (Chourasiya et Mahobiya, 2020). La neurotoxicité de la CYP se manifeste par un comportement agressif, des mouvements non coordonnés et dysfonctionnement des neurotransmetteurs. Ces troubles comportementaux pourraient être dus à l'effet antagoniste de la CYP sur les récepteurs aminobutyrique (GABA). Ce pyréthriinoïde a la capacité d'inhiber le transport des ions chlorure et de moduler l'activité des canaux calciques voltage-dépendants (Ali et al., 2020). La CYP empêche également la fermeture de la porte ionique du canal sodique ce qui prolongera le passage du sodium et la dépolarisation de la membrane, perturbant ainsi la transmission de l'influx nerveux. Après avoir pénétré dans les cellules nerveuses, la CYP produit des cyanohydrines qui sont ensuite décomposées en cyanures et en aldéhydes. Ce processus génère des ROS, qui à leur tour induisent une peroxydation des lipides (LPO) et augmentent les niveaux de calcium cytosolique ( $\text{Ca}^{++}$ ), entraînant ainsi une cytotoxicité et une génotoxicité (figure 20) dans les organismes ciblés (Chourasiya et Mahobiya, 2020).



**Fig. 20:** Présentation schématique du rôle de la famille miR-200 dans l'apoptose des cellules PC12 induite par la CYP (Pandey et al., 2015).

Les pyréthrinoïdes sont connus pour provoquer un stress oxydatif chez les animaux du laboratoire et dans des conditions *in vitro*. Les résultats d'exposition des cellules PC12 (un excellent modèle pour l'étude de la neurotoxicité développementale) à 100 $\mu$ M de la CYP pendant 3 jours ont montré une augmentation significative des niveaux d'ARNm et de protéines P53, un facteur de transcription qui régule l'apoptose neuronale en réponse aux neurotoxines. L'augmentation des niveaux de P53 a joué un rôle dans la surexpression de la famille miR-200 qui sont des molécules d'ARN régulatrices, dont il a été démontré qu'elles régulent la neurogenèse dans le cerveau adulte et en développement. Cette surexpression a significativement inhibé l'expression d'ARNm et de la protéine BCL2 provoquant ainsi l'apoptose.

### 2.3.3. Neurotoxicité développementale de la CYP

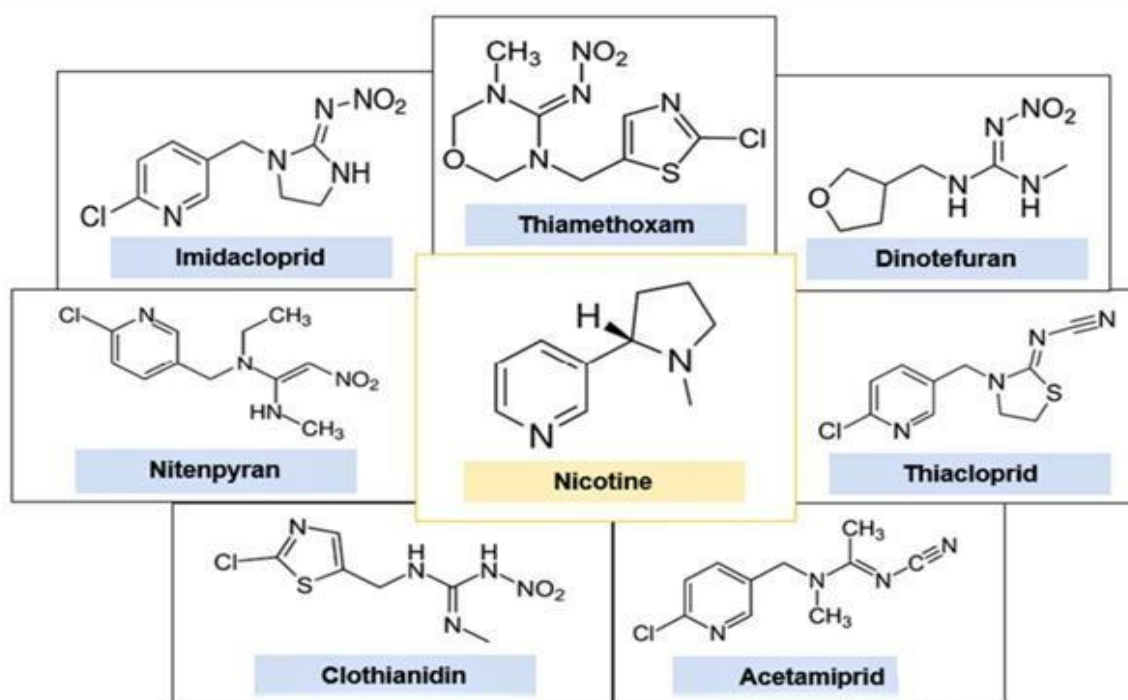
Plusieurs études épidémiologiques ont signalé que l'exposition aux pyréthrinoïdes pendant la grossesse a des effets neurotoxiques sur le cerveau en développement, qui s'exprime par un retard de développement neurocognitif chez les enfants (Viel et al., 2015). Shelton et al. (2014) ont rapporté que l'exposition aux pyréthrinoïdes au cours du troisième trimestre de grossesse augmente la probabilité d'avoir des enfants autistes. Les travaux de Wagner-Schuman et ses collaborateurs (2015) mettent également en cause les pyréthrinoïdes dans le trouble déficitaire de l'attention avec hyperactivité. Les résultats d'une étude *in vivo* montrent que l'exposition transplacentaire à la CYP à une dose de 25 mg/kg de p.c du 15 jusqu'au 21<sup>ème</sup> jour de gestation, induit une astroglie et une microglie dans le cortex cérébral des rats issus des mamans traitées, ce qui correspond à des perturbations de la perméabilité au

niveau de la barrière hémato-encéphalique et à un certain degré d'inflammation dans le cortex cérébral (**Hassouna, 2020**).

### 3. Néonicotinoïdes

#### 3.1. Généralités

Les néonicotinoïdes sont des dérivés synthétiques de la nicotine (**figure 21**). Ils font partie des pesticides les plus populaires dans le monde en raison de leur grande efficacité sur les espèces d'insectes nuisibles, de leur longue persistance ; assurant ainsi de longues périodes de protection et de leur nature systémique qui signifie que le pesticide est présent dans toutes les parties de la plante, ce qui facilite le contrôle d'un large spectre de nuisibles (**Sgolastra et al., 2020**). Néanmoins, de nombreuses études ont prouvé que ces propriétés présentent de nombreux risques ; les résidus de néonicotinoïdes ne peuvent pas être simplement éliminés en raison de leur caractère systémique (**Abreu-Villaça et Levin, 2018**). Après des utilisations répétées, la plupart de ces pesticides et leurs métabolites sont connus pour être persistants dans le sol et les sédiments aquatiques (**Anadón et al., 2020**). De plus, ces composés chimiques ont été détectés dans des zones adjacentes à leur point d'application, ce qui signifie que ces pesticides ne sont pas sélectifs et provoquent des effets néfastes sur les plantes non ciblées et les organismes bénéfiques tels que les abeilles. Par conséquent, ces menaces ont incité l'Union Européenne à interdire l'utilisation de trois néonicotinoïdes (clothianidine, imidaclopride et thiaméthoxame) en 2013 (**Hladik et al., 2018**). De nombreux auteurs ont indiqué qu'il a été prouvé que cette classe de pesticides endommageait divers tissus, notamment le cerveau (**Gasmi et al., 2017**), les reins (**Erdemli et al., 2020**) et le foie (**Sriapha et al., 2020**).



**Fig. 21:** Structures chimiques de la nicotine et des insecticides néonicotinoïdes (Costas-Ferreira et Faro, 2021).

### 3.2. Exemple de néonicotinoïdes : Imidaclopride (IMID)

L'IMID (1[(6-chloro-3-pyridinyl) methyl]-N-nitro-2-imidazolidinimine) (**figure 22**) est l'un des principaux néonicotinoïdes actuellement présent sur le marché (**Anadón et al., 2020**), membre du sous-groupe chloronicotinyl nitroguanidine et il a été conçu pour imiter structurellement la nicotine. Ce composé chimique a été découvert en 1985 et en 1991, il a été produit comme le premier néonicotinoïde à usage commercial (**Ding et al., 2013**). Il a été démontré que l'IMID persiste dans le sol pendant de nombreux mois à des années en raison de sa forte solubilité dans l'eau et de sa nature assez peu volatile, ce qui entraîne son accumulation dans l'environnement où il peut affecter les organismes non ciblés (**Li et al., 2019**).



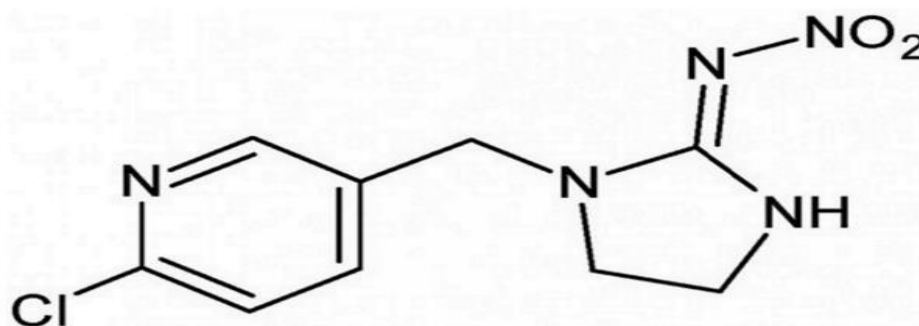


Fig. 22: Structure de l'IMID (Leiva et al., 2017).

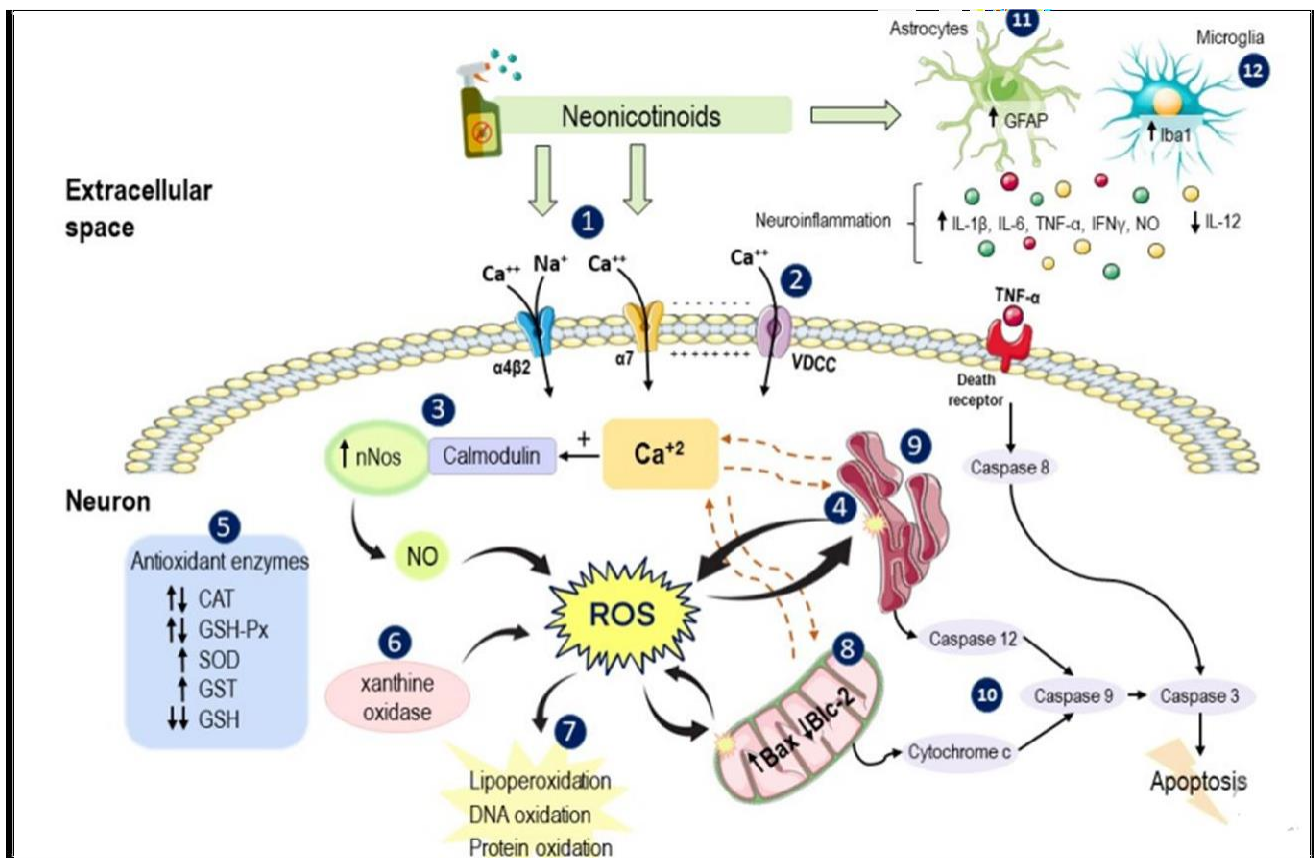
### 3.2.1. Toxicocinétique de l'IMID

Les néonicotinoïdes et leurs métabolites ont un faible coefficient de partage octanol-eau et sont solubles dans l'eau. Après une prise orale, cette classe de pesticides est bien absorbée (92 %) par le tractus intestinal de manière active, et de manière plausible par la peau et les voies aériennes. Chez les mammifères, les néonicotinoïdes une fois absorbés sont rapidement métabolisés dans le foie par le cytochrome P<sub>450</sub> et l'aldéhyde oxydase. Les métabolites issus de cette phase subissent par la suite une conjugaison à savoir une conjugaison du glutathion, de glycine et la glucuronidation. Le métabolisme des néonicotinoïdes peut se produire partout où le cytochrome P<sub>450</sub> et l'aldéhyde oxydase sont exprimés, par exemple dans les globules rouges, le placenta et le cerveau (Marfo et al., 2015). Le métabolisme de ces produits chimiques pourrait donner lieu à des métabolites plus dangereux que le pesticide lui-même ; le desnitroimidaclopride faisant partie de ces métabolites toxiques, en raison de son efficacité également comme agoniste des nAChRs des mammifère (Ichikawa et al., 2019). L'excrétion de ces composés se fait principalement dans l'urine en raison de leur faible poids moléculaire et de leur hydrosolubilité, qui leur permet de traverser librement le glomérule (Marfo et al., 2015).

### 3.2.2. Neurotoxicité de l'IMID

Les néonicotinoïdes agissent spécifiquement sur les insectes en inhibant le mécanisme de transmission de leur système nerveux central par l'activation des nAChRs. Cependant, il a été démontré que l'exposition à cette classe de pesticides a également un effet négatif sur le sous-type  $\alpha 4\beta 2$  nAChR des mammifères (Zheng et al., 2020). En raison de l'activation persistante de ces récepteurs par l'IMID, l'acétylcholine s'accumule bloquant ainsi la voie neuronale nicotinergique, ce qui entraîne la paralysie et la mort (Kara et al., 2015). En association avec l'activation des nAChRs cérébraux, divers neurotransmetteurs clés sont

libérés, notamment la dopamine, le glutamate, la sérotonine et le GABA (acide  $\gamma$ -aminobutyrique) (Anadón et al., 2020). D'après les résultats de l'étude cas-témoins réalisée par Marfo et ses collaborateurs, (2015), les néonicotinoïdes sont fortement associés à des symptômes typiques, notamment neurologiques à savoir la perte de mémoire récente et le tremblement des doigts. Les travaux de Lonare et al. (2014) indiquent que l'exposition des rats à l'IMID pour une durée de 28 jours à des doses de 45 et 90mg/kg p.c induit des lésions cérébrales en diminuant le pouvoir antioxydant et en augmentant la peroxydation lipidique (figure 23).



**Fig.23:**Principaux mécanismes de neurotoxicité des néonicotinoïdes (Costas-Ferreira et Faro, 2021)

(1) Les néonicotinoïdes induisent l'activation des récepteurs de sous-type  $\alpha 4\beta 2$  et  $\alpha 7$ , (2) une augmentation de l'influx de  $Ca^{+2}$ , une dépolarisation de la membrane et l'ouverture du VDCC. (3) Le  $Ca^{+2}$  peut se lier à la calmoduline, augmentant ainsi la synthèse de NO et la production de ROS, (4) comme il peut également se lier aux récepteurs de la ryanodine du RE, augmentant encore ses concentrations dans le cytosol. (5) Les néonicotinoïdes modifient également l'activité de plusieurs enzymes antioxydantes, (6) augmentent l'activité de la xanthine oxydase. Par conséquent, (7) l'augmentation des niveaux de ROS entraîne une peroxydation lipidique et une oxydation d'ADN et des protéines, (8) affectent gravement les mitochondries (9) et le RE, (10) activant ainsi deux voies différentes d'apoptose cellulaire. (11) Les néonicotinoïdes activent également les astrocytes et (12) les microglies, avec une augmentation de la GFAP et de l'Iba1, et une libération de cytokines pro-inflammatoires. Certaines de ces dernières, (13) comme le TNF- $\alpha$ , peuvent se lier aux récepteurs de mort et déclencher l'apoptose neuronale.

### 3.2.3. Neurotoxicité développementale de l'IMID

Selon plusieurs études, les contaminants environnementaux exercent leur impact négatif sur la grossesse et la santé embryonnaire en faisant intervenir plusieurs voies, notamment la perturbation des systèmes de signalisation hormonale, la régulation épigénétique des gènes, ainsi que le déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les voies de détoxification qui ne sont pas entièrement développées au début de la gestation, ce qui rend le fœtus en développement très vulnérable aux dommages oxydatifs, provoquant ainsi une altération irréversible des macromolécules cellulaires, un dysfonctionnement mitochondrial et une apoptose (Al-Gubory, 2014). Les résultats de **Passoni et ses collaborateurs (2021)** montrent des niveaux détectables d'IMID et de ses métabolites dans le cerveau des souris issues des mères traitées avec des doses allant de 0,118 mg/kg/jr à 41 mg/kg/jr entre le 6<sup>ème</sup> et le 9<sup>ème</sup> jour de gestation, ce qui suggère la capacité de l'IMID à traverser la barrière hémato-encéphalique et le placenta.

# Matériels et méthodes

### I. Matériels et méthodes

#### 1. Présentation du sujet

Dans cette présente étude, nous nous sommes focalisés sur deux pesticides largement utilisés dans la région de Bejaïa, à savoir la Cyperméthrine (CYP), un membre de la famille des pyréthriinoïdes, et l'Imidaclopride (IMID), un dérivé synthétique de la nicotine (néonicotinoïde). Les doses ont été choisies en se référant aux résultats de **Jallow et al. (2017)** qui ont trouvé 1,2 mg/kg de résidus d'IMID dans le concombre et de **Skretteberget al. (2015)** qui a trouvé 6.7 mg/kg de résidu de la CYP dans la menthe poivrée.

Il faut également noter que dans la première partie de notre étude, nous avons utilisé un flavonoïde très répandu dans le thé vert, à savoir la catéchine, afin d'évaluer son effet préventif et cytoprotecteur contre une exposition chronique à l'IMID. Selon plusieurs études antérieures, la dose de 20mg/kg de catéchine produisait de meilleurs effets protecteurs dans le traitement de différents types de lésions cérébrales (**Uzun et al., 2010 ; Kalender et al., 2012**), c'est pourquoi cette dose a été choisie dans la présente étude. Pour convertir la concentration des pesticides dans le concombre et la menthe poivrée en dose quotidienne dans les études expérimentales sur les animaux, nous avons utilisé un facteur de conversion qui est de 0,05 chez les rats (**EFSA, 2011**).

#### 2. Produits chimiques

La plupart des produits chimiques utilisés dans cette étude ont été achetés chez Sigma Aldrich, Allemagne. COMMANDO est le nom commercial de l'IMID, acheté auprès de la société VAPCO, Jordanie. CYRUX est le nom commercial de la CYP, acheté auprès de la société UPL Limited, Inde.

#### 3. Entretien des animaux

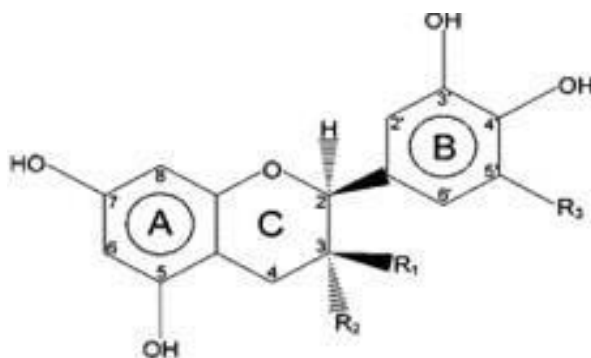
Des rats *albinos Wistar* d'environ 200g ont été fournis par l'institut Pasteur d'Alger. Dès leur réception, les animaux ont été placés dans des cages pour une période d'acclimatation de deux semaines. Ils ont été maintenus dans des conditions de température et d'humidité standards, d'une température de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  et d'une hygrométrie d'environ 60%, avec un cycle périodique (lumière /obscurité) de 12 heures. Les rats ont eu un accès libre à la nourriture et à l'eau. Tous les essais expérimentaux ont été réalisés conformément aux directives internationales pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire.

Cette étude a été réalisée en deux parties dans le but de cerner la nature et l'intensité des effets de deux pesticides largement utilisés et le pouvoir préventif de la catéchine chez le rat.

#### 4. Traitement des animaux

##### Partie I: Altérations cognitives et mitochondriales dans le striatum et l'hippocampe de rat exposés à l'imidaclopride : rôle protecteur des catéchines

Dans un 1er temps, une étude a été réalisée dans le but d'examiner les effets d'une exposition chronique à l'IMID sur le comportement, l'activité cholinestérasique et les réponses au stress oxydatif, dans deux zones principales du cerveau du rat (striatum et hippocampe), ainsi que le rôle protecteur d'un flavonoïde largement présent dans le thé vert, il s'agit de la catéchine (**figure 24**). Plusieurs études ont montré que, grâce à ses propriétés antioxydantes, la catéchine a la capacité de moduler la neurotoxicité ; en protégeant les cellules nerveuses contre les dommages oxydatifs, elle a également la capacité d'améliorer la fonction cognitive en augmentant la plasticité synaptique et la formation de nouvelles connexions entre les neurones. Cela peut aider à prévenir ou à atténuer les déficits cognitifs associés aux maladies neurodégénératives (**Ahmed et al., 2013 ; Teixeira et al., 2013**).

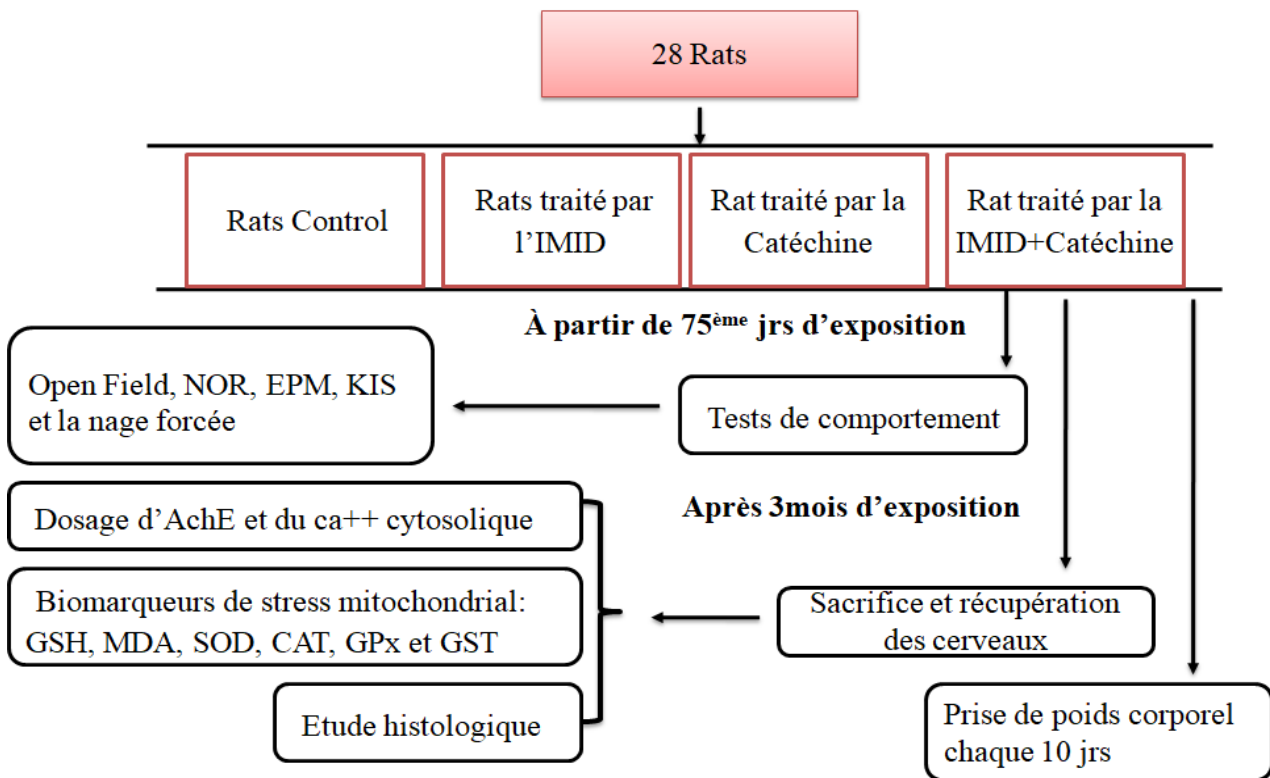


**Fig.24** : Structure de base des catéchines

Dans cette partie, l'IMD et la catéchine ont été mises en suspension dans de l'huile de maïs et administrés par voie orale pendant 3 mois à des doses de 1,2 mg/kg/jour et 20 mg/kg/jour, respectivement. Les rats ont été répartis au hasard en quatre groupes (**figure 25**) :

- groupe témoin recevant seulement 1 ml d'huile de maïs ;
- groupe C recevant 20 mg/kg de catéchine ;
- groupe IMID recevant 1,2 mg/kg d'imidaclopride ;
- groupe IMID + C recevant une combinaison (IMID à 1,2 mg/kg/jour et catéchine à 20 mg/kg/jour).

La prise de poids des rats est effectuée tous les 10 jours durant toute la phase du traitement dans le but d'évaluer l'effet des xénobiotiques étudiés.



**Figure. 25 :** Schéma récapitulatif du protocole expérimental (fenêtre adulte)

**Partie II: Etude neurocomportementale et évaluation des troubles mitochondriaux dans les régions cérébrales de la progéniture (F1, F2) après exposition de rates gestantes et allaitantes à de faibles doses d'imidaclopride et de cyperméthrine**

Deuxièmement, une autre étude a été réalisée dans le but d'évaluer l'effet de l'IMID et de la CYP, soit seuls ou en mixture, au regard de deux périodes d'importance majeure dans le développement précoce du système nerveux, la gestation et l'allaitement, et les conséquences potentiellement persistantes ou retardées survenant à l'âge adulte et au cours des générations. Après deux semaines d'habituation à l'animalerie, les femelles ont été mises en reproduction avec des mâles (2;1). Le lendemain, les rattes ont été examinées par la mise en évidence de la présence des spermatozoïdes au niveau du vagin; ce qui annonce le premier jour gestationnel G1. Après la fécondation, 4 femelles (F0) ont été placées individuellement dans des cages. Par la suite elles ont été réparties en 4 groupes d'exposition (**figure 26**) :

- Groupe témoin recevant de l'huile de maïs ;
- Groupe IMID recevant 1,2 mg/kg d'IMID ;
- Groupe CYP recevant 6,7 mg/kg de CYP ;

- Groupe Mixture (MIX) recevant un mélange (IMID à 1,2 mg/kg/jour et CYP 6,7 mg/kg/jour).

Dans cette étude, l'IMD et la CYP ont été dissous dans de l'huile de maïs et administrés par voie orale depuis le 1<sup>er</sup> jour de gestation jusqu'au 21<sup>ème</sup> jour d'allaitement. Les femelles adultes de la génération F1 (descendants de mères F0) ont été accouplés avec des mâles (non exposés aux pesticides) pour générer la génération F2.

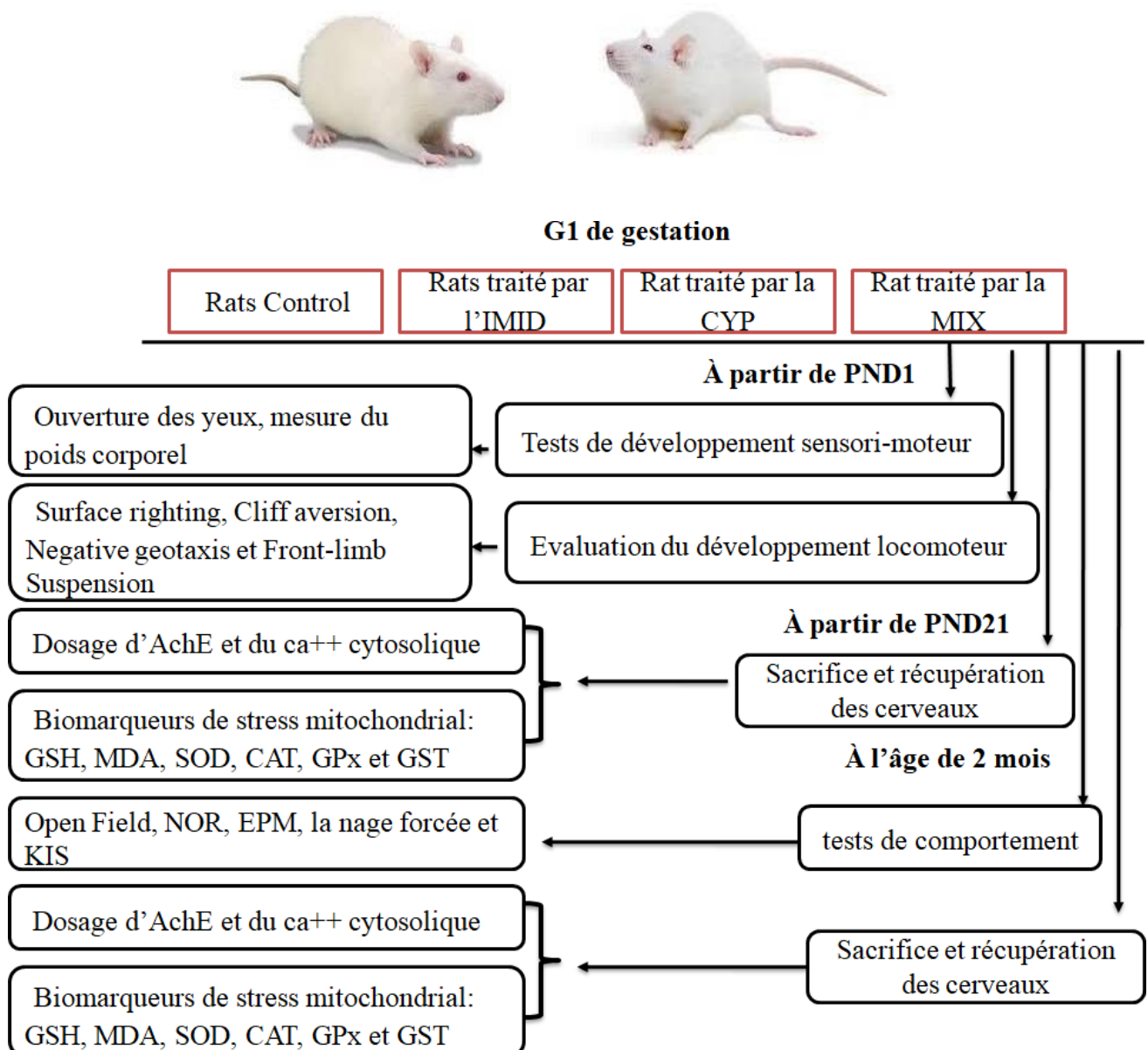


Fig. 26 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental (fenêtre pré et postnatal)



## 5. Analyse comportementale

### *Tests de développement sensori-moteur*

A la naissance, l'ouverture des yeux a été surveillée et le poids corporel a été mesuré du 1<sup>er</sup> au 21<sup>ème</sup> jour de l'âge postnatal.

### *Evaluation du développement locomoteur*

#### Le réflexe de retournement (surface righting)

Du 3<sup>ème</sup> au 5<sup>ème</sup> jour de l'âge postnatal, le réflexe de retournement a été réalisé comme décrit par **Peiffer (2011)**. Ce test consiste à placer le raton sur son dos sur une planche horizontale, l'animal va ensuite essayer de se retourner en se balançant à droite et à gauche. Dans ce test, le temps qu'il faut pour que le raton se remette sur ses quatre pattes est chronométré (**figure 27**).



**Fig. 27** : Test de retournement (surface righting)

### Cliff aversion

Du 5<sup>ème</sup> au 7<sup>ème</sup> jour de l'âge postnatal, Cliff aversion (**figure 28**) teste le réflexe, la force et la coordination du jeune rat. Dans ce test, la tête et les pattes antérieures du raton sont positionnés au bord d'une boîte plate surélevée. Deux essais consécutifs sont effectués pour chaque raton qui sera noté par des points en comptant le temps qu'il lui faut pour s'éloigner du bord (**Peiffer, 2011**).

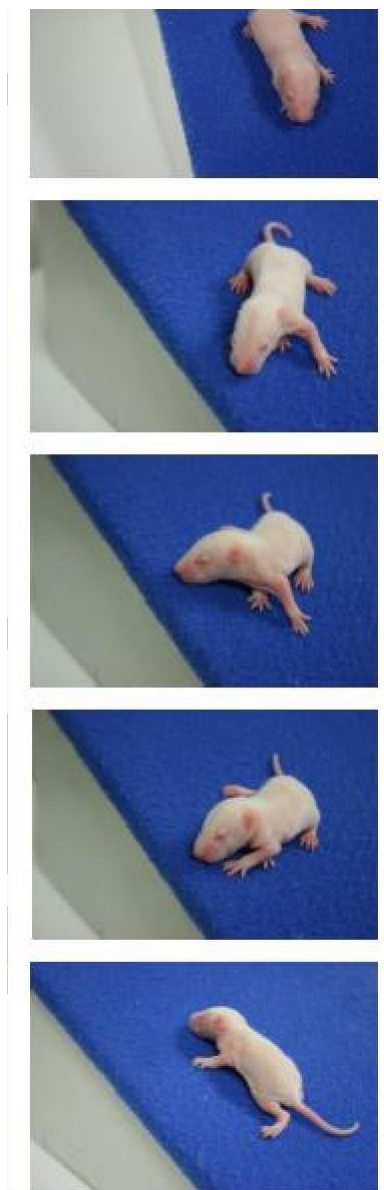


**Fig. 28** : Cliff aversion

### Negative geotaxis

Du 7<sup>ème</sup> au 9<sup>ème</sup> jour de l'âge postnatal, negative geotaxis (**figure 29**) est effectué pour évaluer la coordination motrice, en comptant le temps qu'il faut pour qu'un raton placé sur une pente de

45° avec sa tête dirigée vers le bas de se tourner 180 ° vers le haut (**Feather-Schussler et Ferguson, 2016**).



**Fig. 29** : Negative geotaxis

*Test de suspension (force musculaire)*

Du 10<sup>ème</sup> au 13<sup>ème</sup> jour de l'âge postnatal, front-limb Suspension (**figure 30**) test reflète la force et la coordination musculaire. Il consiste à accrocher les pattes antérieures du raton sur un fil métallique tendu sur un objet stable, en enregistrant le temps total jusqu'à sa chute (**Albina et al., 2005**).



**Fig. 30 :** Test de suspension (force musculaire)

### *Tests du comportement à l'âge adulte*

À partir du 75<sup>ème</sup> jour d'exposition (fenêtre adulte) et 60<sup>ème</sup> jours (fenêtre pré et post-natal), une étude neurocomportementale a été réalisée dans le but d'évaluer la neurotoxicité des deux pesticides étudiés, l'IMD (1,2 mg/kg/jour) et la CYP (6.7 mg/kg/jour) inhérente aux états d'anxiété, d'activité locomotrice, de la mémorisation, l'apprentissage et la force musculaire par différents tests (Open Field, Elevated plus maze, Test de reconnaissance de nouveaux objets (NOR), la nage forcée et Konziela's inverted screen). Ainsi que d'évaluer l'efficacité de l'administration de catéchine dans la prévention des dommages en l'occurrence chez la première partie (fenêtre adulte).

#### Test Open Field (OF)

Ce test est conçu pour évaluer le niveau d'anxiété et pour mesurer l'activité locomotrice (**Riebe et Wotjak, 2012**). L'appareil à champ ouvert est un carré entouré de parois transparentes ; le sol de l'appareil est divisé en 25 carrés égaux (**figure 31**). Selon la méthode décrite par **Tatem et al. (2014)**, le rat a été placé au centre de l'appareil et laissé l'explorer librement pendant 5 min. L'appareil a été nettoyé entre chaque test avec de l'éthanol. Dans cette étude, les schémas comportementaux mesurés sont l'ambulation et le rearing, qui sont considérés comme des indicateurs des activités locomotrices et exploratoires, respectivement.



**Fig. 31:** Test de champ ouvert (open field)

Test d' Elevated Plus Maze (EPM)

Le dispositif EPM se présente sous la forme d'une croix élevée à une hauteur de 50 cm du sol (**figure 32**). Le dispositif est composé de quatre bras, deux bras ouverts et deux bras fermés avec des parois de 30 cm de hauteur. Selon la méthode décrite par **Baldo et Petersén (2015)**, la durée du test est de 5 minutes et commence lorsque le rat est placé au centre du dispositif. Un animal qui reste confiné dans les bras fermés a été considéré comme un comportement anxieux.

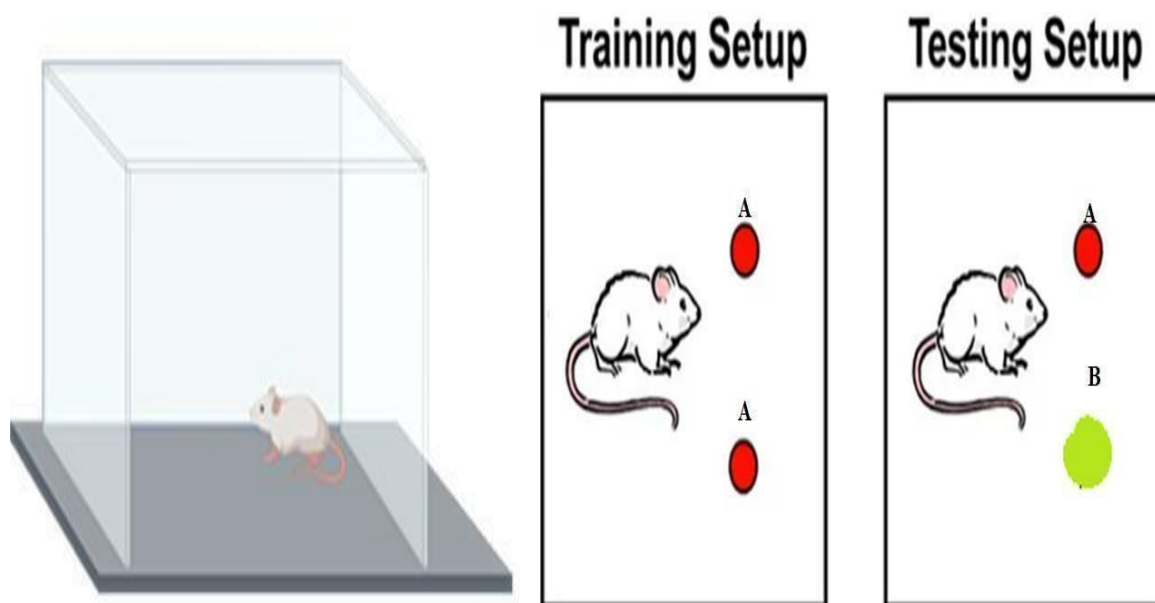


**Fig. 32:** Test d'Elevated Plus Maze (EPM)

Test de reconnaissance de nouveaux objets (NOR)

Le test NOR est basé sur le fait que les rongeurs passent plus de temps à explorer un objet nouveau qu'un objet familier. Selon la méthode décrite par **Antunes et Biala (2011)**. Ce test est réalisé en trois phases : la première étape est la phase d'adaptation pendant laquelle le rat est placé dans le dispositif pendant 5 minutes.

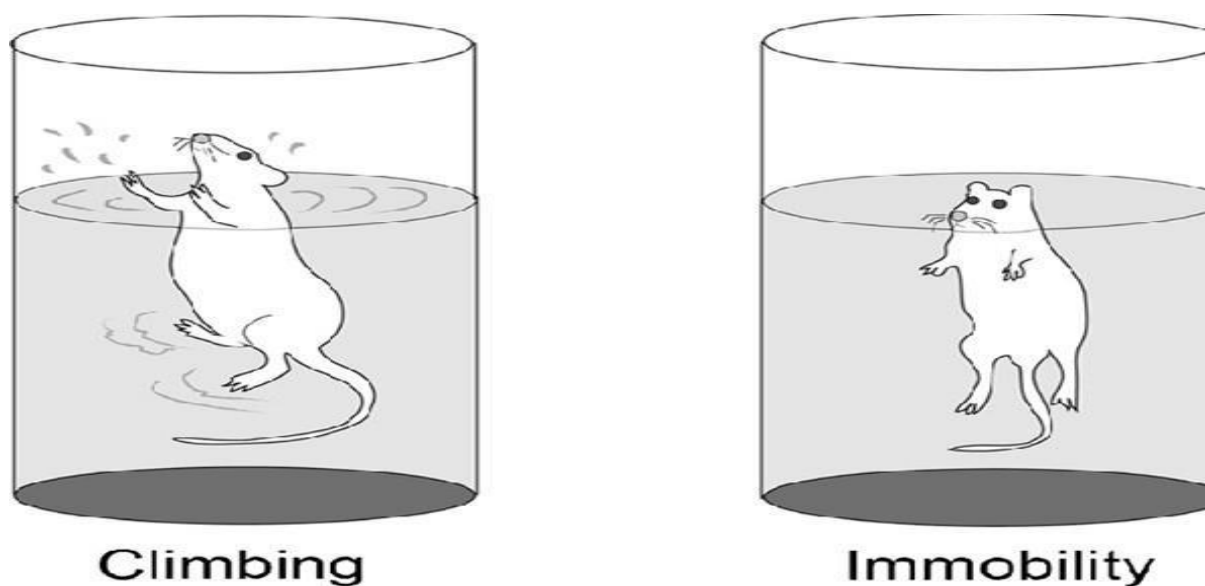
Le lendemain, pendant une période de 10 minutes, le rat est autorisé à explorer et à se familiariser avec deux objets similaires positionnés côte à côte dans le dispositif ; c'est la phase de familiarisation. La troisième étape est la phase de test au cours de laquelle le rat a été laissé explorer deux objets de couleurs différentes : l'objet familier A et le nouvel objet B (**figure 33**). La mesure dépendante était le pourcentage de temps que le rat passait à explorer le nouvel objet par rapport au temps total d'exploration des deux objets. La procédure a été filmée pour calculer l'indice de reconnaissance IR [ $RI = 100 \times (tB/tA + tB)$ ].



**Fig. 33** : Test de reconnaissance de nouveaux objets (NOR)

#### Test de la nage forcée

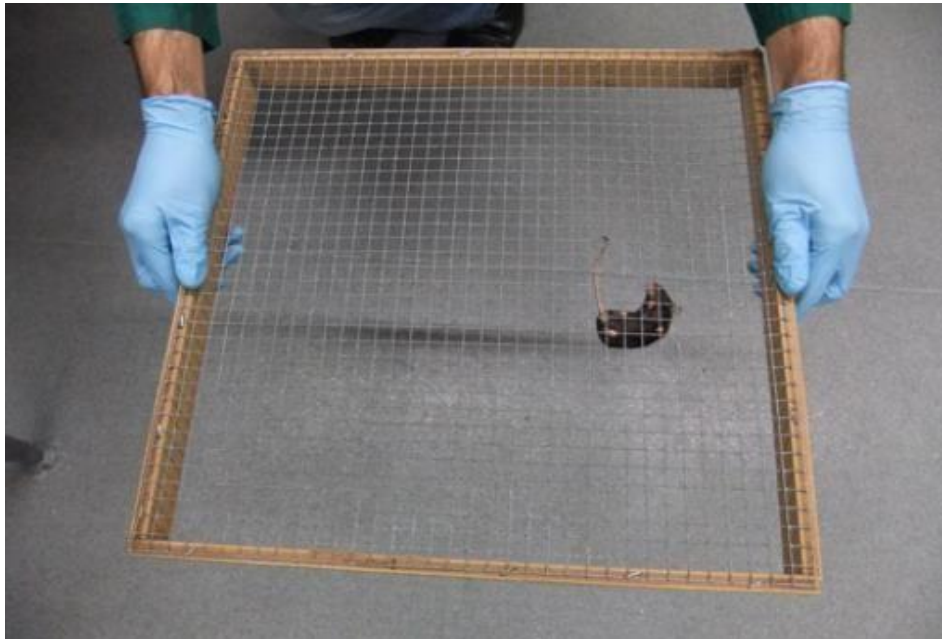
Le test de nage forcée est fréquemment utilisé pour examiner le comportement dépressif. Selon la méthode décrite par **Porsolt et al. (1978)**, l'animal est placé dans un réservoir de 56 cm de haut et 30 cm de large remplie d'eau (25 °C) pendant cinq minutes. La hauteur de l'eau a été ajustée de façon à ce que les membres inférieurs de l'animal ne touchent pas le fond du réservoir pour l'empêcher de s'échapper, le soumettant ainsi à une nage forcée. Dans cette étude, le comportement des rats a été filmé et le temps d'immobilisation a été suivi (**figure 34**).



**Fig. 34** : Test de la nage forcée

### Konziela's inverted screen (KIS)

Basé sur la méthode conçue par **Deacon (2013)**, le test de Konziela's inverted screen évalue la force des animaux, ainsi que leur capacité à maintenir l'équilibre pendant l'inversion. Le test est réalisé en plaçant le rat au centre d'un écran métallique poreux avec des bordures en bois (**figure 35**). Si ce temps est compris entre 1 et 10 s, le rat prend la note 1 ; s'il est compris entre 10 et 26 s, il prend la note 2 ; entre 26 et 60, il prend la note 3.



**Fig. 35:** Test de konziela's inverted screen

## 6. Analyses biochimiques

Après 3 mois d'exposition (fenêtre adulte) ou en phase juvénile G1, adulte G1, juvénile G2 et adulte G2 (fenêtre pré et postnatale), les rats ont été sacrifiés par décapitation après une anesthésie profonde à l'éther ; les cerveaux ont été récupérés et immédiatement lavés avec une solution saline phosphatée froide (PBS), puis disséqués pour séparer le striatum et l'hippocampe. Ces tissus régionaux du cerveau ont été utilisés pour évaluer l'effet des pesticides utilisés et de la catéchine sur le statut redox mitochondrial, l'intégrité et perméabilité membranaire de cet organite, ajouté à cela, une étude histologique chez la fenêtre adulte.



6.1. Séparation de la matrice mitochondriale du striatum et de l'hippocampe

L'extraction des fractions mitochondriales a été réalisée selon la méthode décrite par **Sahu et al. (2014)**. Brièvement, l'hippocampe et le striatum sont immergés et homogénéisés dans un tampon TSE (10mM tris, 250mM sucrose, 0,1mM EDTA, pH 7,2 à 4C°) pour obtenir un tissu homogène à 10%. L'homogénat récupéré est centrifugé à 600g /10min afin d'éliminer les gros débris cellulaires. Le surnageant résultant de cette centrifugation est récupéré puis centrifugé à 10 000g/10min. Le surnageant résultant est considéré comme la fraction cytosolique, et le culot est remis en suspension dans le tampon TS (10mM tris, 250mM saccharose, PH 7.2) puis centrifugé à 10,000g/10min. Le culot résultant de cette dernière centrifugation, considéré comme étant la fraction mitochondriale, est remis en suspension dans le tampon de stockage (250mM sucrose, 50mM tris, PH 7.2) qui sera utilisé directement pour l'évaluation de l'intégrité structurale et fonctionnelle des mitochondries ; le reste est conservé à -20° C pour les analyses ultérieures. Afin de faire éclater les mitochondries et de récupérer la matrice mitochondriale, nous avons procédé à une congélation-décongélation successive associée à une homogénéisation environ 8 fois ; puis, nous avons effectué une centrifugation à 10.000 g/10 min. Le surnageant obtenu a été considéré comme la source mitochondriale de MDA, GSH, CAT, GST, GPx et SOD (**figure 36**).

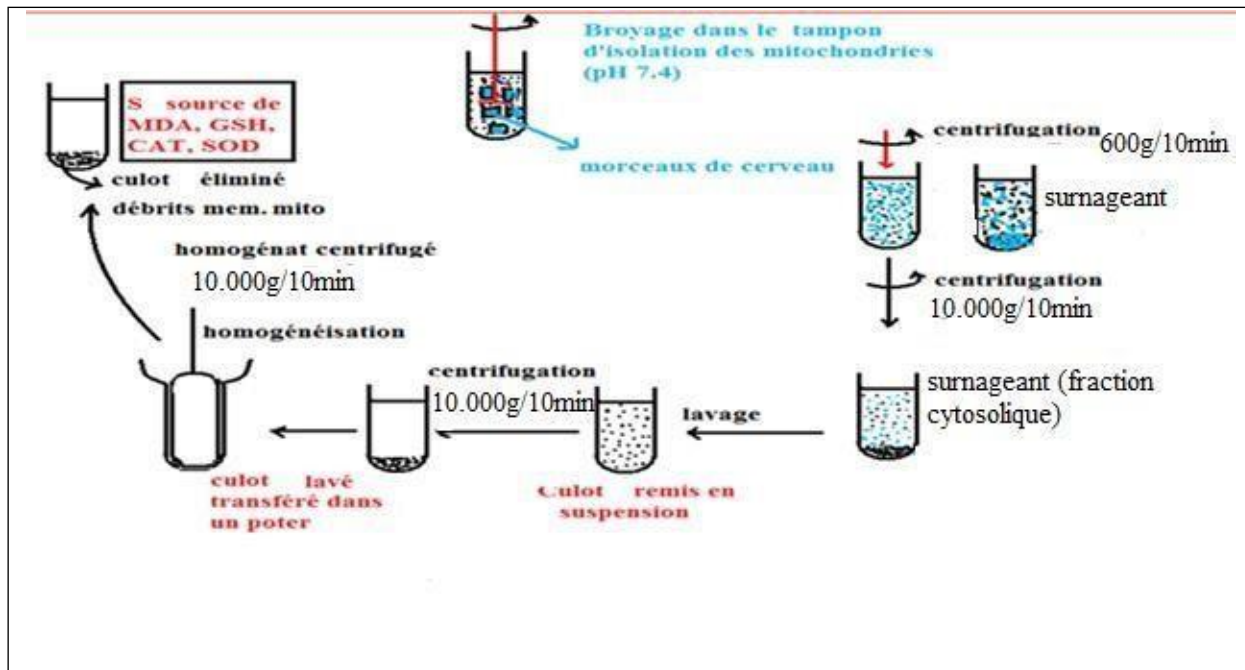


Fig. 36 : Préparation de la suspension et extraction de la matrice mitochondriale

### **6.2. Détermination de l'activité de l'AChE et du calcium cytosolique**

- L'activité d'AChE a été estimée selon la procédure **d'Ellman et al. (1961)**, en utilisant l'acétylthiocholine comme substrat 100µl d'échantillon cytosolique ont été ajoutés à 100µl de DTNB (0,1M, pH 8) + 1ml de tampon tris (0,1M, pH 7). Une fois la réaction stable, 100µl de substrat d'acétylthiocholine ont été ajoutés. L'absorbance a été suivie à 412 nm sur 4 min pendant 20 min. L'activité d'AChE a été exprimée en UI/mg de protéine.

- Les niveaux de calcium dans le cytosol ont été mesurés en suivant les recommandations d'un kit commercial (SPINREACT, Espagne).

### **6.3. Évaluation du gonflement et de la perméabilité mitochondriale**

Le gonflement des mitochondries a été évalué dans le striatum et l'hippocampe en utilisant la méthode de **Li et al (2014)** où l'absorbance des mitochondries isolées à partir de tissus frais à 4°C est surveillée à une longueur d'onde de 540 nm. La diminution de l'absorbance indique un gonflement des mitochondries, qui est le résultat de la perte du pore de transition de perméabilité mitochondrial (MPTP). La perméabilité mitochondriale a été évaluée selon la méthode conçue par **Kristal et al (1996)** ; cette technique est basée sur le taux de passage du Ca<sup>++</sup> suivi d'une augmentation de la taille des mitochondries détectée toutes les 30s pendant 3 min à 540 nm.

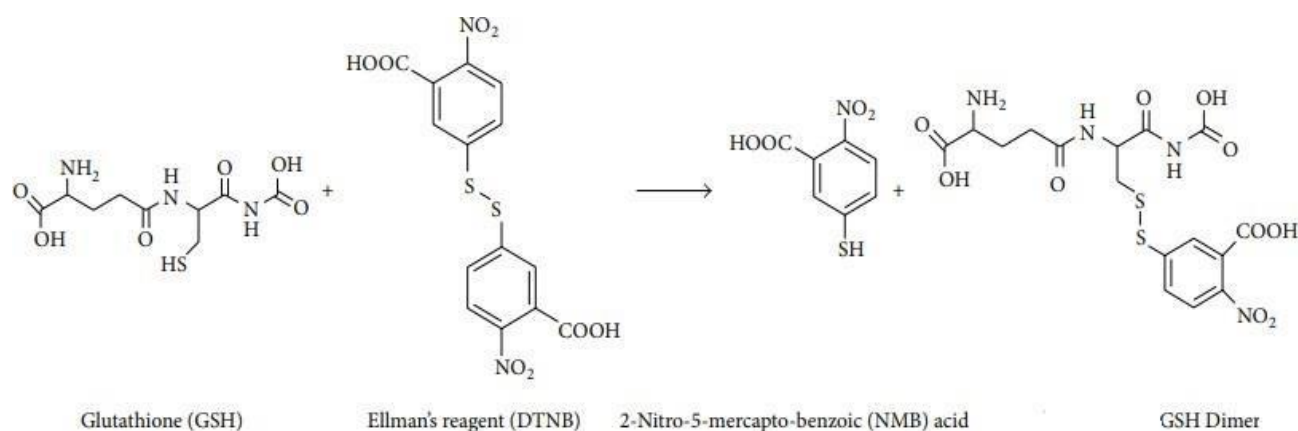
### **6.4. Évaluation des marqueurs du statut redox dans les mitochondries du striatum et de l'hippocampe**

#### **6.4.1. Détermination du taux de glutathion (GSH)**

La concentration en glutathion a été mesurée par la méthode **d'Ellman (1959)**. Le dosage est basé sur l'évaluation de la réduction du réactif d'Ellman (DTNB) par les groupes (SH) en formant l'acide 2-nitro-mercaptobenzoïque (**Gasmi, 2018**) (**figure 39**). Ce dernier est caractérisé par une coloration jaune intense, ce qui permet sa quantification spectrophotométrique à 412 nm.

50 µl d'acide trichloracétique (TCA) (10%) + 50 µl de matrice mitochondriale sont centrifugés à 1400g / 2min. On prélève 50 µl du surnageant auquel on ajoute 1 ml de tampon phosphate (PH= 8) et 20 µl de DTNB (acide 5,5`-dithio-bis-2-nitrobenzoïque) (0,01M). Après 15 minutes d'incubation, la lecture de la densité optique a été effectuée à 412 nm par rapport au blanc de réactif préparé dans les mêmes conditions. Les concentrations du glutathion réduit

sont exprimées en mmol/ml. Elles sont déduites à partir d'une gamme étalon de glutathion préparée dans les mêmes conditions que le dosage (**Annexe 2**).



**Fig.37:** Réaction du réactif d'Ellman avec le glutathion (**Appala et al., 2016**).

#### 6.4.2. Détermination du taux d'acide malondialdéhyde (MDA)

Le MDA est l'un des produits terminaux de la décomposition des acides gras polyinsaturés sous l'effet des ROS libérés au cours du stress (**figure 38**), et peut donc être considéré comme un marqueur de la peroxydation lipidique. Dans cette présente étude, les niveaux de MDA ont été évalués selon la méthode de **Niehius et Samuelson (1968)**. Le principe de cette technique est basé sur la condensation de MDA en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique (TBA), pour former un pigment rose (**figure 39**). 0,5 ml de l'échantillon a été traité avec 2 ml d'un réactif composé de (TBA 37%, TCA 15%, HCl 0,25N), le mélange résultant a été incubé dans un bain-marie à 100°C pendant 15 min puis refroidi et centrifugé pendant 10 min, l'absorbance du surnageant formé a été mesurée par un spectrophotomètre à 532 nm.

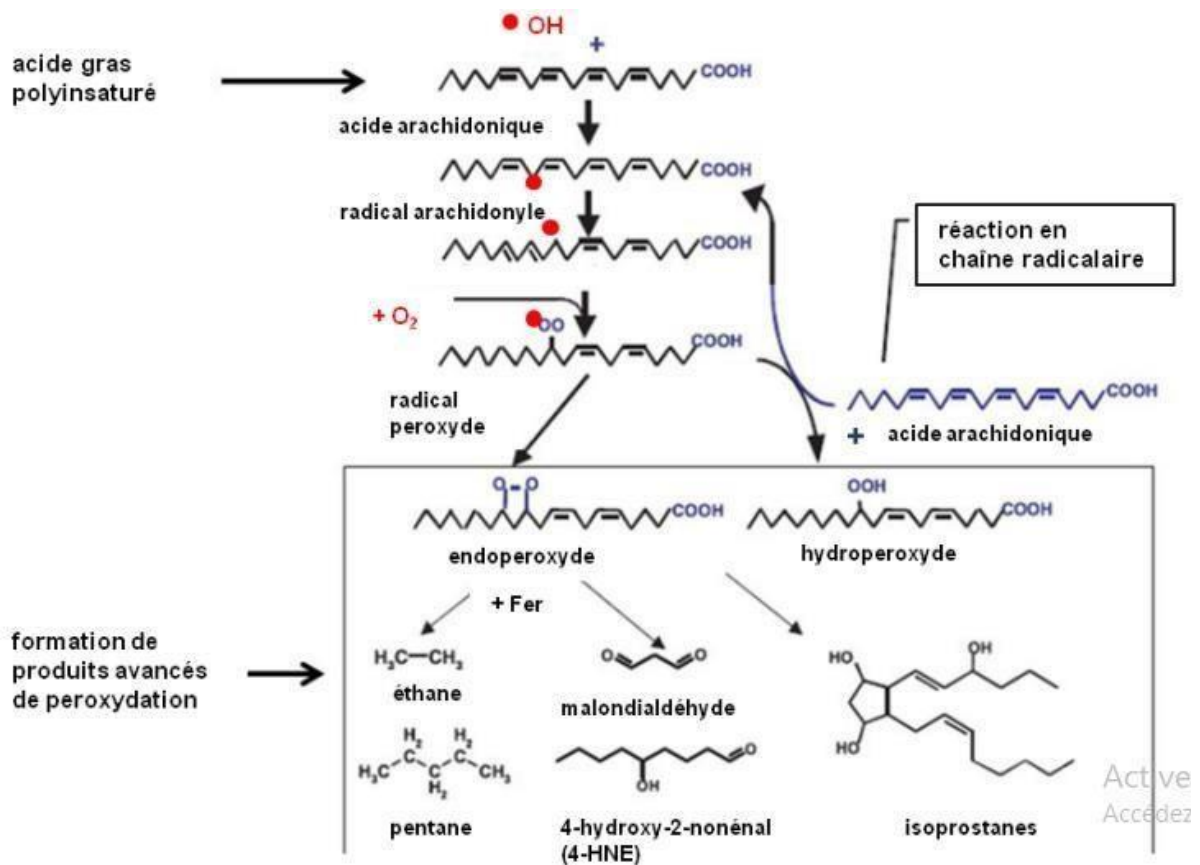


Fig. 38: Réactions en chaîne de la peroxydation lipidique et ses produits terminaux (Dorsemans, 2018).

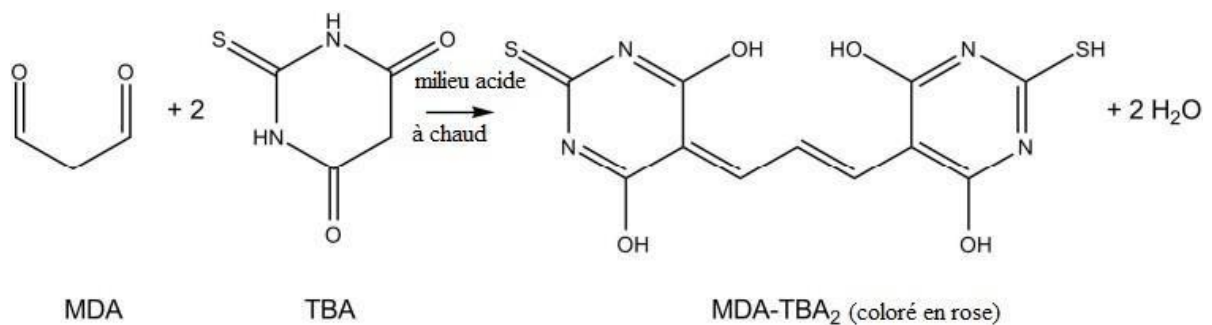


Fig.39 : Principe du dosage du MDA

#### 6.4.3. Détermination de l'activité de la CAT

L'activité enzymatique de la catalase a été déterminée selon la méthode de **Clairbone (1985)** ; cette méthode est basée sur la mesure de la disparition du peroxyde d'hydrogène due à l'activité de cette enzyme (**figure 40**). Dans une cuvette en quartz, nous avons mit 1 mL de

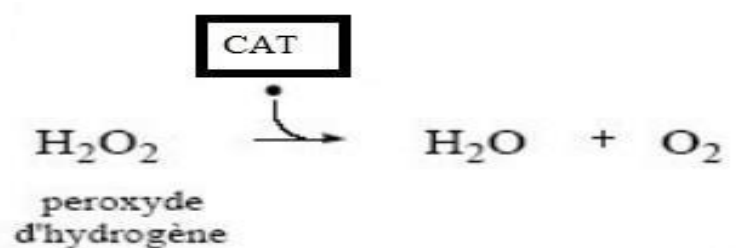
tampon phosphate (0,1 M, pH 7,4) + 50 µl de la source d'enzyme (matrice mitochondriale). La réaction est déclenchée après l'addition de 0,950mL de substrat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.019M) ensuite l'absorbance a été immédiatement mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 240 nm, la réaction est suivie en enregistrant l'absorbance toutes les 30s pendant 3 minutes. L'activité enzymatique est exprimée en UI/mg de protéine selon l'équation suivante.

$$\text{UI /mg de protéine} = 2.303/T \times \log (A1/A2)$$

Où :

**T** : Intervalle de temps en minute.

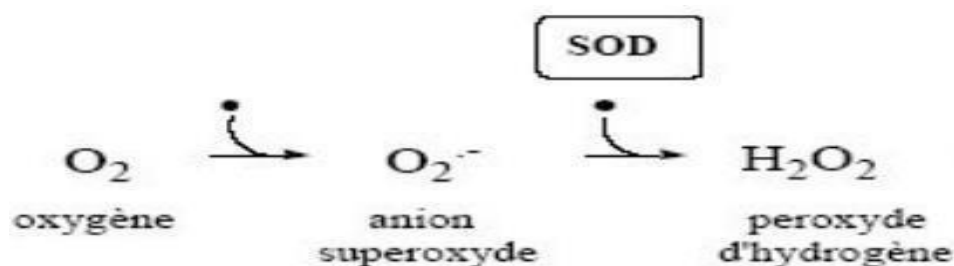
**A1** : correspond à la DO à t0.



**Fig. 40:**Dégradation du peroxyde d'hydrogène par la CAT

#### 6.4.4. Détermination des activités SOD

Par une réaction de dismutation, la SOD a la capacité d'éliminer l'anion superoxyde, première espèce toxique formée à partir de l'oxygène (**figure 41**). L'activité SOD a été évaluée selon la méthode de **Beauchamp et Fridovich (1971)**. Cette activité a été évaluée par la mesure de la capacité de SOD à inhiber la réduction du nitro-bleu de tétrazolium (NBT) par l'anion superoxyde produit suite à la photoréaction de l'oxygène et de la riboflavine en présence d'un donneur d'électron comme la méthionine. 50 µl de la source d'enzyme (matrice mitochondriale) ont été ajoutés à 2ml d'un mélange réactionnel qui contient (cyanure de sodium, NBT, EDTA, riboflavine et tampon phosphate à p H 7,8) en présence de 100 µl de méthionine. Le mélange est soumis au rayonnement d'une lampe de 15 W pendant 15 minutes. L'absorbance a été mesurée à 560 nm et les valeurs ont été exprimées en UI/mg de protéines.



**Fig. 41:** dismutation de l'anion superoxyde par la SOD

#### 6.4.5. Détermination de l'activité GPx

L'activité GPx a été réalisée selon la procédure décrite par **Flohe et Günzler (1984)**. La GPx est la principale enzyme qui élimine le peroxyde d'hydrogène. 0.2ml d'échantillon (matrice mitochondriale) a été ajouté à un tube contenant 0.4ml de GSH (0.1mM) et 0.2ml de tampon phosphate (0.067M, pH 7.8). Le mélange est incubé dans un bain-marie à 25°C pendant 05min.  $H_2O_2$  (1.3mM) a été ajouté pour initier la réaction. Après 10min, le TCA 1% (acide trichloroacétique) a été ajouté pour arrêter la réaction et le mélange est mis dans la glace pendant 30min et centrifugé pendant 10min à 3000t/min. Un volume de surnageant est placé dans une cuvette dans laquelle  $Na_2HPO_4$  (0.32M) + DNTB (1mM) ont été ajoutés. L'absorbance a été mesurée à 412nm toutes les 30 secondes pendant 5min.

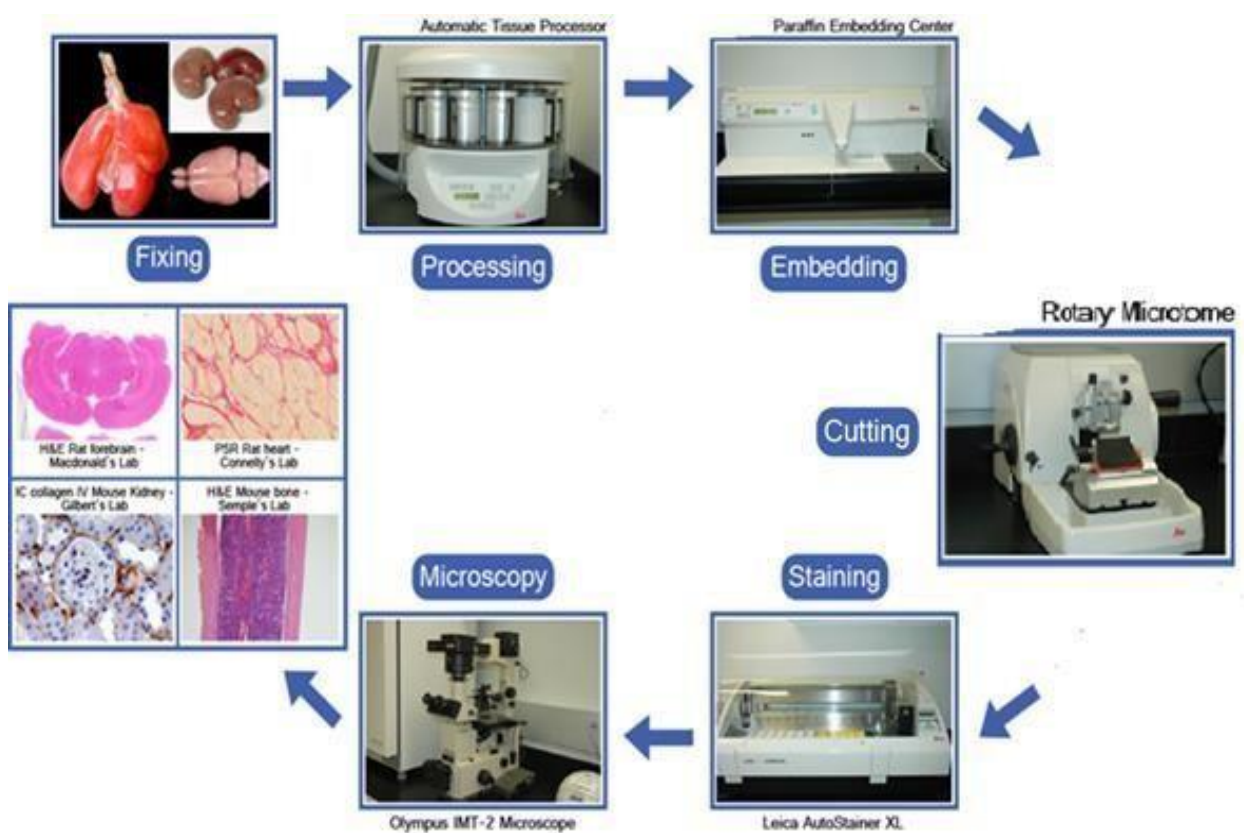
#### 6.4.6. Détermination de l'activité de glutathion-s-transférase (GST)

L'activité glutathion-s-transférase a été mesurée selon la méthode de **Habig et al. (1974)**. 850 $\mu$ l de tampon phosphate d'une concentration égale à 0.1M et un pH égale à 6.5 et 50  $\mu$ l de réactif de CDNB (1-Chloro2,4-dinitrobenzène) à 20 Mm ont été incubé dans un bain marie à 37°C pendant 10 min, puis la réaction est déclenchée par l'ajout de 50 $\mu$ l d'une solution de GSH de 20mM et 50 $\mu$ l de la fraction mitochondriale. La réaction de conjugaison entre le GSH et le CDNB en présence de l'enzyme GST donne un composé, 1-S-Glutathionyl 2-4dinitrobenzène, qui absorbe à 340nm. Ainsi, le changement dans l'absorbance est enregistré à une longueur d'onde de 340 nm dans un intervalle de 30s pendant 5 minutes contre un contrôle préparé dans les mêmes conditions avec du tampon phosphate. Les résultats sont exprimés en UI/mg de protéines selon la formule :

$$K = (\text{DO échantillon} - \text{DO control}) \times 100 / (9,6 \times 0,05)$$

## 7. Etude histologique

Cette partie est réalisée en suivant plusieurs étapes (**figure 42**): la première vise à préserver les tissus et à maintenir la structure vivante, les échantillons de cerveau ont été fixés dans du formol à 10 %. Une fois la fixation effectuée, les échantillons sont placés dans une cassette de traitement des tissus, puis immergés dans un degré croissant d'alcool. Ce dernier doit être éliminé à l'aide d'un solvant organique comme le xylène. L'étape suivante consiste à placer les échantillons de tissu dans de la cire de paraffine, les blocs formés sont ensuite coupés à l'aide d'un microtome rotatif pour produire des sections minces qui peuvent ensuite être colorées et examinées au microscope (**Vohra et Khera, 2014**).



**Fig. 42:**les différentes étapes d'une étude histologique

## **8. Analyse statistique**

Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  SD. Dans les comparaisons multiples, les données ont été analysées à l'aide d'une ANOVA à sens unique. Les différences entre les valeurs moyennes ont été considérées comme significatives à  $*p < 0,05$  ; hautement significatives à  $**p < 0,01$  ; et très hautement significatives à  $***p < 0,001$ . L'étude statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Excel SPC.



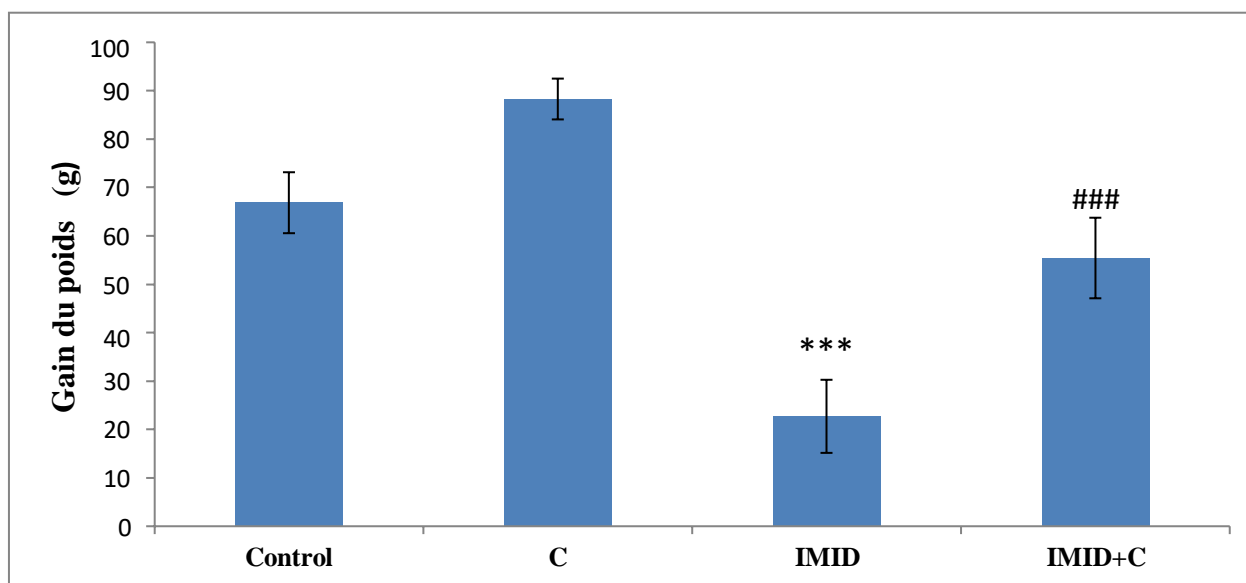
# Résultats et discussions

**Partie I:** Altérations cognitives et mitochondriales dans le striatum et l'hippocampe de rat exposés à l'imidaclopride : rôle protecteur des catéchines

### I. Résultats

#### 1. Effet de l'IMID et de la catéchine sur le gain de poids

Les résultats de l'évaluation du gain de poids (**Fig. 43**) présentent une diminution très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) de gain de poids chez le lot traité par l'IMID en comparaison avec le lot témoin. En revanche, on a observé une amélioration chez les rats traités avec IMID+C.

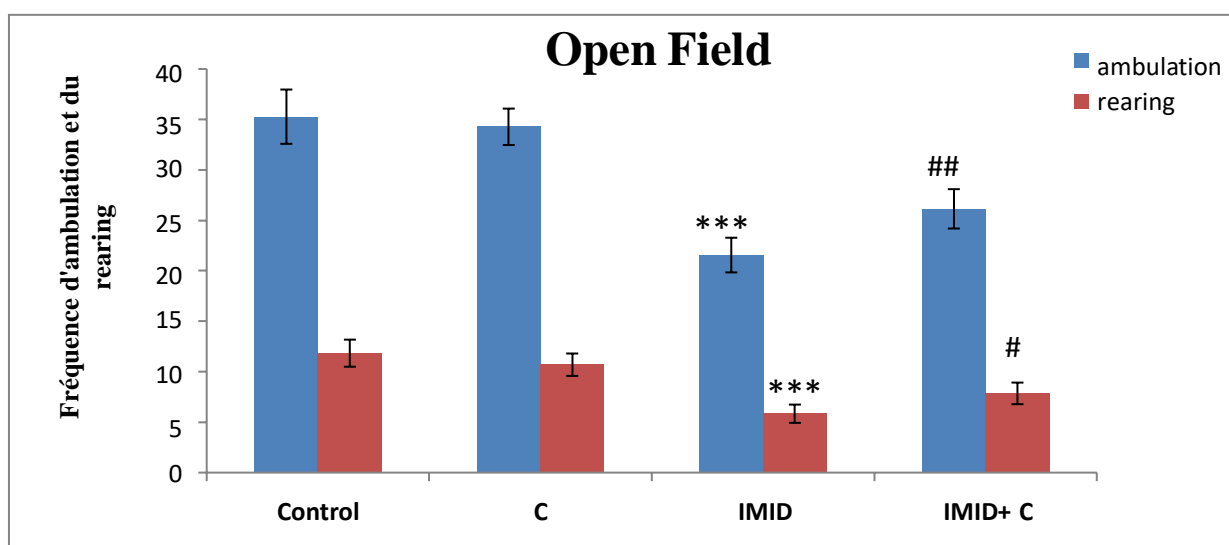


**Fig.43 :** Evolution du gain du poids corporel des rats après 3 mois de traitement par l'IMID et la catéchine. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, ( $n= 7$ ), \*\*\* Différence très hautement significative par rapport au groupe témoin ( $p \leq 0,001$ ). ### Différence très hautement significative par rapport au groupe IMID ( $p \leq 0,001$ ).

#### 2. Étude comportementale

##### • Test d'Open Field

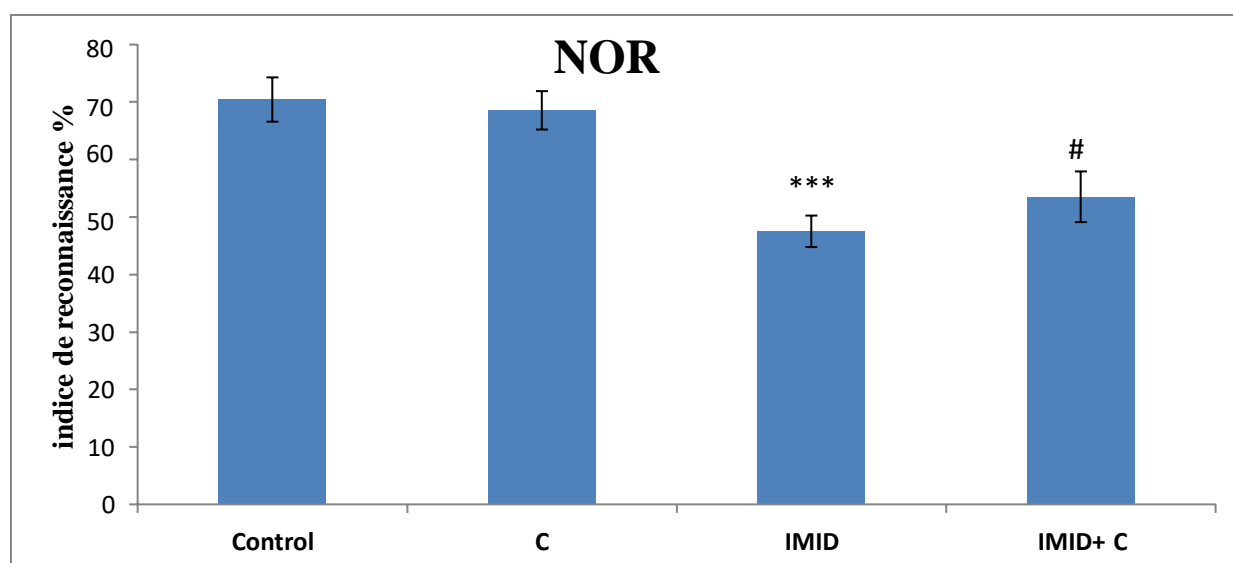
Les résultats de l'étude en Open Field sont illustrés dans la **figure 44**. Ils ont montré l'installation d'un état d'anxiété par une diminution très significative ( $p \leq 0,001$ ) du nombre de cases traversées (ambulation) et du rearing dans le groupe IMID par rapport au contrôle. En revanche, l'administration de catéchine combinée à l'IMID a ramené les résultats à ses valeurs normales.



**Fig. 44 :** Évaluation du niveau d'anxiété chez les rats exposés de manière chronique à une faible dose d'IMID et le rôle préventif de la catéchine à l'aide du test Open Field (fréquence d'ambulation et de rearing). Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, ( $n= 7$ ), \*\*\* Différence très hautement significative par rapport au groupe témoin ( $p \leq 0,001$ ). # Différence significative par rapport au groupe IMID ( $p \leq 0,05$ ). ## Différence très significative par rapport au groupe IMID ( $p \leq 0,01$ ).

#### • Test de reconnaissance de nouveaux objets (NOR)

Dans cette étude, la capacité cognitive a été contrôlée par le test NOR. Les résultats des temps d'exploration de nouveaux objets et familiers sont présentés dans la **figure 45**. Ils montrent que l'IMID induit une diminution très fortement significative ( $p \leq 0,001$ ) de l'indice de reconnaissance (IR) exprimé en pourcentage du temps d'exploration du nouvel objet par rapport au groupe contrôle. Cette diminution a été significativement améliorée dans le groupe IMID+C en ramenant l'IR à ses valeurs normales.



**Fig. 45 :** Evaluation de la mémoire de travail et de la capacité d'apprentissage chez les rats exposés de manière chronique à une faible dose d'IMID et le rôle préventif de la catéchine à l'aide du test NOR. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, ( $n= 7$ ), \*\*\* Différence très hautement significative par rapport au groupe témoin ( $p \leq 0,001$ ). # Différence significative par rapport au groupe IMID ( $p \leq 0,05$ ).

#### • Test d'Elevated plus maze

Les résultats du test EPM après une exposition chronique à l'IMID sont présentés dans le **Tab.2**. Les rats traités avec de l'IMID ont montré une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) du temps passé dans les bras fermés et une diminution significative ( $p < 0,05$ ) du temps passé dans les bras ouverts par rapport aux rats témoins, alors qu'il n'y avait pas de variation significative du nombre d'entrées dans les bras ouverts et fermés. En outre, les résultats soulignent que la supplémentation en catéchines module l'effet d'anxiété induite par l'IMID.

#### • Test de la nage forcée

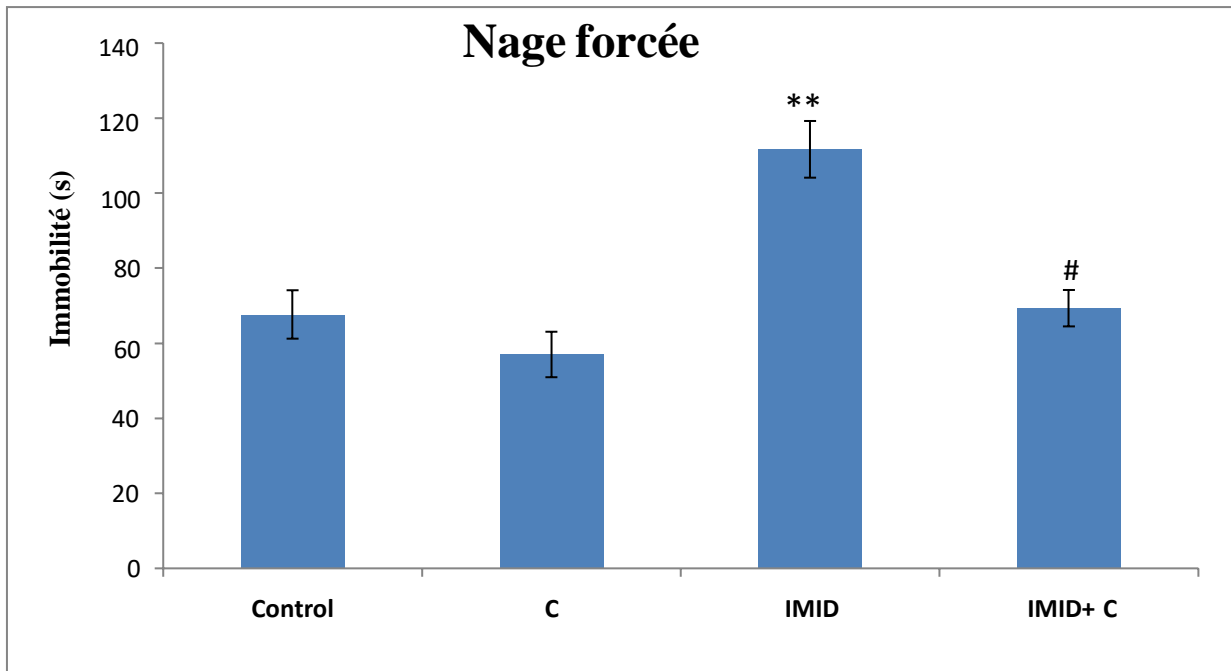
Les résultats du test de la nage forcée sont illustrés dans la **figure 46**. Le groupe traité par l'IMID présente une augmentation significative ( $p \leq 0,01$ ) du temps d'immobilité par rapport au groupe témoin. Le traitement simultané à la catéchine avec IMID a montré une amélioration significative dans ce test par rapport au groupe IMID.

**Tab.2.** Evaluation de l'anxiété chez les rats exposés de manière chronique à une faible dose d'IMID à l'aide du test EPM et rôle préventif de la catéchine. *Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, (n= 7), \* Différence significative par rapport au groupe témoin ( $p \leq 0,05$ ). ## Différence hautement significative par rapport au groupe IMID ( $p \leq 0.01$ ). ### Différence très hautement significative par rapport au groupe IMID ( $p \leq 0.001$ ).*

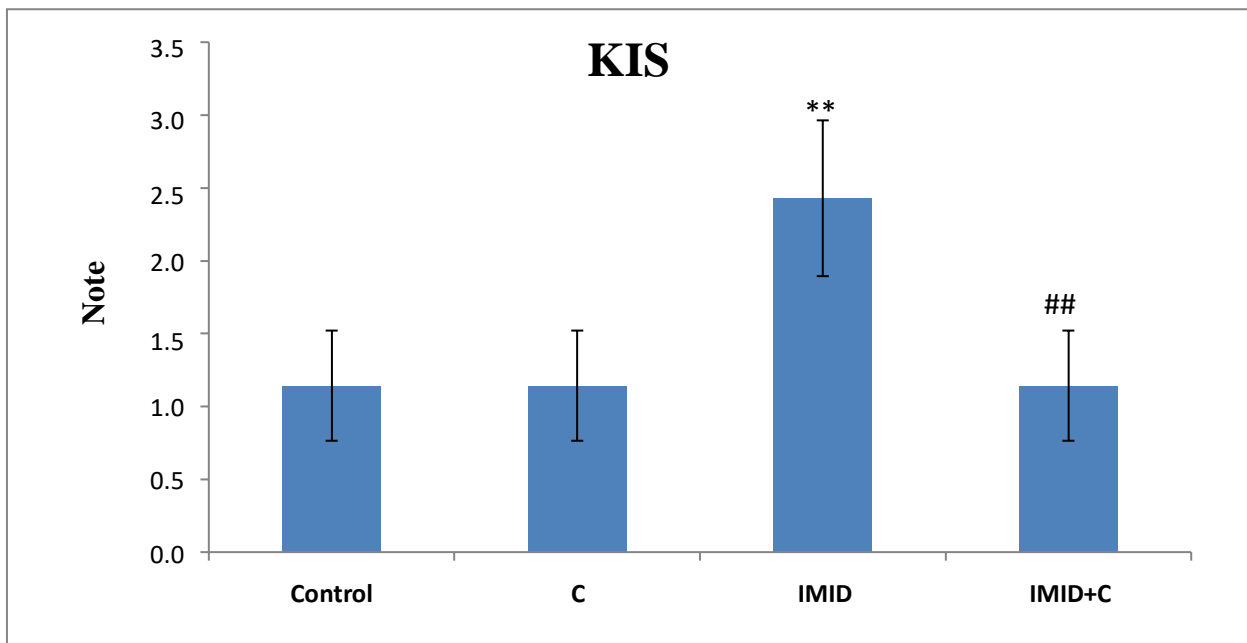
	Time spent in closed arms (s)	Time spent in open arms (s)	Number of entries in closed and open arms
<b>Control</b>	292,2 $\pm$ 1,79	7,8 $\pm$ 1,79	2,2 $\pm$ 1,64
<b>Catechin</b>	291,6 $\pm$ 2,70	8,4 $\pm$ 2,70	1,8 $\pm$ 0,83
<b>IMID</b>	299 $\pm$ 1,41 <sup>*</sup>	1 $\pm$ 1,41 <sup>*</sup>	1,4 $\pm$ 0,54 <sup>ns</sup>
<b>IMID+ Catechin</b>	289 $\pm$ 7,41 <sup>##</sup>	11 $\pm$ 7,41 <sup>###</sup>	2,8 $\pm$ 1,30 <sup>ns</sup>

### • Konziela's inverted screen

La force musculaire est évaluée par le test de Konziela's inverted screen. Les résultats de ce test sont illustrés dans la **figure 47**. Le groupe traité par l'IMID présente une augmentation très significative ( $p \leq 0,01$ ) du temps de chute de l'écran inversé. Or, lorsque la catéchine a été administrée en même temps que l'IMID, les résultats prendraient des valeurs normales.



**Fig. 46 :** Evaluation du temps d'immobilité des rats exposés de manière chronique à une faible dose d'IMID et le rôle préventif de la catéchine à l'aide du test de la nage forcée. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, ( $n= 7$ ), \*\* Différence hautement significative par rapport au groupe témoin ( $p \leq 0,01$ ). # Différence significative par rapport au groupe IMID ( $p \leq 0,05$ ).



**Fig.47 :** Evaluation de la force musculaire des rats exposés de manière chronique à une faible dose d'IMID et le rôle préventif de la catéchine à l'aide du test KIS. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, ( $n= 7$ ), \*\* Différence hautement significative par rapport au groupe témoin ( $p \leq 0,01$ ). ## Différence hautement significative par rapport au groupe IMID ( $p \leq 0,01$ ).

### 3. Détermination de l'activité de l'AChE et du calcium cytosolique

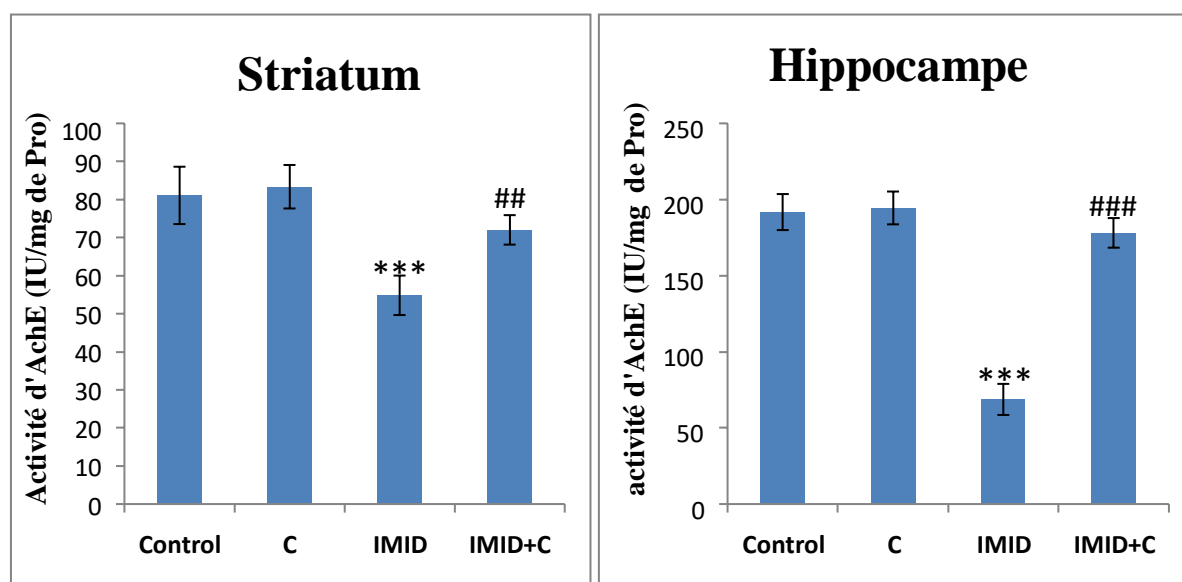
La **figure 48** montre une diminution très significative de l'activité de l'AChE ( $p \leq 0,001$ ) dans l'hippocampe et le striatum des rats traités par IMID. Cependant, cette perturbation est corrigée dans le groupe IMID+C.

La **figure 49** montre une augmentation très significative des niveaux de  $ca^{+2}$  cytosolique dans l'hippocampe et le striatum des rats traités par l'IMID pendant 3 mois par rapport au groupe témoin. Toutefois, ces résultats ont été maintenus à des niveaux normaux dans le groupe traité par IMID + C.

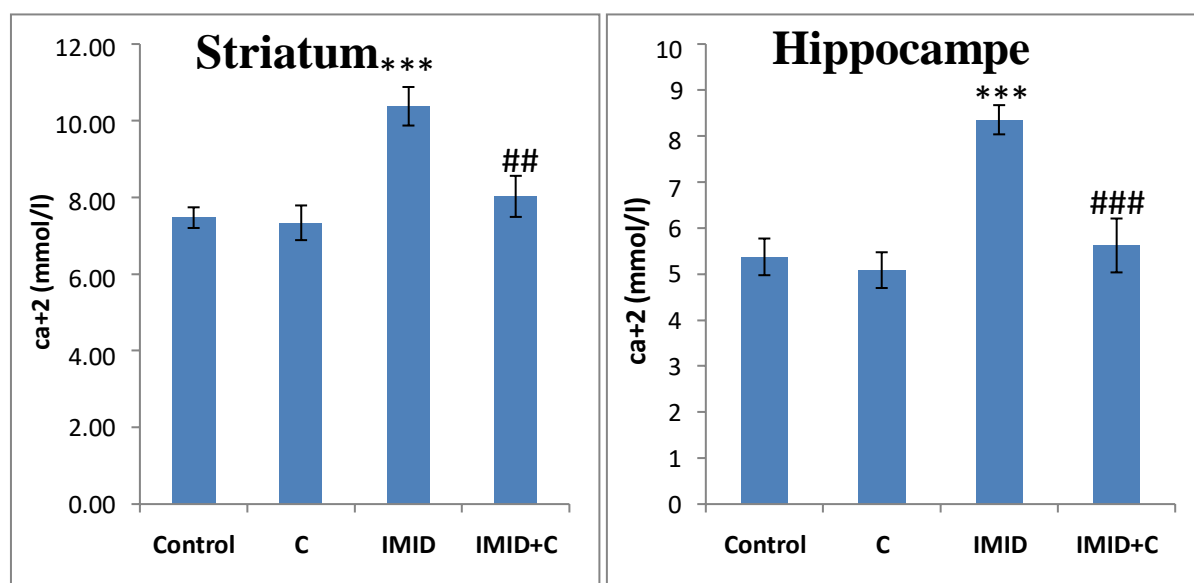
### 4. Évaluation du gonflement et de la perméabilité mitochondriale

#### • Gonflement mitochondriale

Le traitement par IMID provoque une augmentation très significative ( $p \leq 0,001$ ) du gonflement des mitochondries dans l'hippocampe et le striatum par rapport au contrôle. Parallèlement, l'administration conjointe de catéchine et de ce pesticide a permis d'éviter la diminution de la valeur d'absorbance (**Tab.3**).



**Fig. 48** : Activités d'AChE dans le striatum et l'hippocampe chez les rats exposés chroniquement à une faible dose d'IMID et le rôle préventif de la catéchine. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, ( $n=7$ ), \*\*\* Différence très hautement significative par rapport au groupe témoin ( $p \leq 0,001$ ). ## Différence très significative avec le groupe IMID ( $p \leq 0,01$ ). ### Différence très hautement significative par rapport au groupe IMID ( $p \leq 0,001$ ).



**Fig. 49 :** Niveaux de  $ca^{+2}$  cytosolique dans le striatum et l'hippocampe chez des rats exposés de manière chronique à une faible dose d'IMID et le rôle préventif de la catéchine. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, ( $n=7$ ), \*\*\* Différence très hautement significative par rapport au groupe témoin ( $p \leq 0,001$ ). ## Différence très significative avec le groupe IMID ( $p \leq 0,01$ ). ### Différence très hautement significative par rapport au groupe IMID ( $p \leq 0,001$ ).

**Tab.3:** Evaluation du gonflement mitochondrial dans le striatum et l'hippocampe, chez des rats exposés chroniquement à une faible dose d'IMID et le rôle préventif de la catéchine. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, ( $n=7$ ), \*\*\* Différence très hautement significative par rapport au groupe de contrôle ( $p \leq 0,001$ ). ### Différence très significative avec le groupe IMID ( $p \leq 0,001$ ).

Gonflement mitochondrial (densitéoptique)		
Regions du cerveau		
	Striatum	Hippocampe
Control	0,226 $\pm$ 0,016	0,266 $\pm$ 0,017
Catechin	0,230 $\pm$ 0,017	0,268 $\pm$ 0,010
IMID	0,116 $\pm$ 0,009 <sup>***</sup>	0,136 $\pm$ 0,010 <sup>***</sup>
IMID+Catechin	0,212 $\pm$ 0,011 <sup>###</sup>	0,239 $\pm$ 0,016 <sup>###</sup>



• Perméabilité mitochondriale

Les résultats du **Tableau4** montrent une augmentation de la perméabilité mitochondriale des deux zones étudiées dans le groupe traité à l'IMID par rapport au contrôle. Cependant, ces résultats sont corrigés lorsque la catéchine a été co-administrée avec ce néonicotinoïde.

**Tab.4:** Evaluation de la perméabilité mitochondriale dans le striatum et l'hippocampe, chez des rats exposés chroniquement à une faible dose d'IMID et le rôle préventif de la catéchine. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, (n=7), \*\*\* Différence très hautement significative par rapport au groupe témoin ( $p \leq 0,001$ ). # Différence significative par rapport au groupe IMID ( $p \leq 0,05$ ). ## Différence hautement significative par rapport au groupe IMID ( $p \leq 0,01$ ).

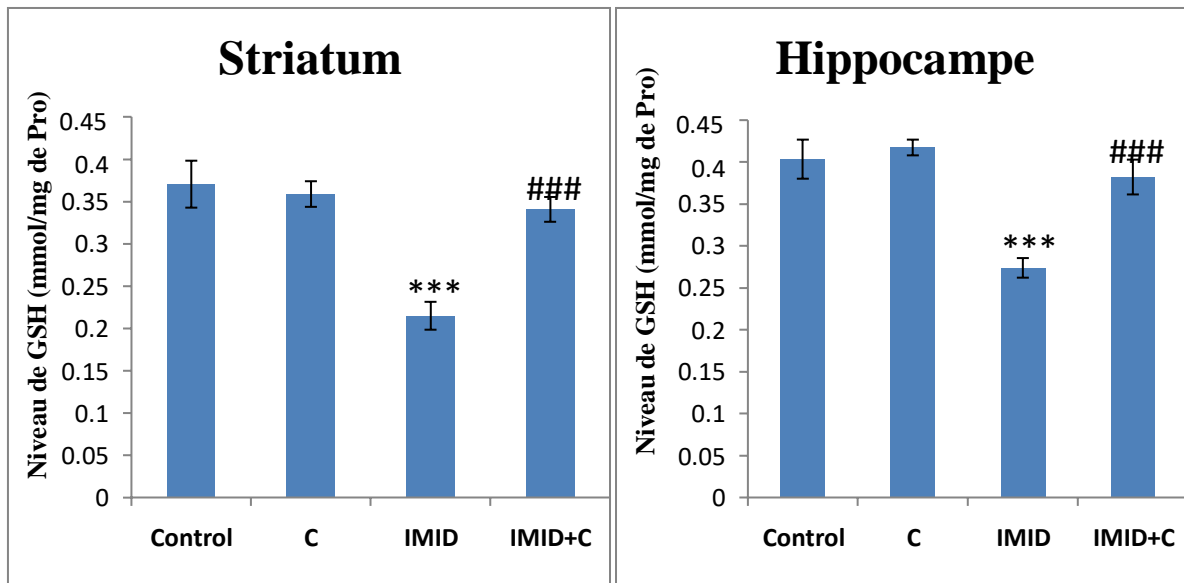
	Perméabilité mitochondriale ( $\Delta OD/\Delta t$ )	
	Régions du cerveau	
	Striatum	Hippocampe
<b>Control</b>	0,013 $\pm$ 0,01	0,016 $\pm$ 0,01
<b>Catechin</b>	0,011 $\pm$ 0,01	0,013 $\pm$ 0,01
<b>IMID</b>	0,062 $\pm$ 0,02***	0,069 $\pm$ 0,03***
<b>IMID+Catechin</b>	0,034 $\pm$ 0,01#	0,031 $\pm$ 0,01##

**5. Évaluation des marqueurs du statut redox dans les mitochondries du striatum et de l'hippocampe**

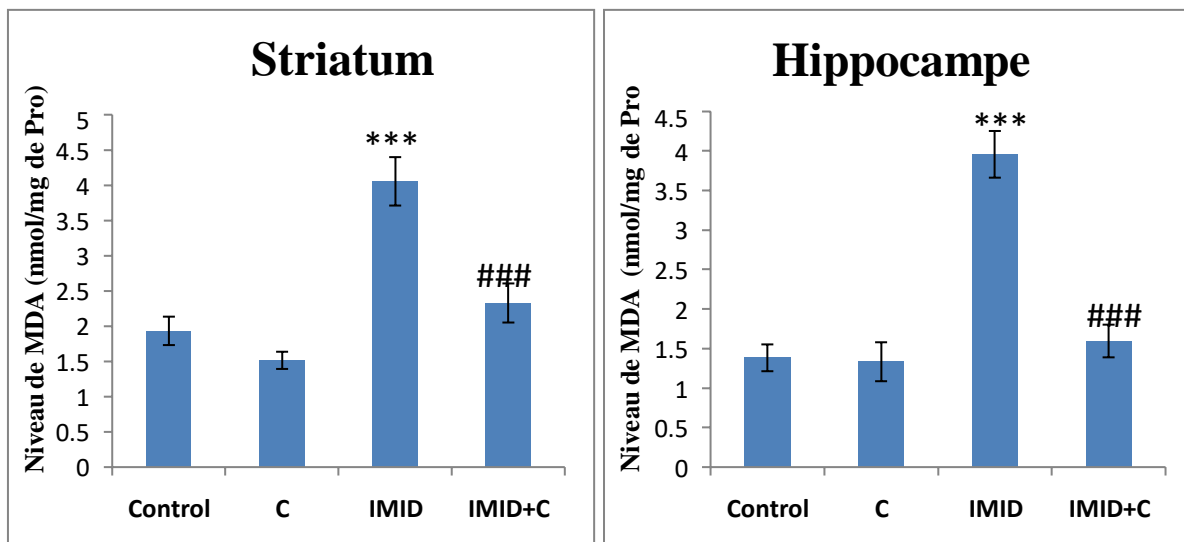
L'évaluation de différents paramètres de stress oxydatif et de peroxydation lipidique dans les deux régions cérébrales du rat exposées à l'IMID seul ou associé aux catéchines, est présentée dans les figures **50, 51, 52, 53, 54 et 56**.

Le taux de GSH mitochondrial a diminué de manière significative ( $p \leq 0,001$ ) dans le groupe traité par IMID par rapport au groupe témoin. Mais lorsque la catéchine a été administrée en même temps que ce pesticide, le GSH a été maintenu à son niveau normal (**Fig. 50**).

Les résultats de cette étude ont montré que l'IMID a induit une augmentation très significative de la teneur en MDA mitochondrial ( $p \leq 0,001$ ) par rapport au groupe témoin. L'administration simultanée de catéchines et de pesticide dans le groupe IMID+C a entraîné une diminution très significative par rapport au groupe IMID (**Fig. 51**).



**Fig. 50 :** Niveaux de GSH dans les mitochondries du striatum et de l'hippocampe chez les rats exposés de manière chronique à une faible dose d'IMID et rôle préventif de la catéchine. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, (n=7), \*\*\* Différence très hautement significative par rapport au groupe témoin ( $p \leq 0,001$ ). ### Différence très significative avec le groupe IMID ( $p \leq 0,001$ ).



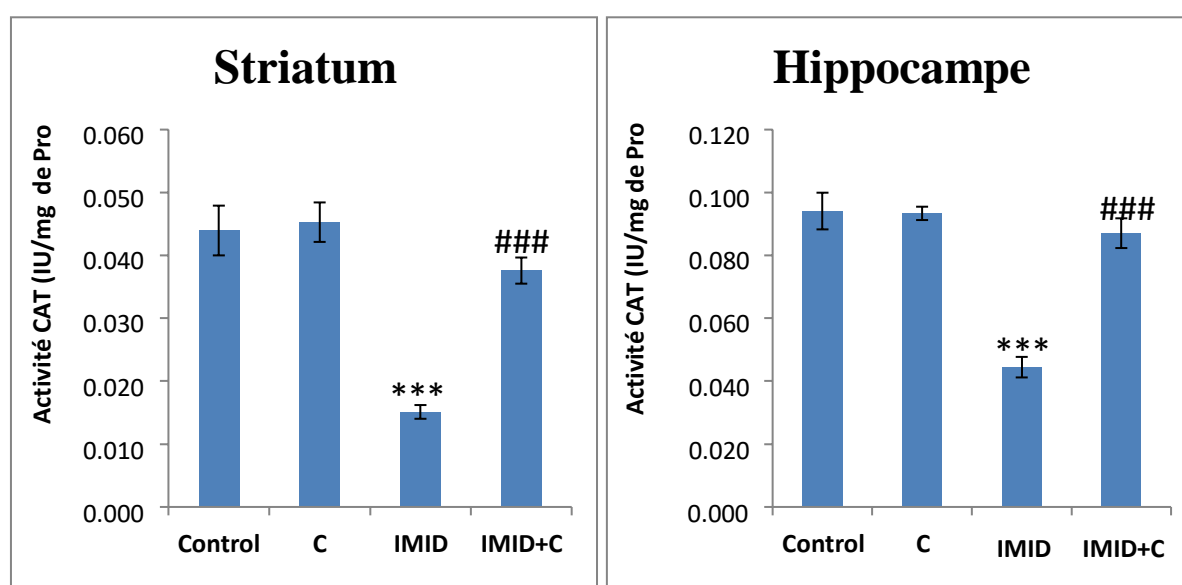
**Fig. 51:** Evaluation du produit final de la peroxydation lipidique (MDA) dans les mitochondries du striatum et de l'hippocampe chez des rats exposés de manière chronique à de faibles doses d'IMID et rôle préventif de la catéchine. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, (n=7), \*\*\* Différence très hautement significative par rapport au groupe de contrôle ( $p \leq 0,001$ ). ### Différence très significative par rapport au groupe IMID ( $p \leq 0,001$ ).

Le traitement par IMID a montré une diminution très significative ( $p \leq 0,001$ ) de l'activité CAT mitochondriale par rapport au groupe témoin. Cependant, cette diminution a été évitée chez les rats lorsque la catéchine a été administrée en association avec l'IMID (**Fig. 52**).

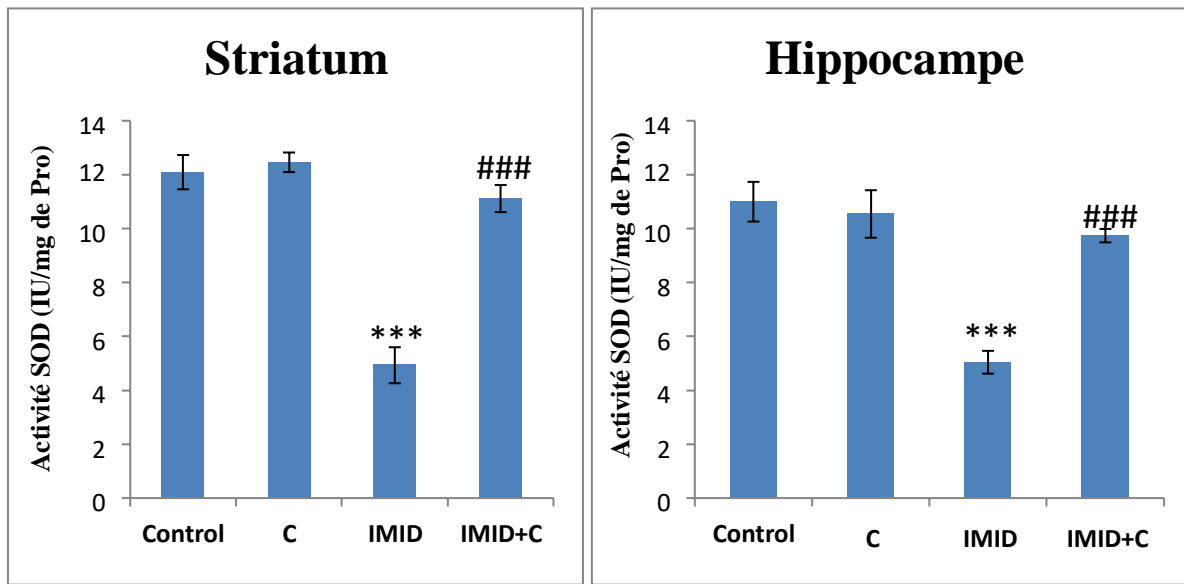
Les résultats de l'évaluation de l'activité SOD mitochondriale révèlent également une diminution très significative ( $p \leq 0,001$ ) de l'activité SOD par rapport au contrôle. Cependant, cette diminution a été corrigée dans le groupe IMID+C (**Fig. 53**).

L'exposition à l'IMID a entraîné une diminution significative ( $p \leq 0,05$ ) de l'activité GPx de l'hippocampe et du striatum par rapport au témoin, alors que cette perte d'activité enzymatique a été évitée dans le groupe IMID+C (**Fig. 54**).

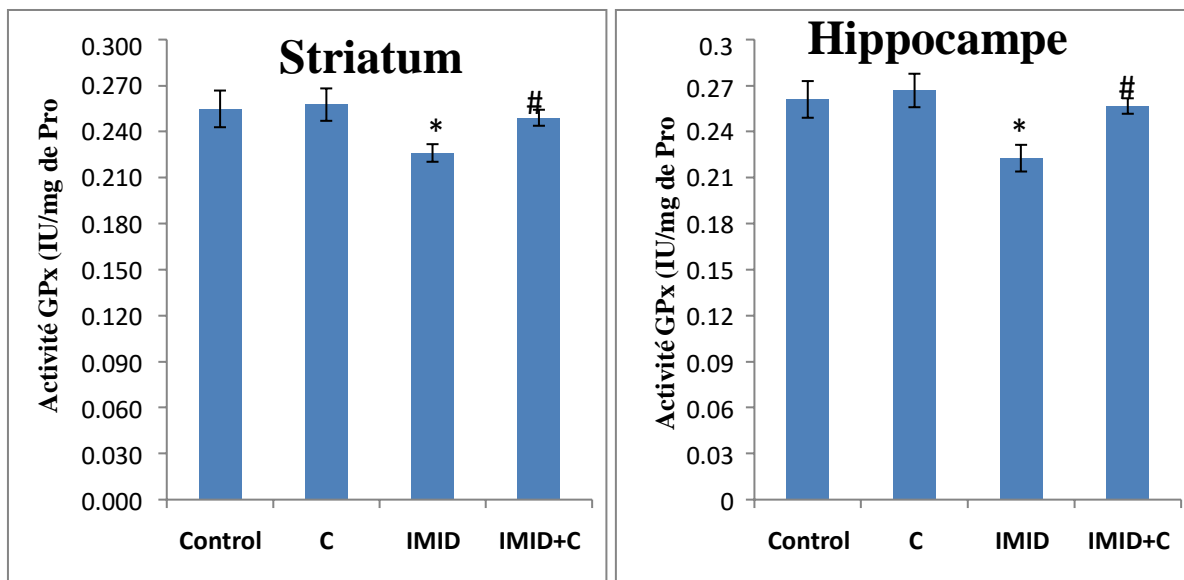
Une augmentation très significative ( $p \leq 0,001$ ) de l'activité GST a été enregistrée dans les mitochondries de l'hippocampe et du striatum des rats traités à l'IMID par rapport au groupe témoin. L'administration concomitante du pesticide associé à la catéchine a normalisé cette activité enzymatique (**Fig. 55**).



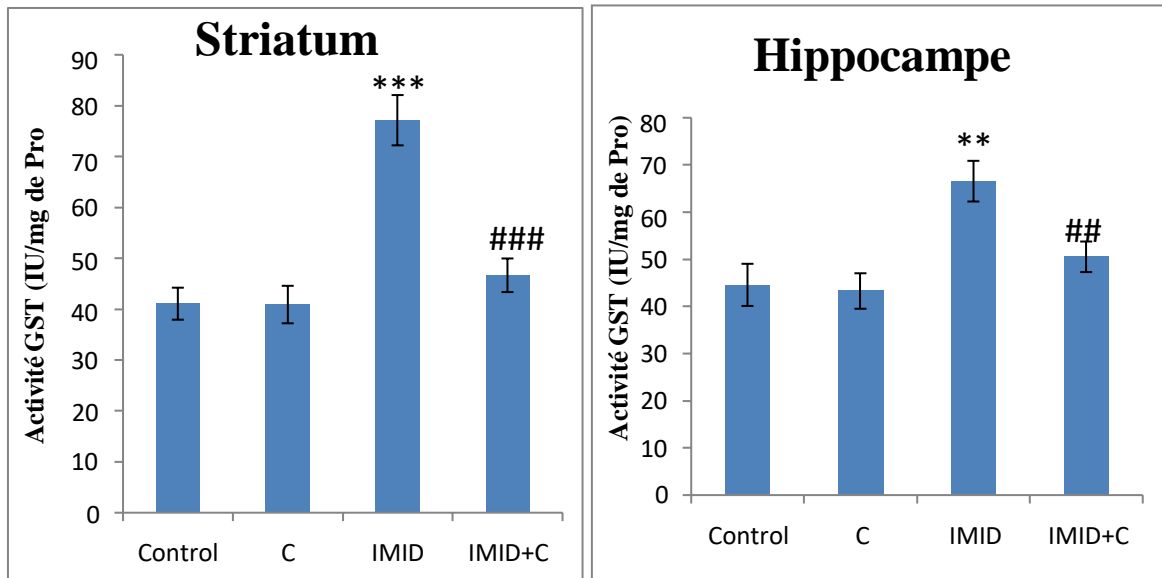
**Fig. 52:** Activités CAT dans les mitochondries du striatum et de l'hippocampe chez des rats exposés de manière chronique à une faible dose d'IMID et rôle préventif de la catéchine. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, ( $n=7$ ), \*\*\* Différence très hautement significative par rapport au groupe témoin ( $p \leq 0,001$ ). ### Différence très significative avec le groupe IMID ( $p \leq 0,001$ ).



**Fig. 53:** Activités SOD dans les mitochondries du striatum et de l'hippocampe chez des rats exposés chroniquement à une faible dose d'IMID et rôle préventif de la catéchine. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, (n=7), \*\*\* Différence très hautement significative par rapport au groupe témoin ( $p \leq 0,001$ ). ### Différence très significative avec le groupe IMID ( $p \leq 0,001$ ).



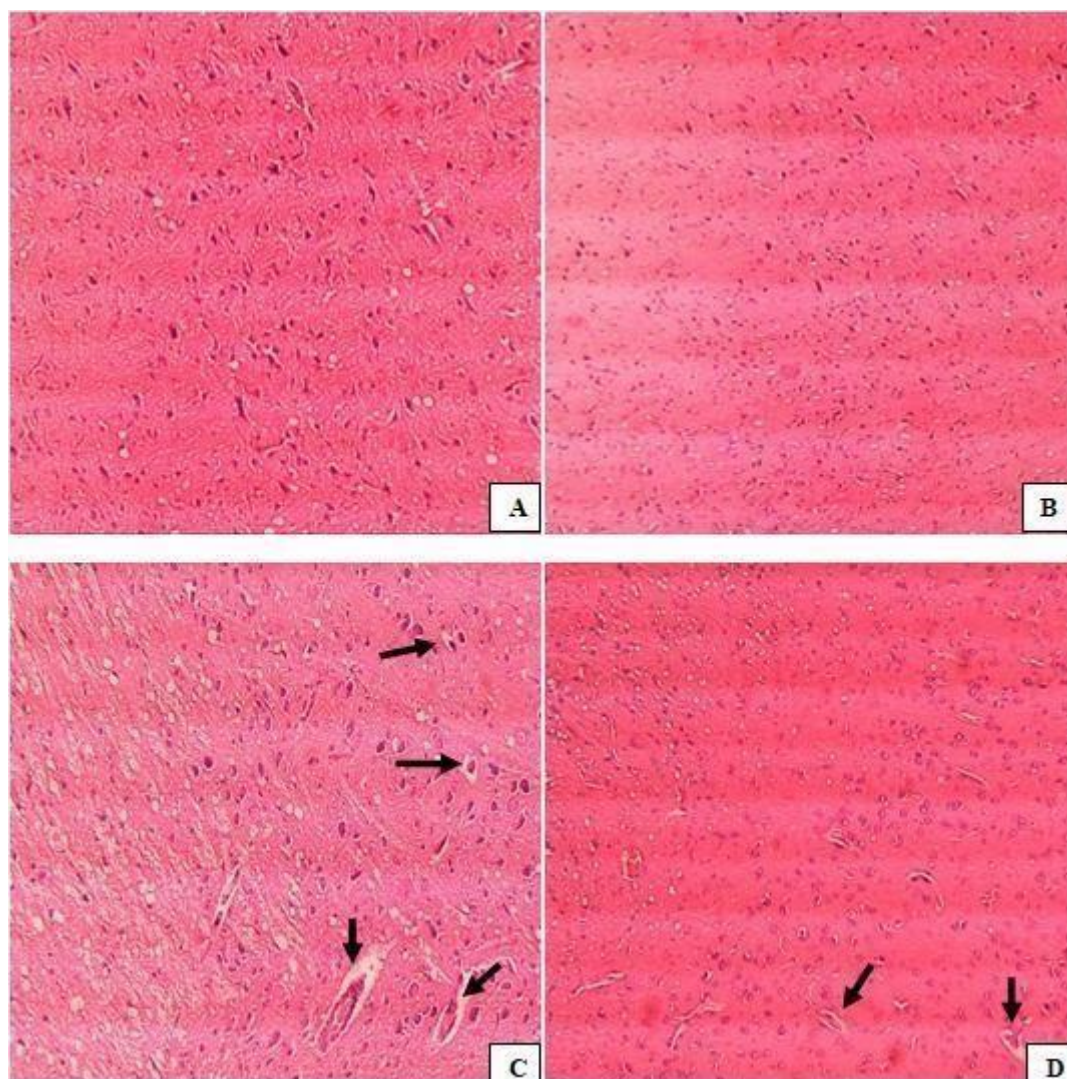
**Fig. 54:** Activités GPx dans les mitochondries du striatum et de l'hippocampe chez des rats exposés de manière chronique à une faible dose d'IMID et rôle préventif de la catéchine. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, (n=7), \* différence significative par rapport au groupe témoin ( $p \leq 0,05$ ). # Différence significative par rapport au groupe IMID ( $p \leq 0,05$ ).



**Fig. 55 :** Activités GST dans les mitochondries du striatum et de l'hippocampe chez les rats exposés de manière chronique à une faible dose d'IMID et rôle préventif de la catéchine. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, (n=7), \*\* Différence hautement significative par rapport au groupe témoin ( $p \leq 0,01$ ). \*\*\* Différence très hautement significative par rapport au groupe témoin ( $p \leq 0,001$ ). ## Différence très significative par rapport au groupe IMID ( $p \leq 0,01$ ). ### Différence très hautement significative avec le groupe IMID ( $p \leq 0,001$ ).

## 6. Etude histologique

Des coupes histologiques du cerveau total ont montré une morphologie normale des neurones dans les groupes contrôle et catéchine. En revanche, les rats traités par l'IMID ont montré une morphologie cellulaire anormale accompagnée d'une vacuolisation marquée autour des neurones, de noyaux condensés et pyknotiques avec des neurones rétrécis. Le groupe IMID+C a montré une dégénérescence neuronale modérée (**Fig. 56**).



**Fig. 56:** Histologie du cerveau après 3 mois de traitement : (A) et (B) : groupes contrôle et catéchine respectivement ; (C) : groupe traité par IMID et (D) : groupe IMID+C.

## II. Discussion des résultats

### II.1. Effets de l'IMID et de la catéchine sur le poids corporel des animaux

À la fin de l'exposition chronique de 90 jours, une diminution significative de la prise de poids a été observée chez les rats traités avec de l'IMID (22 g) par rapport aux autres groupes. Ces résultats sont en adéquation avec ceux obtenus par les travaux de **Katić et al. (2021)** ayant montré que l'exposition à 2,25 mg/kg d'IMID pendant 28 jours a entraîné un gain de poids corporel plus faible chez les rats traités par rapport aux rats témoins. En revanche, le gain de poids a augmenté d'environ 88g dans le groupe catéchine et d'environ 55g lorsqu'elle

est associée à l'IMD. Étant donné que la prise de poids chez les animaux sert d'indice du taux de croissance, la diminution de gain de poids observée dans la présente étude suggère que l'IMD a un effet négatif sur la croissance des animaux en comparaison avec les autres groupes. L'absence de travaux faisant l'évaluation de l'effet des pesticides sur le taux de croissance des animaux ne nous permet pas de justifier d'une manière affirmative ces résultats, même si certaines études fractionnées ont conclu que l'altération de l'assimilation des aliments causée par des lésions tissulaires induites par l'IMID, entraînant une réduction de l'absorption intestinale des nutriments (El-Ela et Abdel-Aziz, 2019).

### II.2. Effets de l'IMID et de la catéchine sur l'Activité d'AChE et le neuro-comportement des animaux

Le test OF est un test expérimental utilisé pour évaluer les niveaux d'activité locomotrice générale, l'anxiété et la volonté d'explorer chez les animaux (Zimcikova et al., 2017). Nos résultats ont démontré une diminution du nombre de carrés traversés (ambulation) et du rearing dans le groupe IMID par rapport au groupe témoin, ce qui suggère que ce pesticide augmente l'anxiété, exprimée par la préférence de rester immobile et proche des murs du champ. Comme les néonicotinoïdes ont la même structure que la nicotine et partagent également une activité agoniste sur les nAChRs, les résultats de cette étude sont cohérents avec ceux de Parameshwaran et al. (2012) qui indiquent que l'exposition prénatale à la nicotine entraîne des troubles neurocomportementaux liés à la modulation de la transmission synaptique glutamatergique dans l'hippocampe. Le test d'OF peut être associé à d'autres mesures de l'anxiété telles que le test EPM, qui a montré que les rats traités à l'IMID évitaient davantage les bras ouverts et passaient plus de temps dans les bras fermés que les rats témoins. Ce comportement peut être dû à l'interaction de l'IMID avec les systèmes sérotoninergiques et dopaminergiques du SNC, dont on sait qu'ils sont intimement impliqués dans la modulation des troubles de l'anxiété (Zhang et al., 2020). Ces résultats sont en accord avec ceux de Burke (2016) qui a étudié l'effet de l'exposition chronique de souris gestantes recevant une injection de 0,5mg/kg/jour d'IMD du 3<sup>ème</sup> jour de gestation jusqu'au 21<sup>ème</sup> jour de la période postnatale. En outre, les résultats du test de la nage forcée ont montré une augmentation du temps d'immobilité, ce qui confirme que l'administration chronique d'IMID induit une détresse comportementale. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Khalil et al. (2017). L'apprentissage et les fonctions cognitives ont été évalués à l'aide du test NOR ; nos résultats ont montré une diminution significative de l'indice de reconnaissance (IR) en fonction du pourcentage de temps que l'animal passe à explorer un nouvel objet, ce qui reflète

une perte de capacité cognitive chez les rats traités par l'IMID par rapport au groupe témoin. Ces déficits dans l'exploration des objets suggèrent la présence de lésions dans l'hippocampe (Stanley et al., 2012). Les effets neurotoxiques des néonicotinoïdes ont été décrits comme des agonistes des récepteurs nicotiques de l'acétylcholine ; dans le présent travail, nous avons remarqué que l'exposition à l'IMID pendant 90 jours diminuait significativement l'activité de l'AChE dans différentes régions du cerveau (striatum et hippocampe), ces résultats sont compatibles avec ceux obtenus par Vohra (2014) et de Moeen et al. (2018). Cette inhibition entraîne une accumulation d'acétylcholine au niveau des synapses, ce qui suggère que le système enzymatique cholinergique est bloqué par l'IMID, impliquant la diminution de l'activité locomotrice spontanée (Katić et al., 2021), les crampes et la faiblesse musculaire quand l'ACh s'accumule dans la jonction neuromusculaire (Adeyinka et Kondamudi, 2020). Ces suggestions sont confirmées par le test Kondziela Inverted Screen qui est conçu pour évaluer la force des animaux, ainsi que leur capacité à maintenir l'équilibre pendant l'inversion (Reekes et al., 2016). En revanche, L'utilisation de la catéchine à une dose de 20 mg/kg/jour comme une molécule protectrice contre les effets délétères de l'IMID a amélioré de façon significative les performances comportementales. Nos résultats sont en accord avec ceux d'Ahmed et al. (2013) qui ont rapporté que l'administration orale de catéchine pourrait être bénéfique pour prévenir la perte de mémoire. Les travaux de Teixeira et ses collaborateurs (2013) indiquent également que la catéchine peut être efficace comme traitement complémentaire de la maladie de Parkinson, car elle protège contre la mort des neurones dopaminergique induite par la 6-hydroxydopamine.

### II.3. Effets de l'IMID et de la catéchine sur les niveaux de $Ca^{+2}$ cytosolique et l'intégrité structurale et fonctionnelle des mitochondries

Etant donné que tout comportement dépend d'un ordre cérébral, les problèmes comportementaux constatés dans cette étude nous amènent à suggérer qu'il existe un dysfonctionnement dans le traitement de l'information au sein du SNC. Dans la présente étude, nous avons remarqué une augmentation significative des niveaux de calcium cytosolique dans le striatum et l'hippocampe du groupe traité par l'IMID par rapport au groupe témoin. De nombreuses études indiquent que l'altération de l'homéostasie calcique est un médiateur de la mort des cellules neuronales (Nikoletopoulou et Tavernarakis, 2012). Cette dérégulation est due à la surcharge des mitochondries en calcium, qui est connu comme un facteur d'activation de plusieurs enzymes telles que les nucléases, les protéases et les phospholipases qui vont provoquer l'oxydation des lipides et des protéines de la membrane



mitochondriale, entraînant ainsi une augmentation de la perméabilité par l'ouverture des pores de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP), ce qui conduit ensuite au gonflement mitochondrial (**Panel et al., 2018**). Cet état est le résultat de la formation de radicaux libres après une exposition de 3 mois à l'IMID. Des résultats similaires ont été rapportés par les travaux de **Gasmi et ses collaborateurs (2017)** ayant montré que l'exposition chronique à l'acétamipride augmente la perméabilité mitochondriale conduisant ainsi au gonflement de ces organelles. Parallèlement, l'administration conjointe de catéchine et d'IMID a pu maintenir l'intégrité mitochondriale. Ce flavonoïde est surtout connu comme un puissant antioxydant en raison de sa capacité à neutraliser les radicaux libres et à chélater les ions métalliques (**Bernatoniene et Kopustinskiene, 2018**).

#### II.4. Effet de l'IMID et de la catéchine sur le statut redox mitochondrial

Des études antérieures ont considéré le stress oxydatif comme l'un des mécanismes neurotoxiques des pesticides. En outre, ce phénomène peut également endommager les molécules biologiques, entraînant la perte de leurs structures et de leurs fonctions (**Chandra et al., 2016**). La présente étude a démontré que l'exposition chronique à l'IMID augmente les niveaux de MDA, ce qui suggère que ce néonicotinoïde est doté d'un potentiel de formation de ROS capables d'oxyder les doubles liaisons des acides gras poly-insaturés, induisant ainsi une lipoperoxydation, ce qui entraîne de graves dommages à la structure de la biomembrane et à la fonction cellulaire. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Ahmed et Nasr (2015)** qui ont observé une augmentation de la peroxydation lipidique, du TNF $\alpha$  du monoxyde d'azote, des activités de la GST et de la CAT, ainsi que une diminution du GSH après une exposition de 28 jours à 200 mg/kg d'IMID. Pour prévenir les effets délétères des ROS, les organismes disposent de molécules antioxydantes, y compris le GSH, qui joue un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie redox en piégeant les ROS par l'intermédiaire de fonctions thiol. Cependant, dans cette étude, le GSH a eu tendance à diminuer dans les mitochondries du striatum et de l'hippocampe des rats exposés de manière chronique à l'IMID (**Pocernich et Butterfield, 2012**). Nos résultats sont en accord avec (**Duzguner et Erdogan, 2012 ; Ahmed et Nasr, 2015**).

La défense naturelle de l'organisme est également assurée par des composés enzymatiques tels que la SOD qui dismute rapidement l'anion radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) en ( $H_2O_2$ ). Afin d'éviter la concentration létale de peroxyde d'hydrogène, les cellules disposent de CAT et de GPx, d'autres enzymes piègeurs, qui catalysent la conversion du  $H_2O_2$  en molécules

inoffensives (H<sub>2</sub>O et O<sub>2</sub>) (Kim et al., 2015). La diminution observée dans l'activité de ces enzymes antioxydantes suggère qu'elles ont été fortement consommées pour neutraliser les radicaux libres en métabolites moins actifs ou inactifs. Ces résultats sont cohérents avec les travaux de Lonare et al. (2014) ayant montré une diminution des activités de CAT, de SOD et de GPx après 28 jours de traitement avec 45 et 90 mg/kg d'IMID. Cependant, l'activité d'une autre enzyme de détoxification, la GST, a augmenté de manière significative dans les deux zones cérébrales traitées par IMID par rapport au groupe témoin. Cette enzyme antioxydante est connue pour catalyser la conjugaison du GSH avec des substrats xénobiotiques (Mazumder et Diederich, 2016) et la biotransformation des pesticides chez les mammifères (Eraslen et al., 2017). Dans la plupart des cas, cette augmentation est observée lorsque la cellule est stressée. Ces résultats sont en accord avec des études précédentes (Ahmed et Nasr, 2015 ; Moeen et al., 2018). D'autre part, cette étude a montré que l'effet neurotoxique induit par l'exposition chronique à l'IMID peut être prévenu globalement par l'utilisation de la catéchine à une dose de 20 mg/ kg/jour. Ces constatations actuelles concordent avec les résultats de l'étude de Moreno-Ulloa et al. (2015) sur l'effet des pesticides et le rôle préventif des catéchines chez le rat.

La capacité des polyphénols du thé, notamment les catéchines, à chélater les ions métalliques tels que le fer et le cuivre, peut contribuer à leur efficacité antioxydante en empêchant les métaux de transition redox-actifs de catalyser la formation de radicaux libres. Les catéchines peuvent également agir comme antioxydants d'une manière indirecte par :

1. l'inhibition des facteurs de transcription sensibles à l'oxydoréduction tels que le facteur nucléaire B (NF-B) et la protéine activatrice-1 (AP-1), dans les cellules en culture.
2. l'inhibition d'enzymes "pro-oxydantes", telles que l'oxyde nitrique synthase inductible, les lipoxygénases, les cyclooxygénases et la xanthine oxydase. La xanthine oxydase catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine en acide urique, tout en réduisant l'O<sub>2</sub> en O<sup>-</sup><sub>2</sub> et en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ; les catéchines du thé vert peuvent inhiber l'activité de la xanthine oxydase.
3. l'induction des enzymes antioxydantes qui ont la capacité de catalyser la conjugaison du glutathion aux électrophiles, réduisant ainsi leur capacité à réagir avec les acides nucléiques et les protéines et à les endommager (Frei et Higdon, 2003).

### II.5. Effets de l'IMID et de la catéchine sur l'histologie cérébrale

L'examen histologique du cerveau a montré que l'exposition orale à 1,2 mg/kg d'IMID pendant 12 semaines a entraîné des lésions irrégulières ; des cellules avec des noyaux condensés et pyknotiques, une vacuolisation marquée autour des neurones avec des neurones

rétrécis. Ces changements histologiques peuvent être attribués à la quantité excessive de radicaux libres générés par l'IMID et ses métabolites. Ces résultats sont en accord avec les travaux de **Soujanya et al. (2012)** qui ont observé des lésions cérébrales chez des rats mâles exposés à 80 mg/kg d'IMID pendant 4 semaines. Grâce à ses effets neuroprotecteurs, la supplémentation en catéchine en même temps que l'IMID a amélioré les changements histopathologiques induits par ce néonicotinoïde. Des observations similaires ont été faites par **Ahmed et al. (2013)** qui révèlent que le prétraitement à la catéchine améliore les anomalies neuronales de l'hippocampe et du cortex frontal en réduisant le stress oxydatif par l'élimination des ROS et l'amélioration de l'activité des enzymes antioxydantes.

**Partie II:** Etude neurocomportementale et évaluation des troubles mitochondriaux dans les régions cérébrales de la progéniture (f1, f2) après exposition de rates gestantes et allaitantes à de faibles doses d'imidaclopride et de cyperméthrine

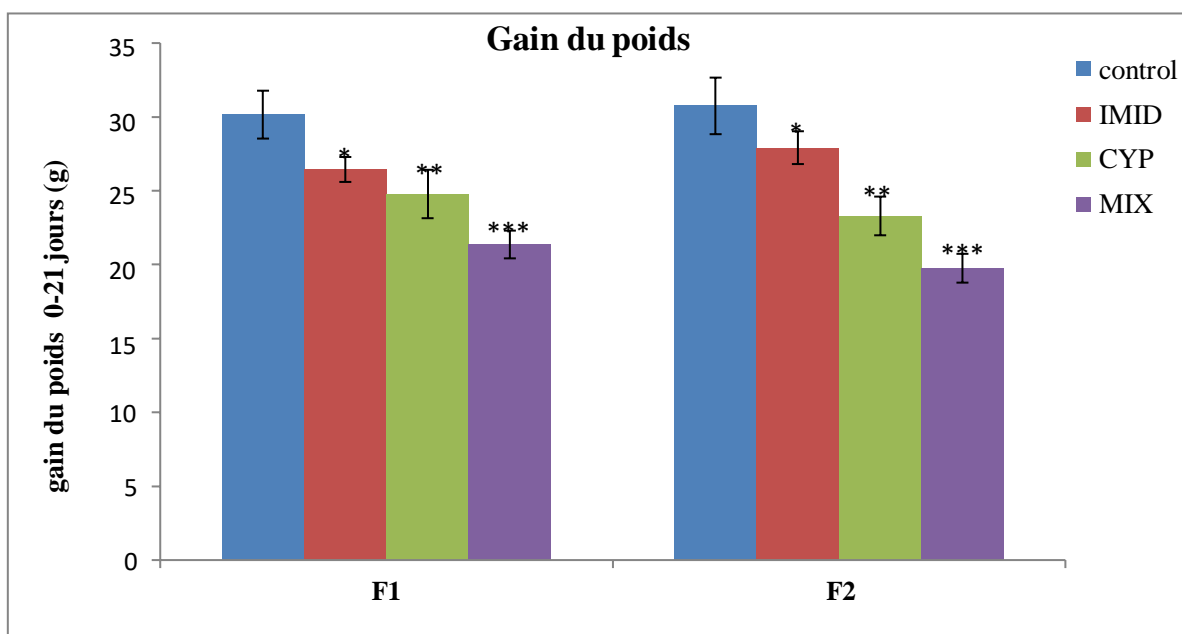
### I. Résultats

#### • Phase juvénile

#### 1. Étude comportementale

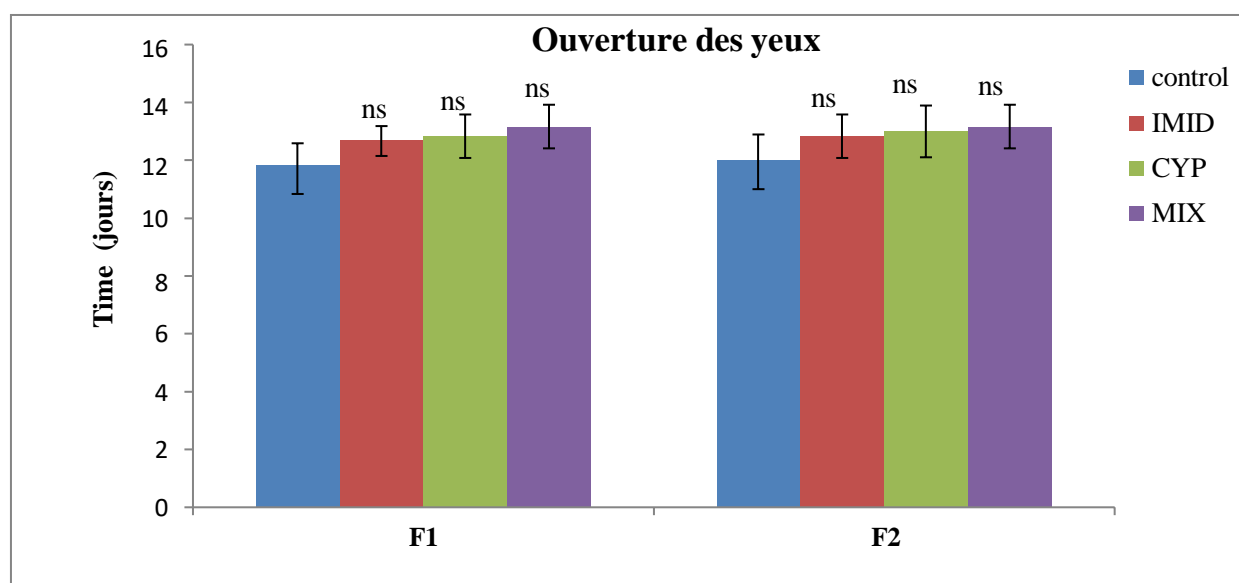
##### 1.1. Tests de développement sensori-moteur

La maturation des ratons a été évaluée par la prise de poids corporel du 1<sup>er</sup> jour (PND1) au jour 21 (PND21). L'exposition indépendante et combiné des mères (F0) à l'IMID et à la CYP a réduit de manière significative le gain du poids des ratons de la première et de la deuxième génération ( $p \leq 0,05$  pour l'IMID,  $p \leq 0,01$  pour la CYP et  $p \leq 0,001$  pour la MIX) (**Fig. 57**).



**Fig. 57:** Effets de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur la prise de poids des nouveau-nés de la première et de la deuxième génération. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, ( $n = 10$ ), \* Différence significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,05$ ). \*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,01$ ). \*\*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,001$ ).

Concernant l'ouverture des yeux, Il n'y a pas eu de changements significatifs chez tous les groupes traités par rapport au groupe témoin (**Fig. 58**).



**Fig. 58:** Effets de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur l'ouverture des yeux chez les rats de la première et de la deuxième génération. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, ( $n = 10$ ), ns pas de différence significative ( $p > 0,05$ ).

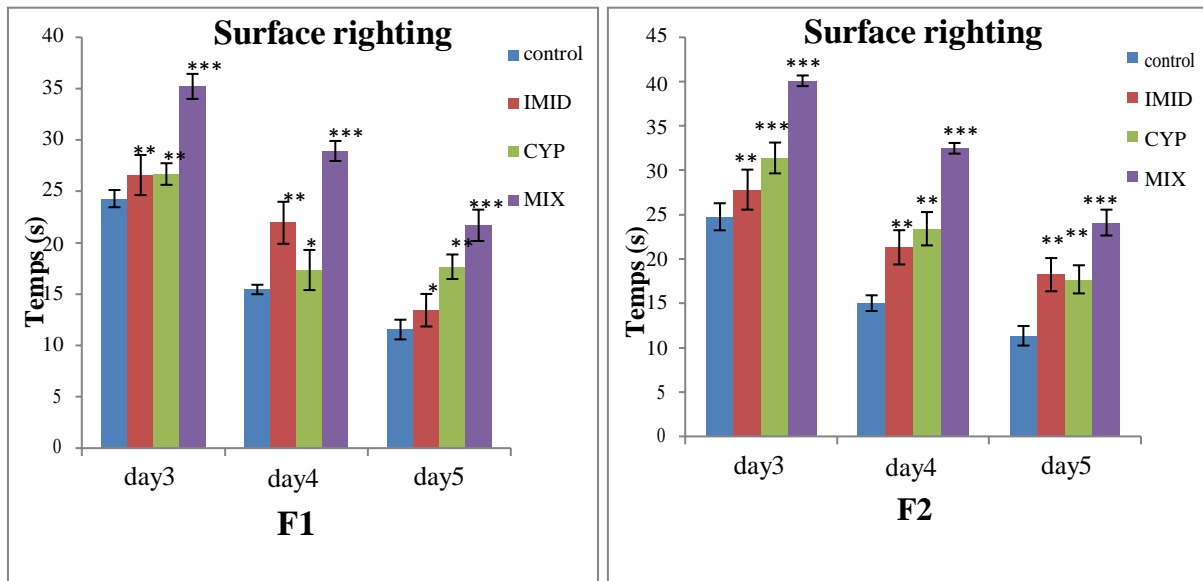
### 1.1.1. Evaluation du développement locomoteur

Le développement neuromoteur a été également étudié par plusieurs tests tels que le surface righting, Cliff aversion, negative geotaxis et le front-limb Suspension.

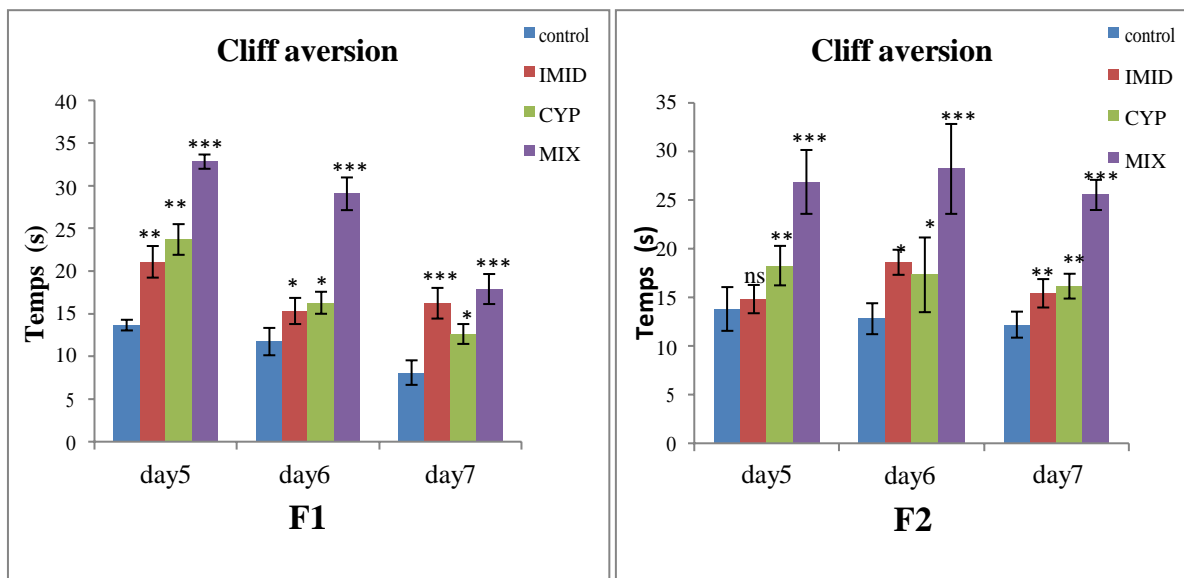
Le développement de la capacité à se retourner (*surface righting*) a été significativement altéré par l'IMID et la CYP soit seule ou en mixture. Le temps moyen nécessaire pour se retourner était plus élevé chez les rats de la génération F1 et F2 nés des mamans traités par rapport au témoin ( $p \leq 0,01$  pour l'IMID et la CYP et  $p \leq 0,001$  pour la MIX) (**Fig. 59**).

L'évitement des falaises (*Cliff aversion*) chez la progéniture F1 et F2 est illustré en **figure 60**. Les rats nés des mamans traités ont mis plus de temps pour reculer sur la plateforme lors des trois jours de test avec une différence significative avec le control, seul en PND 5 l'IMID n'a pas exercé aucun effet significatif sur les rats de la deuxième génération.

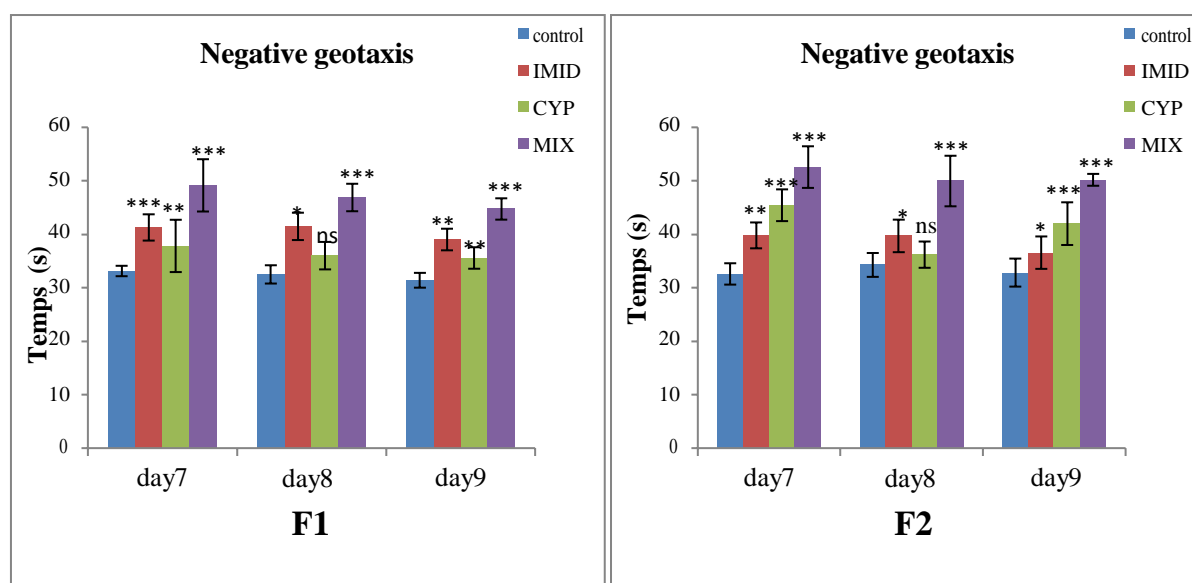
L'exposition pré et postnatale à l'IMID et à la CYP a significativement altéré la capacité des rats à présenter un réflexe dans le test de *negative geotaxis*. Cependant, en PND8 aucune différence significative n'a été enregistrée chez les rats de la première et de la deuxième génération nés des mères traités avec de la CYP seule (**Fig. 61**).



**Fig. 59:** Effets de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur le réflexe de redressement de surface chez les rats de la première et de la deuxième génération. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, (n= 10), \* Différence significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,05$ ). \*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,01$ ). \*\*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,001$ ).



**Fig. 60:** Effets de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur l'évitement des falaises chez les rats de la première et de la deuxième génération. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, (n= 10), ns pas de différence significative ( $p > 0,05$ ). \* Différence significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,05$ ). \*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,01$ ). \*\*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,001$ ).

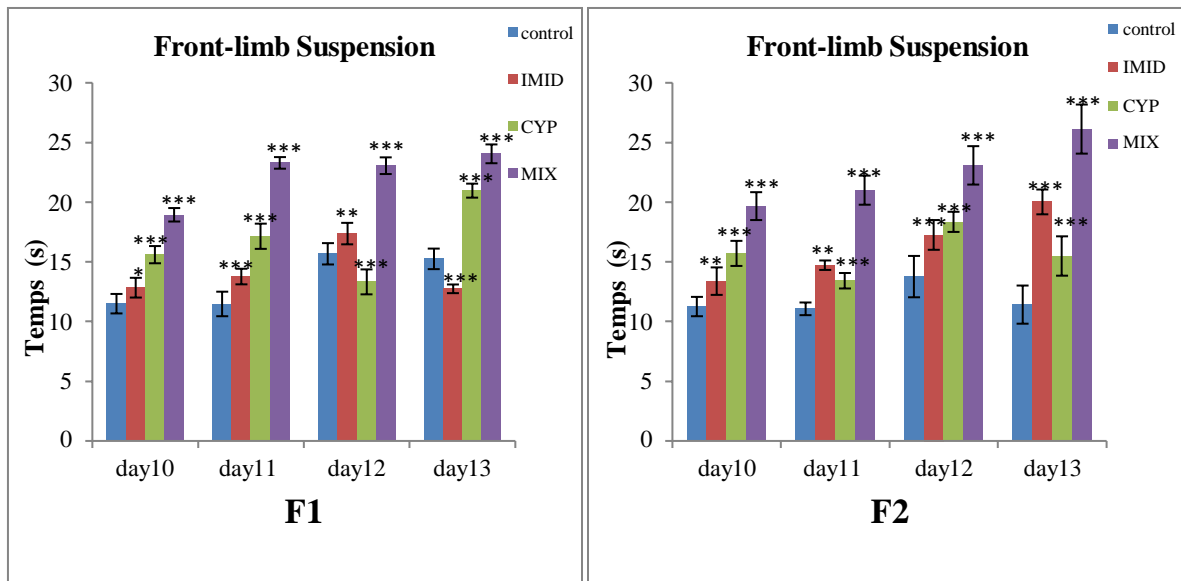


**Fig. 61:** Effets de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur le développement du réflexe chez les rats de la première et de la deuxième génération. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, ( $n = 10$ ), ns pas de différence significative ( $p > 0,05$ ). \* Différence significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,05$ ). \*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,01$ ). \*\*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,001$ ).

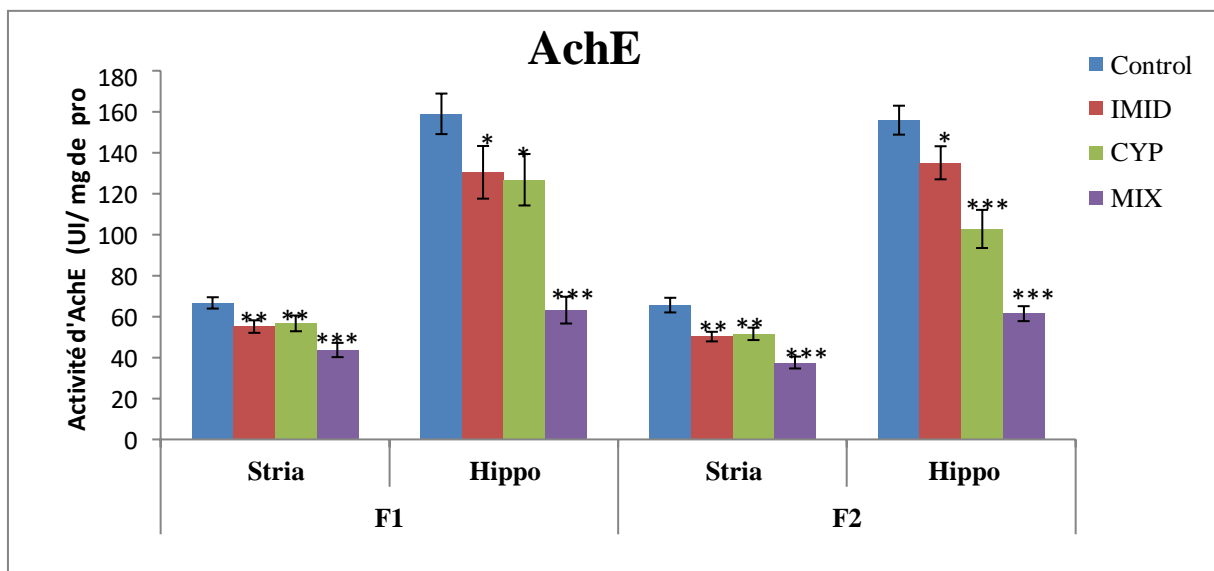
La coordination, le développement et la force motrice ont été évalué par le test de *front-limb Suspension*. Les résultats obtenus ont montré que la latence de chute a été significativement affectée, les rats nés des mères traités avec de l'IMID et de la CYP soit seule ou en mixture sont restés suspendus au fil métallique plus longtemps que les témoins (Fig.62).

## 2. Evaluation de l'activité de l'AcChE et des niveaux de calcium cytosolique chez les rats de la génération F1 et F2

L'exposition des mères à l'IMID et au CYP seule ou en cocktail a entraîné une diminution significative de l'activité de AcChE dans le striatum et l'hippocampe des rats juvénile de la première et de la deuxième génération (Fig. 63).



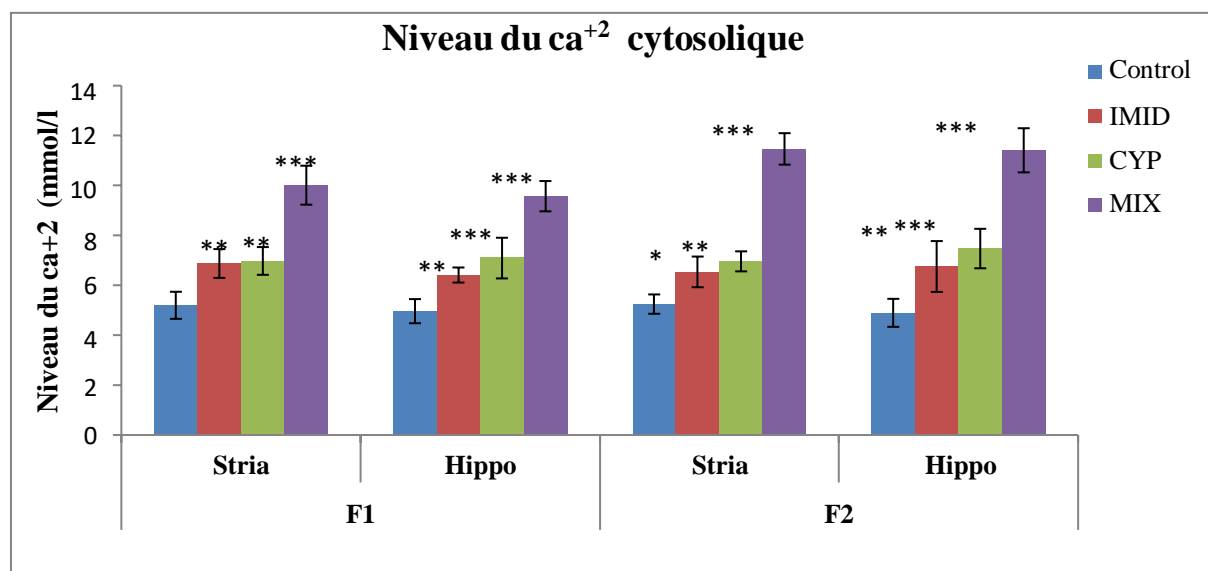
**Fig. 62:** Effets de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur la coordination, le développement et la force motrice chez les rats de la première et de la deuxième génération. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, (n= 10), \* Différence significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,05$ ). \*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,01$ ). \*\*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,001$ ).



**Fig. 63:** Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur l'activité de l'AChE dans le striatum l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 21 jours (phase juvénile). Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, (n= 10). \* Différence significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,05$ ). \*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,01$ ). \*\*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,001$ ).



Les résultats des changements dans les concentrations de calcium à l'extérieur des mitochondries sont indiqués dans la **Fig. 64**. Après une exposition pré et post-natal à l'IMID et à la CYP soit seule ou en mixture, les niveaux du calcium cytosolique ont augmenté d'une manière significative chez les rats nés des mères traitées par rapport à ceux nés des mères témoin.



**Fig. 64:** Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur les niveaux du  $Ca^{+2}$  cytosolique dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 21 jours (phase juvénile). Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, ( $n=10$ ). \* Différence significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,05$ ). \*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,01$ ). \*\*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,001$ ).

### 3. Evaluation du gonflement mitochondrial et de la perméabilité membranaire

Les résultats du **Tableau 5** montrent une augmentation significative du gonflement mitochondrial dans le striatum et l'hippocampe des rats de la première et de la deuxième génération nés des mamans traitées durant la gestation et tout au long de l'allaitement avec de l'IMID et de la CYP, seule ou en mixture, par rapport au rats nés des mamans non traités.

L'exposition maternelle à l'IMID et à la CYP, seule ou en combinaison, a augmenté d'une manière significative la perméabilité mitochondriale dans le striatum et l'hippocampe des rats de la première génération. Cet effet a été transformé aux rats de la génération F2 nés des mamans traités même s'il n'y a pas eu d'exposition directe de la progéniture F1 (**Tab. 6**).

**Tab.5:** Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur le gonflement des mitochondries dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 21 jours (phase juvénile). Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, (n= 10). \*\* Différence hautement significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,01$ ). \*\*\* Différence très hautement significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,001$ ).

Gonflement mitochondrial (densité optique)				
Génération				
	F1		F2	
	Régions du cerveau			
	Striatum	Hippocampe	Striatum	Hippocampe
<b>Control</b>	0.297 $\pm$ 0.020	0.262 $\pm$ 0.017	0.293 $\pm$ 0.014	0.270 $\pm$ 0.013
<b>IMID</b>	0.201 $\pm$ 0.022**	0.185 $\pm$ 0.012***	0.213 $\pm$ 0.008***	0.179 $\pm$ 0.017***
<b>CYP</b>	0.214 $\pm$ 0.022**	0.170 $\pm$ 0.015***	0.210 $\pm$ 0.032***	0.192 $\pm$ 0.021***
<b>MIX</b>	0.182 $\pm$ 0.012***	0.118 $\pm$ 0.014***	0.130 $\pm$ 0.011***	0.098 $\pm$ 0.006***

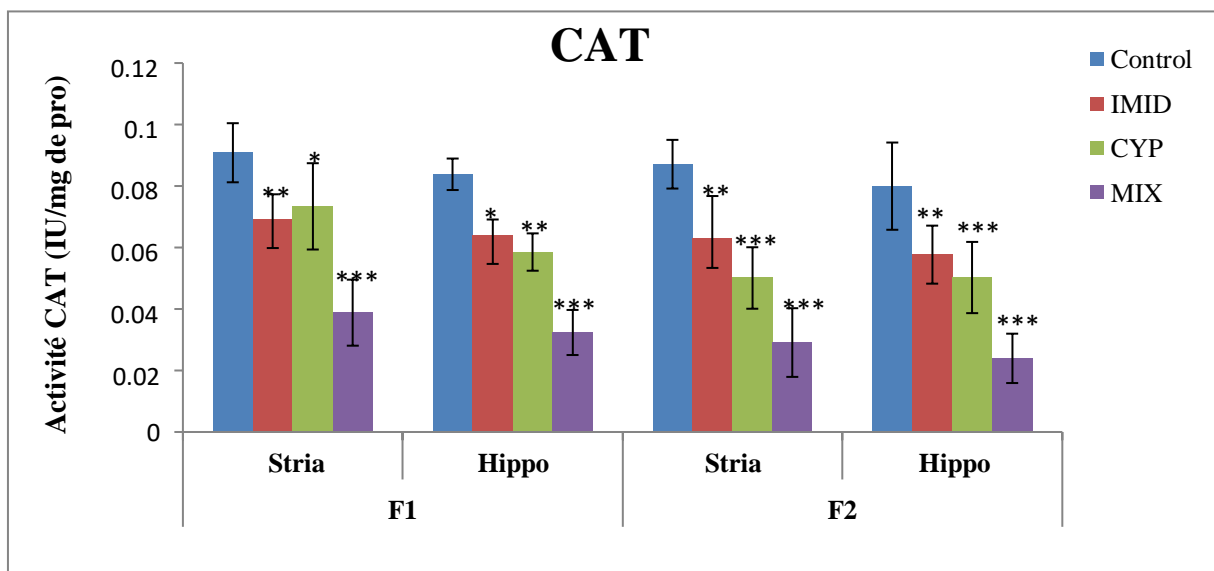
**Tab.6:** Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur la perméabilité mitochondriale dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 21 jours (phase juvénile). Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, (n= 10). \* Différence significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,05$ ). \*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,01$ ). \*\*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,001$ ).

Perméabilité mitochondriale ( $\Delta OD/\Delta t$ )				
Génération				
	F1		F2	
	Régions du cerveau			
	Striatum	Hippocampe	Striatum	Hippocampe
<b>Control</b>	0.017 $\pm$ 0.006	0.019 $\pm$ 0.003	0.022 $\pm$ 0.001	0.020 $\pm$ 0.002
<b>IMID</b>	0.027 $\pm$ 0.007*	0.031 $\pm$ 0.003***	0.026 $\pm$ 0.002**	0.030 $\pm$ 0.002***
<b>CYP</b>	0.031 $\pm$ 0.008**	0.037 $\pm$ 0.005***	0.032 $\pm$ 0.001***	0.037 $\pm$ 0.001***
<b>MIX</b>	0.032 $\pm$ 0.003**	0.040 $\pm$ 0.005***	0.031 $\pm$ 0.001***	0.041 $\pm$ 0.002***

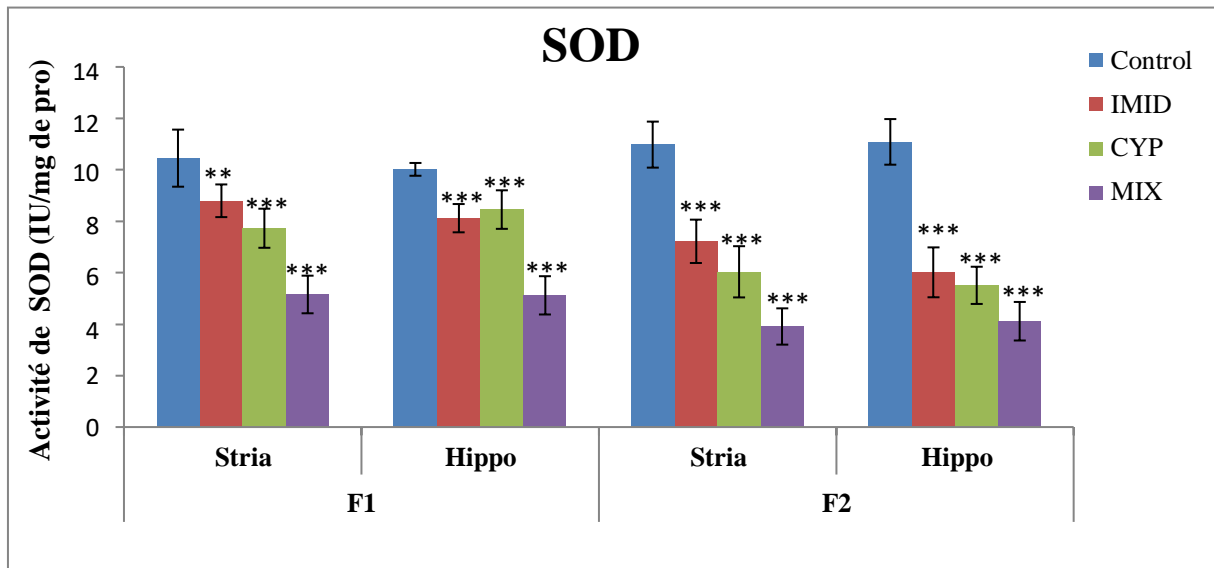
#### 4. Evaluation du statut redox mitochondrial dans le striatum et l'hippocampe des rats de la génération F1 et F2

En ce qui concerne le pouvoir antioxydant, l'activité de la CAT, SOD, GST, GPx et le niveau de GSH dans le striatum et l'hippocampe des rats nés des mamans traités avec de l'IMID et de la CYP, soit seule ou en mixture, ont enregistré des valeurs significativement

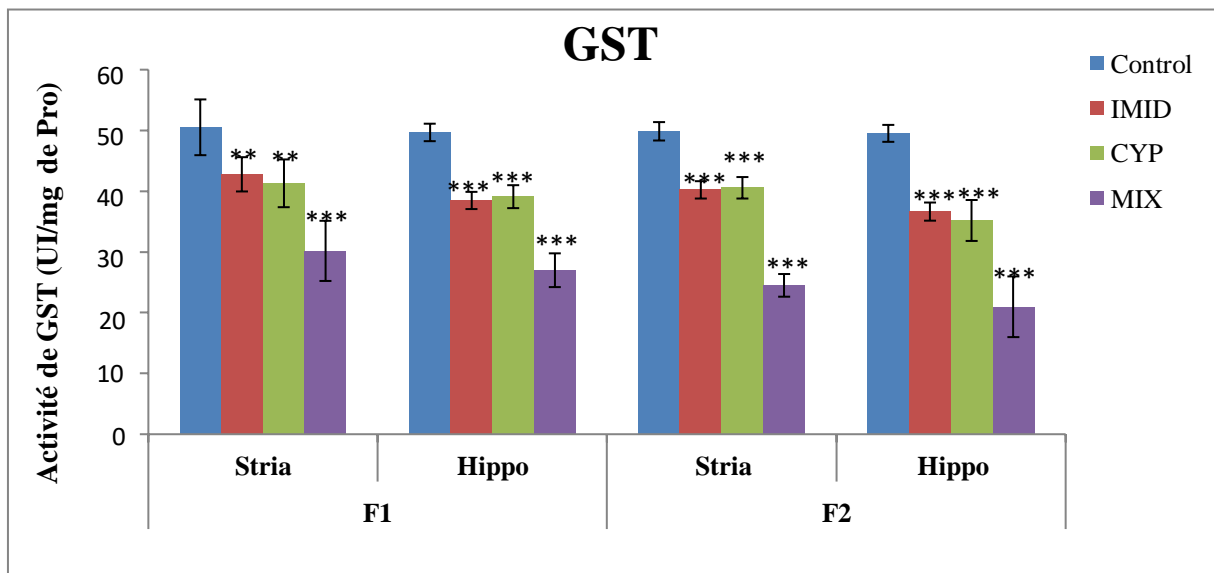
plus basses que le contrôle. Pour la peroxydation lipidique, nos résultats ont montré une augmentation significative du MDA chez les rats nés des mamans traités par rapport à ceux du témoin. Nos résultats ont également montré la persistance de la perturbation de l'homéostasie redox mitochondriale chez les rats de la génération F2 même s'il n'y a pas eu d'exposition directe de la progéniture F1. Les rats des groupes traités ont enregistré une diminution significative ( $p \leq 0.001$ ) dans l'activité de la CAT, SOD, GST, GPx, le niveau de GSH et des valeurs significativement plus élevés du MDA ( $p \leq 0.001$ ). (**Fig. 65, 66, 67, 68, 69, 70**).



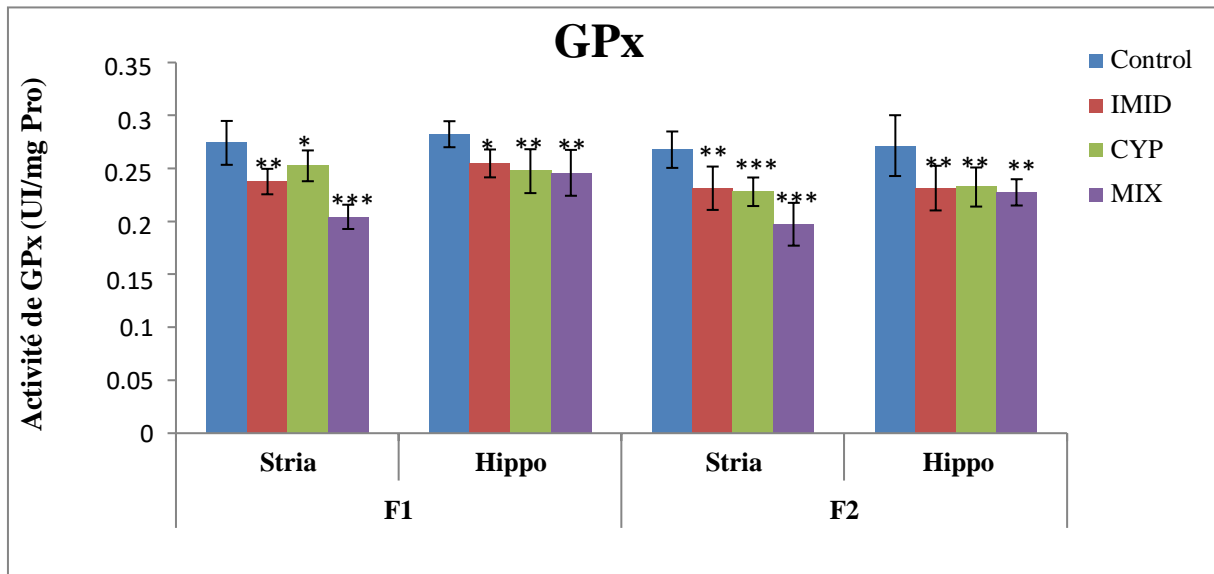
**Fig. 65** : Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur l'activité de la CAT dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 21 jours (phase juvénile). Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, ( $n= 10$ ). \* Différence significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,05$ ). \*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,01$ ). \*\*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,001$ ).



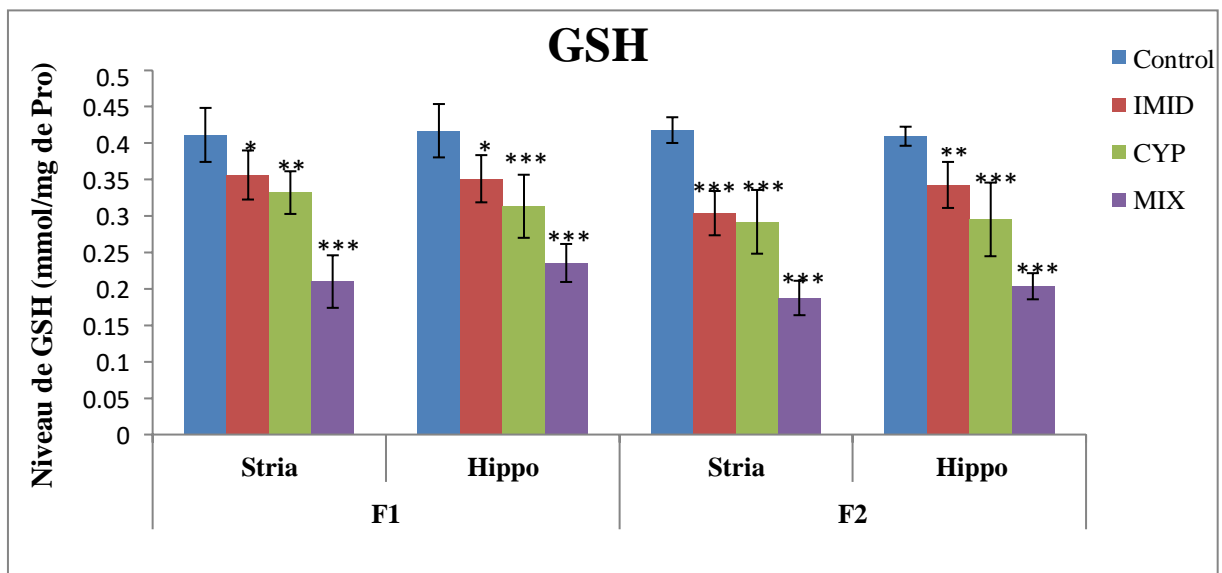
**Fig.66:** Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur l'activité de la SOD dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 21 jours (phase juvénile). Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, (n= 10). \*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,01$ ). \*\*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,001$ ).



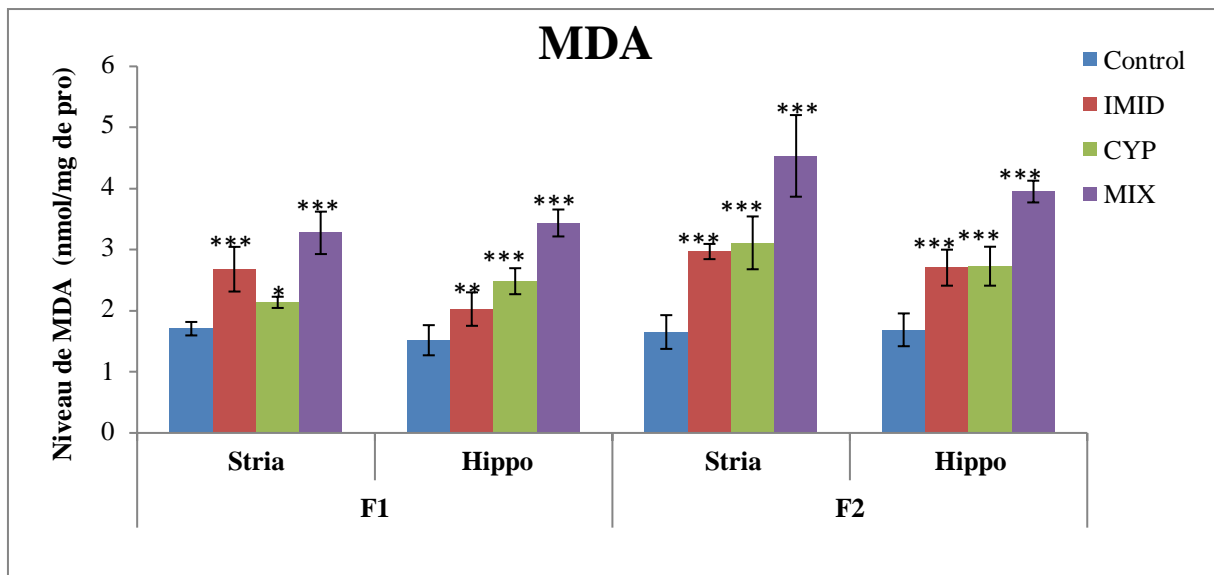
**Fig. 67 :** Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur l'activité de la GST dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 21 jours (phase juvénile). Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, (n= 10). \*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,01$ ). \*\*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,001$ ).



**Fig. 68 :** Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur l'activité de la GPx dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 21 jours (phase juvénile). Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, (n= 10). \* Différence significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,05$ ). \*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,01$ ). \*\*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,001$ ).



**Fig.69:** Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur les niveaux de GSH dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 21 jours (phase juvénile). Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, (n= 10). \* Différence significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,05$ ). \*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,01$ ). \*\*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,001$ ).



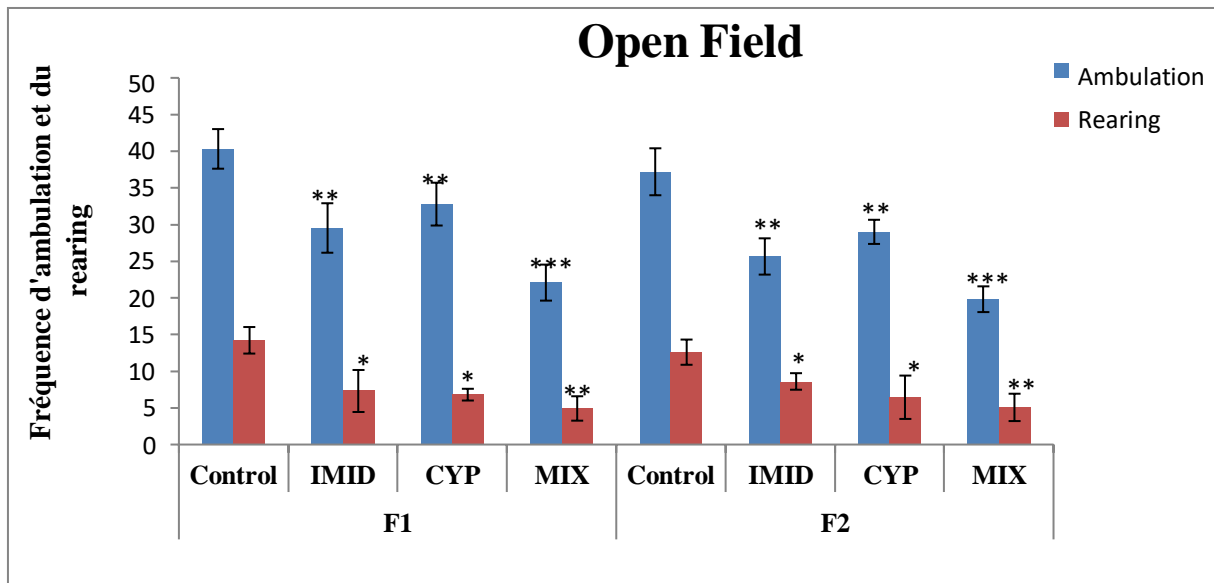
**Fig. 70 :** Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur les niveaux de MDA dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 21 jours (phase juvénile). Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, ( $n=10$ ). \* Différence significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,05$ ). \*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,01$ ). \*\*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,001$ ).

- Phase adulte

1. Étude comportementale

- Test d'Open Field

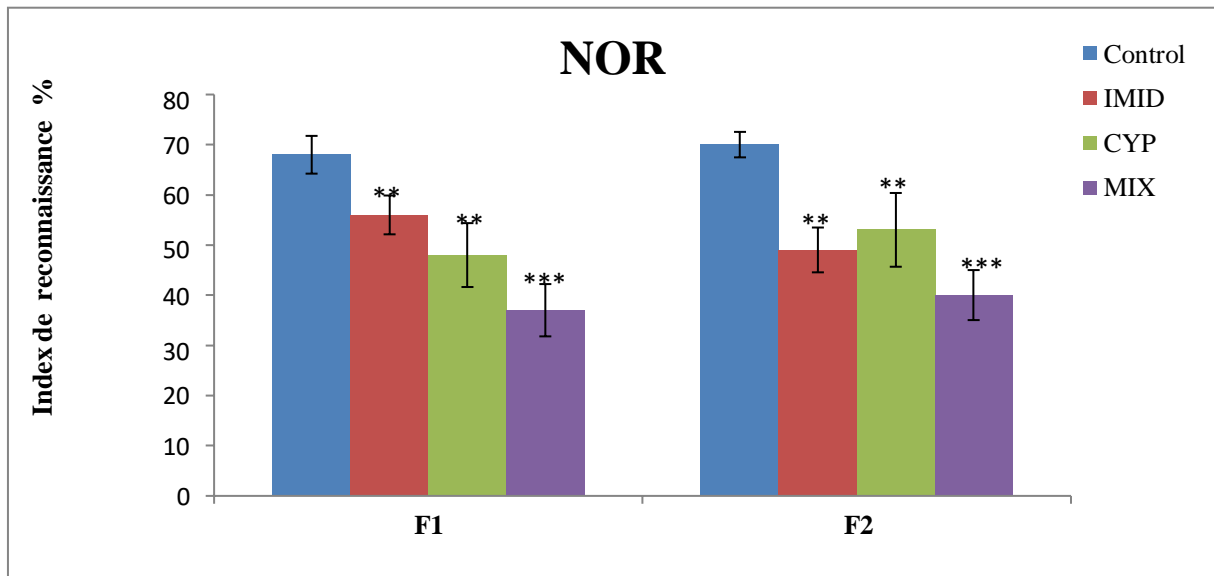
Les résultats de l'étude en Open Field sont illustrés dans la **figure 71**. Ils ont montré l'installation d'un état d'anxiété par une diminution du nombre de cases traversées (ambulation) et du rearing chez les ratons de la génération F1 et F2 nés des mamans traités par rapport au témoin.



**Fig.71:** Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur le niveau d'anxiété des rats de la première et de la deuxième génération à l'aide du test Open Field (fréquence d'ambulation et du rearing), observés à l'âge de 2 mois (phase adulte). Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, ( $n= 10$ ). \*\* Différence hautement significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,01$ ). \*\*\* Différence très hautement significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,001$ ).

• **Test de reconnaissance de nouveaux objets (NOR)**

La capacité cognitive a été contrôlée par le test NOR. Les résultats des temps d'exploration des objets sont présentés dans la **figure 72**. Ils montrent une diminution très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) de l'indice de reconnaissance (IR) chez les ratons de la génération F1 et F2 nés des mamans traités par la MIX par rapport au témoin.



**Fig.72:** Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur la mémoire de travail et de la capacité d'apprentissage des rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 2 mois (phase adulte). Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, (n= 10). \*\* Différence hautement significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,01$ ). \*\*\* Différence très hautement significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,001$ ).

• **Test d'Elevated Plus Maze (EPM)**

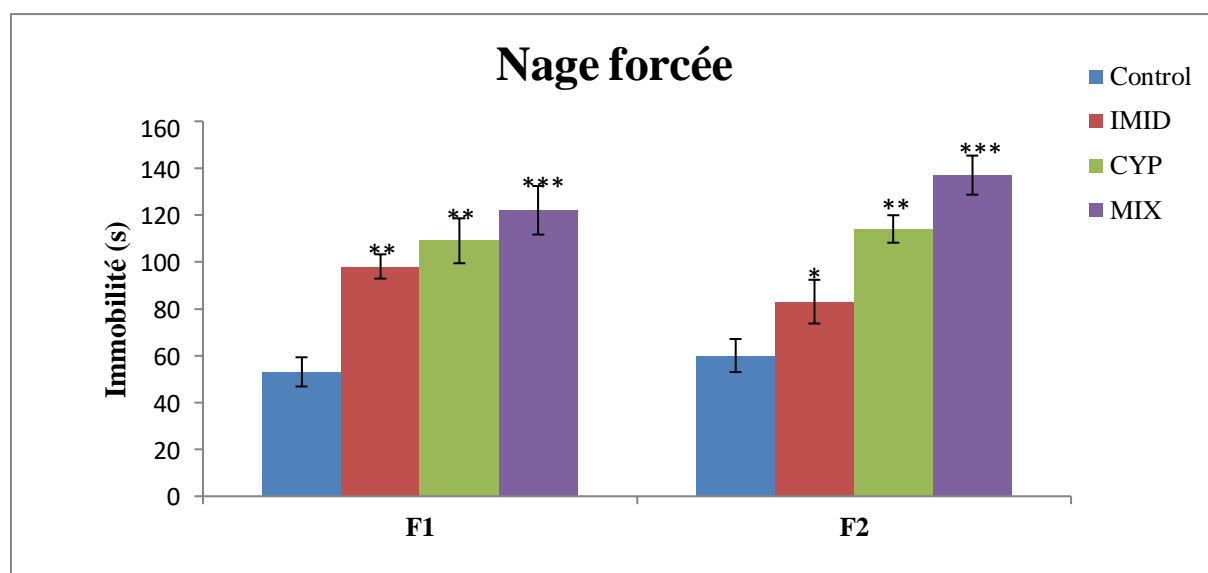
**Tab.7:** Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur l'anxiété des rats de la première et de la deuxième génération à l'aide du test EPM, observés à l'âge de 2 mois (phase adulte). Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, (n= 10). ns pas de différence significative par rapport au contrôle ( $p > 0,05$ ). \* Différence significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,05$ ). \*\* Différence hautement significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,01$ ).

	F1			F2		
	Temps passé dans les bras fermés (s)	Temps passé dans les bras ouverts (s)	Nombre d'entrées dans les bras fermés et ouverts	Temps passé dans les bras fermés (s)	Temps passé dans les bras ouverts (s)	Nombre d'entrées dans les bras fermés et ouverts
<b>Control</b>	289,3 $\pm$ 4,16	10,7 $\pm$ 4,16	3,33 $\pm$ 1,56	290,1 $\pm$ 3,56	9,9 $\pm$ 3,56	2,86 $\pm$ 1,43
<b>IMID</b>	295,5 $\pm$ 1,63*	4,5 $\pm$ 1,63*	2,15 $\pm$ 0,74 <sup>ns</sup>	293,6 $\pm$ 1,06 <sup>ns</sup>	6,4 $\pm$ 1,06 <sup>ns</sup>	1,93 $\pm$ 0,52 <sup>ns</sup>
<b>CYP</b>	292,7 $\pm$ 3,01 <sup>ns</sup>	7,3 $\pm$ 3,01 <sup>ns</sup>	2,46 $\pm$ 0,83 <sup>ns</sup>	294,4 $\pm$ 2,25 <sup>ns</sup>	5,6 $\pm$ 2,25 <sup>ns</sup>	1,74 $\pm$ 0,72 <sup>ns</sup>
<b>MIX</b>	298,8 $\pm$ 0,84**	1,2 $\pm$ 0,84**	1,5 $\pm$ 0,41 <sup>ns</sup>	297,9 $\pm$ 1,17*	2,1 $\pm$ 1,17*	1,31 $\pm$ 0,86 <sup>ns</sup>



• **Test de la nage forcée**

Les résultats du test de la nage forcée sont illustrés dans la **Figure 73**. Les rats nés des mamans traitées par l'IMID, la CYP ou la MIX ont tous présenté une augmentation significative du temps d'immobilité par rapport aux témoins.



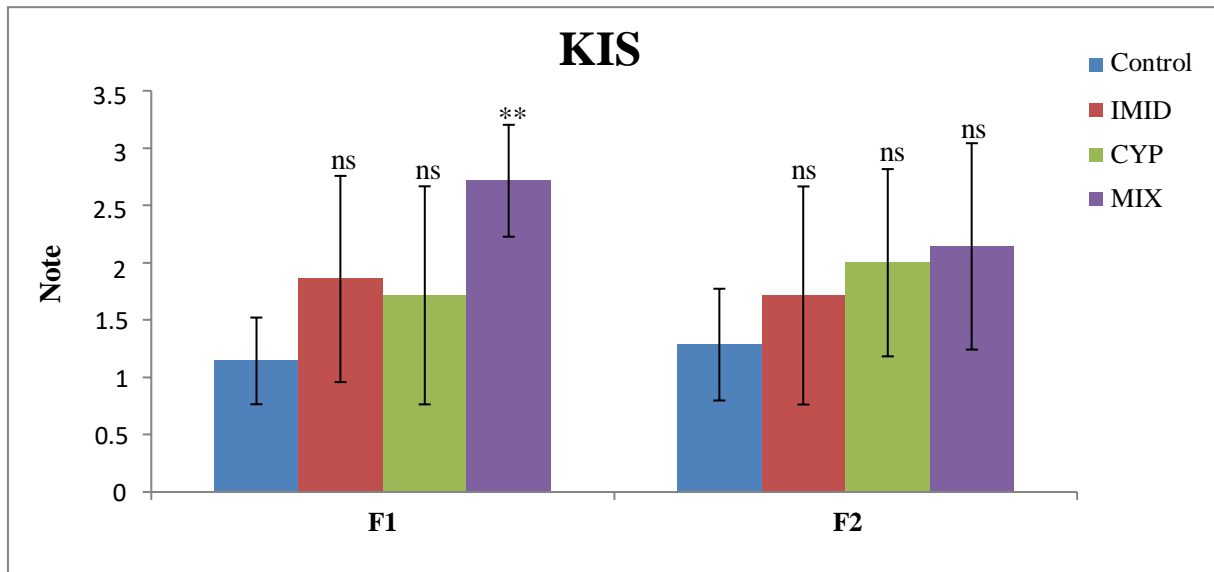
**Fig. 73:** Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur le temps d'immobilité des rats de la première et de la deuxième génération à l'aide du test de la nage forcée, observés à l'âge de 2 mois (phase adulte). Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, ( $n= 10$ ). \* Différence significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,05$ ). \*\* Différence hautement significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,01$ ). \*\*\* Différence très hautement significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,001$ ).

• **Konziela's inverted screen**

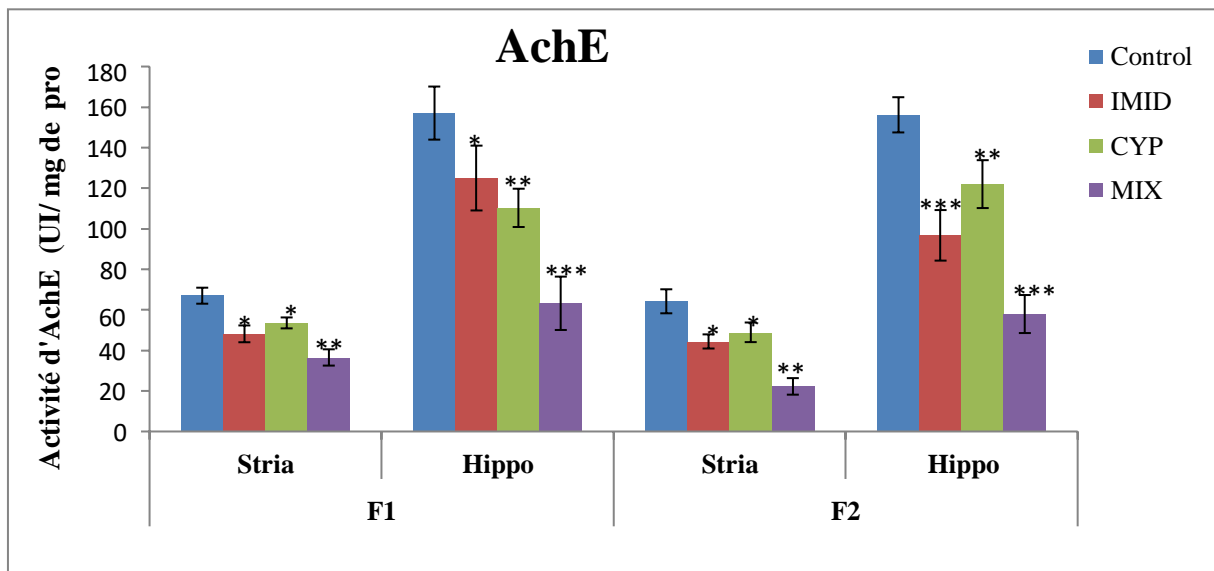
La force musculaire est évaluée par le test de Konziela's inverted screen. Les résultats de ce test sont illustrés dans la **figure 74**. Seuls les rats de la génération F1 nés des mamans traités avec la MIX qui ont présenté une augmentation très significative ( $p \leq 0,01$ ) du temps de chute de l'écran inversé.

**2. Evaluation de l'activité de l'AChE et des niveaux de calcium cytosolique chez les rats de la génération F1 et F2**

L'exposition des mères à l'IMID et au CYP seule ou en cocktail a entraîné la persistance d'une diminution significative de l'activité de AChE dans le striatum et l'hippocampe des rats adultes de la première et de la deuxième génération (**Fig. 75**).

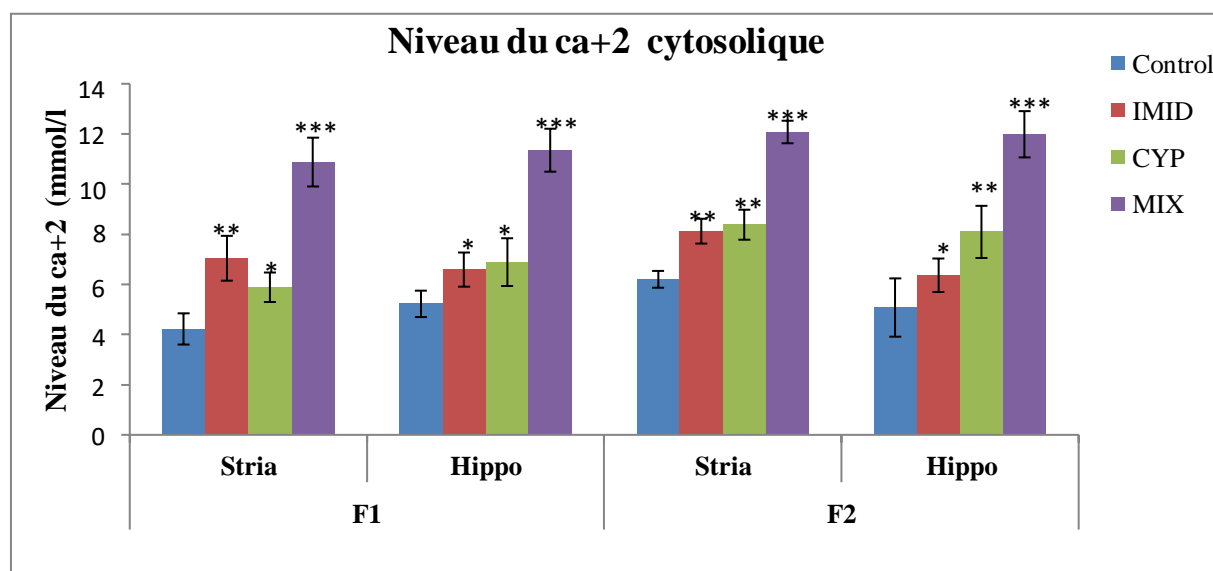


**Fig. 74:** Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur la force musculaire des rats de la première et de la deuxième génération à l'aide du test de KIS, observés à l'âge de 2 mois (phase adulte). Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, ( $n= 10$ ). ns pas de différence significative par rapport au contrôle ( $p > 0,05$ ). \*\* Différence hautement significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,01$ ).



**Fig. 75:** Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur l'activité de l'AChE dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 2 mois (phase adulte). Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, ( $n= 10$ ). \* Différence significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,05$ ). \*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,01$ ). \*\*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,001$ ).

Les résultats des changements dans les concentrations de calcium à l'extérieur des mitochondries sont indiqués dans la **figure 76**. Après une exposition pré et post-natal à l'IMID et à la CYP soit seule ou en mixture, les niveaux du calcium cytosolique ont augmenté d'une manière significative chez les rats nés des mères traitées par rapport à ceux nés des mères témoin.



**Fig. 76:** Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur les niveaux du ca<sup>+2</sup>cytosolique dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 2 mois (phase adulte). Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, (n= 10). \* Différence significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,05$ ). \*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,01$ ). \*\*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,001$ ).

### 3. Evaluation du gonflement mitochondrial et de la perméabilité membranaire

Les résultats du **Tableau 8** montrent une augmentation significative du gonflement mitochondrial dans le striatum et l'hippocampe des rats de la première et de la deuxième génération nés des mamans traitées durant la gestation et tout au long de l'allaitement avec de l'IMID et de la CYP, seule ou en mixture, par rapport au rats nés des mamans non traités.

### 4. Evaluation du statut redox mitochondrial dans le striatum et l'hippocampe des rats de la génération F1 et F2

En ce qui concerne le pouvoir antioxydant, l'activité de la CAT, SOD, GST, GPx et le niveau de GSH dans le striatum et l'hippocampe des rats adultes nés des mamans traités avec de l'IMID et de la CYP, soit seule ou en mixture, ont enregistré des valeurs significativement

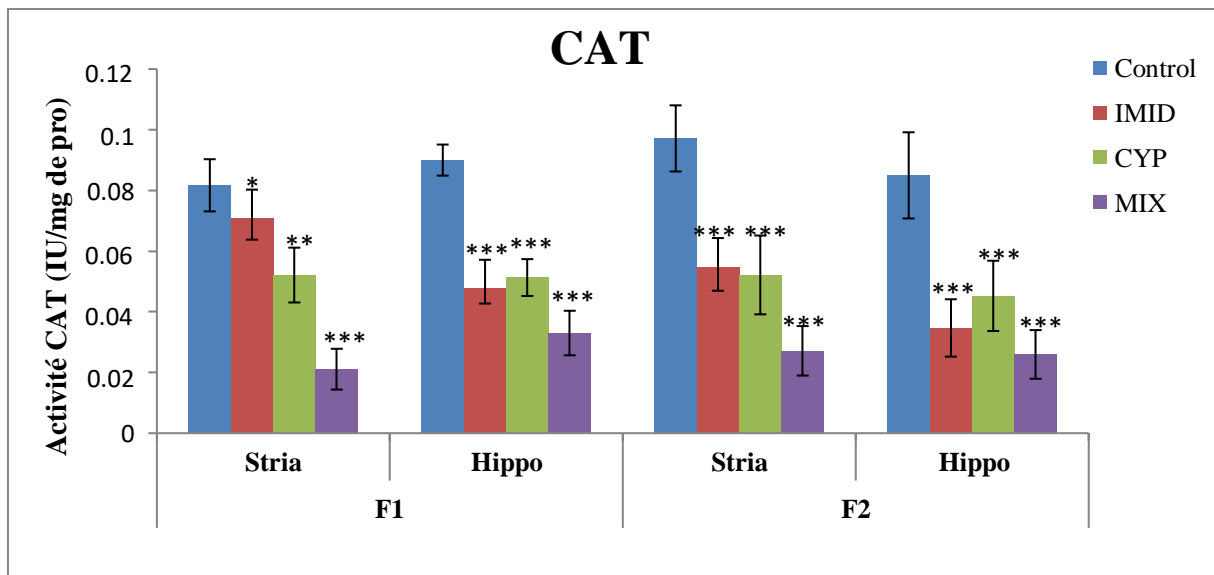
plus basses que le contrôle. Pour la peroxydation lipidique, nos résultats ont montré une augmentation significative du MDA chez les rats âgés de 2 mois nés des mamans traités par rapport à ceux du témoin. Nos résultats ont également montré la persistance de la perturbation de l'homéostasie redox mitochondriale chez les rats adultes de la génération F2 même s'il n'y a pas eu d'exposition directe de la progéniture F1. Les rats des groupes traités ont enregistré une diminution significative ( $p \leq 0.001$ ) dans l'activité de la CAT, SOD, GST, GPx, le niveau de GSH et des valeurs significativement plus élevés du MDA ( $p \leq 0.001$ ). (Fig. 77,78, 79, 80, 81, 82).

**Tab.8:** Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur le gonflement des mitochondries dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération observés à l'âge de 2 mois (phase adulte). *Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, (n= 10). \*\* Différence hautement significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,01$ ). \*\*\* Différence très hautement significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,001$ ).*

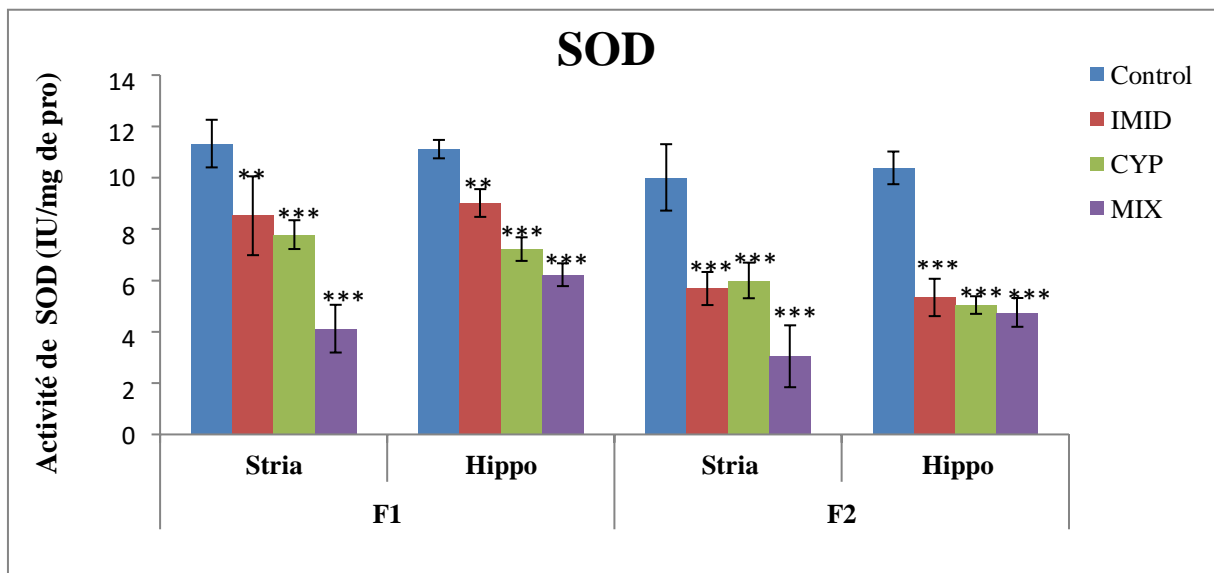
Gonflement mitochondrial (densité optique)				
Génération (adultes)				
	F1		F2	
	Regions du cerveau			
	Striatum	Hippocampus	Striatum	Hippocampus
<b>Control</b>	0.294 $\pm$ 0.030	0.260 $\pm$ 0.027	0.293 $\pm$ 0.024	0.271 $\pm$ 0.032
<b>IMID</b>	0.212 $\pm$ 0.036**	0.172 $\pm$ 0.013***	0.203 $\pm$ 0.010***	0.167 $\pm$ 0.019***
<b>CYP</b>	0.217 $\pm$ 0.022**	0.163 $\pm$ 0.020***	0.193 $\pm$ 0.022***	0.174 $\pm$ 0.1***
<b>MIX</b>	0.176 $\pm$ 0.014***	0.102 $\pm$ 0.024***	0.114 $\pm$ 0.013***	0.083 $\pm$ 0.008***

**Tab.9:** Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur la perméabilité des mitochondries dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération observés à l'âge de 2 mois (phase adulte). *Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, (n= 10). \*\* Différence hautement significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,01$ ). \*\*\* Différence très hautement significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,001$ ).*

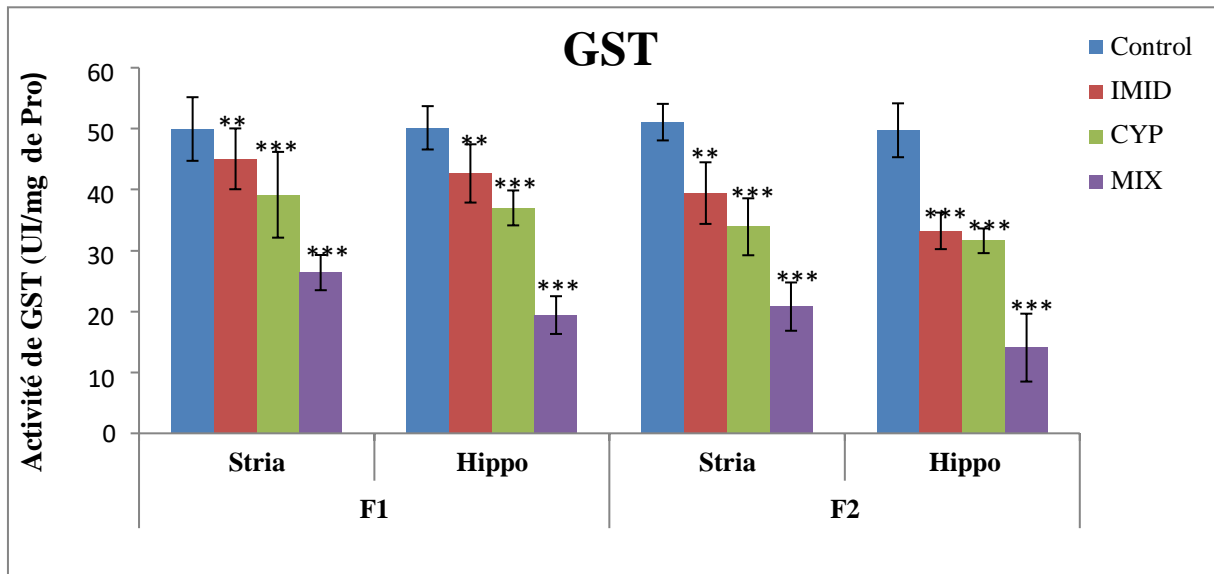
Permeabilité Mitochondrial ( $\Delta OD/\Delta t$ )				
Génération (adultes)				
	F1		F2	
	Regions du cerveau			
	Striatum	Hippocampus	Striatum	Hippocampus
<b>Control</b>	0.018 $\pm$ 0.005	0.019 $\pm$ 0.002	0.021 $\pm$ 0.002	0.018 $\pm$ 0.001
<b>IMID</b>	0.024 $\pm$ 0.006**	0.033 $\pm$ 0.002***	0.028 $\pm$ 0.001**	0.035 $\pm$ 0.002***
<b>CYP</b>	0.031 $\pm$ 0.005***	0.034 $\pm$ 0.003***	0.035 $\pm$ 0.001***	0.038 $\pm$ 0.002***
<b>MIX</b>	0.034 $\pm$ 0.002***	0.039 $\pm$ 0.004***	0.037 $\pm$ 0.003***	0.043 $\pm$ 0.001***



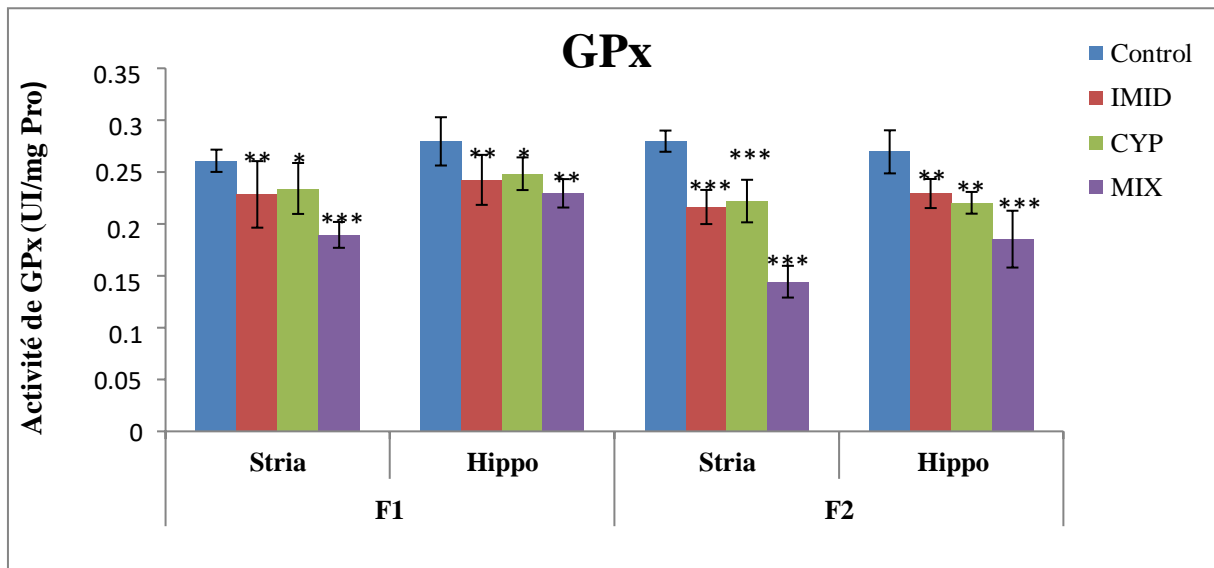
**Fig.77:** Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur l'activité de la CAT dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 2 mois (phase adulte). Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, (n= 10). \* Différence significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,05$ ). \*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,01$ ). \*\*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,001$ ).



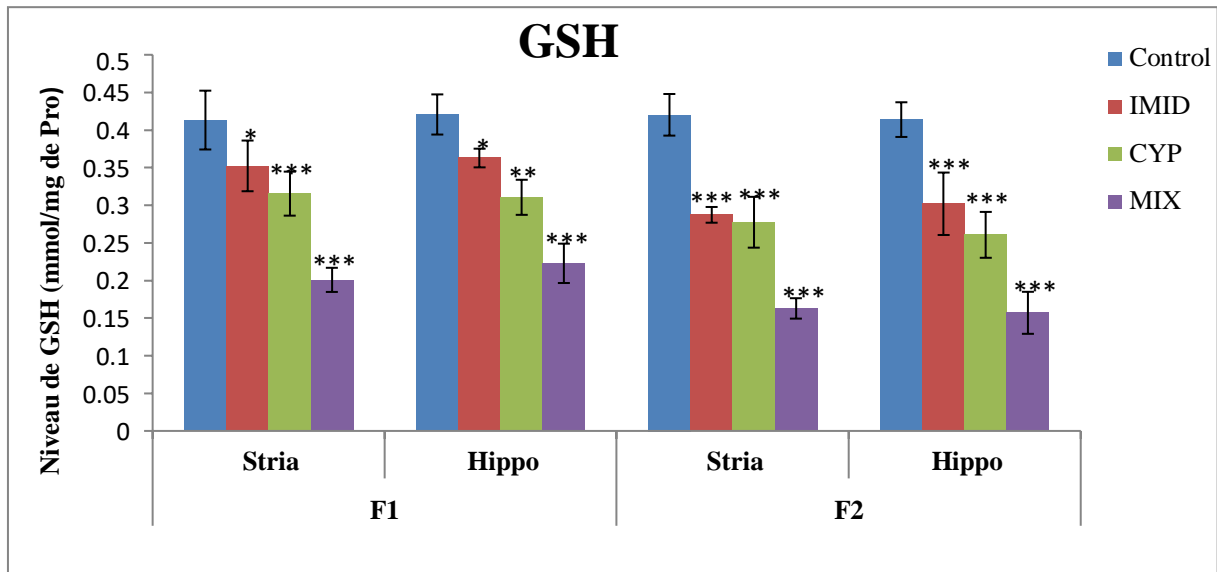
**Fig.78:** Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur l'activité de la SOD dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 2 mois (phase adulte). Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, (n= 10). \*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,01$ ). \*\*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,001$ ).



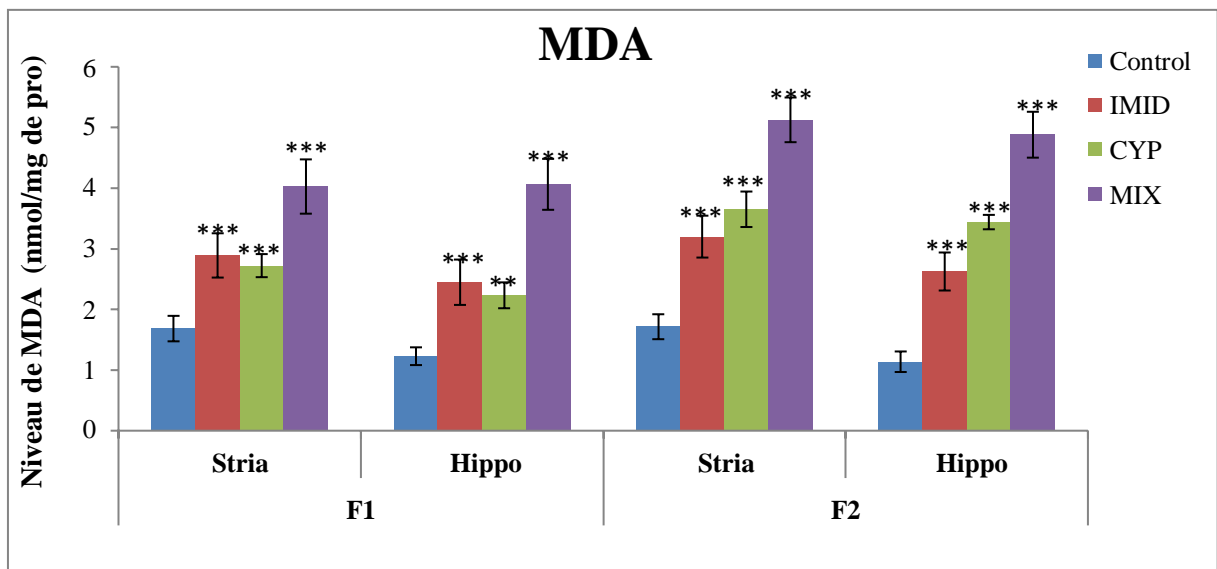
**Fig.79:** Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur l'activité de la GST dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 2 mois (phase adulte). Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, (n= 10). \*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,01$ ). \*\*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,001$ ).



**Fig.80:** Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur l'activité de la GPx dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 2 mois (phase adulte). Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, (n= 10). \* Différence significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,05$ ). \*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,01$ ). \*\*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,001$ ).



**Fig.81:** Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur les niveaux de GSH dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 2 mois (phase adulte). Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, (n= 10). \* Différence significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,05$ ). \*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,01$ ). \*\*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,001$ ).



**Fig.82:** Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à l'IMID, au CYP et à leur mélange sur les niveaux de MDA dans le striatum et l'hippocampe de rats de la première et de la deuxième génération, observés à l'âge de 2 mois (phase adulte). Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SD, (n= 10). \*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,01$ ). \*\*\* Différence très significative par rapport au contrôle ( $p \leq 0,001$ ).

### II. Discussion des résultats

L'omniprésence des pesticides dans l'environnement domestique et agricole augmente la probabilité d'exposition des femmes enceintes et des mères allaitantes, mettant ainsi leurs enfants en danger (Shittu et al., 2021). Pendant le développement du fœtus et de l'enfant, l'environnement peut jouer un rôle important dans l'apparition de nombreuses maladies chroniques, y compris les anomalies du développement neurologique. Il a également été démontré que ces effets néfastes peuvent être transmis aux générations suivantes sans qu'une exposition supplémentaire ne soit nécessaire (Blanc et al., 2020).

#### II.1. Effets de l'IMID et de la CYP sur la prise de poids des rats

Les résultats de la présente étude ont démontré que l'exposition à un mélange de pesticides pendant une période critique du développement, même à de faibles doses adaptées à la consommation humaine, affecte le développement neuronal et modifie l'état redox mitochondrial des rats de la première génération, ces effets négatifs étant également transmis aux rats de la deuxième génération. Il est bien connu que l'IMID, qui est un membre de la famille des néonicotinoïdes, agit de manière similaire à la nicotine en se liant aux nAChRs. L'hyperactivité de ces récepteurs influence la prise alimentaire et diminue le poids corporel, ce qui explique la réduction de la prise de poids chez les descendants F1 et F2 nés de mères traitées avec l'IMID et la CYP, seuls ou en combinaison. Cette réduction indique une diminution de la croissance, ce qui témoigne de la vulnérabilité des rats en développement aux pesticides, cela pourrait s'expliquer par le transfert lactationnel ou placentaire du composé de la mère au fœtus, ce paramètre est un facteur important pour déterminer la toxicité sur le développement (Syed et al., 2016). Les mêmes résultats obtenus par Burke et al. (2018) et Elser et al. (2020) qui ont montré une réduction de poids dans la progéniture de souris exposées pendant la gestation et tout au long de la lactation à 0,5 mg/kg d'IMID et 10 mg/kg de CYP, respectivement.

#### II.2. Effets de l'IMID et de la CYP sur l'activité d'AChE et le neuro-comportement des animaux

D'autre part, plusieurs études ont rapporté que l'exposition aux pyréthrinoïdes et aux néonicotinoïdes affecte les performances neurocomportementales, d'où le retard du réflexe de redressement (surface righting), les troubles du développement du mouvement coordonné. Cela confirme l'impact négatif de ces deux pesticides sur le développement neuromoteur, les



fonctions motrices et la vulnérabilité du cerveau en développement aux agressions xénobiotiques (**Syed et al., 2016**). Ces déficits neurocomportementaux pourraient résulter d'un dysfonctionnement dans de multiples zones du système nerveux central et périphérique ; une étude récente a montré que l'exposition fœtale et lactationnelle à un néonicotinoïde, la clothianidine, inhibe la maturation des neurones immatures dans les cellules progénitrices juvéniles et la viabilité des cellules progénitrices adultes (**Maeda et al., 2021**). Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Laugeray et al. (2017)** qui ont mené une étude chez la souris où les femelles ont reçu 5 et 20 mg/kg/jour de CYP tout au long de la gestation et jusqu'au 15<sup>ème</sup> jour de lactation et ceux de **Elser et al. (2020)** ayant montré que l'exposition maternelle au CYP influence le développement des neurones GABAergiques. Le retard dans la formation de ces neurones peut avoir un impact significatif sur leurs fonctions dans le cerveau mature, ce qui entraînera par la suite des problèmes de développement neurologique chez les enfants. Les travaux de **Lee et al. (2015)** témoignent qu'une seule exposition des souris pendant le pic de la croissance cérébrale (post-natal day PND10) à 0.5 mg/kg de la CYP, a un effet neurotoxique persistant chez l'adulte qui se manifeste par la réduction de la fonction cognitive et l'altération des niveaux de neuroprotéines à savoir la GluR1 (Récepteur de glutamate 1) qui joue un rôle clé dans le développement neuronal et le maintien de la plasticité synaptique. Cela indique que l'exposition néonatale à ce pyréthrianoïde induit des effets neurotoxiques persistants et peut-être irréversibles. Les travaux de **Abou-Dounia et al. (2008)** ont montré que plusieurs régions du cerveau à savoir le cortex et l'hippocampe ont été affectées après une seule exposition intrapéritonéale des ratte gestantes à une dose non létale (337 mg/kg) d'IMID, entraînant ainsi des déficits neurocomportementaux et une augmentation de l'expression de la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) chez les ratons âgés de 30 jours, ce qui correspond au début d'adolescence chez l'Homme. De plus, les résultats de **Nakayama et ses collaborateurs (2019)** ont montré que l'exposition précoce des souris (PND 12 à PND 26) à 5 mg/kg d'IMID provoque une réduction de la neurogenèse dans le gyrus denté (DG) de l'hippocampe qui est une partie d'une région censée contribuer à la formation de nouveaux souvenirs.

En outre, une corrélation significative entre les troubles de la mémoire, les problèmes de développement et de coordination et l'application d'antagonistes des récepteurs de l'ACh a été démontrée (**Haense et al., 2012**). On sait désormais que les néonicotinoïdes et les pyréthrianoïdes ont la capacité d'inhiber l'AChE, entraînant l'accumulation d'acétylcholine dans les synapses, provoquant ainsi une stimulation persistante des neurones cholinergiques

(Arora et al., 2017). Dans l'ensemble, nos résultats concordent avec ceux de Sinha et al. (2006) qui ont essayé de comprendre le mécanisme de toxicité d'un anti-moustique à base de pyréthrinoïdes à différents stades de développement du système nerveux central des rats et ceux de Liu et al. (2018) qui confirment, quant à eux, que le thiamotoxam, un autre pesticide de la famille des néonicotinoïdes, a la capacité de bloquer le transfert d'informations entre les neurones et, en fin de compte, de paralyser les organes cibles. Ces résultats indiquent qu'il existe un lien entre le retard cognitif chez les enfants et l'exposition prénatale aux pesticides (Shelton et al., 2014 ; Gunier et al., 2017).

### II.3. Effets de l'IMID et de la CYP sur le niveau du $Ca^{+2}$ cytosolique et l'intégrité structurale et fonctionnelle des mitochondries

Le cerveau consomme une grande quantité d'oxygène, contient de grandes quantités d'acides gras polyinsaturés (AGPI) et de faibles niveaux d'enzymes antioxydantes, ce qui le rend très vulnérable au stress oxydatif (Sharma et al., 2014), qui se définit par un déséquilibre entre les systèmes pro-oxydants et les antioxydants, favorisant ainsi la génération excessive de radicaux libres ou ralentissant leur élimination (Bragante et al., 2022). L'exposition de rates de la génération F0 à l'IMID et au CYP, seuls ou en mélange, pendant la gestation et tout au long de l'allaitement, a entraîné une augmentation des niveaux de calcium cytosolique chez les rats de la première génération et de la deuxième génération. Cette dérégulation est due à la surcharge des mitochondries en calcium, favorisant ainsi l'ouverture des pores de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) (Panel et al., 2018). Cette dépolarisation mitochondriale devrait produire une déplétion en ATP, suivie d'un gonflement et enfin de la libération du cytochrome c qui favorise alors la signalisation de la mort cellulaire par apoptose (Hosseini et al., 2013). Nos résultats sont en accord avec ceux de Muhammed et al. (2020) qui prouvent que la CYP a la capacité de provoquer des troubles neurodégénératifs par le biais d'un dysfonctionnement mitochondrial, d'une activation des caspases, des dommages de l'ADN génomique, d'une inhibition de l'activité de l'AChE. Les résultats de Kimura-Kuroda et al. (2012) signalent le passage d'IMID à travers la barrière hémato-encéphalique provoquant ainsi des modifications au niveau des membranes cellulaires et des influx calciques excitateurs importants dans les neurones.

Comme les néonicotinoïdes ont la même structure que la nicotine et partagent également une activité agoniste sur les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (nAChRs), nos résultats sont cohérents avec ceux obtenus par Önal et al. (2004) qui indiquent que l'exposition maternelle à la nicotine altère le développement normal des différentes régions du cerveau, en

particulier le CA1 de l'hippocampe, en modifiant son ultra structure par la condensation de la chromatine nucléaire, la dilatation du réticulum endoplasmique rugueux et le gonflement des mitochondries.

D'après nos résultats, il semble que la CYP soit plus neurotoxique que l'IMID. Mais en général, même en tant qu'insecticide spécifique aux insectes, l'IMID pourrait altérer le comportement et l'intégrité mitochondriale des espèces non ciblées. Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Liu et al. (2018)** ; qui prouvent que les pyréthriinoïdes comme la deltaméthrine ont un niveau de neurotoxicité plus élevé par rapport aux organophosphorés et aux néonicotinoïdes en raison de leur lipophilie qui leur permet de s'accumuler dans la membrane cellulaire en perturbant sa structure (**Aouey et al., 2017**).

#### **II.4. Effet de l'IMID et de la CYP sur le statut redox mitochondrial**

La présente étude a démontré qu'en général, l'exposition maternelle à un seul pesticide ou à une combinaison de ces produits phytosanitaires, diminue le taux de GSH ce qui peut refléter sa conjugaison ou son oxydation en G-S-S-G en raison de la surproduction des ROS et de leurs sous-produits (**Katić et al., 2021**). L'activité de la catalase (CAT) et du superoxyde dismutase (SOD) ont enregistré une diminution dans le striatum et l'hippocampe de tous les rats nés des groupes traités et même dans le cerveau des rats de la deuxième génération. De plus, l'activité de la GST, une enzyme de détoxification clé, a été également diminuée. La réduction de l'activité de la GST s'est accompagnée d'une diminution de l'activité du glutathion peroxydase (GPx). La diminution de ces enzymes antioxydantes pourrait être interprétée par leur liaison aux molécules oxydantes produites au cours du métabolisme des pesticides. D'autre part, le MDA, un sous-produit de la peroxydation lipidique utilisé pour quantifier l'étendue des dommages causés aux macromolécules des membranes cellulaires a enregistré une augmentation très hautement significative, ce qui indique l'induction de changements lipoperoxydatifs dans le striatum et l'hippocampe résultant de la génération de ROS suite à l'exposition aux pesticides (**Scarpato et al., 2020**). la perturbation de l'homéostasie du système redox mitochondrial enregistré dans cette étude pourrait être expliqué par la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique des rats qui n'est pas entièrement développée par rapport aux cerveaux mature (**Yadav et al., 2021**), ce qui confirme l'effet dévastateur de l'IMID et de la CYP sur l'architecture du cerveau en développement. Des résultats similaires ont été trouvés par **Syed et al. (2016)** qui ont montré que l'exposition à un mélange de pyrethriinoïdes ; bifenthrin et b-cyfluthrin tout au long des

périodes de gestation et de lactation provoque un stress oxydatif chez les ratons des femelles traitées en réduisant l'activité de la CAT, du SOD et du GPx dans trois régions du cerveau dont le striatum, le cervelet et l'hippocampe. De même, le thiaclopride induisait un stress oxydatif en diminuant l'activité cérébrale de la CAT et du SOD avec une baisse de l'expression de leur ARNm dans le tissu cérébral de l'embryon du poulet (**Farag et al., 2022**).

### III. Discussion générale

Les pesticides peuvent être utilisés pour préserver la durabilité des écosystèmes, mais uniquement s'ils sont sélectifs et n'agissent que sur les organismes cibles. La contamination de la chaîne alimentaire par ces produits chimiques est aujourd'hui un défi inévitable et les aliments sont considérés comme l'une des principales sources d'exposition des consommateurs.

Bien que le cerveau consomme une grande quantité d'énergie, les fonctions du système nerveux dépendent de la fonction mitochondriale. Il a été rapporté que le stress oxydatif est l'un des principaux mécanismes de toxicité des pesticides et qu'il est associé à la neurodégénérescence (**Muhammed et al., 2020**). Nos résultats suggèrent que l'IMID et la CYP provoquent un dysfonctionnement mitochondrial dans le cerveau des rats exposés soit directement ou indirectement, durant la gestation et l'allaitement, par la génération d'un niveau élevé de radicaux libres, que le système de défense antioxydant n'a pas pu neutraliser, ce qui a donc entraîné une peroxydation lipidique conduisant ainsi à des lésions tissulaires.

Les résultats de cette présente étude ont également montré une augmentation significative des niveaux de calcium cytosolique entraînant ainsi une augmentation de la perméabilité par l'ouverture des pores de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP), ce qui a conduit au gonflement de ces organelles. Il a été démontré qu'une surcharge en  $\text{Ca}^{2+}$  déclenche la voie mitochondriale de l'apoptose; Lorsque le  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial est en excès, la membrane devient plus perméable et son potentiel diminue permettant au Cyt c de fuir dans le cytosol. Le Cyt c à son tour active la famille des caspases, y compris la casp 3, qui est le principal exécuteur de l'apoptose (**Wang et al., 2021**).

Il existe une corrélation directe entre l'action de l'ACh dans les fentes synaptiques et l'activité de l'AChE. L'exposition à l'IMID et au CYP a entraîné une diminution significative de l'activité d'AChE dans le striatum et l'hippocampe. Une augmentation indirecte de la neurotransmission excitatrice causée par l'inhibition de cette enzyme pourrait entraîner des

déficits du comportement, de la mémoire, de l'apprentissage et de la peur, ainsi que de l'anxiété et de la dépression (**Mani et Sadiq, 2014**). Plusieurs tests de comportement ont été mis au point dans cette présente étude pour évaluer l'activité locomotrice, la force musculaire, les déficits de développement, les troubles de mémorisation et d'apprentissage. Nos résultats suggèrent que les deux pesticides étudiés entraînent une altération de la mémoire de reconnaissance, des troubles de l'identification des objets et une anxiété sous la forme d'une peur des espaces ouverts.

La catéchine a été utilisée dans la première partie de cette présente étude comme agent neuroprotecteur contre les effets de l'IMID. Nos résultats ont montré que cette substance neuroprotectrice atténue l'effet toxique induit par l'IMID dans les deux régions cérébrales étudiées. La catéchine a minimisé l'altération des mitochondries par l'amélioration du taux du GSH et l'activité des enzymes antioxydantes à savoir la SOD, CAT, GST et GPx. Cet effet protecteur peut être dû à son pouvoir antioxydant, qui s'exprime par l'élimination des ROS et la chélation des ions métalliques en excès (**Muhammed et al., 2020**). En outre, les catéchines ont la capacité d'atteindre les cellules nerveuses, ce qui est une caractéristique importante qui contribue à leur capacité neuroprotectrice. Elles possèdent une variété de mécanismes moléculaires qui leur permettent d'inhiber la peroxydation des lipides et de prévenir la fibrillation de l'amyloïde- $\beta$ , l'accumulation de protéine *tau* et la fibrillation de l' $\alpha$ -synucléine (**Özduran et al., 2023**).

Il est important de noter que nos résultats ont montré la persistance de troubles neurocomportementaux et de dysfonctionnements mitochondriaux à l'âge adulte malgré l'absence de l'exposition aux pesticides chez les rates de la génération F2. Une étude menée au Brésil, en Colombie et en Espagne a signalé la présence de résidus de CYP dans le lait maternel (**Elser et al., 2020 ; Corcellas et al., 2012**). Les travaux de **Laugeray et ses collaborateurs (2017)** ont également souligné que l'exposition in utero et durant la phase lactationnelle à la CYP a des conséquences négatives sur le développement cérébral au début de la vie, des défauts comportementaux durables à l'âge adulte et des modifications de l'expression génétique liées au fonctionnement des mitochondries, à la régulation de l'ADN et au métabolisme des protéines. Cela prouve que les néonicotinoïdes et les pyréthri-noïdes ont des conséquences transgénérationnelles qui se manifestent plus tard dans la vie. Cette transmission pourrait être expliquée par des mécanismes épigénétiques (**Yuan et al., 2016**). Ces résultats indiquent que les organismes peuvent être soumis à des changements moléculaires accumulés au fil des générations et/ou que des mécanismes adaptatifs peuvent

être en mesure de réinitialiser leur état physiologique après un certain nombre de générations (Beck et al., 2017).

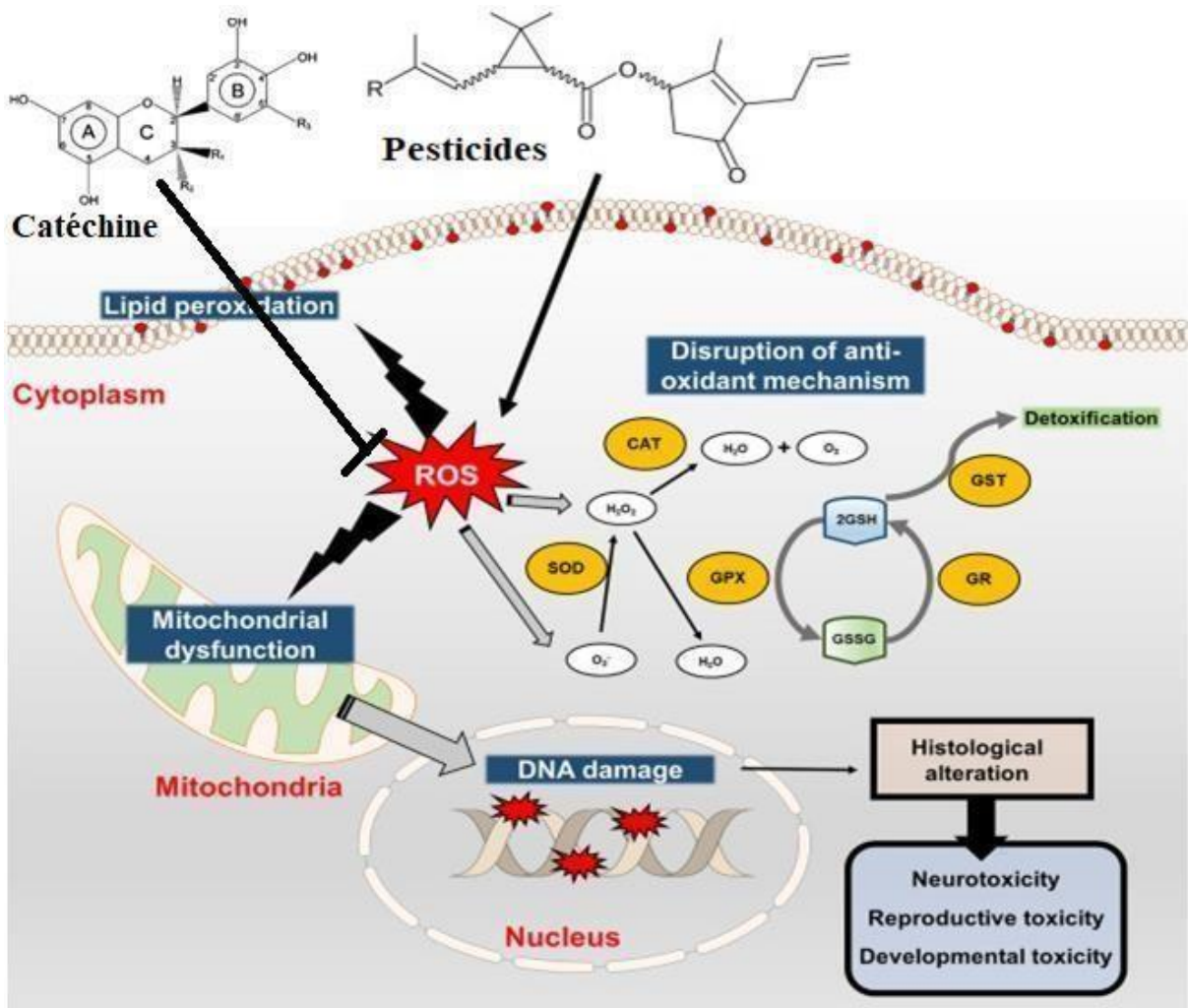


Fig 83: Schéma récapitulatif de la neurotoxicité des pesticides étudiés et l'effet préventif de la catéchine

# Conclusion et perspectives

### **Conclusion**

Il est connu que les pesticides sont essentiels pour améliorer les cultures agricoles et lutter contre les maladies des plantes, mais la présence de leurs résidus dans les matrices alimentaires pourrait être à l'origine de plusieurs pathologies. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à évaluer l'effet neurotoxique direct (fenêtre adulte) et indirect (fenêtre pré et postnatal) d'une exposition orale à des doses réelles de deux pesticides largement utilisés en Algérie, il s'agit de l'IMID et de la CYP.

A la lumière des résultats obtenus dans la première partie de cette présente étude, on peut conclure que l'exposition chronique des rats adultes à 1.2 mg/kg/jour d'IMID a entraîné des déficiences cognitives et des difficultés d'apprentissage, ce qui pourrait se justifier par la perturbation de la neurotransmission cholinergique due à l'inhibition de l'AChE. En outre, l'IMID a induit un stress oxydatif par la perturbation du système antioxydant (GSH, CAT, SOD, GPx et GST), l'augmentation de la peroxydation lipidique (MDA), une perturbation de la perméabilité membranaire et un gonflement mitochondrial dans les deux régions cérébrales étudiées, le striatum et l'hippocampe. Concernant l'étude histologique, des lésions tissulaires ont été également enregistrées. D'autre part, la supplémentation en catéchine (20 mg/kg/jour) a exercé une action protectrice contre les effets délétères de l'IMID sur l'intégrité structurale et fonctionnelle des mitochondries comme elle a prévenu également les troubles cognitifs et neurocomportementaux induit par l'IMID quand il a été administré seul.

Les résultats obtenus dans la deuxième partie de cette étude ont révélé que suite à l'exposition maternelle à l'IMID (1.2 mg/kg/jour) et au CYP (6.7 mg/kg/jour), seuls ou en cocktails, pendant la gestation et l'allaitement, affecte non seulement le comportement et les fonctions cérébrales de la génération F1, mais aussi ces effets se transmettent à la génération suivante (F2), même s'il n'y a pas eu d'exposition directe de la progéniture de la génération F1.

### **Perspectives**

Dans le but de cerner et approfondir la question de la neurotoxicité régionale des pesticides en l'occurrence les deux pesticides faisant l'objet de cette présente étude, il est recommandée d'étaler cette investigation à d'autres aspects histologiques et moléculaires tels que :

- La mise en évidence de la dégénérescence neuronales par les mécanismes de mort cellulaire (apoptose, nécrose et autophagie) en appliquant les méthodes immunohistologiques et biochimiques.



## *Conclusion et perspectives*

---

- Evaluation de certaines protéines indicatrices des maladies neurodégénératives telles que Bin1, tau,  $\alpha$ -synucléine,.. après exposition chronique à ces pesticides.
- Etude des effets génotoxiques des pesticides au niveau des cellules régionales du cerveau telles que les cellules souches neurales (cellules SH-SY5Y, les PC12...) et leur impact sur la neurogenèse surtout au stade juvénile.

# Références bibliographiques

Abou-Donia, M. B., Goldstein, L. B., Bullman, S., Tu, T., Khan, W. A., Dechkovskaia, A. M., & Abdel-Rahman, A. A. (2008). Imidacloprid induces neurobehavioral deficits and increases expression of glial fibrillary acidic protein in the motor cortex and hippocampus in offspring rats following in utero exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 71(2), 119-130.

Abreu-Villaça, Y., & Levin, E. D. (2018). Developmental neurobehavioral neurotoxicity of insecticides. In *Handbook of developmental neurotoxicology* (pp. 453-466). Academic Press.

Adeyinka, A., & Kondamudi, N. P. (2022). Cholinergic crisis. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing.

Ahmed, M. E., Khan, M. M., Javed, H., Vaibhav, K., Khan, A., Tabassum, R., ... & Islam, F. (2013). Amelioration of cognitive impairment and neurodegeneration by catechin hydrate in rat model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type. *Neurochemistry international*, 62(4), 492-501.

Ahmed, M. M., & Nasr, S. A. (2015). Protective effect of broccoli and ferulic acid on imidacloprid-induced neurotoxicity in rats. *Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research*, 4(4), 82-89.

Akhtar MJ, Ahamed M, Alhadlaq HA, AlshamsanA (2017) Mechanism of ROS scavenging and antioxidant signalling by redox metallic and fullerene nanomaterials: Potential implications in ROS associated degenerative disorders. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1861(4): 802-813

Albina, M. L., Bellés, M., Linares, V., Sánchez, D. J., & Domingo, J. L. (2005). Restraint stress does not enhance the uranium-induced developmental and behavioral effects in the offspring of uranium-exposed male rats. *Toxicology*, 215(1-2), 69-79.

Alengebawy, A., Abdelkhalek, S. T., Qureshi, S. R., & Wang, M. Q. (2021). Heavy metals and pesticides toxicity in agricultural soil and plants: Ecological risks and human health implications. *Toxics*, 9(3), 42.

Al-Gubory, K. H. (2014). Environmental pollutants and lifestyle factors induce oxidative stress and poor prenatal development. *Reproductive biomedicine online*, 29(1), 17-31.

Ali, H. F., El-Sayed, N. M., Ahmed, A. A., Hanna, P. A., & Moustafa, Y. M. (2020). Nano selenium ameliorates oxidative stress and inflammatory response associated with cypermethrin-induced neurotoxicity in rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 195, 110479.

Alshatwi, A. A., Hasan, T. N., Alqahtani, A. M., Syed, N. A., Shafi, G., Al-Assaf, A. H., & Al-Khalifa, A. S. (2014). Delineating the anti-cytotoxic and anti-genotoxic potentials of catechin hydrate against cadmium toxicity in human peripheral blood lymphocytes. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 38(2), 653-662.

Álvarez-Diduk, R., & Galano, A. (2015). Adrenaline and noradrenaline: protectors against oxidative stress or molecular targets?. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(8), 3479-3491.

- Anadón, A., Ares, I., Martínez, M., Martínez-Larrañaga, M. R., & Martínez, M. A. (2020). Neurotoxicity of neonicotinoids. In *Advances in neurotoxicology* (Vol. 4, pp. 167-207). Academic Press.
- Anand, K. S., & Dhikav, V. (2012). Hippocampus in health and disease: An overview. *Annals of Indian Academy of Neurology*, 15(4), 239.
- Andreu, V., & Picó, Y. (2012). Determination of currently used pesticides in biota. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404, 2659-2681.
- Angelova, P. R., & Abramov, A. Y. (2018). Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. *FEBS letters*, 592(5), 692-702.
- Antunes, M., & Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive processing*, 13, 93-110.
- Aouey, B., Derbali, M., Chtourou, Y., Bouchard, M., Khabir, A., & Fetoui, H. (2017). Pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin and its metabolites induce liver injury through the activation of oxidative stress and proinflammatory gene expression in rats following acute and subchronic exposure. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(6), 5841-5856.
- Appala, R. N., Chigurupati, S., Appala, R. V., Krishnan Selvarajan, K., & Islam Mohammad, J. (2016). A simple HPLC-UV method for the determination of glutathione in PC-12 cells. *Scientifica*, 2016.
- Arora, S., Balotra, S., Pandey, G., & Kumar, A. (2017). Binary combinations of organophosphorus and synthetic pyrethroids are more potent acetylcholinesterase inhibitors than organophosphorus and carbamate mixtures: An in vitro assessment. *Toxicology Letters*, 268, 8-16.
- Bacqué-Cazenave, J., Bharatiya, R., Barrière, G., Delbecque, J. P., Bouguiyou, N., Di Giovanni, G., ... & De Deurwaerdère, P. (2020). Serotonin in animal cognition and behavior. *International journal of molecular sciences*, 21(5), 1649.
- Báez-Mendoza, R., & Schultz, W. (2013). The role of the striatum in social behavior. *Frontiers in neuroscience*, 7, 233.
- Baldo, B., & Petersén, Å. (2015). Analysis of nonmotor features in murine models of huntington disease. *Movement disorders*, 583-602.
- Banwinkler, M., Theis, H., Prange, S., & van Eimeren, T. (2022). Imaging the Limbic System in Parkinson's Disease—A Review of Limbic Pathology and Clinical Symptoms. *Brain Sciences*, 12(9), 1248.
- Baptista, F. I., Henriques, A. G., Silva, A. M., Wiltfang, J., & da Cruz e Silva, O. A. (2014). Flavonoids as therapeutic compounds targeting key proteins involved in Alzheimer's disease. *ACS chemical neuroscience*, 5(2), 83-92.
- Bear, M. F., Connors, B. W., & Paradiso, M. A. (2016). *Neurosciences: à la découverte du cerveau* (Vol. 4). John Libbey Eurotext.
- Beauchamp, C., Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry* 44(1): 276-287.

- Beck, D., Sadler-Riggelman, I., & Skinner, M. K. (2017). Generational comparisons (F1 versus F3) of vinclozolin induced epigenetic transgenerational inheritance of sperm differential DNA methylation regions (epimutations) using MeDIP-Seq. *Environmental epigenetics*, 3(3), dvx016.
- Bernatoniene, J., & Kopustinskiene, D. M. (2018). The role of catechins in cellular responses to oxidative stress. *Molecules*, 23(4), 965.
- Betts, J. G., Young, K. A., Wise, J. A., Johnson, E., Poe, B., Kruse, D. H., ... & DeSaix, P. (2013). *Anatomy and physiology*.
- Blanc, M., Cormier, B., Hyötyläinen, T., Krauss, M., Scherbak, N., Cousin, X., & Keiter, S. H. (2020). Multi-and transgenerational effects following early-life exposure of zebrafish to permethrin and coumarin 47: Impact on growth, fertility, behavior and lipid metabolism. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 205, 111348.
- 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.
- Bonvallot, N. (2014). Application de la métabolomique à l'étude du lien entre les expositions environnementales aux pesticides pendant la grossesse et le développement de l'enfant: approches épidémiologique et toxicologique (Doctoral dissertation).
- Bourbia-Ait Hamlet, S. (2013). Evaluation de la toxicité de mixtures de pesticides sur un bioindicateur de la pollution des sols *Helix aspersa* (Doctoral dissertation, Université de Annaba-Badji Mokhtar).
- Brodal, P. (2004). *The central nervous system: structure and function*. oxford university Press).
- Burke, A. P. (2016). A neurodevelopmental study of mice following in utero and early postnatal exposure to imidacloprid, a neonicotinoid pesticide. University of Toronto (Canada).
- Burke, A. P., Niibori, Y., Terayama, H., Ito, M., Pidgeon, C., Arsenault, J., ... & Hampson, D. R. (2018). Mammalian susceptibility to a neonicotinoid insecticide after fetal and early postnatal exposure. *Scientific Reports*, 8(1), 16639.
- Bragante, W., Sinhoin, V. D. G., Sugui, M. M., da Cunha, A. P. S., Dos Santos, W. B., & Sinhoin, A. P. (2022). In vivo mutagenic effects and oxidative stress parameters evaluation of cypermethrin and benzoate of emamectin and their mixtures in female mice. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 57(3), 211-219.
- Caillaud, M. (2017). Cognition sociale dans la maladie de Huntington: étude cognitive et par imagerie cérébrale morphologique et fonctionnelle (Doctoral dissertation, Angers).
- Calabresi, P., Centonze, D., & Bernardi, G. (2000). Cellular factors controlling neuronal vulnerability in the brain: a lesson from the striatum. *Neurology*, 55(9), 1249-1255.
- Camacho-Pérez, M. R., Covantes-Rosales, C. E., Toledo-Ibarra, G. A., Mercado-Salgado, U., Ponce-Regalado, M. D., Díaz-Resendiz, K. J. G., & Girón-Pérez, M. I. (2022). Organophosphorus pesticides as modulating substances of inflammation through the cholinergic pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 4523.

Cataldi, S., Stanley, A. T., Miniaci, M. C., & Sulzer, D. (2022). Interpreting the role of the striatum during multiple phases of motor learning. *The FEBS journal*, 289(8), 2263-2281.

Caudle, W. (2018). Fundamentals of the Structure and Function of the Nervous System. In Charlene A. McQueen, eds. *Comprehensive Toxicology (Third Edition)*, Elsevier.

Chaitanya, R. K., Shashank, K., & Sridevi, P. (2016). Oxidative stress in invertebrate systems. *Free Radicals and Diseases*, p. 19.

Chandra, M., Panchatcharam, M., & Miriyala, S. (2016). Biomarkers in ROS and role of isoprostanes in oxidative stress. *Free Radicals and Diseases*, 131-148.

Chen, S., Gu, S., Wang, Y., Yao, Y., Wang, G., Jin, Y., & Wu, Y. (2016). Exposure to pyrethroid pesticides and the risk of childhood brain tumors in East China. *Environmental pollution*, 218, 1128-1134.

Chi, H., Chang, H. Y., & Sang, T. K. (2018). Neuronal cell death mechanisms in major neurodegenerative diseases. *International journal of molecular sciences*, 19(10), 3082.

Chourasiya, S., & Mahobiya, P. (2020). Toxicology and Mode of Action of Cypermethrin. An Overview of Toxicants.

Claiborne, A. (1985) Catalase activity In: Greenwald RA (ed) *Handbook of methods for oxygen free radical research*. CRC Press, Boca Raton, pp 283–284.

Chu, K. O., & Pang, C. C. (2018). Pharmacokinetics and disposition of green tea catechins. *Pharmacokinetics and adverse effects of drugs: mechanisms and risks factors*, 17.

Comtet-Marre, S., Mosoni, P., & Peyret, P. (2020). Effets des polluants environnementaux et alimentaires sur le microbiote intestinal. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 55(5), 255-262.

Corcellas, C., Feo, M. L., Torres, J. P., Malm, O., Ocampo-Duque, W., Eljarrat, E., & Barceló, D. (2012). Pyrethroids in human breast milk: occurrence and nursing daily intake estimation. *Environment international*, 47, 17-22.

Costas-Ferreira, C., & Faro, L. R. (2021). Neurotoxic effects of neonicotinoids on mammals: What is there beyond the activation of nicotinic acetylcholine receptors?—A systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8413.

D'arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell biology international*, 43(6), 582-592.

Deacon, B. J. (2013). The biomedical model of mental disorder: A critical analysis of its validity, utility, and effects on psychotherapy research. *Clinical psychology review*, 33(7), 846-861.

Dekkers, M. P., Nikolettou, V., & Barde, Y. A. (2013). Death of developing neurons: New insights and implications for connectivity. *Journal of Cell Biology*, 203(3), 385-393.

Di Mauro, M. D., Fava, G., Spampinato, M., Aleo, D., Melilli, B., Saita, M. G., ... & D'Antona, N. (2019). Polyphenolic fraction from olive mill wastewater: Scale-up and in vitro studies for ophthalmic nutraceutical applications. *Antioxidants*, 8(10), 462.

Ding F, Peng W, Diao JX, Zhang L, Sun Y (2013) Characteristics and essences upon conjugation of imidacloprid with two model proteins. *Journal of agricultural and food chemistry* 61(19): 4497-4505

Donovan, M. F., & Cascella, M. (2020). Embryology, Weeks 6-8. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.

Dorsemans, A. C. (2018). Diabète, inflammation et stress oxydatif: impact sur la barrière hémato-encéphalique, la neurogenèse et la réparation cérébrale (Doctoral dissertation, La Réunion).

Duzguner, V., & Erdogan, S. (2012). Chronic exposure to imidacloprid induces inflammation and oxidative stress in the liver & central nervous system of rats. *Pesticide biochemistry and physiology*, 104(1), 58-64.

EFSA. (2011). Guidance on Default assumptions used by the EFSA Scientific Panels and Committee, and EFSA Units in the absence of actual measured data. *EFSA J.*, 10, 2579.

El-Ela, F. I. A., & Abdel-Aziz, A. M. (2019). Investigating the potential protective effects of natural product quercetin against imidacloprid-induced biochemical toxicity and DNA damage in adults rats. *Toxicology Reports*, 6, 727-735.

Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*, 82(1), 70-77.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.

Elser, B. A., Kayali, K., Dhakal, R., O'Hare, B., Wang, K., Lehmler, H. J., & Stevens, H. E. (2020). Combined maternal exposure to cypermethrin and stress affect embryonic brain and placental outcomes in mice. *Toxicological sciences*, 175(2), 182-196.

Eraslan, G., Tekeli, M. Y., & Karabacak, M. (2017). Toxicokinetic of cypermethrin in broiler chickens. *Fresenius Environ Bull*, 26, 4704-4710.

Erdemli, M. E., Zayman, E., Erdemli, Z., Gul, M., Gul, S., & Gozukara Bag, H. (2020). Protective effects of melatonin and vitamin E in acetamiprid-induced nephrotoxicity. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 9202-9213.

Fantini, J., & Yahi, N. (2015). Brain lipids in synaptic function and neurological disease: clues to innovative therapeutic strategies for brain disorders. Academic Press.

Farag, M. R., Alagawany, M., Bilal, R. M., Gewida, A. G., Dhama, K., Abdel-Latif, H. M., ... & Naiel, M. A. (2021). An overview on the potential hazards of pyrethroid insecticides in fish, with special emphasis on cypermethrin toxicity. *Animals*, 11(7), 1880.

Farag, M. R., Alagawany, M., Moselhy, A. A., Said, E. N., Ismail, T. A., Di Cerbo, A., ... & Ahmed, M. M. (2022). The Neonicotinoid Thiacloprid Interferes with the Development, Brain Antioxidants, and Neurochemistry of Chicken Embryos and Alters the Hatchling Behavior: Modulatory Potential of Phytochemicals. *Biology*, 11(1), 73.

Feather-Schussler, D. N., & Ferguson, T. S. (2016). A battery of motor tests in a neonatal mouse model of cerebral palsy. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (117), e53569.

Flohe, L., Günzler, W.A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Methods in enzymology* 105: 114-120.

- Fotos, J., Olson, R., & Kanekar, S. (2011). Embryology of the brain and molecular genetics of central nervous system malformation. In *Seminars in Ultrasound, CT, and MR* (Vol. 32, No. 3, pp. 159-166).
- Franklin, J. L. (2011). Redox regulation of the intrinsic pathway in neuronal apoptosis. *Antioxidants & redox signaling*, 14(8), 1437-1448.
- Frei, B., & Higdon, J. V. (2003). Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *The Journal of nutrition*, 133(10), 3275S-3284S.
- Gamet-Payraastre, L. (2020). Exposition aux «cocktails» de pesticides: quels impacts sur la santé?. *Environnement, Risques Sante*, 19(2), 93-100.
- Garbarino, V. R., Orr, M. E., Rodriguez, K. A., & Buffenstein, R. (2015). Mechanisms of oxidative stress resistance in the brain: lessons learned from hypoxia tolerant extremophilic vertebrates. *Archives of biochemistry and biophysics*, 576, 8-16.
- Gasmi, S., Kebieche, M., Rouabhi, R., Touahria, C., Lahouel, A., Lakroun, Z., ... & Soulimani, R. (2017). Alteration of membrane integrity and respiratory function of brain mitochondria in the rats chronically exposed to a low dose of acetamiprid. *Environmental science and pollution research*, 24, 22258-22264.
- Gasmi, S. (2018). Neurotoxicité de deux pesticides (Acetamipride et Deltamethrine) et la prévention de cette toxicité par la quercétine chez le rat (Doctoral dissertation, Université de Tébessa).
- Gougeon, M. L. (2001). Viral strategies for modulation of apoptosis. *Virologie*, 5(5), 347-60.
- Gunier, R. B., Bradman, A., Harley, K. G., Kogut, K., & Eskenazi, B. (2017). Prenatal residential proximity to agricultural pesticide use and IQ in 7-year-old children. *Environmental health perspectives*, 125(5), 057002.
- 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.
- Haense, C., Kalbe, E., Herholz, K., Hohmann, C., Neumaier, B., Kraus, R., & Heiss, W. D. (2012). Cholinergic system function and cognition in mild cognitive impairment. *Neurobiology of aging*, 33(5), 867-877.
- Hafeez, B. B., Park, E., Chun, K. S., Cho, Y. Y., & Kim, D. J. (2021). Regulation of Apoptosis during Environmental Skin Tumor Initiation. In *Regulation and Dysfunction of Apoptosis*. Intech Open.
- Harrow-Mortelliti, M., Reddy, V., & Jimsheleishvili, G. (2019). *Physiology, Spinal Cord*.
- Hassaan, M. A., & El Nemr, A. (2020). Pesticides pollution: Classifications, human health impact, extraction and treatment techniques. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 46(3), 207-220.
- Hassouna, I. (2020). Transplacental neurotoxicity of cypermethrin induced astrogliosis, microgliosis and depletion of let-7 miRNAs expression in the developing rat cerebral cortex. *Toxicology Reports*, 7, 1608-1615.



- Hayes, M. T. (2019). Parkinson's disease and parkinsonism. *The American journal of medicine*, 132(7), 802-807.
- He, S., Zhong, S., Liu, G., & Yang, J. (2021). Alpha-synuclein: The interplay of pathology, neuroinflammation, and environmental factors in Parkinson's disease. *Neurodegenerative Diseases*, 20(2-3), 55-64.
- Hébert, C. (2012). Matrices de microélectrodes tout diamant et composite diamant/nanotubes de carbone pour la neurophysiologie: du matériau aux composants d'interface (Doctoral dissertation, Grenoble).
- Hladik, M. L., Main, A. R., & Goulson, D. (2018). Environmental risks and challenges associated with neonicotinoid insecticides.
- Hosseini, M. J., Naserzadeh, P., Salimi, A., & Pourahmad, J. (2013). Toxicity of cigarette smoke on isolated lung, heart, and brain mitochondria: induction of oxidative stress and cytochrome c release. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 95(9), 1624-1637.
- Hunnicut, B. J., Jongbloets, B. C., Birdsong, W. T., Gertz, K. J., Zhong, H., & Mao, T. (2016). A comprehensive excitatory input map of the striatum reveals novel functional organization. *elife*, 5, e19103.
- Ichikawa, G., Kuribayashi, R., Ikenaka, Y., Ichise, T., Nakayama, S. M., Ishizuka, M., ... & Yoshihara, S. (2019). LC-ESI/MS/MS analysis of neonicotinoids in urine of very low birth weight infants at birth. *PLoS One*, 14(7), e0219208
- Igho, O. E., & Afoke, I. K. (2014). A histomorphologic analysis of pyrethroid pesticide on the cerebrum and cerebellum of adult albino rats. *Journal of Experimental and Clinical Anatomy*, 13(2), 54.
- Iqbal, A., Ahmed, M., Ahmad, S., Sahoo, C. R., Iqbal, M. K., & Haque, S. E. (2020). Environmental neurotoxic pollutants. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 41175-41198.
- Jallow, M. F., Awadh, D. G., Albaho, M. S., Devi, V. Y., & Ahmad, N. (2017). Monitoring of pesticide residues in commonly used fruits and vegetables in Kuwait. *International journal of environmental research and public health*, 14(8), 833.
- Kalender, Y., Kaya, S., Durak, D., Uzun, F. G., & Demir, F. (2012). Protective effects of catechin and quercetin on antioxidant status, lipid peroxidation and testis-histoarchitecture induced by chlorpyrifos in male rats. *Environmental toxicology and pharmacology*, 33(2), 141-148.
- Kalliora, C., Mamoulakis, C., Vasilopoulos, E., Stamatiades, G. A., Kalafati, L., Barouni, R., ... & Tsatsakis, A. (2018). Association of pesticide exposure with human congenital abnormalities. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 346, 58-75.
- Kanyika-Mbewe, C., Thole, B., Makwinja, R., & Kaonga, C. C. (2020). Monitoring of carbaryl and cypermethrin concentrations in water and soil in Southern Malawi. *Environmental Monitoring and Assessment*, 192, 1-14.
- Kara, M., Yumrutas, O., Demir, C. F., Ozdemir, H. H., Bozgeyik, I., Coskun, S., ... & Bal, R. (2015). Insecticide imidacloprid influences cognitive functions and alters learning

performance and related gene expression in a rat model. *International journal of experimental pathology*, 96(5), 332-337.

Katić, A., Kašuba, V., Kopjar, N., Lovaković, B. T., Čermak, A. M. M., Mendaš, G., ... & Želježić, D. (2021). Effects of low-level imidacloprid oral exposure on cholinesterase activity, oxidative stress responses, and primary DNA damage in the blood and brain of male Wistar rats. *Chemico-Biological Interactions*, 338, 109287.

Kempermann, G., Song, H., & Gage, F. H. (2015). Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(9), a018812.

Khakh, B. S. (2019). Astrocyte–neuron interactions in the striatum: insights on identity, form, and function. *Trends in neurosciences*, 42(9), 617-630.

Khalid, N., & Azimpouran, M. (2020). Necrosis.

Khalil, S. R., Awad, A., Mohammed, H. H., & Nassan, M. A. (2017). Imidacloprid insecticide exposure induces stress and disrupts glucose homeostasis in male rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 55, 165-174.

Kim, G. H., Kim, J. E., Rhie, S. J., & Yoon, S. (2015). The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Experimental neurobiology*, 24(4), 325.

Kimura-Kuroda, J., Komuta, Y., Kuroda, Y., Hayashi, M., & Kawano, H. (2012). Nicotine-like effects of the neonicotinoid insecticides acetamiprid and imidacloprid on cerebellar neurons from neonatal rats. *PloS one*, 7(2), e32432.

Klein, M. O., Battagello, D. S., Cardoso, A. R., Hauser, D. N., Bittencourt, J. C., & Correa, R. G. (2019). Dopamine: functions, signaling, and association with neurological diseases. *Cellular and molecular neurobiology*, 39(1), 31-59.

Klima, S. (2021). Developmental neurotoxicity in a human model system (Doctoral dissertation).

Knierim, J. (2015). The hippocampus. *Current Biology*, 25(23), R1116-R1121.

Kostović, I., Sedmak, G., & Judaš, M. (2019). Neural histology and neurogenesis of the human fetal and infant brain. *Neuroimage*, 188, 743-773.

Kotkowski, E., Price, L. R., Fox, P. M., Vanasse, T. J., & Fox, P. T. (2018). The hippocampal network model: A transdiagnostic metaconnectomic approach. *NeuroImage: Clinical*, 18, 115-129.

Kushwaha, M., Verma, S., & Chatterjee, S. (2016). Profenofos, an Acetylcholinesterase-Inhibiting Organophosphorus Pesticide: A Short Review of Its Usage, Toxicity, and Biodegradation. *Journal of environmental quality*, 45(5), 1478-1489.

Kristal, B. S., Park, B. K., & Yu, B. P. (1996). 4-hydroxynonéal est un puissant inducteur de la transition de perméabilité mitochondriale. *J. Biol. Chem*, 271, 6033-6038.

Li, J., Yu, W., Li, X. T., Qi, S. H., & Li, B. (2014). The effects of propofol on mitochondrial dysfunction following focal cerebral ischemia–reperfusion in rats. *Neuropharmacology*, 77, 358-368.

- Laugeray, A., Herzine, A., Perche, O., Richard, O., Montecot-Dubourg, C., Menuet, A., ... & Mortaud, S. (2017). In utero and lactational exposure to low-doses of the pyrethroid insecticide cypermethrin leads to neurodevelopmental defects in male mice—An ethological and transcriptomic study. *PLoS one*, 12(10), e0184475.
- Lee, I., Eriksson, P., Fredriksson, A., Buratovic, S., & Viberg, H. (2015). Developmental neurotoxic effects of two pesticides: Behavior and neuroprotein studies on endosulfan and cypermethrin. *Toxicology*, 335, 1-10.
- Leiva, J. A., Nkedi-Kizza, P., Morgan, K. T., & Kadyampakeni, D. M. (2017). Imidacloprid transport and sorption nonequilibrium in single and multilayered columns of Immokalee fine sand. *PLoS One*, 12(8), e0183767.
- Li, A. N., Li, S., Zhang, Y. J., Xu, X. R., Chen, Y. M., & Li, H. B. (2014). Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 6(12), 6020-6047.
- Li, Y., Long, L., Ge, J., Li, H., Zhang, M., Wan, Q., & Yu, X. (2019). Effect of imidacloprid uptake from contaminated soils on vegetable growth. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(26), 7232-7242.
- Liu, X., Zhang, Q., Li, S., Mi, P., Chen, D., Zhao, X., & Feng, X. (2018). Developmental toxicity and neurotoxicity of synthetic organic insecticides in zebrafish (*Danio rerio*): A comparative study of deltamethrin, acephate, and thiamethoxam. *Chemosphere*, 199, 16-25.
- Liu, Z., Chandrasekaran, A., & Becker, J. M. (2019). Determination of offspring NOAEL for zeta-cypermethrin using internal exposure data from rat developmental neurotoxicity studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 108, 104425.
- Lonare, M., Kumar, M., Raut, S., Badgujar, P., Doltade, S., & Telang, A. (2014). Evaluation of imidacloprid-induced neurotoxicity in male rats: a protective effect of curcumin. *Neurochemistry international*, 78, 122-129.
- Maeda, M., Kitauchi, S., Hirano, T., Ikenaka, Y., Nishi, M., Shoda, A., ... & Hoshi, N. (2021). Fetal and lactational exposure to the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) dose of the neonicotinoid pesticide clothianidin inhibits neurogenesis and induces different behavioral abnormalities at the developmental stages in male mice. *Journal of Veterinary Medical Science*, 83(3), 542-548.
- Mahmood, I., Imadi, S. R., Shazadi, K., Gul, A., & Hakeem, K. R. (2016). Effects of pesticides on environment. *Plant, soil and microbes: volume 1: implications in crop science*, 253-269.
- Mani, V. M., & Sadiq, A. M. M. (2014). Naringin modulates the impairment of memory, anxiety, locomotor, and emotionality behaviors in rats exposed to deltamethrin; a possible mechanism association with oxidative stress, acetylcholinesterase and ATPase. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 4(4), 527-533.
- Maragò, E., Iacopini, P., Camangi, F., Scattino, C., Ranieri, A., Stefani, A., & Sebastiani, L. (2015). Phenolic profile and antioxidant activity in apple juice and pomace: Effects of different storage conditions. *Fruits*, 70(4), 213-223.
- Marfo, J. T., Fujioka, K., Ikenaka, Y., Nakayama, S. M., Mizukawa, H., Aoyama, Y., ... & Taira, K. (2015). Relationship between urinary N-desmethyl-acetamiprid and typical symptoms including neurological findings: a prevalence case-control study. *PLoS one*, 10(11), e0142172.

- Matés, J. M., Segura, J. A., Alonso, F. J., & Márquez, J. (2012). Oxidative stress in apoptosis and cancer: an update. *Archives of toxicology*, 86(11), 1649-1665.
- Maurya, S. K., Mishra, J., Abbas, S., & Bandyopadhyay, S. (2016). Cypermethrin stimulates GSK3 $\beta$ -dependent A $\beta$  and p-tau proteins and cognitive loss in young rats: Reduced HB-EGF signaling and downstream neuroinflammation as critical regulators. *Molecular neurobiology*, 53(2), 968-982.
- Mazumder, A., & Diederich, M. (2016). Natural Compound-Generated Oxidative Stress: From Bench to Bedside. *Free Radicals and Diseases*.
- McEwen, B. S., Nasca, C., & Gray, J. D. (2016). Stress effects on neuronal structure: hippocampus, amygdala, and prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*, 41(1), 3-23
- Meijer, M., Dingemans, M. M., van den Berg, M., & Westerink, R. H. (2014). Inhibition of voltage-gated calcium channels as common mode of action for (mixtures of) distinct classes of insecticides. *Toxicological Sciences*, 141(1), 103-111.
- Mihailoff, G. A., & Haines, D. E. (2018). Chapter 2—The cell biology of neurons and glia. *Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications*, 5th ed.; Haines, DE, Mihailoff, GA, Eds, 15-33.
- Mikolić, A., & Karačonji, I. B. (2018). Imidacloprid as reproductive toxicant and endocrine disruptor: investigations in laboratory animals. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 69(2), 103-108.
- Modanloo, M., & Shokrzadeh, M. (2019). Analyzing mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and apoptosis: potential role of L-carnitine. *Iranian journal of kidney diseases*, 13(2), 74.
- Moeen, D., Amer, A. M., Ismail, N. H., & Ali, E. H. (2018). Possible action of grape seed oil on brain toxicity induced by methomyl or imidacloprid of male rats. *Journal of Scientific Research in Science*, 35(part 1), 250-272.
- Moreno-Ulloa, A., Nogueira, L., Rodriguez, A., Barboza, J., Hogan, M. C., Ceballos, G., ... & Ramirez-Sanchez, I. (2015). Recovery of indicators of mitochondrial biogenesis, oxidative stress, and aging with (–)-epicatechin in senile mice. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 70(11), 1370-1378.
- Muhammed, R. E., El-Desouky, M. A., Abo-Seda, S. B., Nahas, A. A., Elhakim, H. K., & Alkhalaf, M. I. (2020). The protecting role of *Moringa oleifera* in cypermethrin-induced mitochondrial dysfunction and apoptotic events in rats brain. *Journal of King Saud University-Science*, 32(6), 2717-2722.
- Nakayama, A., Yoshida, M., Kagawa, N., & Nagao, T. (2019). The neonicotinoids acetamiprid and imidacloprid impair neurogenesis and alter the microglial profile in the hippocampal dentate gyrus of mouse neonates. *Journal of Applied Toxicology*, 39(6), 877-887.
- Navarrete-Meneses, M., & Pérez-Vera, P. (2019). Pyrethroid pesticide exposure and hematological cancer: epidemiological, biological and molecular evidence. *Reviews on environmental health*, 34(2), 197-210.
- Nelles, D. G., & Hazrati, L. N. (2022). Ependymal cells and neurodegenerative disease: outcomes of compromised ependymal barrier function. *Brain Communications*, 4(6), fcac288.

- Niehaus Jr, W. G., & Samuelsson, B. (1968). Formation of malonaldehyde from phospholipid arachidonate during microsomal lipid peroxidation. *European journal of biochemistry*, 6(1), 126-130.
- Nikoletopoulou, V., & Tavernarakis, N. (2012). Calcium homeostasis in aging neurons. *Frontiers in genetics*, 3, 200.
- Önal, A., Uysal, A., Ülker, S., Delen, Y., Yurtseven, M. E., & Evinç, A. (2004). Alterations of brain tissue in fetal rats exposed to nicotine in utero: possible involvement of nitric oxide and catecholamines. *Neurotoxicology and teratology*, 26(1), 103-112.
- Orrenius, S., Gogvadze, V., & Zhivotovsky, B. (2015). Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. *Biochemical and biophysical research communications*, 460(1), 72-81.
- Özduran, G., Becer, E., & Vatansever, H. S. (2023). The role and mechanisms of action of catechins in neurodegenerative diseases. *Journal of the American Nutrition Association*, 42(1), 67-74.
- Pocernich, C. B., & Butterfield, D. A. (2012). Elevation of glutathione as a therapeutic strategy in Alzheimer disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-molecular basis of disease*, 1822(5), 625-630.
- Panel, M., Ghaleh, B., & Morin, D. (2018). Mitochondria and aging: A role for the mitochondrial transition pore?. *Aging cell*, 17(4), e12793.
- Pandey, A., Jauhari, A., Singh, T., Singh, P., Singh, N., Srivastava, A. K., ... & Yadav, S. (2015). Transactivation of P53 by cypermethrin induced miR-200 and apoptosis in neuronal cells. *Toxicology Research*, 4(6), 1578-1586.
- Parameshwaran, K., Buabeid, M. A., Karuppagounder, S. S., Uthayathas, S., Thiruchelvam, K., Shonesy, B., ... & Suppiramaniam, V. (2012). Developmental nicotine exposure induced alterations in behavior and glutamate receptor function in hippocampus. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69, 829-841.
- Passoni, A., Mariani, A., Comolli, D., Fanelli, R., Davoli, E., De Paola, M., & Bagnati, R. (2021). An integrated approach, based on mass spectrometry, for the assessment of imidacloprid metabolism and penetration into mouse brain and fetus after oral treatment. *Toxicology*, 462, 152935.
- Pathak, V. M., Verma, V. K., Rawat, B. S., Kaur, B., Babu, N., Sharma, A., ... & Cunill, J. M. (2022). Current status of pesticide effects on environment, human health and it's eco-friendly management as bioremediation: A comprehensive review. *Frontiers in Microbiology*, 2833.
- Patil, A. A., Bhor, S. A., & Rhee, W. J. (2020). Cell death in culture: Molecular mechanisms, detections, and inhibition strategies. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 91, 37-53.
- Patri, M. (2019). Synaptic transmission and amino acid neurotransmitters. In *Neurochemical basis of brain function and dysfunction*. IntechOpen.

- Peiffer, J. (2011). Étude de la neurotoxicité d'un Polluant Organique Persistant chez le rat: effets à court et à long terme de l'inhalation répétée de fluorène sur le développement sensori-moteur du jeune et le comportement à l'âge adulte (Doctoral dissertation, Institut National Polytechnique de Lorraine).
- Peng, C., Wang, X., Chen, J., Jiao, R., Wang, L., Li, Y. M., ... & Chen, Z. Y. (2014). Biology of ageing and role of dietary antioxidants. *BioMed Research International*, 2014.
- Pocernich, C. B., & Butterfield, D. A. (2012). Elevation of glutathione as a therapeutic strategy in Alzheimer disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-molecular basis of disease*, 1822(5), 625-630.
- Porsolt, R. D., Bertin, A., & Jalfre, M. (1978). "Behavioural despair" in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine. *European journal of pharmacology*, 51(3), 291-294.
- Pradhan, T., Jung, H. S., Jang, J. H., Kim, T. W., Kang, C., & Kim, J. S. (2014). Chemical sensing of neurotransmitters. *Chemical Society Reviews*, 43(13), 4684-4713.
- Quindroit, P., Crépet, A., & Brochot, C. (2021). Estimating human exposure to pyrethroids' mixtures from biomonitoring data using physiologically based pharmacokinetic modeling. *Environmental Research*, 192, 110281.
- Radi, E., Formichi, P., Battisti, C., & Federico, A. (2014). Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Journal of Alzheimer's disease*, 42(s3), S125-S152.
- Ratelle, M., Coté, J., & Bouchard, M. (2015). Time profiles and toxicokinetic parameters of key biomarkers of exposure to cypermethrin in orally exposed volunteers compared with previously available kinetic data following permethrin exposure. *Journal of Applied Toxicology*, 35(12), 1586-1593
- Raz, A., & Perouansky, M. (2019). Central nervous system physiology: neurophysiology. *Pharmacology and Physiology for Anesthesia*, 145-173.
- Rea, P. (2015). Introduction to the Nervous System. In *Essential clinical anatomy of the nervous system*. Academic Press.
- Redza-Dutordoir, M., & Averill-Bates, D. A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1863(12), 2977-2992.
- Reekes, T. H., Vinyard III, H. T., Echols, W., Eubank III, A. J., Bouldin, M. D., Murray, W. H., ... & Clabough, E. B. (2016). Moderate chronic fetal alcohol exposure causes a motor learning deficit in adult outbred Swiss-Webster mice. *F1000Research*, 5, 1896.
- Richterova, Z., Machova, J., Stara, A., Tumova, J., Velisek, J., Sevcikova, M., & Svobodova, Z. (2015). Effects of a cypermethrin-based pesticide on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Veterinarni Medicina*, 60(8).
- Riebe, C. J., & Wotjak, C. T. (2012). A practical guide to evaluating anxiety-related behavior in rodents. *TRP Channels in Drug Discovery: Volume II*, 167-185.

- Rivas-Arancibia, S., Rodriguez-Martinez, E., Méndez-García, A., Moctezuma-Salgado, M., Jiménez-Espíndola, P., & López-Gonzales, U. (2016). Oxidative Stress, Inflammation, and Formation of Beta-Amyloid 1-42 in Brain. In *Free Radicals and Diseases*. IntechOpen.
- Rosenow, J.M. (2018). Anatomy of the Nervous System. In *Neuromodulation (Second Edition)*. (Pp. 25-39). Academic Press.
- Saboory, E., Ghasemi, M., & Mehranfard, N. (2020). Norepinephrine, neurodevelopment and behavior. *Neurochemistry international*, 135, 104706.
- Sahu, B. D., Tatireddy, S., Koneru, M., Borkar, R. M., Kumar, J. M., Kuncha, M., ... & Sistla, R. (2014). Naringin ameliorates gentamicin-induced nephrotoxicity and associated mitochondrial dysfunction, apoptosis and inflammation in rats: possible mechanism of nephroprotection. *Toxicology and applied pharmacology*, 277(1), 8-20.
- Saïghi, S. (2004). Circuits et systèmes de modélisation analogique de réseaux de neurones biologiques: application au développement d'outils pour les neurosciences computationnelles (Doctoral dissertation, Université Sciences et Technologies-Bordeaux I).
- Samet, J. M., & Wages, P. A. (2018). Oxidative stress from environmental exposures. *Current opinion in toxicology*, 7, 60-66.
- Sano, K., Isobe, T., Yang, J., Win-Shwe, T. T., Yoshikane, M., Nakayama, S. F., ... & Maekawa, F. (2016). In utero and lactational exposure to acetamiprid induces abnormalities in socio-sexual and anxiety-related behaviors of male mice. *Frontiers in neuroscience*, 10, 228.
- Satarker, S., Bojja, S. L., Gurram, P. C., Mudgal, J., Arora, D., & Nampoothiri, M. (2022). Astrocytic glutamatergic transmission and its implications in neurodegenerative disorders. *Cells*, 11(7), 1139.
- Scarpato, R., Testi, S., Colosimo, V., Crespo, C. G., Micheli, C., Azzara, A., ... & Ghirri, P. (2020). Role of oxidative stress, genome damage and DNA methylation as determinants of pathological conditions in the newborn: an overview from conception to early neonatal stage. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 783, 108295.
- Sgolastra, F., Medrzycki, P., Bortolotti, L., Maini, S., Porrini, C., Simon-Delso, N., & Bosch, J. (2020). Bees and pesticide regulation: lessons from the neonicotinoid experience. *Biological Conservation*, 241, 108356.
- 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.
- Shelton, J. F., Geraghty, E. M., Tancredi, D. J., Delwiche, L. D., Schmidt, R. J., Ritz, B., ... & Hertz-Picciotto, I. (2014). Neurodevelopmental disorders and prenatal residential proximity to agricultural pesticides: the CHARGE study. *Environmental health perspectives*, 122(10), 1103-1109.
- Shen, J. (2014). Glutamate. In *Magnetic Resonance Spectroscopy* (pp. 111-121). Academic Press.

- Sheppard, O., & Coleman, M. (2020). Alzheimer's disease: etiology, neuropathology and pathogenesis. Exon Publications, 1-21.
- Shittu, M., Ambali, S. F., Ayo, J. O., Kawu, M. U., & Olatunji, A. O. (2021). Melatonin mitigates thyroid dysfunction induced by gestational and lactational exposure to mixture of chlorpyrifos and cypermethrin in male Wistar rats. *Comparative Clinical Pathology*, 30(3), 529-540.
- Silbereis, J. C., Pochareddy, S., Zhu, Y., Li, M., & Sestan, N. (2016). The cellular and molecular landscapes of the developing human central nervous system. *Neuron*, 89(2), 248-268.
- Singh, A., Kukreti, R., Saso, L., & Kukreti, S. (2019). Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules*, 24(8), 1583.
- Sinha, C., Seth, K., Islam, F., Chaturvedi, R. K., Shukla, S., Mathur, N., ... & Agrawal, A. K. (2006). Behavioral and neurochemical effects induced by pyrethroid-based mosquito repellent exposure in rat offsprings during prenatal and early postnatal period. *Neurotoxicology and teratology*, 28(4), 472-481.
- Skretteberg, L. G., Lyrån, B., Holen, B., Jansson, A., Fohgelberg, P., Siivinen, K., ... & Jensen, B. H. (2015). Pesticide residues in food of plant origin from Southeast Asia—A Nordic project. *Food Control*, 51, 225-235.
- Soujanya, S., Lakshman, M., Anand Kumar, A., & Reddy, A. (2012). Histopathological and ultrastructural changes induced by imidacloprid in brain and protective role of vitamin C in rats. *J Chem Pharma Res*, 4(9), 4307-18.
- Sriapha, C., Trakulsrichai, S., Intaraprasong, P., Wongvisawakorn, S., Tongpoo, A., Schimmel, J., & Wanankul, W. (2020). Imidacloprid poisoning case series: potential for liver injury. *Clinical Toxicology*, 58(2), 136-138.
- Stanley, E. M., Wilson, M. A., & Fadel, J. R. (2012). Hippocampal neurotransmitter efflux during one-trial novel object recognition in rats. *Neuroscience letters*, 511(1), 38-42.
- Stiles, J., & Jernigan, T. L. (2010). The basics of brain development. *Neuropsychology review*, 20(4), 327-348.
- Stranahan, A. M. (2015). Models and mechanisms for hippocampal dysfunction in obesity and diabetes. *Neuroscience*, 309, 125-139.
- Surmeier, D. J. (2018). Determinants of dopaminergic neuron loss in Parkinson's disease. *The FEBS journal*, 285(19), 3657-3668.
- Suryadevara, R., Fadel, H., Michelhaugh, S. K., Mittal, S., & Parajuli, P. (2018). Tumors of the Central Nervous System: Anatomy and Interventional Considerations. In *Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery Systems for Brain Tumors* (pp. 1-26). Academic Press.
- Svingen, T., Ramhøj, L., Mandrup, K., Christiansen, S., Axelstad, M., Vinggaard, A. M., & Hass, U. (2018). Effects on metabolic parameters in young rats born with low birth weight after exposure to a mixture of pesticides. *Scientific reports*, 8(1), 1-10.
- Syed, F., John, P. J., & Soni, I. (2016). Neurodevelopmental consequences of gestational and lactational exposure to pyrethroids in rats. *Environmental toxicology*, 31(12), 1761-1770.



- Sznarkowska, A., Kostecka, A., Meller, K., & Bielawski, K. P. (2017). Inhibition of cancer antioxidant defense by natural compounds. *Oncotarget*, 8(9), 15996.
- Taghizadeh, S. F., Goumenou, M., Rezaee, R., Alegakis, T., Kokaraki, V., Anesti, O., ... & Karimi, G. (2019). Cumulative risk assessment of pesticide residues in different Iranian pistachio cultivars: applying the source specific HQS and adversity specific HIA approaches in Real Life Risk Simulations (RLRS). *Toxicology letters*, 313, 91-100.
- Tang, M., & Taghibiglou, C. (2017). The mechanisms of action of curcumin in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease*, 58(4), 1003-1016.
- Tang, W., Wang, D. I., Wang, J., Wu, Z., Li, L., Huang, M., ... & Yan, D. (2018). Pyrethroid pesticide residues in the global environment: an overview. *Chemosphere*, 191, 990-1007.
- Tatem, K. S., Quinn, J. L., Phadke, A., Yu, Q., Gordish-Dressman, H., & Nagaraju, K. (2014). Behavioral and locomotor measurements using an open field activity monitoring system for skeletal muscle diseases. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (91), e51785.
- Teixeira, M. D. A., Souza, C. M., Menezes, A. P. F., Carmo, M. R. S., Fonteles, A. A., Gurgel, J. P., ... & Andrade, G. M. (2013). Catechin attenuates behavioral neurotoxicity induced by 6-OHDA in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 110, 1-7.
- Thany, S. H., Reynier, P., & Lenaers, G. (2013). Neurotoxicité des pesticides-Quel impact sur les maladies neurodégénératives?. *médecine/sciences*, 29(3), 273-278.
- Uzun, F. G., Demir, F., Kalender, S., Bas, H., & Kalender, Y. (2010). Protective effect of catechin and quercetin on chlorpyrifos-induced lung toxicity in male rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48(6), 1714-1720.
- Viel, J. F., Warembourg, C., Le Maner-Idrissi, G., Lacroix, A., Limon, G., Rouget, F., ... & Chevrier, C. (2015). Pyrethroid insecticide exposure and cognitive developmental disabilities in children: The PELAGIE mother-child cohort. *Environment international*, 82, 69-75.
- Vohra, P. Khera, K.S. (2014). Imidacloprid induced neurotoxic and histological changes in female albino rats. *Zoology* 3(1).
- Volle, R. (2014). Pathogénie des entérovirus: étude de la charge virale au cours de méningites et de la perméabilité des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines (Doctoral dissertation, Université d'Auvergne-Clermont-Ferrand I).
- Wagner-Schuman, M., Richardson, J. R., Auinger, P., Braun, J. M., Lanphear, B. P., Epstein, J. N., ... & Froehlich, T. E. (2015). Association of pyrethroid pesticide exposure with attention-deficit/hyperactivity disorder in a nationally representative sample of US children. *Environmental Health*, 14(1), 1-9.
- Wahlsten, D. (2019). *Genes, Brain Function, and Behavior: What Genes Do, How They Malfunction, and Ways to Repair Damage.* (Pp 31-50). Academic Press.
- Wang, H. X., Zhang, R., Li, Z., Wang, L. S., Yu, Y., Wang, Q., ... & Xu, L. C. (2021). Cypermethrin induces Sertoli cell apoptosis through mitochondrial pathway associated with calcium. *Toxicology research*, 10(4), 742-750.

- Wang, X., & Zheng, W. (2019). Ca<sup>2+</sup> homeostasis dysregulation in Alzheimer's disease: a focus on plasma membrane and cell organelles. *The FASEB Journal*, 33(6), 6697-6712.
- Wang, Y., Han, Y., Xu, P., Guo, B., Li, W., & Wang, X. (2018). The metabolism distribution and effect of imidacloprid in chinese lizards (*Eremias argus*) following oral exposure. *Ecotoxicology and environmental safety*, 165, 476-483.
- Wen, X., Wu, J., Wang, F., Liu, B., Huang, C., & Wei, Y. (2013). Deconvoluting the role of reactive oxygen species and autophagy in human diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 65, 402-410.
- Willerth, S. (2017). Introduction to the nervous system. Eng. *Neural Tissue from Stem Cells*, Elsevier, 17-38.
- Wong, C. T., Wais, J., & Crawford, D. A. (2015). Prenatal exposure to common environmental factors affects brain lipids and increases risk of developing autism spectrum disorders. *European Journal of Neuroscience*, 42(10), 2742-2760.
- Xiang, W., Schlachetzki, J. C., Helling, S., Bussmann, J. C., Berlinghof, M., Schäffer, T. E., ... & Becker, C. M. (2013). Oxidative stress-induced posttranslational modifications of alpha-synuclein: specific modification of alpha-synuclein by 4-hydroxy-2-nonenal increases dopaminergic toxicity. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 54, 71-83.
- Xu, X., Wang, X., Yang, Y., Ares, I., Martínez, M., Lopez-Torres, B., ... & Martínez, M. A. (2022). Neonicotinoids: Mechanisms of systemic toxicity based on oxidative stress-mitochondrial damage. *Archives of Toxicology*, 96(6), 1493-1520.
- Xue, Z., Li, X., Su, Q., Xu, L., Zhang, P., Kong, Z., ... & Teng, J. (2013). Effect of synthetic pyrethroid pesticide exposure during pregnancy on the growth and development of infants. *Asia Pacific Journal of Public Health*, 25(4\_suppl), 72S-79S.
- Yadav, I. C., & Devi, N. L. (2017). Pesticides classification and its impact on human and environment. *Environmental science and engineering*, 6, 140-158.
- Yadav, A., Tandon, A., Seth, B., Goyal, S., Singh, S. J., Tiwari, S. K., ... & Chaturvedi, R. K. (2021). Cypermethrin impairs hippocampal neurogenesis and cognitive functions by altering neural fate decisions in the rat brain. *Molecular Neurobiology*, 58, 263-280.
- Yigit, N., & Velioglu, Y. S. (2020). Effects of processing and storage on pesticide residues in foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(21), 3622-3641.
- Yuan, T. F., Li, A., Sun, X., Ouyang, H., Campos, C., Rocha, N. B., ... & So, K. F. (2016). Transgenerational inheritance of paternal neurobehavioral phenotypes: stress, addiction, ageing and metabolism. *Molecular neurobiology*, 53, 6367-6376.
- Zeljezic, D., Vinkovic, B., Kasuba, V., Kopjar, N., Milic, M., & Mladinic, M. (2017). The effect of insecticides chlorpyrifos,  $\alpha$ -cypermethrin and imidacloprid on primary DNA damage, TP 53 and c-Myc structural integrity by comet-FISH assay. *Chemosphere*, 182, 332-338.
- Zhang, K., Lu, J., & Yao, L. (2020). Involvement of the dopamine D1 receptor system in the anxiolytic effect of cedrol in the elevated plus maze and light–dark box tests. *Journal of pharmacological sciences*, 142(1), 26-33.

## *Références bibliographiques*

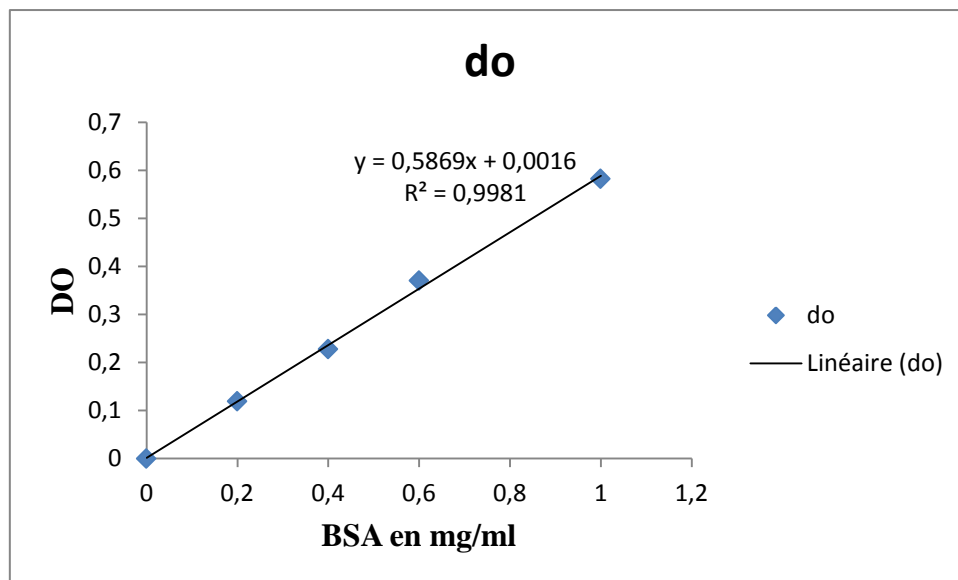
---

- Zhao, G. P., Yang, F. W., Li, J. W., Xing, H. Z., Ren, F. Z., Pang, G. F., & Li, Y. X. (2020). Toxicities of Neonicotinoid-Containing Pesticide Mixtures on Nontarget Organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39(10), 1884-1893.
- Zheng, M., Qin, Q., Zhou, W., Liu, Q., Zeng, S., Xiao, H., ... & Gao, J. (2020). Metabolic disturbance in hippocampus and liver of mice: A primary response to imidacloprid exposure. *Scientific reports*, 10(1), 5713.
- Zhu, Q., Yang, Y., Zhong, Y., Lao, Z., O'Neill, P., Hong, D., ... & Zhao, S. (2020). Synthesis, insecticidal activity, resistance, photodegradation and toxicity of pyrethroids (A review). *Chemosphere*, 254, 126779.
- Zia, Q., Azhar, A., Hassan, N., Jain, P., Singh, M., Mirza, M. A., ... & Jamal, A. (2021). Cell Death: a Molecular Perspective. *Current Molecular Biology Reports*, 1-26.
- Zimcikova, E., Simko, J., Karesova, I., Kremlacek, J., & Malakova, J. (2017). Behavioral effects of antiepileptic drugs in rats: Are the effects on mood and behavior detectable in open-field test?. *Seizure*, 52, 35-40.

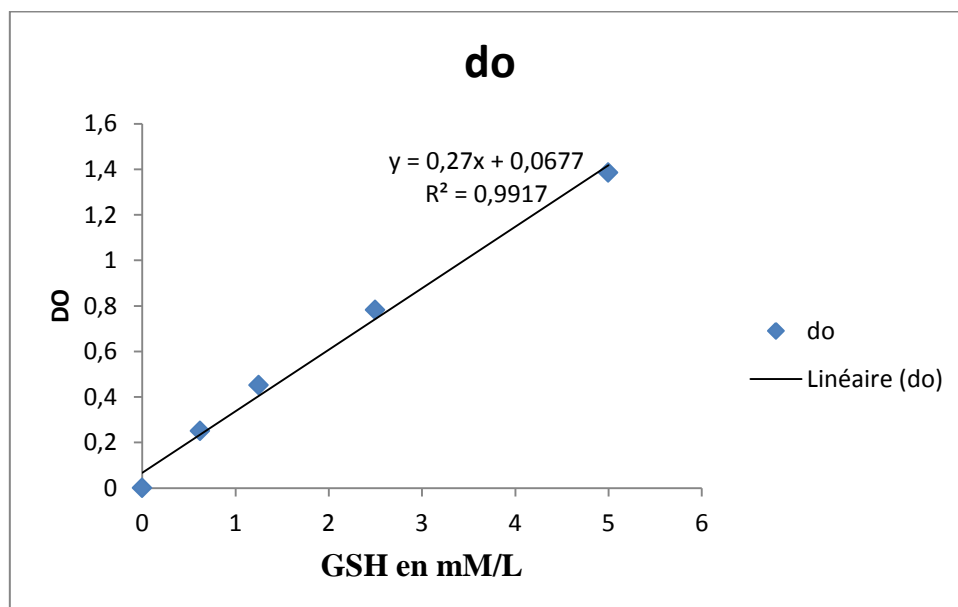
# Annexes

# Annexe

**Annexe 01 :** La courbe d'étalonnage des protéines



**Annexe 02 :** La courbe d'étalonnage de GSH.



## EVALUATION OF MITOCHONDRIAL AND NEUROBEHAVIORAL DISORDERS IN BRAIN REGIONS OF OFFSPRING (F1, F2) AFTER GESTATING AND LACTATING FEMALE RATS EXPOSURE TO LOW-DOSE OF IMIDACLOPRID AND CYPERMETHRIN

Souhila Haddad<sup>1</sup>, Zeyneb Chouit<sup>2</sup>, Dounia Djellal<sup>2</sup>, Salim Gasmi<sup>3</sup>, Messaoud Hachemi<sup>4</sup>, Mourad Hanfer<sup>5</sup>, Djamila Zama<sup>6</sup>, Mohamed Kebieche<sup>2</sup>, Rachid Soulimani<sup>7</sup>

**Address(es):** Salim Gasmi & Mohamed Kebieche,

<sup>1</sup>Laboratoire de Biomathématique, Biophysique, Biochimie et Scientométrie, University of Bejaia, Algeria.

<sup>2</sup>Faculty of natural and life sciences, LMAGECA and MBMP research laboratories, University of Batna2, 05078, Fesdis, Batna, Algeria.

<sup>3</sup>University of Larbi Tebessi, 12002, Tebessa, Algeria.

<sup>4</sup>University of Mohamed Seddik Ben Yahia, Jijel, Algeria.

<sup>5</sup>Veterinary department, University of Batna1, Algeria.

<sup>6</sup>University of Constantine, Constantine Algeria.

<sup>7</sup>Neurotoxicology, développement & Bioactivité, LCOMS, Campus Bridoux, Université de Lorraine, France.

\*Corresponding author: [salim.gasmi@univ-tebessa.dz](mailto:salim.gasmi@univ-tebessa.dz) & [m.kebieche@univ-batna2.dz](mailto:m.kebieche@univ-batna2.dz)

<https://doi.org/10.55251/jmbfs.9541>

### ARTICLE INFO

Received 15. 10. 2022

Revised 17. 1. 2023

Accepted 18. 1. 2023

Published xx.xx.201x

Regular article



### ABSTRACT

The imidacloprid (IMID) and cypermethrin (CYP) pesticides are known to have neurotoxic effects and negative brain developmental consequences when used separately, but little is known about the consequences of using them as a mixture. That could be passed down from one generation to the next. In this context, we were interested in studying the effect of oral exposure of female rats during gestation and throughout the lactational period to real doses of IMID (1.2 mg/kg) and CYP (6.7 mg/kg) either alone or in a mixture on behavior and mitochondrial redox status. The first and second generation pups were followed from birth to juvenile age using a series of tests to assess reflex, coordination and general motor function, including surface righting, cliff aversion, negative geotaxis and the muscle strength test. At PND 21, cholinergic function, oxidative stress and mitochondrial integrity were assessed in the striatum and hippocampus. Our results showed that IMID and CYP, alone or in combination, induced decreased body weight gain, impaired neurobehavioral performance, and AChE inhibition. Oxidative stress markers including GSH level and SOD, CAT, GST and GPx activities showed a significant decrease. While, lipid peroxidation which was assessed by MDA assay, cytosolic calcium level, swelling and mitochondrial permeability recorded a significant increase. In conclusion, the disruption of mitochondrial redox homeostasis and the presence of neurobehavioral disorders even in the offspring of the F2 generation suggests that independent and combined exposure to IMID and CYP during a critical period of development has irreversible effects; long-lasting and persistent.

**Keywords:** Imidacloprid, Cypermethrin, Neurobehavior, Striatum, Hippocampus, Mitochondria, Oxidative stress, Rats

### INTRODUCTION

The fetal period and early life are important stages when optimal brain development is assured. This is when the basic structure of the brain is built. This construction involves a series of processes that are particularly vulnerable to chemical stressors including pesticides. Impairment of this process could disrupt homeostasis, thereby increasing the risk of neurodegenerative disorders (Sunyer and Dadvand, 2019). Several studies have shown that exposure to pesticides is not only through inhalation, skin absorption or ingestion of contaminated food and water but also through the placenta and breast milk during critical periods of development (Dewailly *et al.*, 2014). The use of pyrethroids and neonicotinoids has registered a significant increase due to their efficiencies and wide range of application; they are also less toxic to non-target organisms and efficiently degradable. These two families are considered green pesticides compared to organophosphates. However, the effect of their low concentrations on wildlife, especially bees, as well as humans, remains of concern (Zeljezic *et al.*, 2017). The nervous system is the primary target of CYP, a pyrethroid that exerts a neurotoxic effect through voltage-gated sodium channels. Once this insecticide binds to the  $\alpha$  subunit of the sodium channel, the latter remains in an open position, thus allowing a prolonged passage of sodium and a depolarization of the membrane and ends up disrupting neuronal transmission. Exposure to this pyrethroid also influences other channels such as voltage-gated calcium and potassium channels; it decreases dopamine and acetylcholine levels as it alters key enzymes involved in the synthesis and metabolism of neurotransmitters such as adenosine triphosphatases and AChE (Raszewski *et al.*, 2016). In laboratory animals, intranasal exposure of mice to 5 and 20 mg/kg of CYP during gestation and lactation has been linked to mitochondrial dysfunction as a mechanism of developmental neurotoxicity (Laugeray *et al.*, 2017). Another study conducted on

mice indicates that exposure to CYP results in the release of  $Ca^{2+}$  and free radicals leading to DNA damage and cell death (Maurya, *et al.*, 2014).

Neonicotinoids such as IMID act by binding to the  $\alpha 4$  and  $\beta 2$  subunits of the nicotinic postsynaptic acetylcholine receptors (nAChRs) of mammals. The neurotoxicity of this class is manifested by the inhibition of acetylcholinesterase, thereby reducing the ability of this enzyme to break down acetylcholine in the synapses, which subsequently leads to continuous overstimulation of nerves and muscles. Prenatal exposure to its chemicals affects the formation of neural circuits in several regions of the brain that are involved in the regulation of depression, anxiety, memory and learning (Sano *et al.*, 2016).

Osaka *et al.*, 2016 reported the presence of metabolites of the neonicotinoid Thiamotaxam in the urine of young children. The increased resistance of pests to a single pesticide application has made it necessary to use a cocktail of these chemicals in order to increase its speed of action (Shittu *et al.*, 2021). Therefore, the combined effect of this mixture can lead to a joint interaction between the chemicals thus altering the absorption, biotransformation, distribution and elimination of one on the other and subsequently causing the appearance of new metabolites which could be more dangerous in comparison with the basic preparation, which makes the question of the risk for ecology and human health even more serious (Aouey *et al.*, 2017).

To our knowledge, the CYP and IMID cocktail has not been studied for its transgenerational neurotoxic effects in mammals. Therefore, the objective of this study was to evaluate the toxicity of these pesticides alone or in mixture by examining their effects on neuromotor development, mitochondrial integrity and oxidative damage in the striatum and hippocampus of pups of generations F1 and F2 born to mothers (F0) exposed during gestation and throughout the lactation period.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemical products

Most of the chemicals used in this study were purchased from Sigma Aldrich, Germany. COMMANDO is the trade name of IMID, purchased from VAPCO, Jordan. CYRUX is the trade name of CYP, purchased from UPL Limited India. The doses were chosen by referring to the results of (Jallow et al. 2017) which found 1.2 mg/kg/d of IMID residues in cucumber and of (Skretteber et al. 2015) which found 6.7 mg/kg of CYP residue in peppermint. To convert the concentration of pesticides in cucumber and peppermint to a daily dose in experimental animal studies, we used a conversion factor which is 0.05 in rats (EFSA 2011).

### Breeding and treatment of animals

Wistar albino rats weighing approximately 200g were provided by the Pasteur Institute in Algiers. Upon receipt, the animals were placed in cages for a two-week acclimatization period. They were maintained under standard temperature and humidity conditions, with a temperature of  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  and a humidity of approximately 60%, with a periodic cycle (light/dark) of 12 hours. The rats had free access to food and water. All experimental testing was performed in accordance with international guidelines for the care and use of laboratory animals. After two weeks of habituation to the animal house, the females were bred with males (2:1). The next day, the rats were examined by demonstrating the presence of spermatozoa in the vagina; which announces the first gestational day G1. After fertilization, 4 females (F0) were placed individually in cages. They were then divided into 4 exposure groups:

- Control group-receiving corn oil
- IMID group receiving 1.2 mg/kg of IMID
- CYP group receiving 6.7 mg/kg of CYP
- Mixture group receiving a mixture (IMID at 1.2 mg/kg/day and CYP 6.7 mg/kg/day).

In this study, IMID and CYP were dissolved in corn oil and administered orally from day 1 of gestation to day 21 of lactation. Adult females of the F1 generation (offspring of F0 mothers) were mated with males (not exposed to pesticides) to generate the F2 generation.

### Sensory-motor development tests

At birth, eye opening was monitored and body weight was measured from day 1 to day 21 of postnatal age.

### Evaluation of locomotor development

#### The turning reflex (surface righting)

From day 3 to day 5 of postnatal age, the rollover reflex was performed as described by Peiffer (2011). This test consists of placing the rat on its back on a horizontal board, the animal will then try to turn around by swinging to the right and to the left. In this test, the time it takes for the rat to get back on its four legs is timed.

#### Cliff dislike

From the 5th to the 7th day of postnatal age, Cliff aversion tests the young rat's reflex, strength and coordination. In this test, the rat's head and forelegs are positioned at the edge of a raised flat box. Two consecutive trials are carried out for each rat which will be scored by counting points and the time it takes to move away from the edge is timed (Peiffer, 2011).

#### Negative geotaxis

On days 7 to 9 of postnatal age, negative geotaxis is performed to assess motor coordination, counting the time it takes for a rat placed on a 45° slope with its head pointing down to turn 180° up (Feather-Schussler and Ferguson, 2016).

#### Suspension test (muscle strength)

From the 10th to the 13th day of postnatal age, front-limb Suspension test reflects muscle strength and coordination. It consists of hanging the rat's front legs on a metal wire stretched over a stable object, recording the total time of the fall (Albina et al., 2005).

### Biochemical analysis

At the end of the lactational phase (PND21), the first and second generation rats were sacrificed by decapitation after deep ether anesthesia; the brains were

recovered and immediately washed with a cold phosphated saline solution (PBS), then dissected to separate the striatum and the hippocampus which are used to evaluate the effect of IMID and CYP alone or in mixture on the mitochondrial redox status and membrane integrity of this organ.

### Separation of mitochondrial matrix from striatum and hippocampus.

The extraction of the mitochondrial fractions was carried out according to the method described by Sahu et al. (2014). Briefly, the hippocampus and the striatum are immersed and homogenized in a TSE buffer (10 mM tris, 250 mM sucrose, 0.1 mM EDTA, pH 7.2 at  $4^\circ\text{C}$ ) to obtain a 10% homogeneous tissue. The homogenate recovered is centrifuged at 600 g/10 min in order to eliminate large cellular debris. The supernatant resulting from this centrifugation is recovered and then centrifuged at 10,000g/10min. The resulting supernatant is considered as the cytosolic fraction, and the pellet is resuspended in TS buffer (10mM tris, 250mM sucrose, PH 7.2) then centrifuged at 10,000g/10min. The pellet resulting from this last centrifugation is resuspended in the storage buffer (250 mM sucrose, 50 mM tris, PH 7.2) which will be used directly for the evaluation of the structural and functional integrity of the mitochondria; the rest is stored at  $-20^\circ\text{C}$  for later analyses.

In order to burst the mitochondria and recover the mitochondrial matrix, we performed freeze-thaw combined with approximately 8 times homogenization; then, we performed a centrifugation at 10,000 g/10 min. The obtained supernatant was considered as the source of mitochondrial MDA, GSH, CAT, GST, GPx and SOD.

### Determination of AChE activity and cytosolic calcium

AChE activity was estimated according to the procedure of Ellman et al. (1961), using acetylthiocholine as a substrate. 100  $\mu\text{l}$  of cytosolic sample were added to 100  $\mu\text{l}$  of DTNB (0.1 M, pH 8) + 1 ml of tris buffer (0.1 M, pH 7). Once the reaction was stable, 100  $\mu\text{l}$  of acetylthiocholine substrate was added. Absorbance was monitored at 412 nm over 4 min for 20 min. AChE activity was expressed as IU/mg protein.

Calcium levels in the cytosol were measured following the recommendations of a commercial kit (SPINREACT, Spain).

### Assessment of swelling and mitochondrial permeability

Swelling of mitochondria was assessed in the striatum and hippocampus using the method of Li et al. (2014) where the absorbance of mitochondria isolated from fresh tissue at  $4^\circ\text{C}$  is monitored at a wavelength of 540nm. The decrease in absorbance indicates swelling of the mitochondria, which is the result of loss of the mitochondrial permeability transition pore (MPTP). Mitochondrial permeability was evaluated according to the method designed by Kristal et al. (1996); this technique is based on the rate of passage of  $\text{Ca}^{++}$  followed by an increase in the size of the mitochondria detected every 30 s for 3 min at 540 nm.

### Evaluation of markers of redox status in mitochondria of the striatum and hippocampus

#### Determination of glutathione and malondialdehyde acid levels

The glutathione concentration was measured by the method of Ellman (1959): 50  $\mu\text{l}$  of trichloroacetic acid (TCA) (10%) + 50  $\mu\text{l}$  of mitochondrial matrix are centrifuged at 1400 g/2 min. 50  $\mu\text{l}$  of the supernatant are taken, to which 1 ml of phosphate buffer (PH=8) and 20  $\mu\text{l}$  of DTNB (5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid) (0.01M) are added. After 15 minutes of incubation, the reading of the optical density was carried out at 412 nm with respect to the reagent blank prepared under the same conditions. The evaluation of the end products of lipid peroxidation was carried out by the analysis of side products such as malondialdehyde (MDA) which is commonly measured by its reaction with thiobarbituric acid (TBA). The intense absorption of this complex occurs at a wavelength of 532nm. MDA levels were assessed using the method of Niehuis and Samuelson (1968).

#### Determination of CAT, SOD, GPx and GST activities

The enzymatic activity of catalase was determined according to the method of Clairbone (1985); this method is based on measuring the disappearance of hydrogen peroxide due to the activity of this enzyme. In a quartz cuvette, we put 1 mL of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) + 0.950 mL of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.019 M) + 50  $\mu\text{l}$  of the enzyme source (mitochondrial matrix). The reaction is monitored by recording the absorbance at 240 nm every 30 s for 3 minutes. The enzymatic activity is expressed in IU/mg of protein. The SOD activity was evaluated according to the method of Beauchamp and Fridovich (1971). The SOD activity was evaluated according to the method of Beauchamp and Fridovich (1971). Briefly, 50  $\mu\text{l}$  of the enzyme source (mitochondrial matrix) were added to 2 ml of a reaction mixture which contains (sodium cyanide, NBT, EDTA, riboflavin and phosphate buffer at pH 7.8) in the presence of 100  $\mu\text{l}$  of an electron donor such as methionine. The mixture is subjected to radiation from a 15 W lamp for 15 minutes. Absorbance

was measured at 560 nm. The GPx activity was carried out according to the procedure described by Flohe and Günzler (1984). GPx is the main enzyme that removes hydrogen peroxide. 0.2ml of sample (mitochondrial matrix) was added to a tube containing 0.4ml of GSH (0.1mM) and 0.2ml of phosphate buffer (0.067M, pH 7.8). The mixture is incubated in a water bath at 25° C. for 05 min. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.3mM) was added to initiate the reaction. After 10 min, 1% TCA (tri-chloroacetic acid) was added to stop the reaction and the mixture is put on ice for 30 min and centrifuged for 10 min at 3000 rpm. A volume of supernatant is placed in a cuvette to which Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.32M) + DNTB (1mM) have been added. Absorbance was measured at 412nm every 30 seconds for 05min. The GST activity was measured according to the method of Habig et al. (1974). The intensity of GST activity is directly proportional to the amount of 1-S-Glutathionyl 2-4dinitrobenzene formed from the conjugation between GST and CDNB (1-Chloro2,4-dinitrobenzene) which acts as a substrate. Absorbance was performed every 30s for 5min at 340 nm.

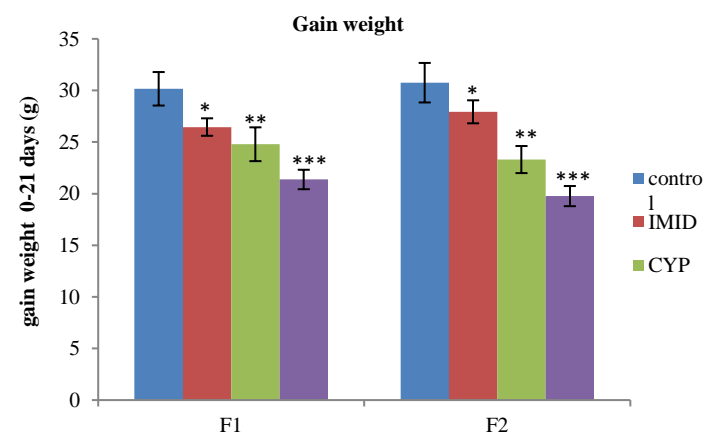
**Statistical analysis**

Data are presented as mean ± SD. In multiple comparisons, data were analyzed using a one-way ANOVA. Differences between mean values were considered significant at \*p < 0.05; highly significant at \*\*p < 0.01; and very highly significant at \*\*\*p < 0.001. The statistical study was carried out using Excel SPC software.

**RESULTS**

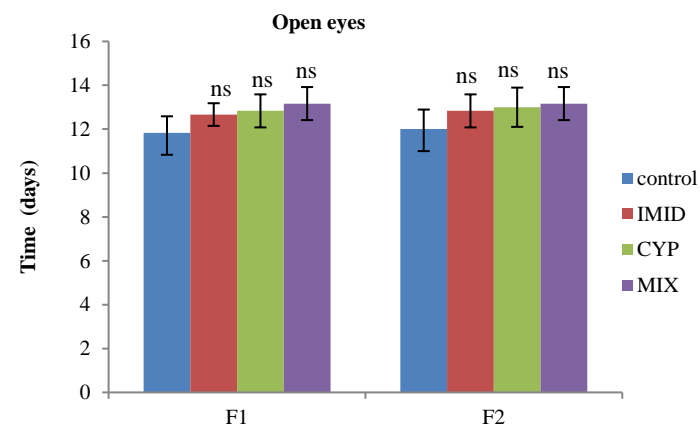
**Sensory-motor development tests**

Pup maturation was assessed by body weight gain from day 1 (PND1) to day 21 (PND21). Independent and combined exposure of dams (F0) to IMID and CYP significantly reduced weight gain of first and second generation pups (p ≤ 0.05 for IMID, p ≤ 0.01 for CYP and p ≤ 0.001 for MIX) (Fig 1).



**Figure 1** Effects of gestational and lactational exposure to IMID, CYP and their mixture on weight gain in neonates of the first and second generation. Values are means ± SD, (n= 10), \* Significant difference versus control (p ≤ 0.05). \*\* Highly significant difference versus control (p ≤ 0.01). \*\*\* Very highly significant difference versus control (p ≤ 0.001).

Regarding eye opening, there were no significant changes in any of the treated groups compared to the control group (Fig 2).

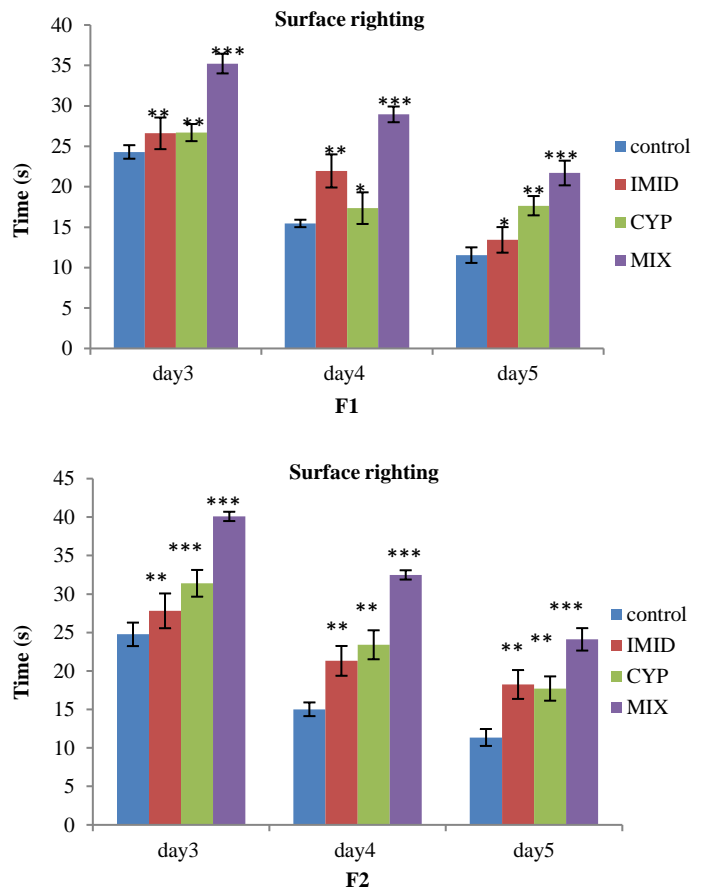


**Figure 2** Effects of gestational and lactational exposure to IMID, CYP and their mixture on eyes opening in neonates of the first and second generation. Values are means ± SD, (n= 10), ns no significant difference (p > 0.05).

**Evaluation of locomotor development**

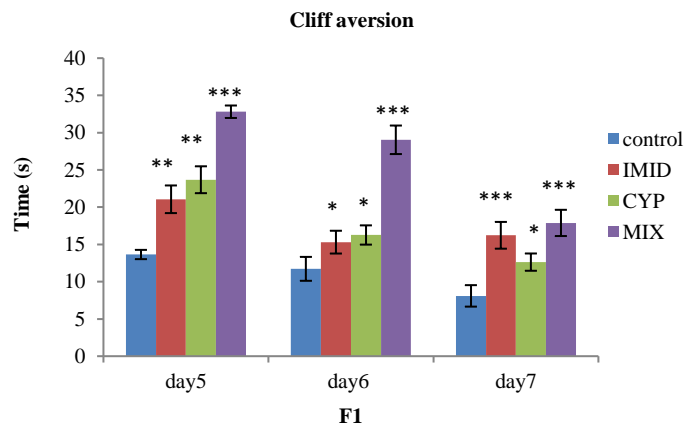
Neuromotor development was also studied by several tests such as surface righting, Cliff aversion, negative geotaxis and front-limb suspension.

The development of the ability to turn over (surface righting) was significantly impaired by IMID and CYP either alone or in combination. The mean time needed to turn around was higher in F1 and F2 generation pups born to treated mothers compared to the control (p ≤ 0.01 for IMID and CYP and p ≤ 0.001 for MIX) (Fig 3).

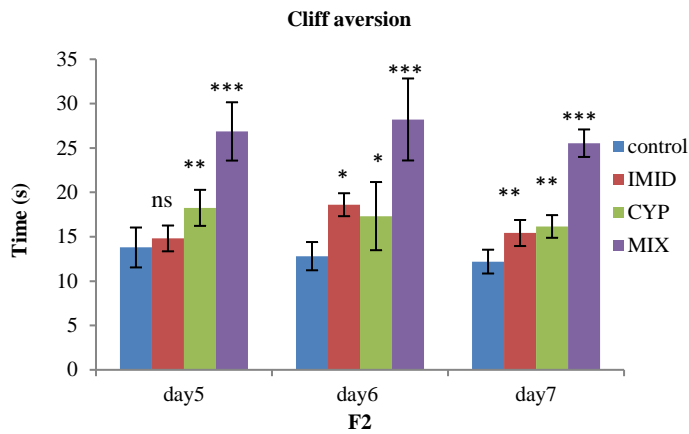


**Figure 3** Effects of gestational and lactational exposure to IMID, CYP and their mixture on surface righting reflex in neonates of the first and second generation. Values are means ± SD, (n= 10), \* Significant difference versus control (p ≤ 0.05). \*\* Highly significant difference versus control (p ≤ 0.01). \*\*\* Very highly significant difference versus control (p ≤ 0.001).

Cliff aversion in F1 and F2 offspring is shown in Figure 4. The pups born to the treated mothers took longer to move back on the platform during the three days of the test with a significant difference with the control, only in PND 5 the IMID did not exert any significant effect on the pups of the second generation.

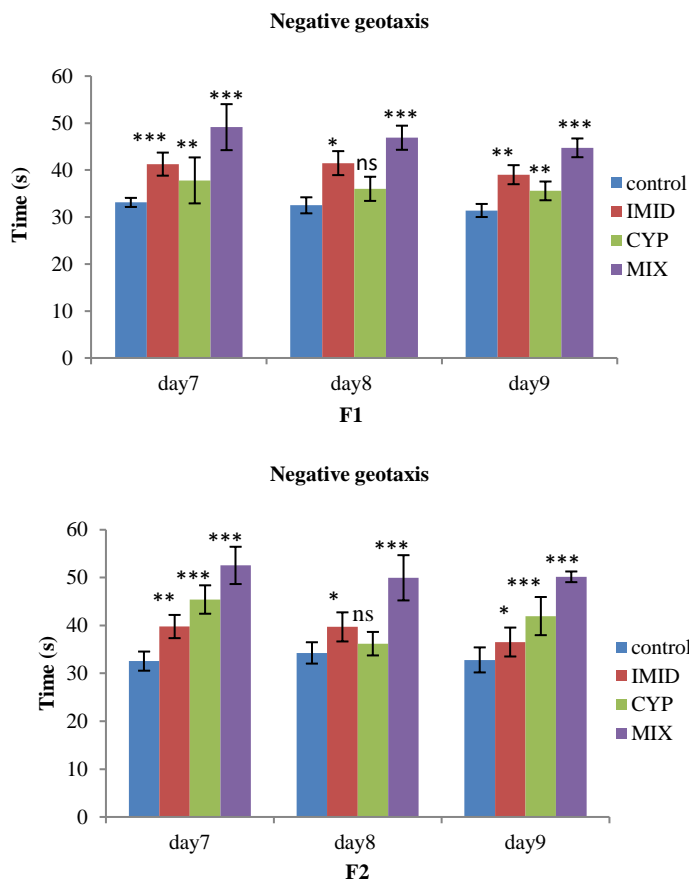






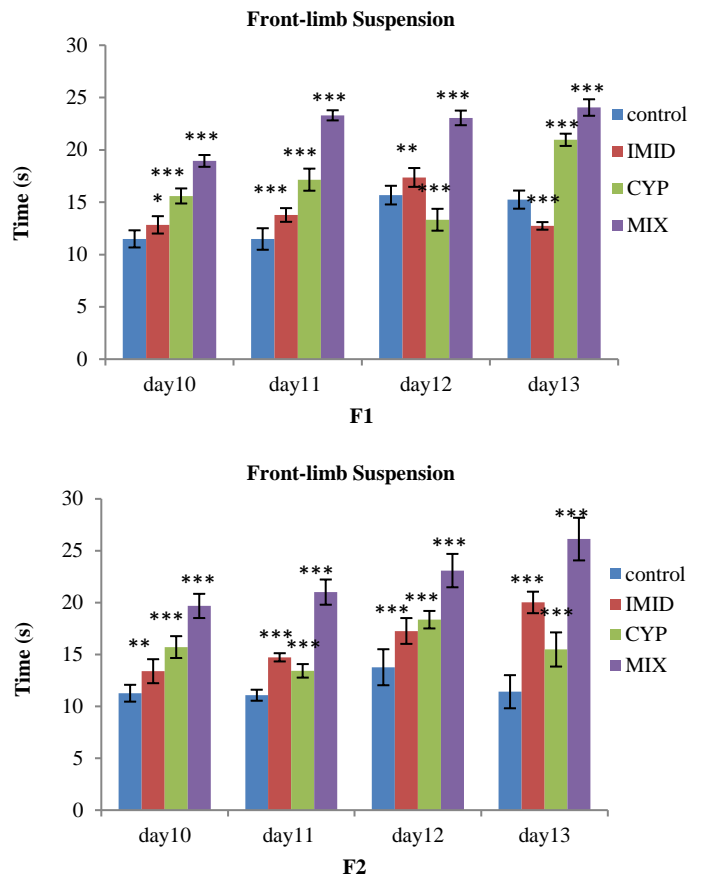
**Figure 4** Effects of gestational and lactational exposure to IMID, CYP and their mixture on cliff aversion in neonates of the first and second generation. Values are means  $\pm$  SD, (n= 10), ns no significant difference (p > 0.05). \* Significant difference versus control (p  $\leq$  0.05). \*\* Highly significant difference versus control (p  $\leq$  0.01). \*\*\* Very highly significant difference versus control (p  $\leq$  0.001).

Pre- and postnatal exposure to IMID and CYP significantly impaired the ability of pups to exhibit reflex in the negative geotaxis test. However, in PND8 no significant difference was recorded in first and second-generation pups born to dams treated with CYP alone (Fig 5).



**Figure 5** Effects of gestational and lactational exposure to IMID, CYP and their mixture on development of negative geotaxis reflex in neonates of the first and second generation. Values are means  $\pm$  SD, (n= 10), ns no significant difference (p > 0.05). \* Significant difference versus control (p  $\leq$  0.05). \*\* Highly significant difference versus control (p  $\leq$  0.01). \*\*\* Very highly significant difference versus control (p  $\leq$  0.001).

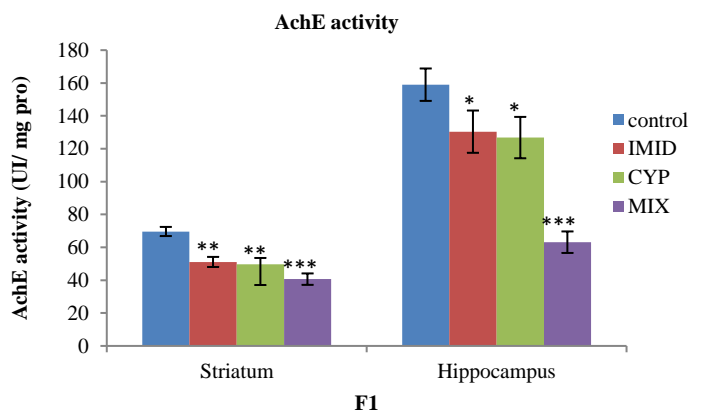
Coordination, development and motor strength were assessed by the front-limb suspension test. The results obtained showed that the fall latency was significantly affected, pups born to mothers treated with IMID and CYP either alone or in a mixture remained hanging from the wire longer than the controls (Fig 6).

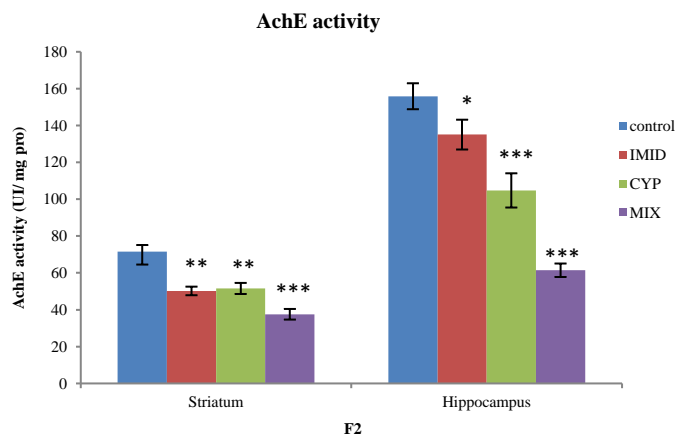


**Figure 6** Effects of gestational and lactational exposure to IMID, CYP and their mixture on coordination, development and motor strength in neonates of the first and second generation. Values are means  $\pm$  SD, (n= 10). \* Significant difference versus control (p  $\leq$  0.05). \*\* Highly significant difference versus control (p  $\leq$  0.01). \*\*\* Very highly significant difference versus control (p  $\leq$  0.001).

**Evaluation of AchE activity in pups of the F1 and F2 generation**

Maternal exposure to IMID and CYP alone or in cocktail resulted in a significant decrease in AChE activity in the striatum and hippocampus of first and second generation juvenile pups (Fig 7).





**Figure 7** Effects of gestational and lactational exposure to IMID, CYP and their mixture on acetylcholinesterase activity in striatum, and hippocampus of rats of the first and second generation observed at 21 days of age. Values are means  $\pm$  SD, (n= 10). \* Significant difference versus control (p  $\leq$  0.05). \*\* Highly significant difference versus control (p  $\leq$  0.01). \*\*\* Very highly significant difference versus control (p  $\leq$  0.001).

**Evaluation of mitochondrial swelling and membrane permeability**

The results in Table 1, show a significant increase in mitochondrial swelling in the striatum and hippocampus of first and second generation pups born to dams treated during gestation and throughout lactation with IMID and of CYP, alone or in a mixture, compared to pups born to untreated mothers.

**Table 1** Effect of gestational and lactational exposure to IMID, CYP and their mixture on mitochondrial swelling in striatum, and hippocampus of rats of the first and second generation observed at 21 days of age. Values are means  $\pm$  SD, (n= 10). \*\* Highly significant difference versus control (p  $\leq$  0.01). \*\*\* Very highly significant difference versus control (p  $\leq$  0.001).

	Mitochondrial swelling (optic density)			
	generations			
	F1		F2	
	Brains regions			
	Striatum	Hippocampus	Striatum	Hippocampus
Control	0.297 $\pm$ 0.020	0.262 $\pm$ 0.017	0.293 $\pm$ 0.014	0.270 $\pm$ 0.013
IMID	0.201 $\pm$ 0.022**	0.185 $\pm$ 0.012***	0.213 $\pm$ 0.008***	0.179 $\pm$ 0.017***
CYP	0.214 $\pm$ 0.022**	0.170 $\pm$ 0.015***	0.210 $\pm$ 0.032***	0.192 $\pm$ 0.021***
MIX	0.182 $\pm$ 0.012***	0.118 $\pm$ 0.014***	0.130 $\pm$ 0.011***	0.098 $\pm$ 0.006***

Maternal exposure to IMID and CYP, alone or in combination, significantly increased mitochondrial permeability in the striatum and hippocampus of first generation pups. This effect was transformed to the pups of the F2 generation born from the treated mothers even if there was no direct exposure of the F1 offspring (Tab 2).

The results of changes in calcium concentrations outside the mitochondria are shown in Figure 8. After pre- and postnatal exposure to IMID and CYP either alone or in combination, cytosolic calcium levels increased significantly in pups born to treated dams relative to those born to control dams.

**Evaluation of mitochondrial redox status in the striatum and hippocampus of F1 and F2 generation pups**

With respect to antioxidant potency, CAT, SOD, GST, GPx activity and GSH level in the striatum and hippocampus of pups born to IMID and CYP-treated mothers, either alone or in mixture, recorded values significantly lower than the control. For lipid peroxidation, our results showed a significant increase in MDA in pups born to treated mothers compared to those of the control (Table 3).

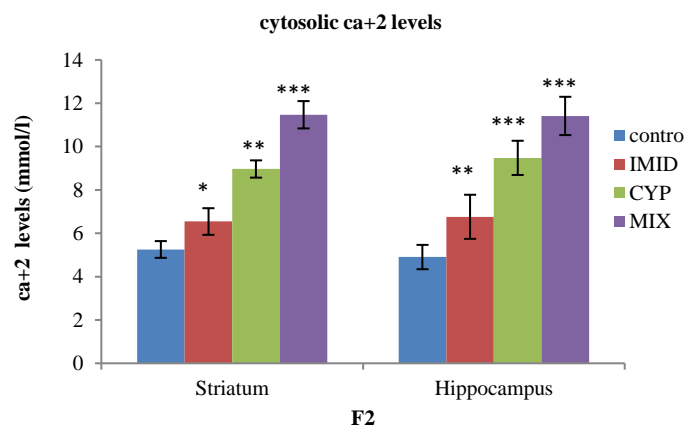
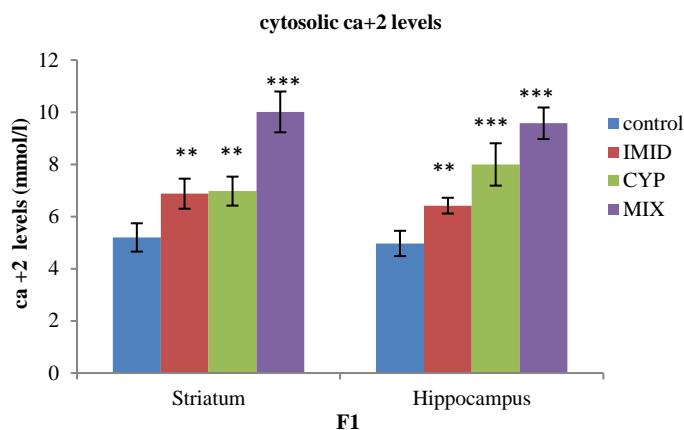
**Table 3** Effect of gestational and lactational exposure to IMID, CYP and their mixture on antioxidant enzymes and malondialdehyde levels in striatum, and hippocampus of rats of the first generation observed at 21 days of age. Values are means  $\pm$  SD, (n= 10). \* Significant difference versus control (p  $\leq$  0.05). \*\* Highly significant difference versus control (p  $\leq$  0.01). \*\*\* Very highly significant difference versus control (p  $\leq$  0.001).

	Mitochondrial oxidative stress parameters							
	groups							
	Control		IMID		CYP		MIX	
	Stria	Hippo	Stria	Hippo	Stria	Hippo	Stria	Hippo
MDA (nmol/mg Pro)	1.707 $\pm$ 0.10	1.51 $\pm$ 0.24	2.681 $\pm$ 0.36***	2.025 $\pm$ 0.27**	2.13 $\pm$ 0.09*	2.48 $\pm$ 0.21***	3.27 $\pm$ 0.34***	3.43 $\pm$ 0.22***
GSH (mmol/mgPro)	0.411 $\pm$ 0.03	0.417 $\pm$ 0.03	0.356 $\pm$ 0.03*	0.351 $\pm$ 0.03*	0.33 $\pm$ 0.02**	0.31 $\pm$ 0.05***	0.21 $\pm$ 0.03***	0.33 $\pm$ 0.02**
GST (UI/mg Pro)	50.52 $\pm$ 4.58	49.68 $\pm$ 1.43	42.797 $\pm$ 2.82**	38.498 $\pm$ 1.41***	41.30 $\pm$ 3.92**	39.11 $\pm$ 1.89***	30.19 $\pm$ 4.94***	27.01 $\pm$ 2.76***
GPx (UI/mg Pro)	0.274 $\pm$ 0.02	0.28 $\pm$ 0.01	0.237 $\pm$ 0.01**	0.254 $\pm$ 0.01*	0.25 $\pm$ 0.01*	0.24 $\pm$ 0.02**	0.20 $\pm$ 0.01***	0.24 $\pm$ 0.02**
CAT (UI/mg Pro)	0.090 $\pm$ 0.00	0.08 $\pm$ 0.01	0.069 $\pm$ 0.00**	0.064 $\pm$ 0.013*	0.07 $\pm$ 0.01*	0.05 $\pm$ 0.00**	0.03 $\pm$ 0.01***	0.03 $\pm$ 0.01***
SOD (UI/mg Pro)	10.45 $\pm$ 1.10	10.02 $\pm$ 0.24	8.80 $\pm$ 0.63**	8.12 $\pm$ 0.84***	7.73 $\pm$ 0.76***	8.46 $\pm$ 0.74**	5.16 $\pm$ 0.72***	5.12 $\pm$ 0.94***

Stria : Striatum, Hippo : Hippocampus

**Table 2** Effect of gestational and lactational exposure to IMID, CYP and their mixture on mitochondrial permeability in striatum, and hippocampus of rats of the first and second generation observed at 21 days of age. Values are means  $\pm$  SD, (n= 10). \* Significant difference versus control (p  $\leq$  0.05). \*\* Highly significant difference versus control (p  $\leq$  0.01). \*\*\* Very highly significant difference versus control (p  $\leq$  0.001).

	Mitochondrial permeability ( $\Delta$ OD/ $\Delta$ t)			
	generations			
	F1		F2	
	Brains regions			
	Striatum	Hippocampus	Striatum	Hippocampus
Control	0.017 $\pm$ 0.006	0.019 $\pm$ 0.003	0.022 $\pm$ 0.001	0.020 $\pm$ 0.002
IMID	0.027 $\pm$ 0.007*	0.031 $\pm$ 0.003***	0.026 $\pm$ 0.002**	0.030 $\pm$ 0.002***
CYP	0.031 $\pm$ 0.008**	0.037 $\pm$ 0.005***	0.032 $\pm$ 0.001***	0.037 $\pm$ 0.001***
MIX	0.032 $\pm$ 0.003**	0.040 $\pm$ 0.005***	0.031 $\pm$ 0.001***	0.041 $\pm$ 0.002***



**Figure 8** Effects of gestational and lactational exposure to IMID, CYP and their mixture on cytosolic ca<sup>2+</sup> levels in striatum, and hippocampus of rats of the first and second generation observed at 21 days of age. Values are means  $\pm$  SD, (n= 10). \* Significant difference versus control (p  $\leq$  0.05). \*\* Highly significant difference versus control (p  $\leq$  0.01). \*\*\* Very highly significant difference versus control (p  $\leq$  0.001).

The results in Table.4 show the persistence of disruption of mitochondrial redox homeostasis in the F2 generation pups even though there was no direct exposure of the F1 offspring. The pups in the treated groups recorded a significant decrease (p  $\leq$  0.001) in the activity of CAT, SOD, GST, GPx, the level of GSH and significantly higher values of MDA (p  $\leq$  0.001).

**Table 4** Effect of gestational and lactational exposure to IMID, CYP and their mixture on antioxidant enzymes and malondialdehyde levels in striatum, and hippocampus of rats of the second generation observed at 21 days of age. *Values are means ± SD, (n= 10).* \* Significant difference versus control (p ≤ 0.05). \*\* Highly significant difference versus control (p ≤ 0.01). \*\*\* Very highly significant difference versus control (p ≤ 0.001).

	Mitochondrial oxidative stress parameters							
	groups							
	Control		IMID		CYP		MIX	
	Stria	Hippo	Stria	Hippo	Stria	Hippo	Stria	Hippo
MDA (nmol/mg Pro)	1.653±0.17	1.686±0.26	2.970±0.39***	2.704±0.29***	3.111±0.43***	2.729±0.31***	4.536±0.66***	3.950±0.17***
GSH (mmol/mgPro)	0.418±0.01	0.409±0.01	0.304±0.03***	0.342±0.03**	0.292±0.04***	0.295±0.05***	0.197±0.02***	0.203±0.01***
GST (U/mg Pro)	49.87±1.51	49.53±1.39	40.24±1.48***	36.65±1.52***	40.57±1.76***	35.20±3.37***	24.52±1.86***	20.99±4.98***
GPx (U/mg Pro)	0.267±0.01	0.271±0.02	0.231±0.02**	0.231±0.02**	0.228±0.01***	0.232±0.01**	0.197±0.02***	0.227±0.01**
CAT (U/mg Pro)	0.087±0.00	0.080±0.01	0.06±0.01**	0.05±0.00**	0.05±0.009***	0.05±0.01***	0.029±0.01***	0.024±0.00***
SOD (U/mg Pro)	10.98±0.89	11.08±0.88	7.22±0.84***	6.01±0.96***	6.04±0.99***	5.51±0.72***	3.91±0.70***	4.11±0.74***

Stria : Striatum, Hippo : Hippocampus

**DISCUSSION**

The ubiquity of pesticides in the domestic and agricultural environment increases the likelihood of exposure for pregnant women and nursing mothers, putting their children at risk (Shittu et al., 2021). During fetal and childhood development, the environment can play an important role in the onset of many chronic diseases, including neurodevelopmental abnormalities. It has also been shown that these adverse effects can be transmitted to subsequent generations without the need for additional exposure (Blanc et al., 2020). The results of the present study demonstrated that exposure to a mixture of pesticides during a critical developmental period even at low doses that have been adapted for human consumption affects neuronal development and alters the mitochondrial redox status of 1st generation pups, these negative effects were also transmitted to the 2nd generation pups. It is well known that IMID, which is a member of the neonicotinoid family, acts in a similar way to nicotine by binding to postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). Hyperactivity of these receptors influences food intake and decreases body weight, which explains the reduction in weight gain in F1 and F2 offspring born to dams treated with IMID and CYP either alone or in combination. This reduction indicates reduced growth, which testifies to the vulnerability of developing rats to pesticides, this could be explained by the placental transfer of the compound from the mother to the fetus, this parameter is an important factor in determining developmental toxicity (Syed et al., 2016). Our results agree with those of Burke et al. 2018 and Elser et al. 2020 which showed weight reduction in the offspring of mice exposed during gestation and throughout lactation to 0.5 mg/kg IMID and 10 mg/kg CYP, respectively.

On the other hand, several studies have reported that exposure to pyrethroids and neonicotinoids affects neurobehavioral performance, hence the delay of the righting reflex (surface righting), disorders in the development of coordinated movement and the sense of movement. equilibrium that were recorded after pre and postnatal exposure to IMID and CYP either alone or in cocktails. This confirms the negative impact of these two pesticides on neuromotor development, motor functions and the vulnerability of the developing brain to xenobiotic insults (Syed et al., 2016). These neurobehavioral deficits could be the result of dysfunction in multiple areas of the central and peripheral nervous system; a recent study showed that fetal and lactational exposure to a neonicotinoid, clothianidin, inhibits the maturation of immature neurons in juvenile progenitor cells and the viability of adult progenitor cells (Maeda et al., 2021). Our results are in agreement with the work of Laugeray et al., 2017 who conducted a study in mice where females received 5 and 20 mg/kg/day of CYP throughout gestation and up to the 15th day. of lactation and those of Elser et al. 2020 who showed that maternal exposure to CYP influences the development of GABAergic neurons. The delay in the formation of these neurons can have a significant impact on their functions in the mature brain, which will subsequently cause neurodevelopmental problems in children. Moreover, a significant correlation between impaired memory performance, developmental/coordination problems and the application of ACh receptor antagonists has been demonstrated (Haense et al., 2012). It is now known that neonicotinoids and pyrethroids have the ability to inhibit AChE which leads to the accumulation of acetylcholine in synapses, subsequently causing persistent stimulation of cholinergic neurons (Arora et al., 2017). Overall, our results agree with those of Sinha et al. 2006 who tried to understand the mechanism of toxicity of a pyrethroid-based mosquito repellent at different stages of development of the central nervous system of rats and those of Liu et al., 2018 who confirm that thiamotoxam, another pesticide of the neonicotinoid family, has the ability to block the transfer of information between neurons and ultimately paralyze target organs. These results indicate that there is a link between cognitive delay in children and prenatal exposure to pesticides (Shelton., 2014; Gunier et al., 2017).

As the brain consumes a large amount of oxygen, contains high amounts of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and has low levels of antioxidant enzymes; which makes it very vulnerable to oxidative stress (Sharma et al., 2014), which is defined by an imbalance between the amounts of oxidant and antioxidant compounds, thus promoting the excessive generation of free radicals or slowing down their elimination (Bragante et al., 2022). Exposure of F0 generation rats to IMID and CYP, alone and in mixture, during gestation and throughout the lactation period resulted in increased cytosolic calcium levels in first generation rat pups. and the second generation. This dysregulation is due to the overload of the

mitochondria with calcium, which is known as an activating factor of several enzymes such as nucleases, proteases and phospholipases which will cause the oxidation of lipids and proteins of the mitochondrial membrane, thereby promoting the opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) (Panel et al., 2018). This mitochondrial depolarization should produce ATP depletion, followed by swelling and finally the release of cytochrome c which then promotes cell death signaling (Hosseini et al., 2013). Our results are in agreement with those of Muhammed et al. 2020 which prove that CYP has the ability to cause neurodegenerative disorders through mitochondrial dysfunction, caspase activation, genomic DNA damage, inhibition of AchE activity. Since neonicotinoids have the same structure as nicotine and also share agonist activity at nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), our results are consistent with those of Önal et al., 2004 which indicate that maternal exposure to nicotine alters the normal development of the different regions of the brain, in particular the CA1 of the hippocampus, by modifying its ultrastructure by the condensation of nuclear chromatin, the dilation of the rough endoplasmic reticulum and mitochondrial swelling.

As the brain consumes a large amount of oxygen, contains high amounts of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and has low levels of antioxidant enzymes; which makes it very vulnerable to oxidative stress (Sharma et al., 2014), which is defined by an imbalance between the amounts of oxidant and antioxidant compounds, thus promoting the excessive generation of free radicals or slowing down their elimination (Bragante et al., 2022). Exposure of F0 generation rats to IMID and CYP, alone and in mixture, during gestation and throughout the lactation period resulted in increased cytosolic calcium levels in first generation rat pups. and the second generation. This dysregulation is due to the overload of the mitochondria with calcium, which is known as an activating factor of several enzymes such as nucleases, proteases and phospholipases which will cause the oxidation of lipids and proteins of the mitochondrial membrane, thereby promoting the opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) (Panel et al., 2018). This mitochondrial depolarization should produce ATP depletion, followed by swelling and finally the release of cytochrome c which then promotes cell death signaling (Hosseini et al., 2013). Our results are in agreement with those of Muhammed et al. 2020 which prove that CYP has the ability to cause neurodegenerative disorders through mitochondrial dysfunction, caspase activation, genomic DNA damage, inhibition of AchE activity. Since neonicotinoids have the same structure as nicotine and also share agonist activity at nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), our results are consistent with those of Önal et al., 2004 which indicate that maternal exposure to nicotine alters the normal development of the different regions of the brain, in particular the CA1 of the hippocampus, by modifying its ultrastructure by the condensation of nuclear chromatin, the dilation of the rough endoplasmic reticulum and mitochondrial swelling.

According to our results, it seems that CYP is more neurotoxic than IMID. But in general, even as an insect-specific insecticide, IMID could alter the behavior and mitochondrial integrity of non-target species. Our results are in agreement with the work of Liu et al. (2018); which prove that pyrethroids like deltamethrin have a higher level of neurotoxicity compared to organophosphates and neonicotinoids due to their lipophilicity which allows them to accumulate in the cell membrane by disrupting its structure (Aouey et al. 2017). It is important to note that our results showed the persistence of neurobehavioral disorders and mitochondrial dysfunction even after cessation of exposure in F2 generation pups. A study that was conducted in Brazil, Colombia and Spain reported the presence of CYP residues in human breast milk indicating that IMID and CYP can be transferred from mother to offspring possibly through the placenta and through breast milk (Elser et al., 2020; Corcellas et al., 2012 ; Djellal et al., 2022 ; Gasmı et al., 2022). This proves that neonicotinoids and pyrethroids have transgenerational consequences that manifest later in life. This transmission could be explained by epigenetic mechanisms (Yuan et al., 2016). These results indicate that organisms may be subject to molecular changes accumulated over generations and/or that adaptive mechanisms may be able to reset their physiological state after a number of generations (Beck et al., 2017).

## CONCLUSION

It can be concluded that maternal exposure to IMID and CYP, alone and in cocktails, during gestation and throughout the lactational period, even at low doses, affects not only the behavior and brain function of the generation F1, but these effects are also transformed to the next generation (F2) even though there was no direct exposure of the F1 offspring. This proves that independent and combined exposure to IMID and CYP during a critical period of development has long-lasting, even persistent, irreversible effects. From here, we can say that exposure to Imidacloprid and Cypermethrin pesticides causes several pathological effects at the level of the brain, which leads to its dysfunction, which was confirmed by previous experiences, especially with regard to behavior, memory and intelligence. This study also confirmed the hypothesis of transmission of these toxics through breastfeeding.

## REFERENCES

- Albina, M. L., Bellés, M., Linares, V., Sánchez, D. J., & Domingo, J. L. (2005). Restraint stress does not enhance the uranium-induced developmental and behavioral effects in the offspring of uranium-exposed male rats. *Toxicology*, 215(1-2), 69-79. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.06.027>
- Aouey, B., Derbali, M., Chtourou, Y., Bouchard, M., Khabir, A., & Fetoui, H. (2017). Pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin and its metabolites induce liver injury through the activation of oxidative stress and proinflammatory gene expression in rats following acute and subchronic exposure. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(6), 5841-5856. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8323-4>
- Arora, S., Balotra, S., Pandey, G., & Kumar, A. (2017). Binary combinations of organophosphorus and synthetic pyrethroids are more potent acetylcholinesterase inhibitors than organophosphorus and carbamate mixtures: An in vitro assessment. *Toxicology Letters*, 268, 8-16. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.12.009>
- Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry* 44(1): 276-287 [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)
- Beck, D., Sadler-Riggelman, I., Skinner, M.K., 2017. Generational comparisons (F1 versus F3) of vinclozolin induced epigenetic transgenerational inheritance of sperm differential DNA methylation regions (epimutations) using MeDIP-Seq. *Environmental Epigenetics* 3. <https://doi.org/10.1093/eep/dvx016>
- Blanc, M., Cormier, B., Hyötyläinen, T., Krauss, M., Scherbak, N., Cousin, X., & Keiter, S. H. (2020). Multi-and transgenerational effects following early-life exposure of zebrafish to permethrin and coumarin 47: Impact on growth, fertility, behavior and lipid metabolism. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 205, 111348. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111348>
- Bragante, W., Sinhorin, V. D. G., Suguí, M. M., da Cunha, A. P. S., Dos Santos, W. B., & Sinhorin, A. P. (2022). In vivo mutagenic effects and oxidative stress parameters evaluation of cypermethrin and benzoate of emamectin and their mixtures in female mice. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 57(3), 211-219. <https://doi.org/10.1080/03601234.2022.2045841>
- Burke, A. P., Niibori, Y., Terayama, H., Ito, M., Pidgeon, C., Arsenault, J., ... & Hampson, D. R. (2018). Mammalian susceptibility to a neonicotinoid insecticide after fetal and early postnatal exposure. *Scientific reports*, 8(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35129-5>
- Claiborne A (1985) Catalase activity In: Greenwald RA (ed) *Handbook of methods for oxygen free radical research*. CRC Press, Boca Raton, pp 283-284. <https://doi.org/10.1093/clinchem/47.11.2075a>
- Corcellas, C., Feo, M.L., Torres, J.P., Malm, O., Ocampo-Duque, W., Eljarrat, E., Barceló, D., 2012. Pyrethroids in human breast milk: occurrence and nursing daily intake estimation. *Environ. Int.* 47, 17-22. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.05.007>
- Dewailly, E., Forde, M., Robertson, L., Kaddar, N., Sidi, E. A. L., Côté, S., ... & Ayotte, P. (2014). Evaluation of pyrethroid exposures in pregnant women from 10 Caribbean countries. *Environment international*, 63, 201-206. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.11.014>
- Djellal, D., Haddad, S., Gasmí, S., Chouit, Z., Kebieche, M., Hachemi, M., Hanfer, M., Ferhat, N., Bennoune, O., Fetoui, H., & Soulimani, R. (2022). Chronic thiacloprid exposure impairs cognitive function and triggers mitochondrial apoptosis pathway in rat striatum and hippocampus: neuropreventive effect of bitter apricot kernels extract (prunus armeniaca l.). *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 12(3), e9089. <https://doi.org/10.55251/jmbfs.9089>
- EFSA (European Food Safety Authority) (2011). Guidance on default assumptions used by the EFSA scientific panels and committee, and EFSA units in the absence of actual measured data: 1-30 <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2579>
- Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics* 82(1): 70-77 [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
- Ellman GL, Courtney KD, Andres JrV, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology* 7(2): 88-95 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006295261901459>
- Elser, B. A., Kayali, K., Dhakal, R., O'Hare, B., Wang, K., Lehmler, H. J., & Stevens, H. E. (2020). Combined maternal exposure to cypermethrin and stress affect embryonic brain and placental outcomes in mice. *Toxicological Sciences*, 175(2), 182-196. <https://doi.org/10.1093/toxsci/xfaa040>
- Farag, M. R., Alagawany, M., Moselhy, A. A., Said, E. N., Ismail, T. A., Di Cerbo, A., ... & Ahmed, M. M. (2022). The Neonicotinoid Thiacloprid Interferes with the Development, Brain Antioxidants, and Neurochemistry of Chicken Embryos and Alters the Hatching Behavior: Modulatory Potential of Phytochemicals. *Biology*, 11(1), 73. <https://doi.org/10.3390/biology11010073>
- Feather-Schussler, D. N., & Ferguson, T. S. (2016). A battery of motor tests in a neonatal mouse model of cerebral palsy. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (117), e53569. <https://doi.org/10.3791/53569>
- Flohe L, Günzler WA (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Methods in enzymology* 105: 114-120 [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05015-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05015-1)
- Gasmí, S., Benaicha, B., Kebieche, M., Mennai, I. (2022). Preventive effects of citrullus colocynthis. L plant extract on deltamethrin pesticide induced pneumotoxicity in wister rats, *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences: Vol. 11 No. 5* <https://doi.org/10.55251/jmbfs.5268>
- Guiner RB, Bradman A, Castorina R, Holland NT, Avery D, Harley KG, et al. Prenatal Residential Proximity to Agricultural Pesticide Use and IQ in 7-Year-Old Children. *Environ Res.* 2017; 158: 358-365. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.06.036> <https://doi.org/10.1289/EHP504>
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry* 249(22): 7130-7139. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)42083-8)
- Haense, C., Kalbe, E., Herholz, K., Hohmann, C., Neumaier, B., Kraus, R., & Heiss, W. D. (2012). Cholinergic system function and cognition in mild cognitive impairment. *Neurobiology of aging*, 33(5), 867-877. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.08.015>
- Hosseini, M. J., Naserzadeh, P., Salimi, A., & Pourahmad, J. (2013). Toxicity of cigarette smoke on isolated lung, heart, and brain mitochondria: induction of oxidative stress and cytochrome c release. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 95(9), 1624-1637. <https://doi.org/10.1080/02772248.2014.884206>
- Jallow MF, Awadh DG, Albaho MS, Devi VY, Ahmad N (2017) Monitoring of pesticide residues in commonly used fruits and vegetables in Kuwait. *International journal of environmental research and public health* 14(8): 833 <https://doi.org/10.3390/ijerph14080833>
- Katić, A., Kašuba, V., Kopjar, N., Lovaković, B. T., Čermak, A. M. M., Mendaš, G., ... & Želježić, D. (2021). Effects of low-level imidacloprid oral exposure on cholinesterase activity, oxidative stress responses, and primary DNA damage in the blood and brain of male Wistar rats. *Chemico-Biological Interactions*, 338, 109287. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109287>
- Kristal BS, Park BK, Yu BP (1996) 4-hydroxynonénal est un puissant inducteur de la transition de perméabilité mitochondriale. *J. Biol. Chem* 271 : 6033-6038 <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg412>
- Laugeray, A., Herzine, A., Perche, O., Richard, O., Montecot-Dubourg, C., Menuet, A., ... & Mortaud, S. (2017). In utero and lactational exposure to low-doses of the pyrethroid insecticide cypermethrin leads to neurodevelopmental defects in male mice—An ethological and transcriptomic study. *PLoS one*, 12(10), e0184475. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184475>
- Li, J., Yu W, Li XT, Qi SH, Li B (2014) The effects of propofol on mitochondrial dysfunction following focal cerebral ischemia-reperfusion in rats. *Neuropharmacology* 77: 358-368 <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.08.029>
- Liu, X., Zhang, Q., Li, S., Mi, P., Chen, D., Zhao, X., & Feng, X. (2018). Developmental toxicity and neurotoxicity of synthetic organic insecticides in zebrafish (*Danio rerio*): A comparative study of deltamethrin, acephate, and thiamethoxam. *Chemosphere*, 199, 16-25. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.176>
- Maeda, M., Kitauchi, S., Hirano, T., Ikenaka, Y., Nishi, M., Shoda, A., & Hoshi, N. (2021). Fetal and lactational exposure of the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) dose of the neonicotinoid pesticide clothianidin inhibits neurogenesis and induces different behavioral abnormalities at the developmental stages in male mice. *Journal of Veterinary Medical Science*, 20-0721. <https://doi.org/10.1292/jvms.20-0721>
- Maurya, S. K., Mishra, J., Tripathi, V. K., Sharma, R., & Siddiqui, M. H. (2014). Cypermethrin induces astrocyte damage: Role of aberrant Ca<sup>2+</sup>, ROS, JNK, P38, matrix metalloproteinase 2 and migration related reelin protein. *Pesticide biochemistry and physiology*, 111, 51-59. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.03.005>
- Muhammed, R. E., El-Desouky, M. A., Abo-Seda, S. B., Nahas, A. A., Elhakim, H. K., & Alkhalaf, M. I. (2020). The protecting role of *Moringa oleifera* in cypermethrin-induced mitochondrial dysfunction and apoptotic events in rats brain. *Journal of King Saud University-Science*, 32(6), 2717-2722. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.06.006>
- Niehaus WG, Samuelson B (1968) Formation of malondialdehyde from and glucose 6-phosphate dehydrogenase from fermenting yeast and phospholipids arachidonate during microsomal lipid peroxidation. *Eur J Biochem* 6: 126-30
- Önal, A., Uysal, A., Ülker, S., Delen, Y., Yurtseven, M. E., & Evinç, A. (2004). Alterations of brain tissue in fetal rats exposed to nicotine in utero: possible

- involvement of nitric oxide and catecholamines. *Neurotoxicology and teratology*, 26(1), 103-112. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2003.08.005>
- Osaka, A., Ueyama, J., Kondo, T., Nomura, H., Sugiura, Y., Saito, I., ... & Kamijima, M. (2016). Exposure characterization of three major insecticide lines in urine of young children in Japan—neonicotinoids, organophosphates, and pyrethroids. *Environmental research*, 147, 89-96. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.01.028>
- Panel M, Ghaleh B, Morin D (2018) Mitochondria and aging: A role for the mitochondrial transition pore? *Aging cell* 17(4): e12793 <https://doi.org/10.1111/ace1.12793>
- Peiffer, J. (2011). Étude de la neurotoxicité d'un Polluant Organique Persistant chez le rat: effets à court et à long terme de l'inhalation répétée de fluorène sur le développement sensori-moteur du jeune et le comportement à l'âge adulte (Doctoral dissertation, Institut National Polytechnique de Lorraine).
- Raszewski, G., Lemieszek, M. K., & Lukawski, K. (2016). Cytotoxicity induced by cypermethrin in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 23(1). <https://doi.org/10.5604/12321966.1196863>
- Sahu BD, Tatireddy S, Koneru M, Borkar RM, Kumar JM, Kuncha M, Srinivas R, Sunder SR, Sistla R (2014) Naringin ameliorates gentamicin-induced nephrotoxicity and associated mitochondrial dysfunction, apoptosis and inflammation in rats: possible mechanism of nephroprotection. *Toxicology and applied pharmacology* 277(1): 8-20 <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.02.022>
- Sano, K., Isobe, T., Yang, J., Win-Shwe, T. T., Yoshikane, M., Nakayama, S. F., ... & Maekawa, F. (2016). In utero and lactational exposure to acetamiprid induces abnormalities in socio-sexual and anxiety-related behaviors of male mice. *Frontiers in neuroscience*, 10, 228. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00228>
- Scarpato, R., Testi, S., Colosimo, V., Crespo, C. G., Micheli, C., Azzara, A., ... & Ghirri, P. (2020). Role of oxidative stress, genome damage and DNA methylation as determinants of pathological conditions in the newborn: an overview from conception to early neonatal stage. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 783, 108295. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2019.108295>
- 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. <https://doi.org/10.4103/2231-0738.129598>
- Shelton JF, Geraghty EM, Tancredi DJ, Delwiche LD, Schmidt RJ, Ritz B, et al. Neurodevelopmental disorders and prenatal residential proximity to agricultural pesticides: the CHARGE study. *Environ Health Perspect*. 2014; 122: 1103-1109. <https://doi.org/10.1289/ehp.1307044>
- Shittu, M., Ambali, S. F., Ayo, J. O., Kawu, M. U., & Olatunji, A. O. (2021). Melatonin mitigates thyroid dysfunction induced by gestational and lactational exposure to mixture of chlorpyrifos and cypermethrin in male Wistar rats. *Comparative Clinical Pathology*, 30(3), 529-540. <https://doi.org/10.1007/s00580-021-03247-8>
- Sinha, C., Seth, K., Islam, F., Chaturvedi, R. K., Shukla, S., Mathur, N., ... & Agrawal, A. K. (2006). Behavioral and neurochemical effects induced by pyrethroid-based mosquito repellent exposure in rat offsprings during prenatal and early postnatal period. *Neurotoxicology and teratology*, 28(4), 472-481. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2006.03.005>
- Skretteberg, L. G., Lyrån, B., Holen, B., Jansson, A., Fohgelberg, P., Siivinen, K., ... & Jensen, B. H. (2015). Pesticide residues in food of plant origin from Southeast Asia—A Nordic project. *Food Control*, 51, 225-235. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.11.008>
- Sunyer, J., & Dadvand, P. (2019). Pre-natal brain development as a target for urban air pollution. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 125, 81-88. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13226>
- Syed, F., John, P. J., & Soni, I. (2016). Neurodevelopmental consequences of gestational and lactational exposure to pyrethroids in rats. *Environmental toxicology*, 31(12), 1761-1770. <https://doi.org/10.1002/tox.22178>
- Yadav, A., Tandon, A., Seth, B., Goyal, S., Singh, S. J., Tiwari, S. K; Chaturvedi, R. K. (2020). Cypermethrin Impairs Hippocampal Neurogenesis and Cognitive Functions by Altering Neural Fate Decisions in the Rat Brain. *Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02108-9>
- Yuan, T.F., Li, A., Sun, X., Ouyang, H., Campos, C., Rocha, N.B.F., Arias-Carrion, O., Machado, S., Hou, G. & So, K.F. (2016) Transgenerational Inheritance of Paternal Neurobehavioral Phenotypes: Stress, Addiction, Ageing and Metabolism. *Mol Neurobiol*, 53, 6367-6376. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0252-18.2018>
- Zeljezic, D., Vinkovic, B., Kasuba, V., Kopjar, N., Milic, M., & Mladinic, M. (2017). The effect of insecticides chlorpyrifos,  $\alpha$ -cypermethrin and imidacloprid on primary DNA damage, TP 53 and c-Myc structural integrity by comet-FISH assay. *Chemosphere*, 182, 332-338. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.010>

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/370352453>

# Cognitive and Mitochondrial Alterations in Rat Striatum and Hippocampus Exposed to Imidacloprid: The Protective Role of Catechins

Article in *Proceedings of the National Academy of Sciences, India - Section B: Biological Sciences* · April 2023

DOI: 10.1007/s40011-023-01467-2

CITATIONS

0

READS

64

11 authors, including:



Souhila Haddad

Université de Béjaïa

11 PUBLICATIONS 58 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Zeyneb Chouit

University of Jijel

10 PUBLICATIONS 31 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Djellal Dounia

Université Batna 2

8 PUBLICATIONS 13 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Messaoud Hachemi

university of batna2

20 PUBLICATIONS 50 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

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



Valorisation de la flore algérienne : Etude d'une plante endémique du genre *Linariaia* (Scrophulariaceae) [View project](#)



Algerian Plants as Source for New Anti-Inflammatory. [View project](#)



# Cognitive and Mitochondrial Alterations in Rat Striatum and Hippocampus Exposed to Imidacloprid: The Protective Role of Catechins

Souhila Haddad<sup>1</sup> · Zeyneb Chouit<sup>2</sup> · Dounia Djellal<sup>3</sup> · Messaoud Hachemi<sup>4</sup> · Mourad Hanfer<sup>3,5</sup> · Ferhat Nouicer<sup>8</sup> · Omar Bennoune<sup>8</sup> · Zhoura Lakroun<sup>2</sup> · Djamila Zama<sup>6</sup> · Mohamed Kebieche<sup>3</sup> · Rachid Soulimani<sup>7</sup>

Received: 28 January 2022 / Revised: 10 March 2022 / Accepted: 15 March 2023  
© The Author(s), under exclusive licence to The National Academy of Sciences, India 2023

**Abstract** The focus of this study was to investigate the effect of chronic exposure to imidacloprid (IMID) on the neurotoxicity and protective role of catechins in rats. Imidacloprid (1.2 mg/kg/day: realistic dose) and catechins (20 mg/kg/day) were administered orally for 90 days. In this animal experiment, mitochondrial membrane permeability, matrix redox status, cholinergic function and cognitive function were evaluated in the rat striatum and hippocampus. Chronic exposure to imidacloprid has resulted in significant decreases in mitochondrial glutathione (GSH) rate and catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) activity, while glutathione-S-transferase (GST) activity Malondialdehyde (MDA) and cytosolic calcium (Ca<sup>2+</sup>) levels were significantly increased. The same results showed an improvement in mitochondrial membrane permeability as well as an increase in mitochondrial edema. In addition, assessment of cholinergic function revealed a decrease in acetylcholinesterase (AChE) activity alongside

behavioral and cognitive disorders such as muscle weakness, anxiety, memory loss and learning ability. Conversely, these results indicate that catechins protected brain regions from mitochondrial and cognitive impairment by imidacloprid. Finally, these results showed that chronic exposure to IMID is associated with loss of mitochondrial integrity, dysfunction of the cholinergic system, and impairment in neurobehavior and cognitive ability. In addition, catechins showed neuroprotective potential against pesticide neurotoxicity generated in both regions of rat brain.

**Keywords** Imidacloprid · Behavioral deficits · Striatum · Hippocampus · Mitochondrial alterations · Catechins

## Introduction

It is widely recognized that pesticides are essential for improving agricultural crops and controlling plant diseases, but their side effects could affect other ecosystems and living organisms that these crop protection products do not target. In fact, the prolonged and uncontrolled use of these chemicals has indirect negative effects on many other living

**Significance statement:** In this study, imidacloprid induced disruption of mitochondrial membrane permeability and swelling, and cognitive potential disorders in rat striatum and hippocampus, while catechins prevented these abnormalities when administered with this pesticide.

✉ Mohamed Kebieche  
kebiechem2016@gmail.com

- 1 Laboratoire de Biomathématique, Biophysique, Biochimie et Scientométrie, University of Bejaia, Béjaia, Algeria
- 2 University of Mohamed Seddik Ben Yahia, Jijel, Algeria
- 3 BMBP Laboratory, Faculty of Natural and Life Sciences, University of Batna 2, Route de Constantine, 05078 Fesdis, Batna, Algeria
- 4 Laboratory of Biotechnology of Bioactive Molecules and Cellular Pathophysiology, University of Batna 1, Batna, Algeria

- 5 Laboratory of Biology and Environment, University of Mentouri Brothers, Constantine, Algeria
- 6 Research Unit: VNRBM, PBA, University of Mentouri Brothers, Constantine, Algeria
- 7 Unité UR AFPA, EA3998, INRA USC 0340, MRCA, Neurotoxicologie Alimentaire et Bioactivité, Université de Lorraine, BP 4102, 57040 Metz, France
- 8 Veterinary Department, University of Batna 1, Batna, Algeria

organisms, such as the environment, animals and humans [1]. In addition, pesticides can affect biodiversity by killing pollinating insects and degrade the quality of agricultural soils by affecting their microbiological and water content [2]. Alarming levels of pesticide residues are also found in fruits and vegetables, which are probably considered to be the most common routes of exposure for people not directly exposed to these chemical compounds [3]. Neonicotinoids are a new generation of neuroactive pesticides chemically related to nicotine and are considered to be the most popular in the world due to their proven effectiveness against harmful insect species and knowing that their long persistence ensures long periods of protection and their systemic nature could also cover all parts of the plant, which makes it easier to combat a wide variety of pests [4]. Imidacloprid (IMID) is a member of the neonicotinoid family of pesticides. It is widely used to confront wide range of pests in agricultural and veterinary areas [5]. After extensive application, IMID has been shown to persist in soil for a few months to years due to its high water solubility and relatively non-volatile nature, allowing for its accumulation in the environment where non-target organisms such as humans and animals live [6]. It is chemically known that IMID acts similarly to nicotine by irreversibly binding to the postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors (nAChR). This permanent activation leads to an accumulation of acetylcholine by blocking the nicotinic neuronal pathway, causing paralysis and death [7]. The modes of action of environmental pollutants include an increase in oxidative stress through intensive formation of free radicals (ROS), which has been observed in several neurological disorders. To study IMID's mode of action, researchers studied the effects of this pesticide on the respiratory chain axis and the disruption of its ROS production. One of these studies showed a disruption in electron flow within complex I, explained by the overproduction of ROS, observed during chronic exposure to IMID in brain rats, leading to an imbalance in redox status capable of inducing cell death of apoptosis via the intrinsic mitochondrial pathway [8]. To study IMID's mode of action, researchers studied the effects of this pesticide on the respiratory chain axis and the disruption of its ROS production. One of these studies showed a disruption in electron flow within complex I, explained by the overproduction of ROS, observed during chronic exposure to IMID in brain rats, leading to an imbalance in redox status capable of inducing cell death of apoptosis via the intrinsic mitochondrial pathway [9]. It has been reported through literature data that endogenous antioxidant defenses are not always sufficient to completely prevent oxidative cell damage; hence, the urgent need to use exogenous sources of antioxidants [10]. Notably, many studies have shown that the natural antioxidants are the safer strategy to neutralize or eliminate xenobiotics from the body. Catechin or epigallocatechin-3-gallate (EGCG) is the main

flavonoid in green tea; it is classified as Flavan-3-ol. The antioxidant activity of catechins is known to be higher than that of vitamin C or  $\alpha$ -tocopherol [11].

First, this study focused on evaluating the neurotoxic effects of IMID in both striatal and hippocampal brain regions using an environmental dose found in cucumber (1.2 mg/kg/day) [12] in adult male rats exposed for a long time duration (90 days), by assessing the integrity of the mitochondrial membrane and its redox status, with a focus on behavioral changes, alongside the study of catechins to prevent brain damage from this neonicotinoid.

## Material and Methods

### Chemicals

Chemicals almost all chemicals were supplied by Sigma-Aldrich, Germany. Commando is the trade name of the pesticide used (IMID) purchased from the VAPCO Society, Jordan. The IMID dose (1.2 mg/kg) was chosen with reference to the realistic level of this pesticide found in cucumbers. In order to convert the concentration of IMID in cucumbers into the daily dose in animal experiments studies, we used a conversion factor of 0.05 in rats.

### Animal Treatments

28 male Wistar albino rats weighing 220,260 g were purchased from the Pasteur Institute of Algeria (PIA). Before the rats were subjected to the treatments, they were adapted for 2 weeks. The animals were maintained under a daily 12 h light/dark cycle at constant temperature (22 °C) and relative humidity of 55–10% and were fed standard rat pellets and water ad libitum. All animal experiments were performed in accordance with international guidelines for the care and use of laboratory animals. In this study, all animal experiments were approved by PIA according to the code of ethics: No Batna-Univ 2.2020.231. IMID and catechins were suspended in corn oil. The rats were randomly divided into 4 groups of 7 rats each as follows: Control group received only 1 ml corn oil; Group C received 20 mg/kg catechin; Group IMID received 1.2 mg/kg; IMIDGroup IMID + C received a combination (IMID at 1.2 mg/kg/day and catechin at 20 mg/kg/day).

### Behavioral and Cognitive Evaluation

The study performed an assessment of the neurotoxicity of IMID through some neurological and cognitive functions such as anxiety, locomotor activity, memory, learning and muscle strength using several of the following tests:



- *Open field (OF)*: The OF field was realized according to the Tatem et al. [13].
- *Elevated Plus Maze (EPM)*: The EPM was performed according to the procedure described by Baldo and Peterson [14].
- *Novel Object Recognition (NOR)*: The NOR test was performed according to the method described by Antunes and Biala [15].
- *Forced Swimming (FS)*: FST was calculated according to Porsolt et al. described method implemented. [16].
- *Konzielas Inverted Screen (KIS)*: Based on the method of Deacon [17].

### Biochemical Analysis

After 3 months exposure, the rats were sacrificed by decapitation after deep ether anesthesia. The brains were harvested and immediately washed with cold phosphate-buffered saline (PBS) and then dissected to separate the striatum and hippocampus, which will be used to assess the variation of various indicators.

#### *Isolation of the Mitochondrial Matrix from Striatum and Hippocampus*

Extraction of mitochondrial fractions was performed according to the method described by Sahu et al. [18]. A fraction of the obtained mitochondrial suspension was used directly for assessment of swelling and membrane permeability, and the remainder is kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  for further assays. The mitochondrial matrix was isolated by freezing and thawing approximately 8 times in conjunction with homogenization; then, we performed centrifugation at 10,000 g/10 min. The supernatant obtained was considered a source of mitochondrial MDA, GSH, CAT, GST, GPx and SOD.

#### *Determination of AChE Activity and Calcium Cytosol*

- AChE activity was determined in the cytosol by the method of Ellman et al. [19].
- The determination of the cytosolic calcium level was performed according to the manufacturer's instructions using commercial kit (SPINREACT, Spain).

#### *Assessment of Mitochondrial Swelling, and Permeability*

- Mitochondrial swelling was evaluated in the striatum and hippocampus using the method of Li et al. [20].
- Mitochondrial permeability was assessed according to the method designed by Kristal et al. [21].

#### *Assessment of Redox Status Markers in Striatum and Hippocampus Mitochondria*

- The protein contents of different samples were determined according to the method of Bradford [22].
- All oxidative stress indicators which are, namely GSH, MDA, CAT, SOD, GPx and GST, were measured in mitochondrial brain following methods reported by Abdel-Tawab et al. [23].

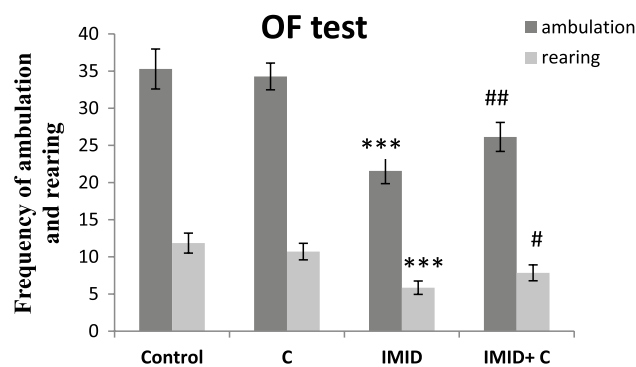
### Statistical Analysis

Data are presented as mean standard deviation. For multiple comparisons, data were analyzed using one-way ANOVA. Differences in means were considered significant at  $*p < 0.05$ ; highly significant at  $**p < 0.01$ ; and very highly significant at  $***p < 0.001$ . The statistical study was performed using the Excel SPC software package.

## Results and Discussion

### Behavioral and Cognitive Evaluation

The OF test results are shown in Fig. 1. They demonstrated the installation of anxiety by a very highly significant decrease ( $p < 0.001$ ) in the number of crossed squares (walking) and rearing in the IMID group compared to the control group, while the concomitant administration of catechins in combination with IMID restored normal results. In fact, the field test showed a decrease in rearing and walking frequency in the IMID-treated group, suggesting that this pesticide increases anxiety, expressed as a preference to remain immobile and close to the walls of the field.



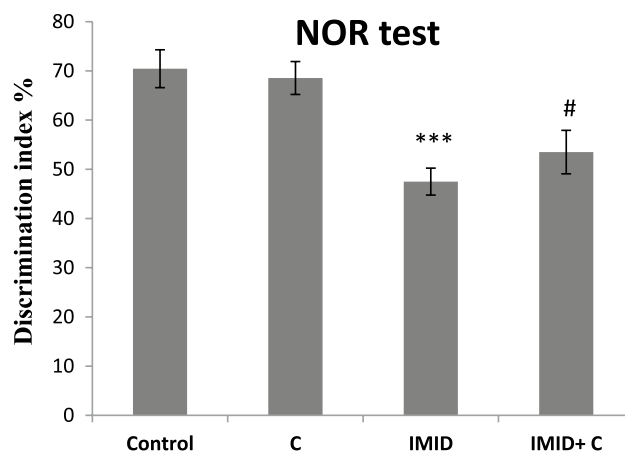
**Fig. 1** Evaluation of the level of anxiety in the rats exposed chronically to low dose of IMID and preventive role of Catechin (C) using the Open Field test (frequency of ambulation and rearing). Values are means  $\pm$  SD, ( $n=7$ ), \*\*\*Very highly significant difference from the control group ( $p \leq 0.001$ ). #Significant difference from the IMID group ( $p \leq 0.05$ ). ##Highly significant difference from the IMID group ( $p \leq 0.01$ )

Similarly, previous studies have observed that prenatal exposure to nicotine leads to neurobehavioral disorders related to the modulation of glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus [24]. The EPM results after chronic IMID exposure are presented in Table 1. Rats treated with IMID showed a significant increase ( $p < 0.05$ ) in time spent in closed arms and a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in time spent in open arms compared to control rats, while there was no significant variation in the number of Entries gave in open and closed arms. Furthermore, the results underscore that catechins supplementation modulates the IMID-induced anxiety effect. Interestingly, the association of EPM with OF tests revealed anxious behavior in IMID-treated rats compared to the control group. This behavior may be due to the interaction of IMID with CNS serotonergic and dopaminergic systems, which are known to be intimately involved in the modulation of anxiety disorders [25]. In addition, the results of the FS test showed an increase in immobility time, confirming that chronic administration of IMID induces behavioral distress. However, in the NOR test, the results of exploration times of new and familiar objects are shown in Fig. 2, showing that IMID caused a very highly significant decrease ( $p < 0.001$ ) in the recognition index (RI), expressed as the percentage of exploration time of the new object compared to the control group, reflecting a loss of cognitive ability in rats. This decrease was significantly ameliorated in the IMID + C group, whereas catechin supplementation resulted in a significant increase in RI compared to the IMID group. In addition, the results of the forced swimming test are shown in Fig. 3. The IMID-treated group shows a highly significant increase ( $p < 0.01$ ) in immobility time compared to the control group. Treatment of animals associated with catechins and IMID showed a significant improvement in this test compared to the IMID group. The same conclusion was similarly drawn when muscle strength and grip ability were evaluated by the KIS screen test. In fact, this test (Fig. 4) showed that the IMID group had a

**Table 1** Assessment of anxiety effects in the rats exposed chronically to a low dose of IMID using the EPM test and preventive role of Catechin

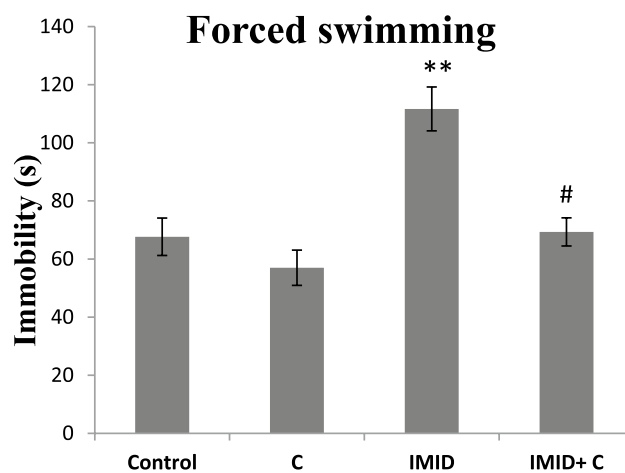
	Time spent in closed arms (s)	Time spent in open arms (s)	Number of entries in closed and open arms
Control	292.2 ± 1.79	7.8 ± 1.79	2.2 ± 1.64
Catechin	291.6 ± 2.70	8.4 ± 2.70	1.8 ± 0.83
IMID	299 ± 1.41*	1 ± 1.41*	1.4 ± 0.54 <sup>ns</sup>
IMID + Catechin	289 ± 7.41 <sup>##</sup>	11 ± 7.41 <sup>###</sup>	2.8 ± 1.30 <sup>ns</sup>

Values are means ± SD,  $n = 7$ , ns no significant difference ( $p > 0.05$ ). \*Significant difference from the control group ( $p \leq 0.05$ ). ## Highly significant difference from the IMID group ( $p \leq 0.01$ ). ### Very highly significant difference from the IMID group ( $p \leq 0.001$ )

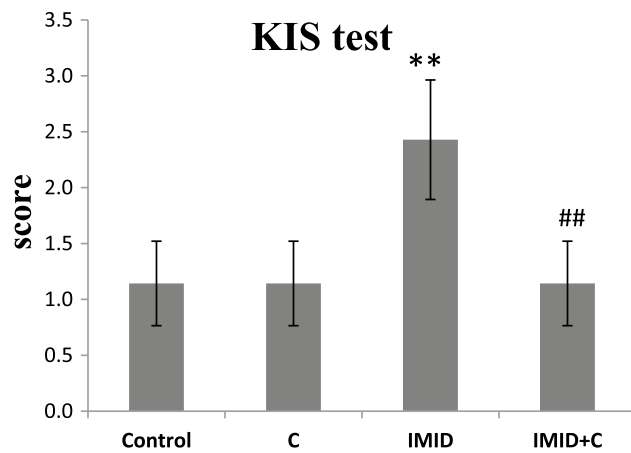


**Fig. 2** Evaluation of working memory and learning ability in the rats exposed chronically to low dose of IMID and preventive role of Catechin using the NOR test. Values are means ± SD, ( $n = 7$ ), \*\*\*Very highly significant difference from the control group ( $p \leq 0.001$ ). #Significant difference from the IMID group ( $p \leq 0.05$ )

highly significant increase ( $p < 0.01$ ) in the time to fall from the inverted screen, at the same time, when catechin was co-administered with IMID, these results returned to normal. In parallel, chronic IMID exposure of rats significantly ( $p < 0.001$ ) decreased AChE activity (Fig. 5) in both brain striatum and hippocampus. This inhibition leads to accumulation of acetylcholine in nerve synapses and myoneural junctions, suggesting that the cholinergic system could be blocked by IMID, leading to decreased spontaneous locomotor activity and muscle spasms in rats. These suggestions are also explained by the application of the KIS test, designed



**Fig. 3** Evaluation of immobility time of the rats exposed chronically to low dose of IMID and preventive role of Catechin using the Forced swimming test. Values are means ± SD, ( $n = 7$ ), \*\*highly significant difference from the control group ( $p \leq 0.01$ ). #Significant difference from the IMID group ( $p \leq 0.05$ )



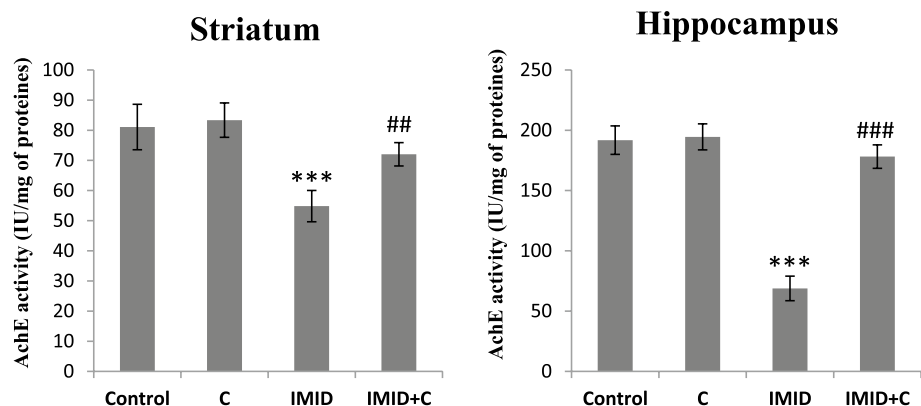
**Fig. 4** Evaluation of the muscle strength of the rats exposed chronically to low dose of IMID and preventive role of Catechin (C) using the KIS test. Values are means  $\pm$  SD, ( $n=7$ ), \*\*highly significant difference from the control group ( $p \leq 0.01$ ). ##Highly significant difference from the IMID group ( $p \leq 0.01$ )

to evaluate the strength of animals as well as their ability to maintain balance during inversion [26].

#### Evaluation of Mitochondrial Swelling, Membrane Permeability and Cytosolic $Ca^{2+}$

Treatment with IMID induced a very highly significant increase ( $p < 0.001$ ) in mitochondrial edema in both hippocampus and striatum compared to control, at the same time, when catechins co-administered with IMID, prevented this mitochondrial swelling (Table 2). In addition, the results in Table 3 express an increase in membrane permeability of striatum and hippocampal mitochondria in the IMID-treated group compared to the control. However, these results were reduced to normal levels by co-administration of catechins with the neonicotinoid. Simultaneously, assessment of cytosolic  $Ca^{2+}$  (Fig. 6) also showed a very highly significant increase in both hippocampus and striatum chronically treated with IMID compared to control

**Fig. 5** AChE activities in both striatum and hippocampus in rats exposed chronically to low-dose of IMID and preventive role of Catechin (C). Values are means  $\pm$  SD, ( $n=7$ ), \*\*\*Very highly significant difference from the control group ( $p \leq 0.001$ ). ##Highly significant difference from the IMID group ( $p \leq 0.01$ ). ###Very highly significant difference from the IMID group ( $p \leq 0.001$ )



**Table 2** Evaluation of mitochondrial swelling in the striatum and hippocampus, in rats exposed chronically to low-dose of IMID and preventive role of Catechin

	Mitochondrial swelling as (optic density)	
	Brains regions	
	Striatum	Hippocampus
Control	0.226 $\pm$ 0.016	0.266 $\pm$ 0.017
Catechin	0.230 $\pm$ 0.017	0.268 $\pm$ 0.010
IMID	0.116 $\pm$ 0.009***	0.136 $\pm$ 0.010***
IMID+ Catechin	0.212 $\pm$ 0.011###	0.239 $\pm$ 0.016###

Values are means  $\pm$  SD, ( $n=7$ ), \*\*\*Very highly significant difference from the control group ( $p \leq 0.001$ ). ###Very highly significant difference from the IMID group ( $p \leq 0.001$ )

normalized in IMID + C treated group. This up-regulation is most likely due to the translocation of the mitochondrial calcium through the opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP), which subsequently leads to mitochondrial swelling, and it is known that the permeabilization of the mitochondrial membranes (MMP) generally separates the critical lesion cell survival and death [27].

#### Evaluation of Mitochondrial Redox Status in Rat Striatum and Hippocampus

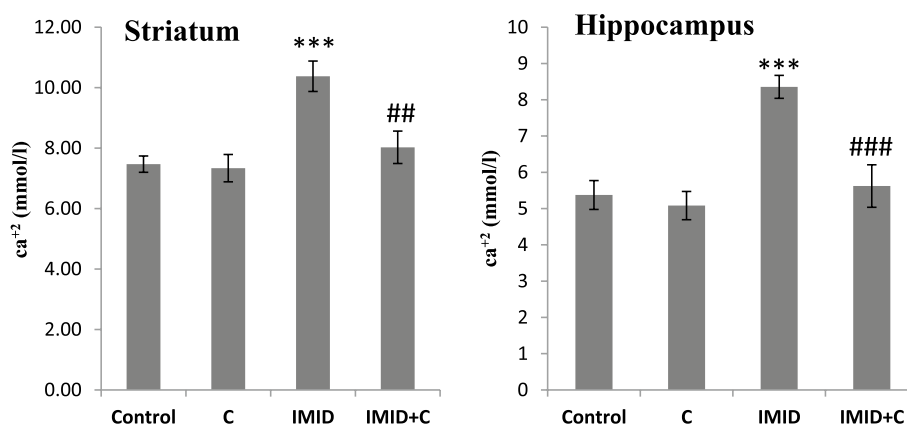
The rate of mitochondrial GSH decreased significantly ( $p < 0.001$ ) in the IMID-treated group compared to the control group. But when catechin was administered together with this pesticide, GSH was maintained at its normal level (Table 4). The results of this study also showed that IMID induced a very highly significant increase in mitochondrial MDA content ( $p < 0.001$ ) compared to the control group. The simultaneous administration of catechins and the pesticide in the IMID + C group resulted in a very highly significant decrease compared to the IMID group (Table 4). Previous studies have considered oxidative stress as one of the neurotoxic mechanisms of pesticides. In addition, this

**Table 3** Evaluation of mitochondrial permeability in the striatum and hippocampus, in rats exposed chronically to low-dose of IMID and preventive role of Catechin

	Mitochondrial permeability as ( $\Delta OD/\Delta t$ )	
	Brains regions	
	Striatum	Hippocampus
Control	0.013 ± 0.01	0.016 ± 0.01
Catechin	0.011 ± 0.01	0.013 ± 0.01
IMID	0.062 ± 0.02***	0.069 ± 0.03***
IMID + Catechin	0.034 ± 0.01#	0.031 ± 0.01##

Values are means ± SD, (n=7), \*\*\*Very highly significant difference from the control group ( $p \leq 0.001$ ). #Significant difference from the IMID group ( $p \leq 0.05$ ). ##Highly significant difference from the IMID group ( $p \leq 0.01$ )

phenomenon can also trigger damage to biological molecules, leading to the loss of their structures and functions [28]. The present study demonstrated that chronic exposure to IMID increases MDA levels, suggesting that this neonicotinoid is endowed with the potential formation of ROS capable of oxidizing double bonds of fatty acid hydrocarbon chains, thereby inducing lipoperoxidation is promoted, consequently leading to severe damage to biomembrane structure and cell function. Similarly, results from previous studies showed that chronic exposure to acetamiprid (another neonicotinoid) caused an increase in mitochondrial edema and membrane permeability [29]. There is evidence that organisms have numerous antioxidant molecules to prevent the deleterious effects of ROS, including GSH, which plays a critical role in maintaining redox homeostasis by scavenging ROS via thiol functions. However, in this study, GSH tended to be decreased in the striatum and hippocampal mitochondria in rats chronically exposed to IMID. At the same time treatment with IMID showed a very highly significant

**Fig. 6** Cytosolic  $Ca^{2+}$  levels in striatum and hippocampus in rats exposed chronically to low-dose of IMID and preventive role of Catechin (C). Values are means ± SD, (n=7), \*\*\*Very highly significant difference from the control group ( $p \leq 0.001$ ). ##Highly significant difference from the IMID group ( $p \leq 0.01$ ). ###Very highly significant difference from the IMID group ( $p \leq 0.001$ )**Table 4** Assessment of oxidative stress parameters in rat striatum and hippocampus mitochondria exposed chronically to low-dose of IMID and preventive role of Catechins

Rat groups	Control	Catechins (C)	IMID	IMID + C
<i>Rat striatum</i>				
GSH (mmol/mg of pro)	0.370 ± 0.027	0.358 ± 0.015	0.214 ± 0.016***	0.340 ± 0.014###
MDA (nmol/mg of pro)	1.933 ± 0.201	1.516 ± 0.122	4.054 ± 0.343***	2.328 ± 0.278###
CAT (IU/mg of pro)	0.044 ± 0.004	0.045 ± 0.003	0.015 ± 0.001***	0.038 ± 0.002###
SOD (IU/mg of pro)	12.091 ± 0.636	12.458 ± 0.363	4.927 ± 0.668***	11.111 ± 0.501###
GPx (IU/mg of pro)	0.254 ± 0.011	0.257 ± 0.010	0.217 ± 0.008*	0.239 ± 0.007#
GST (IU/mg of pro)	41.070 ± 3.145	40.902 ± 3.682	77.103 ± 4.949***	46.633 ± 3.300###
<i>Rat hippocampus</i>				
GSH (mmol/mg of pro)	0.403 ± 0.023	0.417 ± 0.009	0.273 ± 0.011***	0.382 ± 0.020###
MDA (nmol/mg of pro)	1.384 ± 0.169	1.334 ± 0.246	3.959 ± 0.295***	1.596 ± 0.206###
CAT (IU/mg of pro)	0.094 ± 0.006	0.093 ± 0.002	0.044 ± 0.003***	0.087 ± 0.005###
SOD (IU/mg of pro)	10.994 ± 0.737	10.539 ± 0.879	5.039 ± 0.402***	9.734 ± 0.249###
GPx (IU/mg of pro)	0.261 ± 0.011	0.266 ± 0.010	0.210 ± 0.006*	0.243 ± 0.008#
GST (IU/mg of pro)	44.562 ± 4.468	43.254 ± 3.791	60.550 ± 4.305**	50.487 ± 3.245###

Values are means ± SD, (n=7). \*Significant difference from the control group ( $p \leq 0.05$ ). \*\*Highly significant difference from the control group ( $p \leq 0.01$ ). \*\*\*Very highly significant difference from the control group ( $p \leq 0.001$ ). #Significant difference from the IMID group ( $p \leq 0.05$ ). ## Highly significant difference from the IMID group ( $p \leq 0.01$ ). ###Very highly significant difference from the IMID group ( $p \leq 0.001$ )

decrease ( $p < 0.001$ ) in mitochondrial CAT activity compared to control. However, this decrease was prevented in the rats when catechin was co-administered with IMD (Table 4). While the mitochondrial SOD activity assessment results also show a very highly significant ( $p < 0.001$ ) decrease in SOD activity compared to the control, this decrease was corrected at the same time in the IMID + C group (Table 4). Exposure to IMID caused a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in both hippocampal and striatal GPx activity compared to control, while this loss of enzymatic activity was prevented in the IMID + C group (Table 4). However, GST activity increased significantly ( $p < 0.001$ ) in both IMID-treated brain areas compared to the control group normalized by catechins (Table 4). On the other hand, this study showed that the neurotoxic effect induced by chronic IMID exposure can be prevented globally by using catechins at a dose of 20 mg/kg/day. These current findings agree with the results of the study carried out by Moreno-Ulloa et al. [30] on the effect of pesticides and the preventive role of catechins in rats.

## Conclusion

The data obtained from this study revealed that chronic exposure of rat striatum and hippocampus to IMID led to cognitive impairments and learning disabilities, which could be justified partially by the disturbance of cholinergic neurotransmission due to cholinesterase inhibition. In addition, IMID induced oxidative stress and mitochondrial injuries leading to disturbance of membrane permeability and mitochondrial swelling which impaired cognitive abilities in rats. On the other hand, catechin supplementation exhibits protective action against IMD effects on mitochondrial integrity and function and prevents also cognitive disorders.

**Acknowledgements** First, we are thankful to Ministry of education and scientific research of Algeria for its support in realizing this study. This work was achieved in the laboratory of Pharmacology and toxicology, Faculty of SNV, University of Batna 2. Authors, namely Souhila Haddad, Zeyneb Chouit, Dounia Djellal, Messaoud Hachemi, Mourad Hanfer, Ferhat Nouicer, Omar Bennoune, Zhoura Lakroun, Djamilia Zama, Mohamed Kebieche, Rachid Soulimani,

## Declarations

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Valette A, Weiss K, Rateau P, Roig B (2019) Chemistry and psychology: cross views on pesticide risks. In: Roig B et al (eds) Management of emerging public health issues and risks. Academic Press, London, pp 225–242. <https://doi.org/10.1016/C2016-0-00995-6>
- Skevas T (2020) Evaluating alternative policies to reduce pesticide groundwater pollution in Dutch arable farming. *J Environ Plan Manag* 63(4):733–750
- Salman LAL, Ahmed IAM (2016) Evaluation of some pesticide residues in fruits import by high performance liquid chromatography. *Al-Mustansiriyah J Sci* 27(4):15–20
- Sgolastra F, Medrzycki P, Bortolotti L, Maini S, Porrini C, Simon-Delso N, Bosch J (2020) Bees and pesticide regulation: lessons from the neonicotinoid experience. *Biol Conserv* 241:108356
- Ensley SM (2018) Chapter 40-neonicotinoids. In: Gupta RC (ed) Veterinary toxicology. Academic Press, Cambridge, pp 521–524
- Li Y, Long L, Ge J, Li H, Zhang M, Wan Q, Yu X (2019) Effect of imidacloprid uptake from contaminated soils on vegetable growth. *J Agric Food Chem* 67(26):7232–7242
- Kara M, Yumrutas O, Demir CF, Ozdemir HH, Bozgeyik I, Coskun S, Eraslan E, Bal R (2015) Insecticide imidacloprid influences cognitive functions and alters learning performance and related gene expression in a rat model. *Int J Exp Pathol* 96(5):332–337
- Thany SH, Reynier P, Lenaers G (2013) Neurotoxicité des pesticides: Quel impact sur les maladies neurodégénératives. *Med Sci* 29:273–278
- Martelli F, Zhongyuan Z, Wang J, Wong C-O, Karagas NE, Roessner U et al (2020) Low doses of the neonicotinoid insecticide imidacloprid induce ROS triggering neurological and metabolic impairments in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 117:25840–25850. <https://doi.org/10.1073/pnas.2011828117-DOI-PMC-PubMed>
- Akhtar MJ, Ahamed M, Alhadlaq HA, Alshamsan A (2017) Mechanism of ROS scavenging and antioxidant signalling by redox metallic and fullerene nanomaterials: potential implications in ROS associated degenerative disorders. *Biochim Biophys Acta* 1861(4):802–813
- Kim MJ, Kim JH, Kim JH et al (2015) Comparative studies on the antioxidant capacities and catechin profiles of conventional and organic green tea. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 58:475–480. <https://doi.org/10.1007/s13765-015-0045-7>
- Jallow MF, Awadh DG, Albaho MS, Devi VY, Ahmad N (2017) Monitoring of pesticide residues in commonly used fruits and vegetables in Kuwait. *Int J Environ Res Public Health* 14(8):833
- EFSA (2011) Guidance on default assumptions used by the EFSA scientific panels and committee, and EFSA units in the absence of actual measured data. *EFSA J* 10:2579
- Baldo B, Petersén Á (2015) Analysis of nonmotor features in murine models of Huntington disease. In: LeDoux MS (ed) Movement disorders. Academic Press, London, pp 583–602
- Antunes M, Biala G (2012) The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process* 13(2):93–110
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M (1978) “Behavioural despair” in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine. *Eur J Pharmacol* 51(3):291–294
- Deacon BJ (2013) The biomedical model of mental disorder: a critical analysis of its validity, utility, and effects on psychotherapy research. *Clin Psychol Rev* 33(7):846–861
- Sahu BD, Tatireddy S, Koneru M, Borkar RM, Kumar JM, Kuncha M, Srinivas R, Sunder SR, Sistla R (2014) Naringin ameliorates gentamicin-induced nephrotoxicity and associated mitochondrial dysfunction, apoptosis and inflammation in rats: possible mechanism of nephroprotection. *Toxicol Appl Pharmacol* 277(1):8–20
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7(2):88–95

20. Li J, Yu W, Li XT, Qi SH, Li B (2014) The effects of propofol on mitochondrial dysfunction following focal cerebral ischemia–reperfusion in rats. *Neuropharmacology* 77:358–368
21. Kristal BS, Park BK, Yu BP (1996) 4-hydroxynonéal est un puissant inducteur de la transition de perméabilité mitochondriale. *J Biol Chem* 271:6033–6038
22. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72(1–2):248–254
23. Mossa A-TH, Swelam ES, Mohafrash SMM (2015) Sub-chronic exposure to fipronil induced oxidative stress, Biochemical and histopathological changes in the liver and kidney of male albino rats. *Toxicol Rep* 2:775–784
24. Garbarino VR, Orr ME, Rodriguez KA, Buffenstein R (2015) Mechanisms of oxidative stress resistance in the brain: lessons learned from hypoxia tolerant extremophilic vertebrates. *Arch Biochem Biophys* 576:8–16
25. Parameshwaran K, Buabeid MA, Karuppagounder SS, Uthayathas S, Thiruchelvam K, Shonesy B, Dityatev A, Escobar MC, Dhannasekaran M, Suppiramaniam V (2012) Developmental nicotine exposure induced alterations in behavior and glutamate receptor function in hippocampus. *Cell Mol Life Sci* 69(5):829–841
26. Zhang K, Lu J, Yao L (2020) Involvement of the dopamine D1 receptor system in the anxiolytic effect of cedrol in the elevated plus maze and light–dark box tests. *J Pharmacol Sci* 142(1):26–33
27. Reekes TH, Vinyard HT III, Echols W, Eubank AJ III, Bouldin MD, Murray WH, Brewer S, Brown BT, Willis HL Jr, Tabrani Z, Favero CB, Clabough EB (2016) Moderate chronic fetal alcohol exposure causes a motor learning deficit in adult outbred Swiss-Webster mice. *F1000Research* 5(1896):1896
28. Panel M, Ghaleh B, Morin D (2018) Mitochondria and aging: a role for the mitochondrial transition pore? *Aging Cell* 17(4):e12793. <https://doi.org/10.1111/ace1.12793>
29. Chen T, Tan J, Wan Z, Zou Y, Afewerky HK, Zhang Z, Zhang T (2017) Effects of commonly used pesticides in China on the mitochondria and ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *Int J Mol Sci* 18(12):2507. <https://doi.org/10.3390/ijms18122507>
30. Moreno-Ulloa A, Nogueira L, Rodriguez A, Barboza J et al (2015) Recovery of indicators of mitochondrial biogenesis, oxidative stress, and aging with (–)-epicatechin in senile mice. *J Gerontol Ser A* 70(11):1370–1378. <https://doi.org/10.1093/gerona/glu131>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.