

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET DE TOXICOLOGIE ENVIRONNEMENTALE

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT
Spécialité : Immunologie

**Toxicité du Roundup® TURBO sur les statuts
physiologique, biochimique et oxydatif chez le rat de la
souche Wistar. Évaluation des effets protecteurs de
l'huile de *Linum usitatissimum* et du sulfate de zinc**

Présentée par : Mme DJABER Nesrine

Directeur de thèse : Mr MESSARAH Mahfoud

Prof., Université Badji Mokhtar- Annaba

Membres de Jury:

Président : Mr KECHRID Zine

Prof., Université Badji Mokhtar - Annaba

Examineurs : Mme ALEM Karima

MCA, Université Badji Mokhtar - Annaba

Mme SLIMANI Souheila

Prof., Université 20 août 1955 - Skikda

N° DBCH...../2023

Année universitaire : 2022/2023

Remerciements

*Mes remerciements les plus sincères et les plus chaleureux s'adressent : A **ALLAH** le tout puissant qui m'a permis d'être ce que je suis aujourd'hui. Car l'homme propose mais **ALLAH** dispose. Seigneur, veuillez toujours diriger mes pas.*

*Mes remerciements vont en premier lieu à mon directeur de thèse **Mr MESSARAH Mahfoud** Professeur à l'université Badji Mokhtar d'Annaba, qui m'a fait l'honneur d'accepter de réaliser cette thèse. Je vous remercie pour votre soutien et confiance en toutes circonstances, pour vos conseils avisés pratiques, techniques et scientifiques, et votre aide précieuse tout au long de ce travail. Je voudrais également souligner votre disponibilité, vos qualités scientifiques et votre intérêt pour la recherche qui étaient pour moi une source de motivation supplémentaire. Je lui exprime mes sincères reconnaissances.*

*Je remercie **Mr KECHRID Zine** Professeur à l'université Badji Mokhtar d'Annaba, merci de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de soutenance.*

*Mes remerciements s'adressent aussi à **Mme ALEM Karima** maitre de conférence à l'université Badji Mokhtar - Annaba pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.*

***Mme SLIMANI Souheila** Professeur à l'université 20 août 1955 de Skikda qui a bien voulu accepter d'évaluer mon travail et faire partie de mon jury de soutenance.*

*Tout comme je remercie **Mme BOUMENDJEL AMEL** Professeur à l'université Badji Mokhtar d'Annaba pour son aide précieuse et sa présence.*

*Je tiens à remercier **Mr BOUMENDJEL Maheiddine** professeur à l'université Badji Mokhtar d'Annaba pour son amical accueil, sa gentillesse et son aide très précieuse.*

*Je souhaite également exprimer mes sincères et profonds remerciements à **M. le Dr KHALDI Taha**, Maitre de recherche au Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine, pour leur aide illimitée, leur précieux conseil, soutien moral et leur disponibilité tout au long de la partie pratique.*

Je exprime ma sincère gratitude, à :

*Tous les chercheurs du **Laboratoire de Biochimie et Toxicologie Environnementale**
(L.B.T.E.), Université Badji Mokhtar, Annaba qui à un moment ou un autre nous ont
conseillées et m'ont aidées.*

*Toute l'équipe du service d'anatomie pathologique à l'hôpital **EL HADDI BENDJEDID**
El-Tarf pour leur chaleureux accueil et la réalisation des coupes histologiques.*

*Tout le personnel du laboratoire de biochimie et microbiologie à l'hôpital **CHU IBEN**
ROCHED Annaba, pour la réalisation des paramètres biochimiques.*

Dédicaces

À mes très chers parents, BOUZID & CHARA

À mon mari, RIDA

À mon petit ange MOHAMED OUSSAID

Aux membres des familles DJABER et BELAID

*-Toute personne...qui m'a aidé à franchir un horizon dans ma
vie...*

TABLE DES MATIERES

RESUME	I
ABSTRACT	III
المخلص.....	V
LISTE DES TABLEAUX	VI
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES ABREVIATIONS :	VIII
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : GLYPHOSATE	3
1. DEFINITION DES PESTICIDES	3
2. GLYPHOSATE	3
2.1. Définition :	3
2.2. Mode d'action dans la plante.....	4
2.3. Utilisation	4
2.3.1. Utilisations agricoles	4
2.3.2. Utilisations non agricoles	5
2.4. Propriétés physicochimiques du glyphosate :	5
2.5. Le métabolisme et la cinétique du glyphosate chez les animaux de laboratoire	5
2.5.1. Absorption :	5
2.5.2. Distribution.....	6
2.5.3. Métabolisme	6
2.5.4. Élimination	6
2.6. Évaluation du risque toxicologique chez les animaux de laboratoire	6
2.7. Effets sur l'homme	6
2.8. Effets écologiques chez les organismes non visés	6
2.8.1. Poisson.....	6
2.8.2. Les oiseaux	7
3. GLYPHOSATE ET STRESS OXYDANT	7
CHAPITRE II : ZINC	8
1. DEFINITION :	8
2. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES.....	8
3. BESOIN ET SOURCE DU ZINC	8
4. DEVENIR DU ZINC DANS L'ORGANISME	8
4.1. Absorption :	8
4.2. Transport	9
4.3. Distribution.....	10
a. Dans le sang.....	10
b. Dans les tissus	10
4.4. Excrétion	10
5. ROLE DU ZINC DANS LES PROCESSUS BIOLOGIQUES	11

5.1 Dans l'expression des gènes et dans la transcription de l'ADN	11
5.2. Défense immunitaire	11
5.3. Fonction cérébrale	11
6. ZINC ET STRESS OXYDATIF	11
6.1. Définition du stress oxydant.....	11
6.2. Défense anti-oxydante du zinc :	11
6.3. Le zinc est un pro-oxydant:.....	13
CHAPITRE III : LINUM USITATISSIMUM	14
1. ÉTYMOLOGIE.....	14
2. CLASSIFICATION.....	14
3. COMPOSITION DE LA GRAINE DE LIN	15
3.1. Composition chimique :	15
3.2. Etude phytochimique de <i>L. usitatissimum</i>	15
3.2.1. Les composés phénoliques	15
3.2.2. Les flavonoïdes.....	16
3.3. Composition et caractéristiques d'huile <i>L. usitatissimum</i> :.....	16
3.3.1. Etude chromatographique d'huile de <i>L. usitatissimum</i> :.....	16
4. UTILISATIONS PHARMACOLOGIQUES DES GRAINES DE <i>L. USITATISSIMUM</i> ...	17
4.1. Effets sur le profile lipidique.....	17
4.2. Activité antidiabétique	18
4.3. Les maladies cardiovasculaires	18
4.4. Effets sur le système respiratoire et immunitaire	18
4.5. Activité antimicrobienne et antifongique.....	18
5. TOXICITE	18
CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES.....	19
1. ETUDE PHYTOCHIMIQUE.....	19
1.1. Matériel végétal :.....	19
1.2. Dosage des composés phénoliques (dosages colorimétriques)	19
1.2.1. Dosage des phénols totaux	19
1.2.2 Dosage des flavonoïdes totaux.....	19
1.2.3 Dosage des tanins condensés	19
1.2.4. Dosage des flavonols.....	19
1.3. Évaluation de l'activité antioxydante	19
1.3.1. Etude de l'activité antioxydante (Méthode DPPH).....	19
1.3.2. Capacité antioxydante totale (CAT).....	20
1.3.3. Méthode de blanchissement du β -carotène	20
1.3.4. Méthode de réduction du Fer (FRAP).....	20
2. ETUDE BIOLOGIQUE	21
2.1. Animaux et conditions d'élevage	21
2.2. Traitement des rats	21
2.2.1. Protocole expérimental.....	21

2.2.2. Sacrifice des rats et prélèvement des échantillons :	21
2.3. Détermination de la formule de numération sanguine (FNS)	24
2.4. Dosage des paramètres biochimiques.....	24
2.5. Dosage des paramètres de stress oxydatif	24
2.5.1. Dosages des protéines	24
2.5.2. Détermination du taux de la peroxydation lipidique (MDA)	24
2.5.3. Détermination du taux des produits protéiques d'oxydation avancés (AOPP).....	24
2.5.4. Détermination du taux des protéines carbonylées (PCO)	24
2.5.5. Détermination du taux de glutathion réduit (GSH)	25
2.5.6. Détermination de la concentration de la Vit C	25
2.5.7. Détermination de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (E.C. 1.11.1.9)	26
2.5.8. Détermination de l'activité enzymatique de la glutathion-S-transférase (EC 2.5.1.18)	26
2.5.9. Détermination de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) (E.C.1.11.1.6).....	26
2.5.10. Détermination de l'activité enzymatique du superoxyde dismutase (SOD)	26
2.5.11. Détermination de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE)	26
6. ETUDE HISTOLOGIQUE	26
7. TRAITEMENT STATISTIQUE DES RESULTATS :	26
CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION.....	27
1. LA COMPOSITION CHIMIQUE & LES PROPRIETES ANTIOXYDANTES DE L'HUILE DE <i>LINUM USITATISSIMUM</i>	27
1.1. Dosage des composés phénoliques	27
1.2. Activité anti-oxydante	27
DISCUSSION :	28
2. IMPACT DU ROUNDUP SUR LA VARIATION DES PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES, HEMATOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES : EFFETS PROTECTEURS DE LA SUPPLEMENTATION EN <i>LINUM USITATISSIMUM</i> OU EN ZINC.....	29
2.1. Effet du Roundup sur l'état général de santé des rats	29
2.2. Etude pondérale.....	29
2.2.1. Variation du poids corporel.....	29
2.2.2. Variation de la consommation quotidienne d'aliment et de l'eau de boisson.....	29
2.2.3. Poids absolu et relatif des organes étudiée	30
DISCUSSION :	32
2.3. Etude des paramètres biochimiques:	33
2.3.1. Bilan énergétique :	33
2.3.2. Bilan hépatique.....	33
2.3.3. Bilan lipidique	35
2.3.4. Bilan rénal :	36
DISCUSSION :	37
2.4. Effet du traitement sur les paramètres hématologiques	42
DISCUSSION :	42

3. STRESS OXYDATIF INDUIT PAR LE ROUNDUP : EFFETS PROTECTEURS DE LA SUPPLEMENTATION EN ZINC ET EN HUILE DE <i>LINUM USITATISSIMUM</i>	44
3.1. PARAMETRES NON-ENZYMATIQUES	44
3.1.1. Taux de malondialdehyde.....	44
3.1.2. Taux des produits proteiques d'oxydation avancee.....	44
3.1.3. Taux des proteines carbonylees.....	44
3.1.4. Taux du glutathion reduit	45
3.1.5. Taux d'acide ascorbique.....	46
3.2. PARAMETRES ENZYMATIQUES	47
3.2.1. Taux du glutathion peroxydase	47
3.2.2. Taux du glutathion - S- transférase	47
3.2.3. Taux de catalase	48
3.2.4. Taux du superoxyde dismutase	48
DISCUSSION :	50
4. L'ACTIVITE DE L'ACETYLCHOLINESTERASE AU NIVEAU CEREBRALE :.....	56
DISCUSSION :	56
5. ETUDE HISTOLOGIQUE	57
5.1. Etude histologique du foie.....	57
5.2. Etude histologique des reins.....	58
5.3. Etude histologique du cerveau	58
DISCUSSION	62
CONCLUSION	64
REFERENCES BIBIOGRAPHIQUE	66
ANNEXE	85
ACTIVITES ET RECHERCHE SCIENTIFIQUE	87

Résumé

L'objectif de la présente étude consiste à évaluer les effets cytoprotecteur et antioxydant de l'huile de lin à raison de 0.5 g/kg de poids corporel (*Linum usitatissimum*) ainsi que l'effet préventif du zinc à raison de 277 mg/l contre la cytotoxicité et le stress oxydatif induits par le Roundup à 269.9 mg/kg administré dans l'eau de boisson chez les rats mâles de la souche Wistar.

L'analyse phytochimique de l'huile de lin a révélé une composition riche et variée en métabolites secondaires où les phénols totaux, les flavonoïdes, les tannins, les flavonols et les orto-diphénols. De plus, cette huile est doué d'activités antioxydantes chélatante et neutralisante très importantes. En effet, les tests antioxydants *in vitro* montrent que l'huile de lin à une activité antioxydante vis-à-vis du radical DPPH. En plus de son effet protecteur contre l'oxydation de l'acide linoléique couplée à celle du β -carotène, il est susceptible de protéger la cellule contre divers dommages oxydatifs grâce à sa capacité antioxydante totale élevée.

In vivo, nos résultats ont montré que l'herbicide administré induit une diminution du poids corporel des rats males associé à une perturbation de statut oxydant (augmentation du contenu en MDA, en AOPP, en PCO et inhibition de l'activité des enzymes antioxydantes (GPx, GST, SOD et CAT) ainsi que inhibition au niveau du GSH et de la Vit C. Cet état de stress oxydatif conduit à une augmentation des biomarqueurs hépatiques (ASAT, ALAT, LDH, ALP, protéines totales et l'albumine) et rénales (créatinine, urée et acide urique). Concernant le métabolisme lipidique et glucidique, le RDP a provoqué une hypercholestérolémie, hypertriglycéridémie et hyperglycémie.

La toxicité induite par le RDP a été également observée au niveau des paramètres hématologiques, objectivés par une anémie. Suite à un traitement au RDP, l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase du cerveau a été réduite comparativement aux témoins. Ces modifications biochimiques sont confirmées par les données histologiques où des changements extensifs dégénératifs et des infiltrations de cellules mononucléaires se manifestent, congestion vasculaire, dilatation des sinusoides et hémorragie et nécrose tissulaire au niveau hépatiques.

L'étude histologique rénal révèle des lésions glomérulaires, hémorragique et dilatation des tubules contournés proximaux. Tandis que l'histologie cervicale a donné des modifications dégénératives et une gliose focale chez les rats traités par le RDP comparativement aux témoins.

Cependant, la supplémentation orale en huile de lin et en zinc aux rats traités par le Roundup, ont atténué certains effets nocifs et toxiques de ce pesticide. Ceci met nettement en évidence les rôles protecteurs de ces deux antioxydants vis-à-vis du stress oxydant généré au cours du traitement par cet organophosphate. De plus, l'effet préventif de *L. usitatissimum* contre la toxicité induite par le RDP est vraisemblablement attribuée aux différents constituants de cette huile qui sont doués d'une forte aptitude à chélater et neutraliser les radicaux libres et protéger les organes étudiés contre le stress oxydant.

Mots-clés : Roundup, *Linum usitatissimum*, Zinc, Stress oxydant, Cytotoxicité, Antioxydants, Phytochimique.

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the cytoprotective and antioxidant effects of linseed oil at 0.5 g/kg body weight (*Linum usitatissimum*) and the preventive effect of zinc at 277 mg/l against cytotoxicity and oxidative stress induced by Roundup at 269.9 mg/kg administered in drinking water in male Wistar rats.

Phytochemical analysis of linseed oil revealed a rich and varied composition of secondary metabolites including total phenols, flavonoids, tannins, flavonols and orto-diphenols. Moreover, this oil is endowed with highly significant chelating and neutralizing antioxidant activities. In fact, *in vitro* antioxidant tests show that flaxseed oil has antioxidant activity against the DPPH radical. In addition to its protective effect against linoleic acid oxidation coupled with that of β -carotene, it is likely to protect the cell against various oxidative damages due to its high total antioxidant capacity.

In vivo, our results showed that the administered herbicide induced a decrease in body weight in male rats, associated with a disturbance in oxidative status (increased MDA, AOPP and PCO content and inhibition of antioxidant enzyme activity (GPx, GST, SOD and CAT) as well as GSH and Vit C levels. This state of oxidative stress leads to an increase in hepatic biomarkers (ASAT, ALAT, LDH, ALP, total proteins and albumin) and renal biomarkers (creatinine, urea and uric acid). Concerning to lipid and carbohydrate metabolism, RDP induced hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia and hyperglycemia. .

RDP-induced toxicity which was observed in hematological parameters, as evidenced by anemia. Following RDP treatment, brain acetylcholinesterase enzyme activity was reduced compared with controls.

These biochemical changes were confirmed by histological data, which revealed extensive degenerative changes and mononuclear cell infiltration, vascular congestion, sinusoid dilatation and hemorrhage and tissue necrosis in the liver.

Renal histology reveals glomerular lesions, hemorrhage and dilatation of proximal convoluted tubules. Cervical histology showed degenerative changes and focal gliosis in RDP-treated rats compared with controls.

However, oral supplementation of flaxseed oil and zinc to Roundup-treated rats attenuated some of the harmful and toxic effects of this pesticide. This clearly highlights the protective roles of these two antioxidants against oxidative stress generated during treatment with this organophosphate.

Furthermore, the preventive effect of *L. usitatissimum* against RDP-induced toxicity is similarly attributed to the various constituents of this oil, which are endowed with a strong ability to chelate and neutralize free radicals and protect the organs studied against oxidative stress.

Keywords: Roundup, *Linum usitatissimum*, Zinc, Oxidative stress, Cytotoxicity, Antioxidants, Phytochemical.

الملخص :

الهدف من هذه الدراسة هي تقييم التأثيرات الواقية للخلايا ومضادات الأكسدة لزيت بذور الكتان بجرعة 0.5 غ / كغ وزن حي (*Linum usitatissimum*) وكذلك التأثير الوقائي للزنك بجرعة 277 مغ /ل ضد التسمم الخلوي و الإجهاد التأكسدي الناتج عن تأثير Roundup 269.9 مغ / كغ في مياه الشرب لفنران ذكور ا من سلالة Wistar .

بالإضافة إلى ذلك، يتمتع هذا الزيت بأنشطة مهمة جدًا لمضادات الأكسدة في الواقع، أظهرت اختبارات مضادات الأكسدة في المختبر أن زيت بذور الكتان له نشاط مضاد للأكسدة ضد جذور DPPH. بالإضافة إلى تأثيره الوقائي ضد أكسدة حمض اللينوليك إلى جانب تأثير بيتا كاروتين ، فمن المرجح أن يحمي الخلية من أضرار الأكسدة المختلفة بفضل قدرتها العالية المضادة للأكسدة.

في الجسم الحي ، أظهرت نتائجنا أن هذا مبيد الأعشاب التي تم تناوله أدى إلى انخفاض في وزن الجسم ذكور الفنران المرتبط باضطراب حالة الأكسدة زيادة محتوى MDA و AOPP و PCO وتنشيط نشاط الإنزيمات مضادة الأكسدة (GPx و GST و SOD و CAT) و كذلك مستوى Vit C. GSH. هذه الحالة من الإجهاد التأكسدي تؤدي إلى زيادة في وظيفة الكبد (ASAT ، ALAT ، LDH ، ALP ، البروتين الكلي والألبومين) الوظيفة الكلوية (الكرياتينين واليوريا وحمض اليوريك) فيما يتعلق بعملية أيض الدهون و الكربوهيدرات ، يتسبب RDP في زيادة تركيز كوليسترول ، و الغليسيريدات الثلاثية و ارتفاع السكر في الدم.

كما لوحظت السمية التي يسببها RDP على مستوى المعايير الدموية ادت الى فقر الدم. بعد علاج بال RDP يكون نشاط إنزيم أستيل كولين إستراز في الدماغ منخفض مقارنةً بالشواهد.

يتم تأكيد هذه التغيرات الكيميائية الحيوية من خلال البيانات النسيجية حيث تظهر احتقان الأوعية الدموية، تسلل خلايا أحادية النواة، تمدد الجيوب، نزيف ونخر الأنسجة في الكبد.

كشفت الدراسة النسيجية الكلوية تمزقات في الكبيبة، نزيف وتمدد في الأنابيب الملتفة. بينما أظهرت أنسجة المخ تغيرات وضمور الخلايا العصبية لفنران المعالجة بـ RDP مقارن بالشواهد.

في حين أن المعالجة بزيت بذور الكتان و الزنك عن طريق الفم عند الفنران المعالجة بـ Roundup أدت إلى التخفيف من بعض مؤثراته الضارة و السامة لهذا المبيد. مما يدل بوضوح على الأدوار الوقائية لهذين المضادين للأكسدة ضد الإجهاد التأكسدي الناتج عن المعاملة بالفوسفات العضوي

بالإضافة إلى ذلك، فإن التأثير الوقائي لـ *L. usitatissimum* ضد السمية التي يسببها RDP يُعزى بشكل مشابه جدًا إلى المكونات المختلفة لهذا الزيت والتي تتمتع بقدرة قوية على تخليب الجذور الحرة وتحييدها وحماية الأعضاء المدروسة من الإجهاد التأكسدي.

الكلمات الدالة : Roundup ، *Linum usitatissimum* ، الزنك ، إجهاد التأكسدي، تسمم خلوي، مضادات الأكسدة، كيمياء نباتية.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01: Caractéristiques physico-chimiques du glyphosate.....	5
Tableau 02: Propriétés physico-chimiques du zinc (Seve et Favier 2002; Chang, 2005).....	8
Tableau 03: classification botanique du <i>L. usitatissimum</i> (Diederichsen et Richards 2003)	14
Tableau 04: Composition chimique générale des graines de <i>L. usitatissimum</i>	15
Tableau 05 : Composition en acides gras de l'huile de lin(Gutiérrez et al., 2010).....	16
Tableau 06: Analyse par CGL des esters méthyliques d'acides gras de l'huile de lin (EL- kabten) (Hendawi et al., 2016).	17
Tableau 07 : Teneur en composés phénoliques de l'huile de lin	27
Tableau 08 : Activité antioxydante de l'huile de lin.....	28
Tableau 09: Variation du poids corporel (g) chez les rats témoins et les rats traités.	30
Tableau 10:Consommation quotidienne de l'aliment et de l'eau de boisson chez les rats témoins et les rats traités.	30
Tableau 11:Variation de poids absolu (PA) (g) du foie, des reins et du cerveau chez les rats témoins et les rats traités chez les rats témoins et les rats traités.	31
Tableau 12 : Variation de quelques paramètres biochimiques chez les rats témoins et traités.	35
Tableau 13 : Profil hématologique chez les rats témoins et les rats traités après 30 jours de traitement.....	42
Tableau 14: Variation de la teneur en malondialdéhyde (nmol/mg de protéine) dans le foie, les reins et le cerveau	45
Tableau 15: Variation de la teneur en produits protéiques d'oxydation avancée (nmol/mg de protéine) dans le foie, les reins et le cerveau.....	45
Tableau 16: Variation de la teneur en protéines carbonylées (nmol/mg de protéine) dans le foie, les reins et le cerveau.	45
Tableau 17 : Variation de l'activité de GPx (nmol GSH/min/mg de protéine) dans le foie, les reins et le cerveau.	48
Tableau 18 : Variation de l'activité de GST (nmol CDNB/min/mg de protéine) dans le foie, les reins et le cerveau.....	48
Tableau 19 : Variation de l'activité de la catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min/mg}$ de protéine) dans le foie, les reins et le cerveau	49

LISTE DES FIGURES

Figure 01: Structure chimique du glyphosate (Williams et al., 2000).	3
Figure 02: Mécanisme d'action du glyphosate : inhibition de la 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthétase (Rueda-Ruzafa et al., 2019)	4
Figure 03: Mécanisme de l'absorption du zinc (Seve et Favier 2002).	9
Figure 04 : Transport cellulaire du zinc (Hrabeta et al., 2016)	10
Figure 05 : Participation du zinc aux mécanismes antioxydants (Marreiro et al., 2017).	13
Figure 06: Aspect morphologique du <i>Linum usitatissimum</i>	14
Figure 07 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental.	23
Figure 08 : Gamme d'étalonnage utilisée (BSA 1mg/ml) pour le dosage des protéines.	24
Figure 09 : Réaction entre les protéines carbonylées et le DNPH.	25
Figure 10 : Principe de dosage du glutathion.	25
Figure 11 : Gamme d'étalonnage du vit C.	25
Figure 12 : Principe de dosage du GST.....	26
Figure 14 : Variation du poids relatif des organes (Foie, reins et cerveau) en g/100 g Pc chez les rats témoins et les rats traités.	31
Figure 15 : Variation de la concentration plasmatique en urée (mmol/l), créatinine (µmol/l) et acide urique (µmol/l) chez les rats témoins et les rats traités après 30 jours de traitement.....	36
Figure 15 : Variation du taux de glutathion réduit (nmol/mg de protéine) dans le foie, les reins et le cerveau.	46
Figure 16 : Variation du taux d'acide ascorbique (nmol acide ascorbique/mg de protéine) dans le foie et les reins.....	47
Figure 17 : Variation de l'activité de la SOD (U/mg de protéine) dans le foie et les reins.	49
Figure 18: Variation de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (µmol/min/mg protéine) dans le cerveau.....	56
Figure 20: Les coupes histologiques colorées H & E du foie (× 40) du foie Contrôles (A), traités avec RDP (B à E), Zn co-administré avec RDP (F) et HLU co-administré avec RDP (G), Zinc (H), <i>Linum usitatissimum</i> (I) après 4 semaines de traitement. Congestion vasculaire (flèche rouge), infiltration mononucléaire (cercle noir), hépatocyte (flèche noire) et dilatation des sinusoides (flèche jaune), nécrose () et dégénérescence et gonflement des hépatocytes (cercle rouge).....	59
Figure 21 : Les coupes histologiques colorées H & E des reins (×40). Contrôles (A), traités avec RDP (B), Zn co-administré avec RDP (C) et HLU co-administré avec RDP (D), Zinc (E), <i>Linum usitatissimum</i> (F) après 4 semaines de traitement. Espace de Bowman (flèche noire), dilatation tubulaire (flèche jaune), hémorragique (cercle) et Malpighien atrophié et effondré (flèche rouge).....	60
Figure 22 : Les coupes histologiques colorées H & E du cerveau (×40). Contrôles (A), traités avec RDP (B), Zn co-administré avec RDP (C) et HLU co-administré avec RDP (D), Zinc (E), <i>Linum usitatissimum</i> (F) après 4 semaines de traitement. Neurones (cercle noir), dégénérescence neuronale (cercle rouge), vacuoles (flèche noire), gliose focale autour des neurones (flèche rouge).....	61

Liste des abréviations :

- **AGPI** : Acides Gras Polyinsaturés
- **AGS** : Acides Gras Saturés
- **AL**: Acide Linoléique
- **ALA**: Acide Alpha-Linolénique
- **ALAT**: alanines aminotransférases
- **ASAT**: aspartate aminotransférase
- **BHT** : Butylated Hydroxy Toluene
- **BSA** : Albumine de sérum de bœuf
- **DNPH** : la dinitrophénylhydrazine
- **DPPH** : (1,1-Diphényl 2-Pyridylhydrazil)
- **ERO**: espèces réactives de l'oxygène
- **G6PDH**: Glucose-6-phosphate déshydrogénase
- *Lu* : *Linum usitatissimum L.*
- **MCV** : Maladies Cardiovasculaires
- **MES**: (2-[N-morpholino]acide éthane sulfonique)
- **MOPS** : Acide morpholino-3 propanesulfonique
- **PAL**: Phosphatases alcalines
- **PBS** : phosphate-buffered saline (tampon phosphate salin)
- **PC**: Poids Corporel
- **PIPES** : Acide pipérazine-1,4-diéthanesulfonique
- **PL** : Phospholipides
- **SDG**: Secoisolarecirésinol Di-Glucoside
- **TCA** :acide trichloroacétique

INTRODUCTION GENERALE

Introduction

Le Roundup est l'un des herbicides les plus couramment utilisés, vu le potentiel herbicide et la faible toxicité qu'il présente pour les mammifères (El-Demerdash et al., 2006). Toutefois, on y trouve des résidus de cet herbicide partout dans l'environnement (eau, air, l'eau de pluie et de brouillard) et dans les produits alimentaires (Rott et al., 2004). Par conséquent, une exposition à cet herbicide peut conduire à des effets aigus sur la santé. Des études récentes ont montré que le Roundup est un facteur de risque pour plusieurs pathologies telles que les cancers (Li et al., 2013), l'infertilité (Dai et al., 2016), les troubles neurologiques (Rebai et al., 2017) et les maladies cardiovasculaires (Wani et Blanco-Garcia, 2016).

La présence du Roundup dans l'organisme induit la production d'espèces réactives de l'oxygène tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les radicaux hydroxylés (HO) et les anions superoxydes ($O_2\cdot^-$) perturbant le statut redox des cellules, ce qui occasionne un stress oxydatif. De ce fait, l'organisme dispose de systèmes enzymatiques complexes lui permettant de biotransformer les xénobiotiques principalement par le foie et secondairement par les reins, les poumons et le cerveau (Larsen et al., 2012).

De ce fait, le matériel végétal qui fait l'objet de cette étude est l'huile de Lin *Linum usitatissimum* L. (Lu), connue sous le nom de «Zeriât el kettan» appartenant à la famille des *Linaceae*. La graine de lin est devenue plus populaire en raison de son profil nutritionnel attrayant (Bekhit et al., 2018). Elle est riche en une gamme de composants bioactifs, de nutriments et antioxydants, notamment des protéines, des lipides non saturés, des fibres alimentaires, des polyphénols et des minéraux (Shim et al., 2014).

Les oligo-éléments présents dans de nombreux aliments jouent un rôle crucial dans diverses pathologies. Le zinc est un élément structurel constituant de nombreuses protéines, hormones et récepteurs hormonaux, qui joue un rôle fondamental dans un large éventail de processus biochimiques, et c'est un modulateur important dans le système nerveux central (SNC) des mammifères (Nazarizadeh et Asri-Rezaie 2016; Maret, 2019), défense antioxydante.

Zn est un cofacteur important de nombreuses enzymes antioxydantes, telles que l'induction de métallothionéines qui protègent les composants cellulaires de l'oxydation (Semercioz et al., 2017), la protection des groupements sulfhydryles de l'oxydation et maintien d'un niveau intracellulaire réduit de glutathion (Bashandy et al., 2018).

Ainsi, dans cette étude, notre objectif principal est d'étudier l'effet antioxydant d'huile de lin (*Linum usitatissimum L*) et du zinc sur, le statut redox chez des rats reçu le Roundup.

Avant de présenter les résultats, une étude bibliographique succincte est reportée sur les connaissances acquises à ce jour sur, le Roundup ainsi que l'effet antioxydant du zinc. De plus, les caractéristiques concernant l'huile de lin (*Linum usitatissimum L*) sont également présentées.

Pour cela, nous nous sommes fixés deux objectifs :

- **Le premier objectif** consiste à évaluer le pouvoir antioxydant et la teneur en composés phénoliques (polyphénols, flavonoïdes, tanins) de l'huile de lin *in vitro*.
- **Le deuxième objectif** porte un intérêt particulier sur l'évaluation des effets modulateurs de la supplémentation en huile de lin ou en Zinc afin d'atténuer les dégâts oxydatifs dans le sang et les tissus des rats ont reçu le RDP *in vivo* en évaluant :
 - ✓ Les paramètres physiologiques (poids corporel, consommation d'aliment et poids relatifs des organes étudiés). ;
 - ✓ L'analyse de quelques paramètres biochimiques et hématologiques;
 - ✓ l'évaluation du système pro/anti-oxydant par la détermination de quelques éléments non enzymatiques comme le malondialdéhyde (MDA), des produits protéiques d'oxydation avancés (AOPP), des protéines carbonylées (PCO), le glutathion réduit (GSH) et l'acide ascorbique (Vit C) ;
 - ✓ L'exploration du statut antioxydants enzymatiques; de la glutathion peroxydases (GPx), de la glutathion-S-transférase (GST), du superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase (CAT);
 - ✓ La détermination de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase cérébrale.
 - ✓ l'étude histologique des organes cible (foie, rein et cerveau).

Enfin, nous discutons un ensemble de résultats obtenus dans ce manuscrit, dans lequel nous allons quelques perspectives sont proposées sur ce travail de recherche.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE



CHAPITRE I : GLYPHOSATE

CHAPITRE I : GLYPHOSATE

1. Définition des pesticides:

Les humains ont toujours dû protéger les cultures des parasites, des ravageurs et des plantes concurrentes. La première utilisation était la lutte des membres en désherbant ou en ramassant des insectes. Certains produits sont utilisés, mais depuis la Seconde Guerre mondiale, avec le développement rapide de la technologie, la chimie organique, le contrôle chimique a eu l'importance qu'on lui connaît aujourd'hui par l'introduction de pesticides (Silvy, 1995).

Les pesticides sont des substances utilisées pour repousser, détruire ou combattre des organismes dangereux comme les plantes, les animaux, les champignons ou les bactéries qui entravent les activités humaines. Il s'agit principalement d'herbicides, de fongicides et d'insecticides, selon leur cible (de l'Anses, 2011).

Selon l'organisation *Food and Agriculture Organization* (FAO), les pesticides sont définis comme des substances utilisées lors de la production ou du stockage des produits agricoles pour neutraliser ou détruire les ravageurs, les vecteurs de maladies humaines ou animales, les espèces végétales ou animales vénéneuses ou nuisibles (Reeves et al., 2016).

2. Glyphosate

2.1. Définition :

C'est un herbicide organophosphoré, Les chimistes l'appellent sous le nom N-phosphonométhyl glycine (Kremer et al., 2009). Selon la nomenclature de L'union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC), il porte le numéro CAS, 107-83-6, et sa formule chimique est $C_3H_8NO_5P$ (Fig. 01). Depuis son lancement en 1974 sous la formulation commerciale « Roundup » (Monsanto, USA), c'est l'herbicide le plus vendu au monde (TRAN-THI et al., 2009).

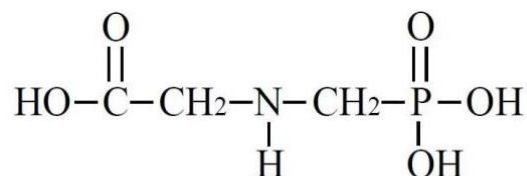


Figure 01: Structure chimique du glyphosate (Williams et al., 2000).

Le produit le plus courant contient 360g de glyphosate/litre. Le glyphosate seul est inefficace, car il n'adhère pas aux feuilles et pénètre difficilement dans celles-ci. Pour accroître sa solubilité, Il est généralement préparé sous forme de sel d'isopropylamine pour le rendre plus

soluble, ou des additifs ou des surfactants lui sont ajoutés pour le fixer sur les plantes (Le Mer et al., 2013).

2.2. Mode d'action dans la plante

Le glyphosate est utilisé après l'émergence ou pulvérisé est absorbé par la plante au niveau des feuilles avant d'être transporté par la sève jusqu'à l'extrémité des racines (Solomon et Thompson 2003). Cet herbicide fait partie de la catégorie d'herbicides qui sont utilisés au niveau folliculaire en inhibant la production d'acides aminés aromatiques (Malik et al., 1989). Cet herbicide agit en inhibant l'enzyme 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthétase (EPSPS) présente dans les chloroplastes. Cette enzyme est une transférase qui participe à la voie de synthèse de l'acide shikimique, qui conduit à la biosynthèse d'acides aminés aromatiques tels que les phénylalanines, les tyrosines et les tryptophanes (Fig. 02) (Blackburn et Boutin 2003).

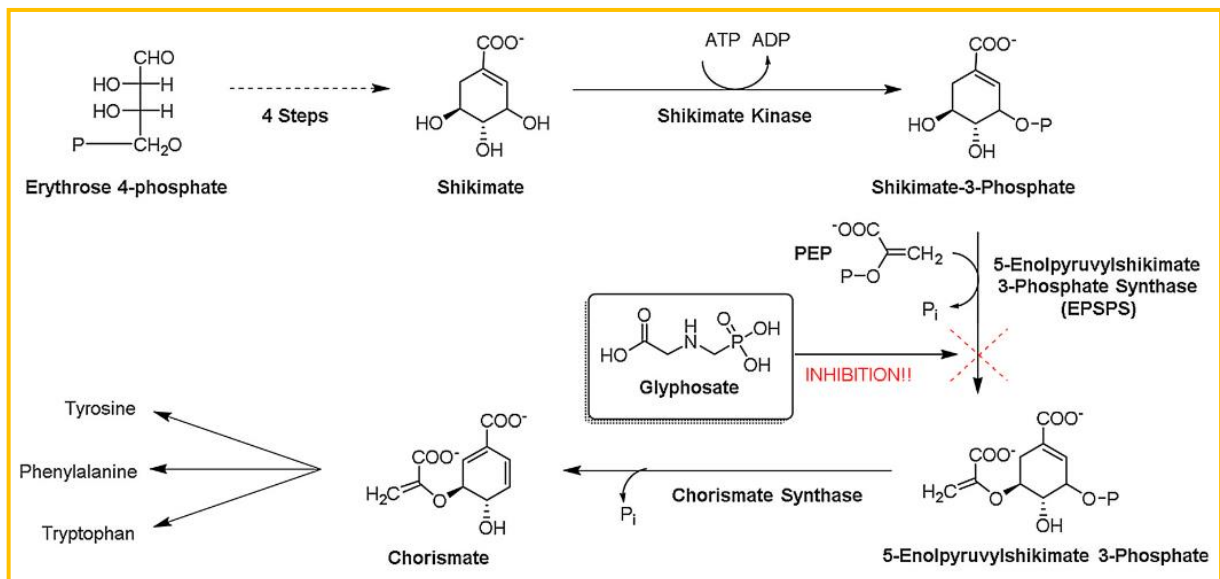


Figure 02: Mécanisme d'action du glyphosate : inhibition de la 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthétase (Rueda-Ruzafa et al., 2019)

2.3. Utilisation

Le glyphosate a une activité non sélective, ce qui signifie qu'il peut neutraliser n'importe quelle espèce de plante et éviter la multiplication des traitements. La praticité de cet herbicide le rend très apprécié à la fois par les professionnels (agriculteurs, travailleurs des collectivités, paysagistes...) et les particuliers (Solomon et Thompson 2003).

2.3.1. Utilisations agricoles :

Le glyphosate est utilisé par les professionnels agricoles pour éliminer les mauvaises herbes qui peuvent nuire à leurs cultures de différentes manières :

- Pour désherber les zones cultivées avant la germination ;
- Sur les zones non cultivées pour restaurer la fertilité du sol ;
- Pour la dessiccation qui précède certaines récoltes.

2.3.2. Utilisations non agricoles :

Le glyphosate peut être également utilisé dans d'autres secteurs que l'agriculture. En effet, puisque cet herbicide peut désherber des multitudes de plantes, ce dernier peut être utilisé par des municipalités pour nettoyer des parcs, des jardins publics et des bords de routes (**Pousset, 2003**).

2.4. Propriétés physicochimiques du glyphosate :

Cet herbicide est un acide faible organique amphotère, ce qui veut dire qu'il peut agir à la fois comme un acide et comme une base. Le Glyphosate est très polaire, dans les sols, il est rapidement adsorbé (**Giesy et al., 2000; Ibáñez et al., 2005**).

Tableau 01: Caractéristiques physico-chimiques du glyphosate
(**Giesy et al., 2000; Worthing et Hance 2000**)

Formule brute	C ₃ H ₈ NO ₅ P
Nom chimique	N-(phosphonométhyl) glycine
Masse molaire (g/mol)	169,08
Point de fusion	189.5 °C
Densité (g/ml)	1,71
Etat physique	Poudre cristalline blanche, inodore
Solubilité dans l'eau	10,5 g/L à 20°C, pH = 2
Demi-vie (jours)	Glyphosate: 1.2à 197.3 (sol), 7à 14(eau) AMPA: 76 à 240 (sol), 7 à 14 (eau) POEA : 7à 14 (sol), 21 -42 (eau)

2.5. Le métabolisme et la cinétique du glyphosate chez les animaux de laboratoire

2.5.1. Absorption :

Le glyphosate est rapidement absorbé dans le tractus gastro-intestinal des rats après son administration orale, de façon limitée. Ce taux d'absorption est varié selon de la dose administrée, une étude a montré que le taux d'absorption était de 30 à 36 % avec une dose de 10 mg/kg (**Brewster et al., 1991; Williams et al., 2000**).

2.5.2. Distribution

Les études ont montré que le glyphosate radio marqué a été absorbé (distribué) dans l'ensemble des tissus par le rat après administration d'une seule dose orale. (**Anadón et al., 2009**).

2.5.3. Métabolisme

Le glyphosate est excrété sans être métabolisé chez l'animal (mammifère). L'étude d'**Anadón et al., (2009)** a démontré que le glyphosate est peu métabolisé chez le rat et qu'il sera principalement éliminé ou faiblement éliminé sous forme d'AMPA (Acide Amino Méthyl Phosphorique).

2.5.4. Élimination

L'élimination du glyphosate a été étudiée chez les rats. Après administration par voie orale, l'élimination du glyphosate est rapide et presque totale, principalement dans les matières fécales, et via l'urine (environ 30 %) (**Krieger, 2010**).

2.6. Évaluation du risque toxicologique chez les animaux de laboratoire

La DL50 orale et dermale du glyphosate et du Roundup chez les rats est supérieure à 5000 mg/kg p.c. (**Williams et al., 2000**). De plus, la DL50 orale du rat AMPA, le principal métabolite du glyphosate, est de 8300 mg/kg de p.c. (**Smith et Oehme 1992**). Cependant, le principal surfactant de Roundup, le POEA, a une DL50 orale de 1200 mg/kg de p. c. chez le rat et une DL50 dermale de 1260 mg/kg de p.c. chez le lapin(**Williams et al., 2016**).

2.7. Effets sur l'homme

Le Roundup et leurs résidus sont des composés fortement toxiques chez l'homme. Qu'il s'agisse de jardiniers professionnels ou amateurs, la majorité des contaminations par glyphosate se produisent chez les personnes qui manipulent directement l'herbicide. Il peut pénétrer dans l'organisme via la peau, les voies respiratoires (par inhalation de gouttelettes) ou le tube digestif. En cas de projection oculaire accidentelle, une pénétration conjonctivale est également possible (**Testud et Grillet 2007**).

2.8. Effets écologiques chez les organismes non visés

2.8.1. Poisson

Plusieurs études toxicologiques font état des effets du Roundup sur les organismes vivants en milieu aquatique. Le Roundup provoque un stress oxydatif dans le foie et inhibe l'acétylcholinestérase dans les muscles et le cerveau du poisson néo-tropical (*Prochilodus lineatus*) (**Modesto et Martinez 2010**).

2.8.2. Les oiseaux

L'exposition au Roundup a entraîné des altérations de la structure des testicules et perturbations aux taux sériques de testostérone et d'estradiol du canard (*Anas platyrhynchos*) (Oliveira et al., 2007).

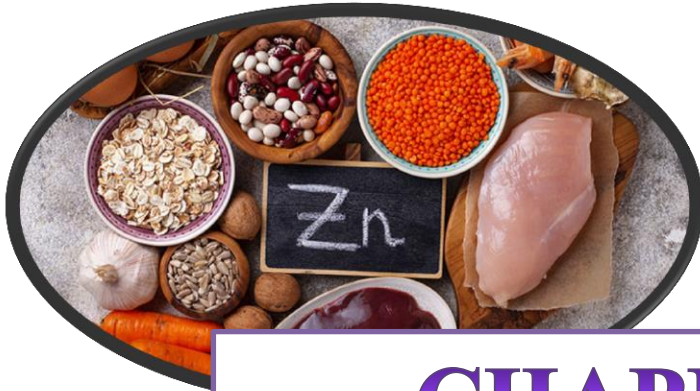
3. Glyphosate et stress oxydant :

Plusieurs études ont montré l'implication du stress oxydatif dans la toxicité de l'herbicide glyphosate commercialisé Roundup® chez plusieurs systèmes biologiques, et en particulier chez les rats et les poissons (Modesto et Martinez 2010; Abarikwu et al., 2015; Larsen et al., 2016; Santo et al., 2018).

En effet les dommages oxydatifs induits par le glyphosate sont provoqués par les ERO qui ont des effets néfastes sur les tissus du rat tels que le foie, le rein, le cerveau et les érythrocytes (Gasnier et al., 2009).

L'exposition à des substances toxiques présentes dans l'environnement, tels que la pollution, les rayonnements et les pesticides (herbicides), peuvent contribuer à l'apparition de ces espèces réactives oxydantes. Ces ERO ont un impact significatif sur la toxicité des pesticides présents dans l'environnement (Djeffal et al., 2015).

Outre la capacité du glyphosate à déréguler les défenses antioxydantes, l'effet neurotoxique de cet herbicide va résulter à une libération accrue du neurotransmetteur glutamate et va aussi induire un stress oxydant. Le glutamate en excès va activer ses récepteurs ainsi que les canaux du calcium voltage dépendants (Cattani et al., 2014).



CHAPITRE II :

ZINC

CHAPITRE II : ZINC

1. Définition :

Le mot « zinc » dérive de l'ancien allemand « zinke », qui signifie pointe acérée ou dent, du fait de la forme de certaines particules du zinc. Le zinc (Zn) est l'un des oligo-éléments les plus abondants dans la croûte terrestre. Il est présent dans l'air, le sol et l'eau et est présent dans tous les aliments, après le fer et le magnésium (**Beliles, 1994**), et l'un des micronutriments présent dans tous les tissus humains et les fluides tissulaires (**Vardatsikos et al., 2013**). Il est présent à une concentration de 2-4 g/Kg de poids corporel chez l'organisme humain (**Seve et Favier 2002**).

2. Propriétés physico-chimiques

Le zinc prend l'aspect d'un métal brillant, de couleur blanc bleuâtre, de symbole Zn, de numéro atomique 30 il appartient à la famille de métaux de transition (**Brzowska et Sulkowska 1996**). Il est présent dans les molécules organiques, essentiellement sous forme de cation divalent (Zn^{2+}). (**Seve et Favier 2002**).

Tableau 02: Propriétés physico-chimiques du zinc (**Seve et Favier 2002; Chang, 2005**)

Numéro atomique	30
Masse atomique	65,37 g.mol ⁻¹
Période/groupe	12/4/d
Electronégativité de Pauling	1,6
Isotopes	5
Configuration électronique	[Ar] 3d ¹⁰ 4S ²

3. Besoin et Source du zinc

Les besoins en zinc sont estimés à 14 mg/jour chez l'adulte et à 12 mg/jour chez la personne âgée de plus de 75 ans. (**Imoberdorfa et al., 2010**).

Il est présent en grande quantité dans les aliments d'origine animale : viandes, poissons et fruits de mer. Les céréales complètes, les légumineuses telles que les lentilles, les graines de soja et les légumes secs (amandes, noix) en contiennent également. (**Tabatabaie et al., 2007**).

4. Devenir du zinc dans l'organisme :

4.1. Absorption :

L'absorption du zinc se fait au niveau de l'intestin grêle. Lors d'un repas, le zinc semble être capté par des acides aminés (cystéine) (**Seve et Favier 2002**). La majeure partie de zinc

transférée du l'intestin à la circulation portale, est absorbée rapidement et transporté au foie, où elle est absorbée et libérée dans la circulation générale pour être redistribuer aux tissus extra-hépatiques (**Fig 03**) (**Cousins et al., 2003**).

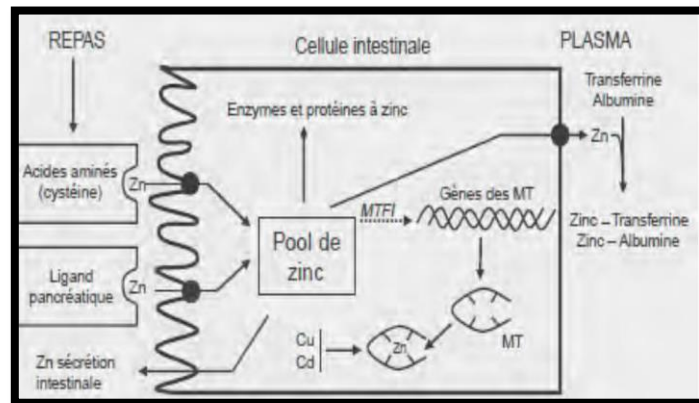


Figure 03: Mécanisme de l'absorption du zinc (**Seve et Favier 2002**).

4.2. Transport

Le transport actif du zinc n'est pas assuré par une protéine spécifique, mais par plusieurs transporteurs capables de capter plus ou moins de zinc selon leurs concentrations et leurs affinités respectives.

Il y a deux familles de transporteurs de zinc ; les transporteurs ZnT (Zn^{2+} transporter) et ZIP (Zn^{2+} - and IrT - like protéines) ou (Zn^{2+} and Fe^{2+} régulation protéines) ont un rôle dans la régulation homéostatique du zinc cellulaire (**Fig. 04**). La famille ZnT à 10 transporteurs identifiés expulse le Zn, la famille ZIP à 14 transporteurs identifiés capte le Zn extracellulaire (**Hirano et al., 2008**).

Les deux familles interviennent dans le stockage du zinc. ZnT-1 transporte le zinc de l'entérocyte vers la circulation sanguine (**Kay et Toth 2008**).

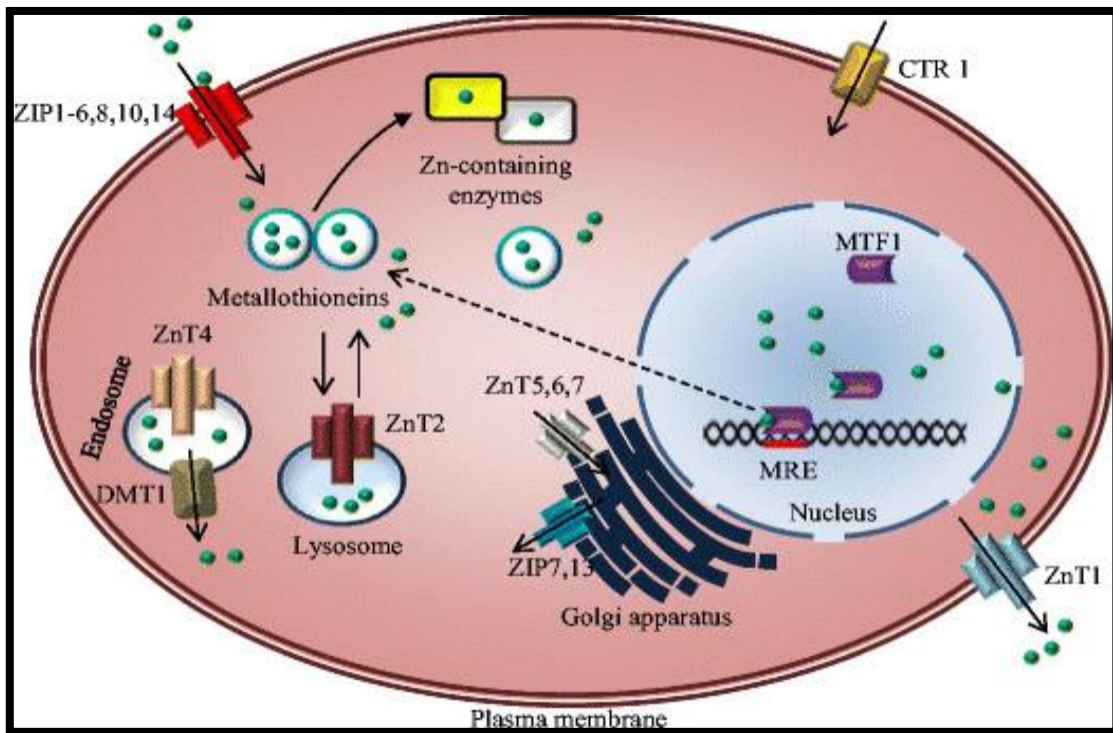


Figure 04 : Transport cellulaire du zinc (Hrabeta et al., 2016)

4.3. Distribution

a. Dans le sang

Le total du zinc dans le sérum est de 0,1%, et sa concentration dans le plasma est de 1mg/l. Il est lié irréversiblement à l'albumine 60%, à l'alpha 2 macroglobuline 30%, et réversiblement à la transferrine, à la transthyréline, à protéines et des acides aminés tel que l'histidine (Cousins et al., 2003; Roohani et al., 2013).

b. Dans les tissus

La quantité du zinc (98%) dans tous les tissus sont localisés au niveau intracellulaire (Imoberdorfa et al., 2010). Les os contiennent 30% et 60% pour les muscles de la quantité totale du zinc. On trouve également des concentrations en zinc au niveau d'autres organes (Zhao et al., 2016). Le foie est l'organe de distribution du zinc possède un turnover du zinc 5 à 6 fois plus élevé que les autres tissus.

4.4. Excrétion

Le tube digestif est le principal moyen par lequel le zinc est excrété. Le zinc fécal (environ 10mg/j) est égal au zinc non absorbé (67%) et au zinc endogène (33%). De plus, environ 0,5 mg de zinc peuvent être perdus par jour dans la sueur et dans l'urine. Les autres fluides corporels sont également importants pour éliminer le zinc. (Schlegel, 2010).

5. Rôle du zinc dans les processus biologiques

5.1. Dans l'expression des gènes et dans la transcription de l'ADN

Les enzymes dont il est le cofacteur, telles que les ADN ou ARN polymérase, les ARNt synthétases, les transcriptases reverses et la thymidine kinase, jouent un rôle dans le métabolisme des acides nucléiques. La molécule perd la capacité de se fixer sur l'ADN en l'absence de zinc. **(Roohani et al., 2013)**.

5.2. Défense immunitaire

Selon les résultats de nombreuses études nutritionnelles, le zinc alimentaire affecte les réponses immunitaires. L'immunité cellulaire est perturbée par un manque de zinc, en particulier **(Le Pabic, 2014)**. Il est un cofacteur de l'IL-2, des lymphokines et des cytokines. Le zinc, comme tous les antioxydants, renforce l'immunité cellulaire, qui peut être très diminuée par le stress oxydant en raison de la forte sensibilité des LTs aux radicaux libres **(Ben Mansoura, 2021)**.

5.3. Fonction cérébrale

Le Zn peut moduler l'excitabilité globale du cerveau par ses effets sur les récepteurs du glutamate, et probablement de l'acide γ -aminobutyrique (GABA), et donc Zn pourrait agir comme un neurotransmetteur et neuromodulateur **(Tóth, 2011)**.

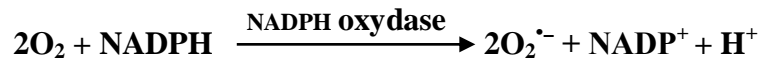
6. Zinc et stress oxydatif

6.1. Définition du stress oxydant

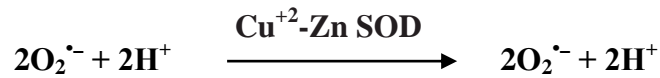
Au niveau de notre organisme, il existe un équilibre entre les espèces réactives, présentes à l'état basal en faible concentration et le système antioxydant qui comprend des enzymes, des vitamines, des oligoéléments et du glutathion. Le déséquilibre de la balance «pro-oxydants/antioxydants » provoque le stress oxydatif **(Bonnefont-Rousselot, 2014)**.

6.2. Défense anti-oxydante du zinc :

- ✓ Le zinc est un antioxydant puissant. Il inhibe l'enzyme NADPH-Oxydase qui catalyse la production de superoxyde d'oxygène ($O_2^{\cdot-}$) à partir d' O_2 . Cette hypothèse est confirmée par certaines études notamment celle de **Li et al., (2017)** réalisée sur des souris soumises à un régime pauvre en Zn. La séquestration du Zn^{+2} en excès stimule la génération de H_2O_2 . Dans ce modèle *in vivo* de carence en Zn^{+2} , la génération accrue de H_2O_2 est empêchée par l'inhibition de la NADPH oxydase caractérisé par un relargage prolongé des ERO. On conclure que la NADPH oxydase, est une enzyme régulée par Zn^{2+} **(Li et al., 2017)**.



- ✓ Le zinc est un cofacteur avec le cuivre du superoxyde dismutase (Cu-Zn SOD), la SOD assure l'élimination de l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$), première espèce toxique formée à partir de l'oxygène (**Bosco et al., 2010**).



- ✓ Aussi, il protège, par compétition avec le fer, les groupes SH de l'oxydation au niveau de la membrane. Le zinc influence l'expression de la glutamate-cystéine ligase, une enzyme impliquée dans la synthèse du glutathion qui joue un rôle dans la régulation de glutathion peroxydase (GSH-Px) et la catalase et agit directement sur la neutralisation des radicaux libres (**Marreiro et al., 2017**).
- ✓ Ainsi que, Il empêche les métaux de transition de produire des ERO en rivalisant avec eux dans la réaction de Fenton, ce qui produit des ion hydroxyle $\text{OH}^{\cdot-}$ particulièrement nocifs, et induit la synthèse de métallothionéines anti-oxydantes (**Seve et Favier 2002; Roussel 2014**).
- ✓ Des recherches récentes portant sur l'influence des protéines porteuses de zinc sur le stress oxydatif cellulaire. les auteurs ont également découvert que le peroxyde d'hydrogène peut induire l'augmentation du zinc intracellulaire. Le ZnT-7 peut protéger ces cellules car ce transporteur de zinc réduit l'agrégation des ions zinc libres et inhibe l'apoptose induite par le peroxyde d'hydrogène (**Liang et al., 2013**).
- ✓ Le zinc est libéré de son complexe avec la métallothionéines dans des conditions de stress oxydatif. MTF-1, un facteur de transcription dépendant du zinc (**Marreiro et al., 2017**).

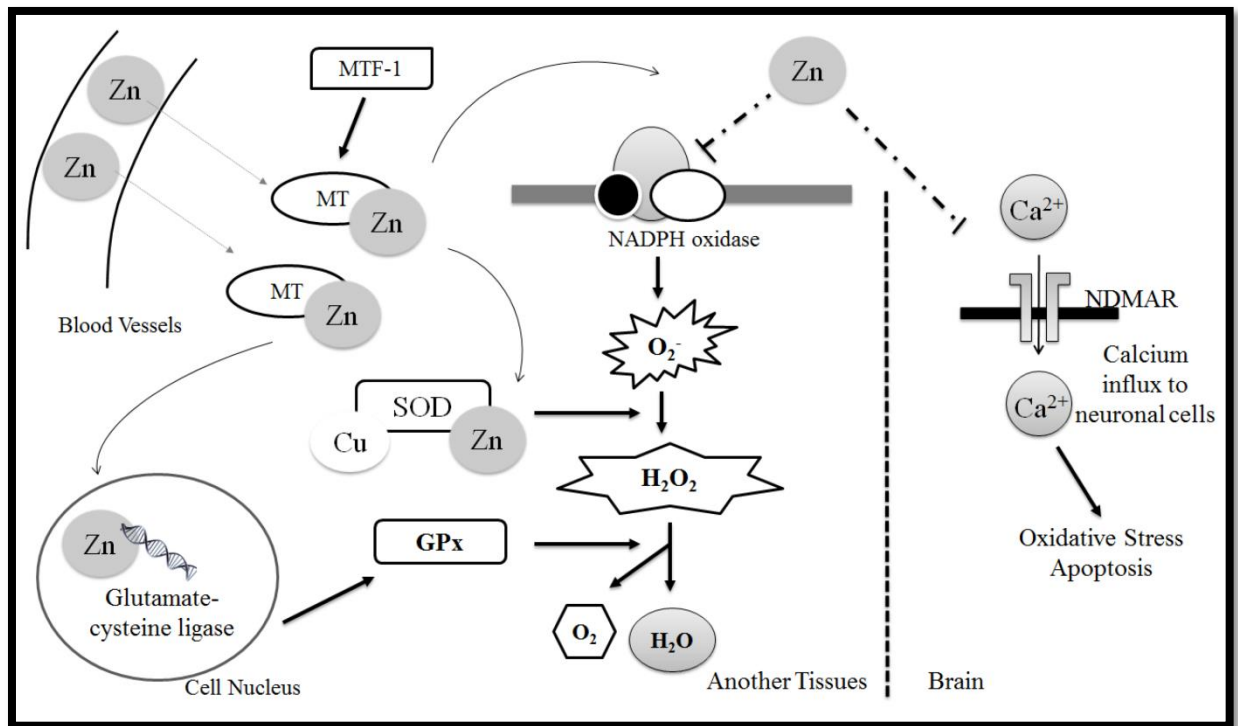


Figure 05 : Participation du zinc aux mécanismes antioxydants (Marreiro et al., 2017).

6.3. Le zinc est un pro-oxydant:

L'excès de zinc induit également une carence en cuivre, qui provoque une diminution de l'expression des enzymes dépendant du cuivre, telles que le superoxyde dismutase, qui est important dans la défense antioxydante. De plus, les ions zinc ont une capacité limitée à se lier à la métallothionéines, qui est sensible aux situations de stress oxydatif (Maret, 2013). Ce stress oxydatif se traduit par des concentrations élevées de zinc libre et induit un statut pro-oxydant. Une faible concentration de zinc entraîne également un stress oxydatif puisque cette condition provoque la mort cellulaire et favorise la production de ERO (Maret, 2008).



CHAPITRE III :
LINUM
USITATISSIMUM

CHAPITRE III : LINUM USITATISSIMUM

1. Étymologie

Le genre *Linum* «issu du mot latin : lineus qui veut dire lin» compte environ 200 espèces dont la plus répandue et la plus cultivée est *Linum usitatissimum*. L'espèce *usitatissimum* signifie «du mot latin : usitatus = habituel, d'usage» (en anglais Flax, en arabe El-katan الكتان) (Saint-Pierre, 2010). Le lin est utilisé dans les domaines de l'industrie textile (fibres) et alimentaire (graine et huile) (Beroual et al., 2013).

Le nom botanique, *Linum usitatissimum* a été donné par Linnaeus en 1753 dans son livre "Species Plantarum" (Jhala et Hall 2010).



Figure 06: Aspect morphologique du *Linum usitatissimum*

a: Fleur b: Capsule c: Graine de lin

2. Classification

Cette classification est essentiellement basée sur des critères anatomiques et morphologiques.

Tableau 03: classification botanique du *L. usitatissimum* (Diederichsen et Richards 2003)

Règne	Plantae
Division	Pteridophyta
Sous-division	Angiospermae
Classe	Dicotyledoneae
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Geraniales
La famille	Linaceae
Tribu	Linoideae
Genre	<i>Linum</i>
Espèce	<i>usitatissimum</i> L

3. Composition de la graine de lin

3.1. Composition chimique :

Les graines de lin contiennent une faible quantité d'amidon, environ 40% de lipides, 30% de fibres alimentaires, 20% de protéines et 460-520 Kcal/100g d'énergie. Sa composition chimique varie considérablement dépend la répartition géographique, des méthodes de culture et du temps de récolte dans lesquelles la plante est cultivée (**Daun et al., 2003**).

Les téguments sont principalement constitués de polyphénols et de composés glucidiques (mucilage), tandis que l'embryon est principalement constitué de protéines et d'huile (**Lepiniec et al., 2006**). Le taux de chaque composant présent dans la graine de lin est indiqué dans le tableau 04.

Tableau 04: Composition chimique générale des graines de *L. usitatissimum*.

Constituants	Pourcentage	Composition chimique	Références
Protéines	20-25%	Leucine*, méthionine*, phénylalanine*, valine*, l'isoleucine*, lysine*, histidine*, glycine, proline, thréonine*, cystine, tryptophane*.	(Morris, 2007; Venglat et al., 2011)
Lipides	30-40%	Stérols, cholestérol, lipides complexes, glycolipides, phospholipides.	(Oomah, 2001)
Les composés glucidiques	6-10%	L'amidon, et les fibres (mucilage, cellulose et la lignine).	(Jhala et Hall 2010)
Vitamines	/	Acide ascorbique (C), thiamine (B1), riboflavine (B2), niacine (B3), acide pantothénique (B5), folate (B6) cyan cobalamine (B12)	(Daun et al., 2003)
Les minéraux	3-4%	Zinc, manganèse, aluminium, nickel, sélénium, potassium, magnésium, calcium, sodium, phosphore	(Daun et al., 2003)

3.2. Etude phytochimique de *L. usitatissimum*

3.2.1. Les composés phénoliques

Dans les graines de lin, les acides phénoliques sont présents en faible quantité, ils sont constitués de 72% d'acides hydroxycinnamiques et de 28% d'acides hydroxybenzoïques (**Alu'datt et al., 2013**).

3.2.2. Les flavonoïdes

Les graines de lin sont constituées majoritairement de flavonols (Oomah, 2003). Ils sont composés de kaempférol, de quercétine et d'herbacétine. Ces substances sont présentes sous la forme glycosylée (Kasote et al. 2011). Les anthocyanidines, les flavanones et les proanthocyanidines sont également accumulés dans les graines de lin (Žuk et al., 2011).

3.3. Composition et caractéristiques d'huile *L. usitatissimum* :

Les graines de lin contiennent de 35 à 45% d'huile, ce qui le classe parmi les oléagineux (Daun et al., 2003). L'huile de lin est un aliment pauvre en graisses saturées car elle est composée de 73% d'acides gras polyinsaturés (AGPI), 18% d'acides gras monoinsaturés (AGMI) et 5-15% d'acides gras saturés (AGS) (Tableau 05). On sait qu'elle est la source la plus riche en ALA, qui représente 55 % des acides gras totales (Roy et al., 2007).

Tableau 05 : Composition en acides gras de l'huile de lin (Gutiérrez et al., 2010).

Nom de l'acide gras	Nomenclature biochimique	Formule semi-développée	Répartition (%)	% insaturés et saturés
Acide palmitique	C16:0		4-6	5-15 % d'Acides gras saturés
Acide stéarique	C18:0		2-6	
Acide oléique	C18:1 ω9		10-22	75-95 % d'Acides gras insaturés
Acide linoléique	C18:2 ω6		12-18	
Acide α-linolénique	C18:3 ω3		50-62	

3.3.1. Etude chromatographique d'huile de *L. usitatissimum* :

La composition chimique de l'huile de lin (commercialisé EL-kabten) fait apparaître 1,67% d'insaponifiables et 98,33% d'acides gras. L'analyse CGL des esters méthyliques d'acides gras a été dans le tableau 6 (Hendawi et al., 2016).

Tableau 06: Analyse par CGL des esters méthyliques d'acides gras de l'huile de lin (EL-kabten) (Hendawi et al., 2016).

Les acides gras	Concentration (%)	Les acides gras	Concentration (%)
C4:0 acide butanoïque	0.08	C18:3 acide γ linoléique	8,93
C8:0 acide caprylique	0.08	C20:0 acide arachidique	12,95
C10:0 acide caprique	0.06	C20:3 cis-8,11,14-Eicosatrienoic	2.98
C11:0 acide undécanoïque	0.34	C20:4 acide arachidonique	10.81
C12:0 acide laurique	0.05	Inconnu	0.15
C13:0 acide tridécanoïque	0.02	Acides gras insaturés	84.55
C14:0 acide myristique	0.20	Acides gras saturés	15.30
C15:0 acide pentadécanoïque	0.04		
C16:0 acide palmitique	0.26		
C16:1 acide palmitoléique	11.67		
C17:0 acide heptadécanoïque	0.59		
C17:1 cis-10- Heptadécanoïque	0.34		
C18:0 acide stéarique	0.61		
C18:1 acide oléique	45.63		
C18:2 acide linoléique	4.19		

4. Utilisations Pharmacologiques des graines de *L. usitatissimu*

Les graines de lin et l'huile sont considérées comme des aliments essentiels à la santé. Ils doivent être considérés comme des aliments sains pour la vie. Le lin n'est pas une nouvelle nourriture. En fait, c'est l'un des aliments les plus anciens, voire les plus originaux. C'est une plante millénaire aux vertus médicinales (Halligudi, 2012).

4.1. Effets sur le profile lipidique

Il a été démontré que l'administration de *L. usitatissimum* exerce de puissants effets inhibiteurs sur le profile lipidique grâce aux actions de ALA (Ayad et al., 2013). Caligiuri et al., (2014) ont montré que la consommation de 30 à 50 g par jour de graines de lin moulu réduit le taux de cholestérol total (0,21 mmol/L) et du cholestérol-LDL (0,22 mmol/L) par rapport aux valeurs initiales.

4.2. Activité antidiabétique

Linum a un immense effet thérapeutique chez les personnes souffrant de diabète et celles qui souffrent d'intolérance au glucose car elle a réduit la réponse glycémique postprandiale et l'insuline (Gonçalves et al., 2018).

4.3. Les maladies cardiovasculaires

Protéines de lin sont riches en oméga 3 et en arginine, un acide aminé acide lorsqu'ils sont présent dans l'endothélial vasculaire, peut abaisser la tension artérielle et prévenir de thrombose (Marambe et al., 2008).

4.4. Effets sur le système respiratoire et immunitaire

La graine de lin est également considérée comme efficace pour les problèmes respiratoires. Elle soulage les douleurs pulmonaires (Iserin et al., 2001). Le lin est utilisé en infusion dans la médecine ayurvédique (Inde) pour traiter les inflammations, la toux et les bronchites (Goyal et al., 2014). Elle s'avère efficace contre l'emphysème et la cystite chronique, ainsi que contre le rhume, l'artériosclérose et l'angine de poitrine (Halligudi, 2012).

De même, ces graines augmentent les niveaux des cytokines pro- inflammatoires (IL-1, IL-6 et TNF- α) (Abidi et al., 2019).

4.5. Activité antimicrobienne et antifongique

De même, l'activité antibactérienne et antifongique a été rapportée dans les oligosaccharides extraits de cette graine (Guilloux et al., 2009), ce qui permet de contrôler la croissance d'agents pathogènes affectant le secteur agricole, tels que *Alternia solani* et *Alternia alternata*, ainsi que l'agent pathogène humain *Candia albicans* *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, et *Bacillus subtilis* (Kaithwas et al., 2011).

5. Toxicité :

L'instabilité de l'huile de *Linum* et son risque d'oxydation rapide étaient suffisamment important pour considérer son usage comme toxique et a été longtemps interdite pour cette raison, autorisée à nouveau à la consommation depuis 2010. Il faut éviter d'avaler les graines au risque d'une occlusion intestinale (Couplan et Debuigne 2013).

ETUDE EXPERIMENTALE



CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES

1. Etude phytochimique

1.1. Matériel végétal :

La substance végétale utilisée est composée d'huile de *Linum usitatissimum* a été procurée du marché local d'Annaba (la marque El-Captain, a company for Extracting Natural Oils, Plants and Cosmetics cité El-Obour, Cairo, Egypt.). L'huile est extraite par pression à froid.

1.2. Dosage des composés phénoliques (dosages colorimétriques)

1.2.1. Dosage des phénols totaux :

La concentration en phénols totaux des extraits, a été déterminée en utilisant le réactif Folin-Ciocalteu **Bouaziz et al., (2005)**. L'équation ($Y=3,7047x$) a été utilisée pour calculer le contenu en phénols total (**Annexe 01**).

1.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux :

La quantification de contenu flavonoïque a été estimée par la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) et la soude (NaOH) (**Zhishen et al., 1999**). La concentration est calculée selon l'équation : $Y=3,1929x$ (**Annexe 02**).

1.2.3. Dosage des tanins condensés :

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode à la vanilline en milieu acide (**Julkunen-Tiitto, 1985**). Le contenu en tannins a été calculé à partir de l'équation du courbe étalon de la catéchine ($Y=3.813x$) (**Annexe 03**).

1.2.4. Dosage des flavonols

La quantification des flavanols a été effectuée par la méthode d'**Yermakov et al., (1987)**. Le dosage des flavonols a été calculé selon l'équation : $Y=3,836x + 0,122$ (**Annexe 04**).

1.2.5. Dosage des ortho-diphénols

Les ortho-diphénols ont été réalisés selon la méthode décrite par **Mateos et al., (2001)** où les ortho-diphénols forment des complexes colorés avec les ions molybdates. Le taux en ortho-diphénols a été déterminé à partir de l'équation : $Y= 0,0035x - 0,0225$ (**Annexe 05**).

1.3. Évaluation de l'activité antioxydante

1.3.1. Etude de l'activité antioxydante (Méthode DPPH) :

Le test utilisé pour mesurer le pouvoir anti-radicalaire d'un échantillon est celui décrit par **Bouaziz et al., (2010)**.

Le pourcentage d'absorption est calculé :

$$\%DO = \frac{DO_{DPPH} - DO_{\text{échantillon}}}{DO_{DPPH}} \times 100$$

Avec :

$DO_{100\%}$: absorbance du "total".

DO_{Essai} : absorbance de la solution en présence d'extraits.

1.3.2. Capacité antioxydante totale (CAT) :

Ce test est évalué par la méthode de phosphomolybdène (**Prieto et al., 1999**). Cette dernière a été déterminée selon l'équation ($Y=4,1449x + 0,0293$) (**Annexe 06**).

1.3.3. Méthode de blanchissement du β -carotène

L'activité antioxydante a été réalisée par la méthode de décoloration du β -carotène décrite par **Pratt, (1980)** et modifiée par **Kulisic et al., (2004)**.

1.3.4. Méthode de réduction du Fer (FRAP)

L'activité réductrice du fer de notre huile est déterminée selon la méthode décrite par **Pan et al., (2008)**.

2. Etude biologique

2.1. Animaux et conditions d'élevage

Au cours de l'étude, 60 rats blancs mâles de la souche Wistar (*Rattus rattus*) en provenance de l'institut Pasteur d'Algérie (centre d'élevage, El Kouba-Alger) ont été utilisés.

Ces rongeurs ont été élevés dans une animalerie, et ont été soumis à une période d'adaptation d'environ un mois. Ils ont été nourris selon leur préférence avec un concentré énergiquement équilibré (provenant de l'ONAB de Béjaïa).

2.2. Traitement des rats

2.2.1. Protocole expérimental

Les rats ont été répartis en six groupes de dix chacun, il s'agit de :

- **Groupe 1 (C)** : Rats contrôle.
- **Groupe 2 (RDP)** : Les rats reçoivent le Roundup dans l'eau de boisson, à raison de 269.9mg/kg P.C. pendant une durée de 30 jours ; cette dose, qui représente le 1/18 de la DL50 est choisi selon les résultats des travaux d'**El-Shenawy, (2009)**.
- **Groupe 3 (Zn)** : les rats reçoivent par gavage le zinc ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) à raison de 0.227 g/l chaque jour pendant 30 jours ; cette dose est choisie selon les résultats de **Barkat et al., (2015)**.
- **Groupe 4 (HLU)** : les rats reçoivent par gavage l'huile de *Linum usitatissimum* à raison de 0.5g/Kg du P.C., cette dose a été choisie selon les travaux d'**Hendawi et al., (2016)**.
- **Groupe 5 (RDP+Zn)** : les rats reçoivent le Roundup dans l'eau de boisson, avec la supplémentation quotidienne de Zn, et ce avec les mêmes doses que celle du groupe 2 et 3.
- **Groupe 6 (RDP+ HLU)** : les rats reçoivent le Roundup dans l'eau de boisson, avec la supplémentation jour après jour de HLU, et ce avec les mêmes doses que celle du groupe 2 et 4.

2.2.2. Sacrifice des rats et prélèvement des échantillons :

Après 30 jours de traitement, les rats sont sacrifiés par décapitation.

a. Récupération sanguin :

Le sang est immédiatement recueilli dans des tubes: Les tubes à EDTA serviront pour la détermination de la formule de numération sanguine (FNS). Les tubes secs afin de récupérer le sérum, qui sera conservé pour doser les paramètres biochimiques.

b. Prélèvement des organes

Une dissection abdominale longitudinale est effectuée pour le prélèvement des différents organes (foie, reins, et cerveau). Les organes sont rincés avec une solution de chlorure de NaCl

à 0,9%. Un fragment de foie, de rein et lob de cerveau de chaque groupe de rat sont séparément fixés dans le formol à 10% afin de réaliser des coupes histologiques, le reste des organes sont conservés au congélateur à -20°C pour le dosage des paramètres du stress oxydatif.

c. Préparation des homogénats de tissus :

Un gramme de foie, de rein et cerveau de rats récupérés à partir des six lots étudiés, ont été broyés par un broyeur ultrason. Le surnageant obtenu est aliquoté dans des tubes eppendorfs puis conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

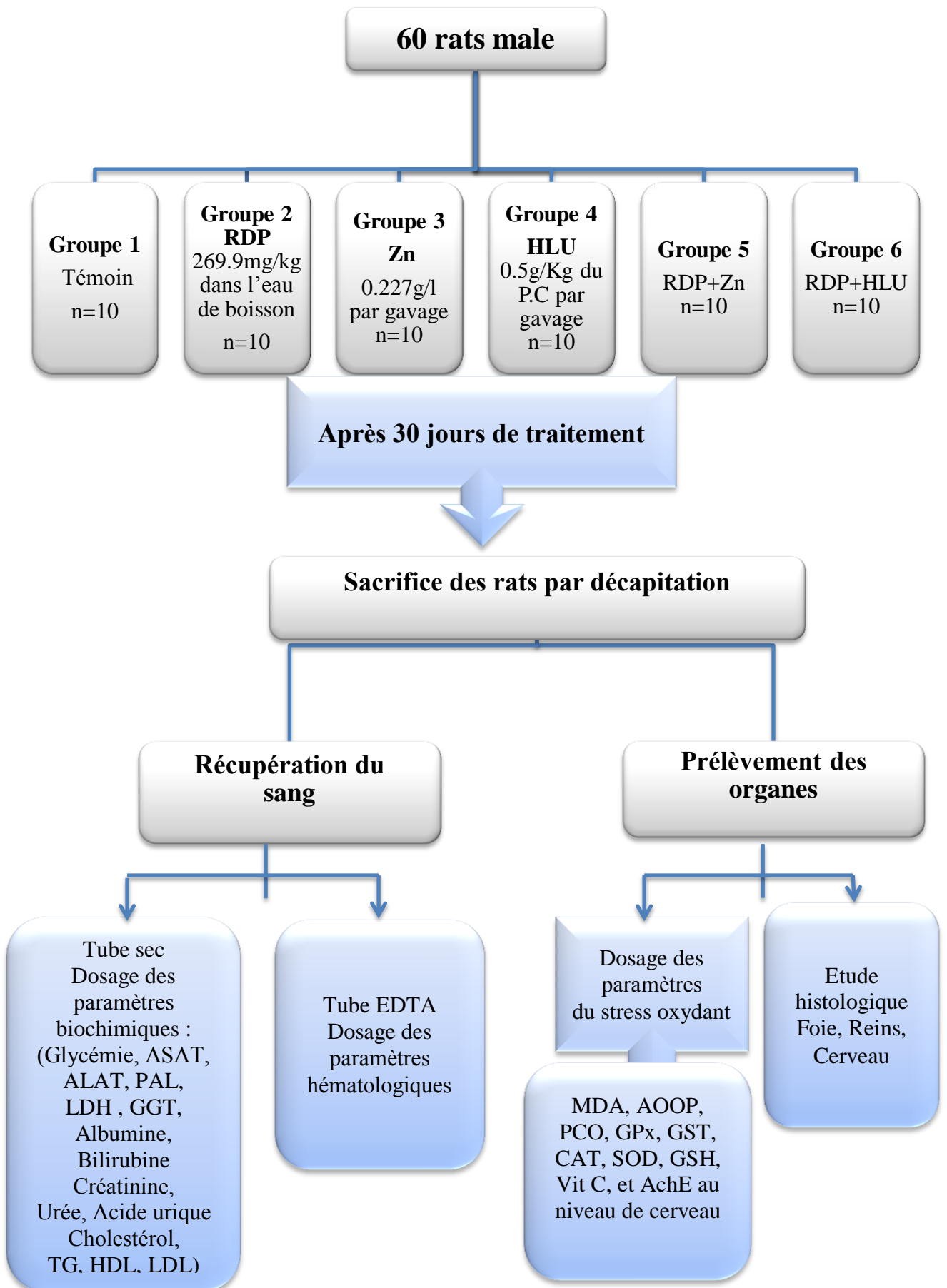


Figure 07 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental.

2.3. Détermination de la formule de numération sanguine (FNS)

La détermination de la formule de numération sanguine (FNS) a été effectuée à l'aide d'un analyseur ERMA INC (fullautomatic blood cell counter model PCE-210N).

2.4. Dosage des paramètres biochimiques :

Le dosage des paramètres biochimiques a été effectué à l'aide d'un automate de type «COBAS INTEGRA 400 »

2.5. Dosage des paramètres de stress oxydatif

Tous les réactifs utilisés ont pour origine Sigma chemical co. (USA).

2.5.1. Dosages des protéines

Les protéines tissulaires ont été quantifiées selon la méthode colorimétrique de **Bradford, (1976)**.

La concentration des protéines a été déterminée selon la courbe (**figure 08**).

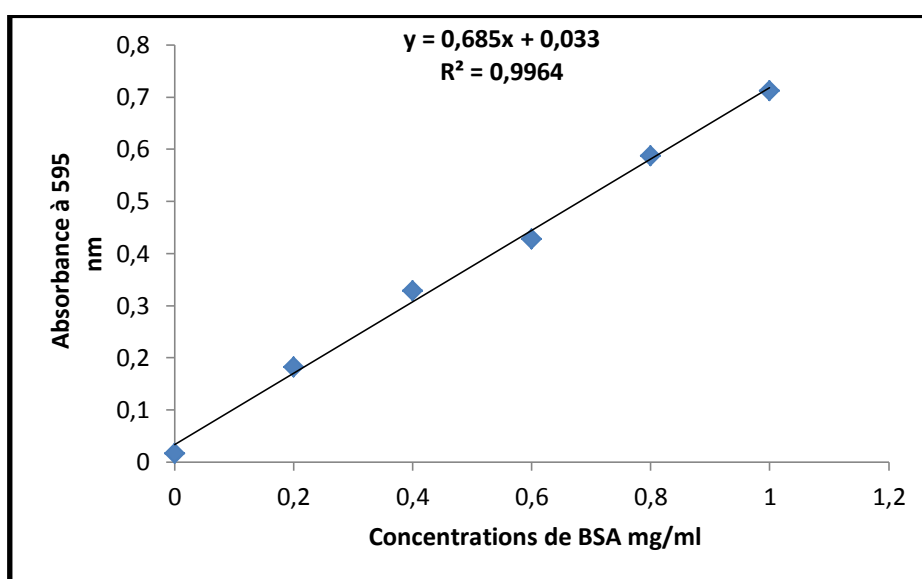


Figure 08 : Gamme d'étalonnage utilisée (BSA 1mg/ml) pour le dosage des protéines.

2.5.2. Détermination du taux de la peroxydation lipidique (MDA)

Le taux de peroxydation lipidique a été évalué en mesurant le malondialdéhyde avec le test TBARS (Thiobarbituric reactive species) selon la méthode de **Buege et Aust (1978)**.

2.5.3. Détermination du taux des produits protéiques d'oxydation avancés (AOPP)

Le contenu tissulaire en AOPP a été déterminé selon la méthode de **Kayali et al., (2006)**.

2.5.4. Détermination du taux des protéines carbonylées (PCO)

Les protéines carbonylées (PCO) sont mesurées selon la méthode de **Levine (1990)** (**fig. 09**).

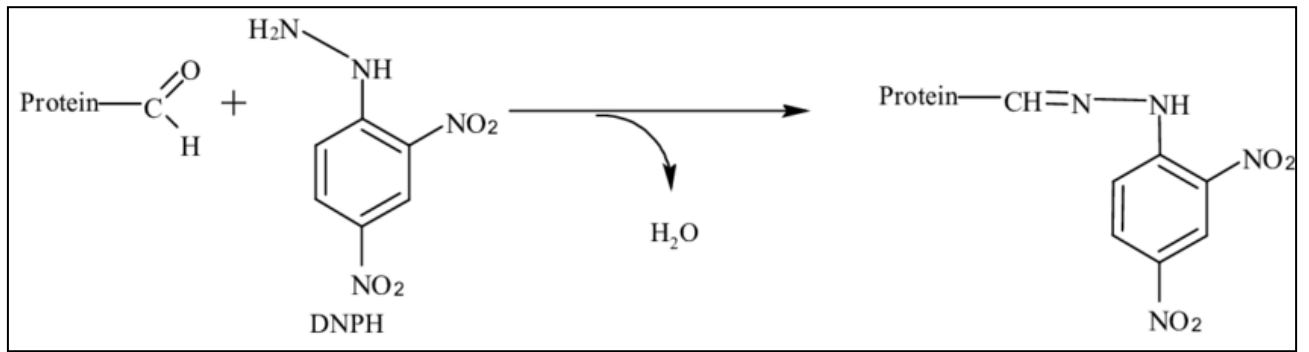


Figure 09 : Réaction entre les protéines carbonylées et le DNPH.

2.5.5. Détermination du taux de glutathion réduit (GSH)

Le dosage du glutathion réduit est réalisé selon la méthode d'**Ellman, (1959)**, avec quelques modifications apportées par **Jollow et al., (1974)** (**fig. 10**).

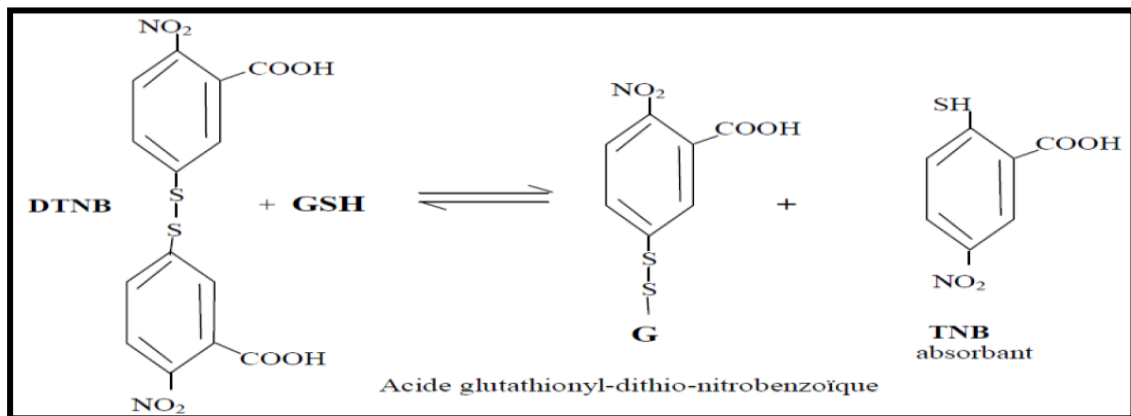


Figure 10 : Principe de dosage du glutathion.

2.5.6. Détermination de la concentration de la Vit C

La détermination du taux de vitamine C (acide ascorbique) est effectuée selon la technique de **Jacques- Silva et al., (2001)**. La D.O. obtenue est rapportée sur la courbe d'étalonnage (**Fig. 11**).

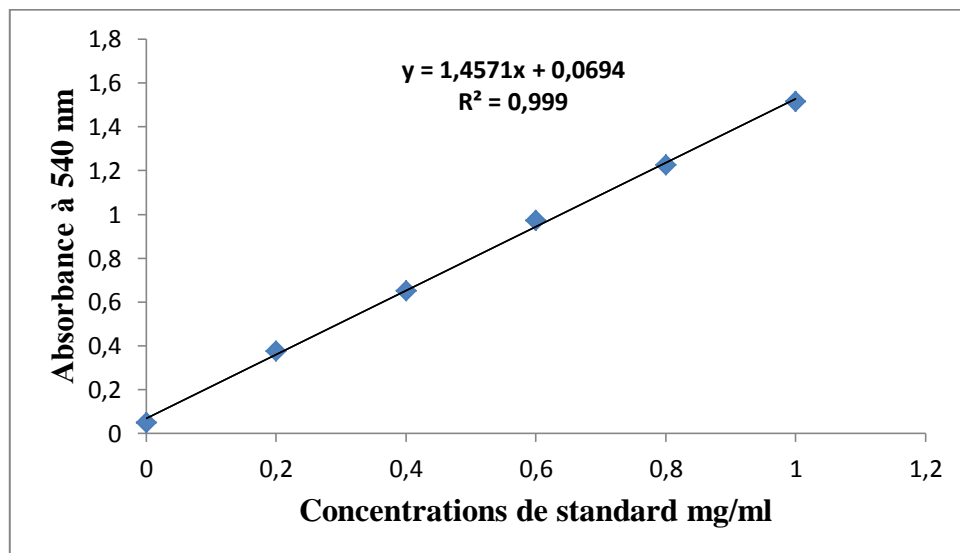


Figure 11 : Gamme d'étalonnage du vit C.

2.5.7. Détermination de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (E.C. 1.11.1.9)

L'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) a été mesurée par la méthode de **Flohé et Günzler (1984)**.

2.5.8. Détermination de l'activité enzymatique de la glutathion-S-transférase (EC 2.5.1.18)

L'activité enzymatique de la glutathion-S-transférase (GST) est mesurée par la méthode d' **Habig et al., (1974) (Fig.12)**.

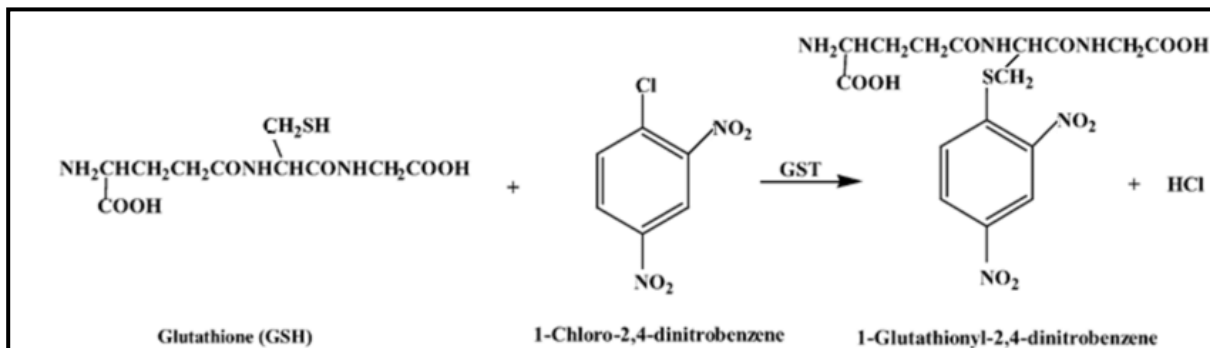


Figure 12 : Principe de dosage du GST.

2.5.9. Détermination de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) (E.C.1.11.1.6)

L'activité enzymatique de la catalase est mesurée selon la méthode d' **Aebi, (1984)**.

2.5.10. Détermination de l'activité enzymatique du superoxyde dismutase (SOD)

L'activité du superoxyde dismutase (SOD) est déterminée à partir de sa capacité à inhiber la réduction du nitro blue tetrazolium (NBT) (**Beyer Jr et Fridovich 1987**).

2.5.11. Détermination de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE)

L'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase est déterminée selon la méthode d'**Ellman et al., (1961)**.

6. Etude histologique

Les coupes histologiques ont été réalisées à l'hôpital d'El- Hadi Benjdid –El Tarf- service d'anatomie pathologie à l'aide d'un appareil automatique (**LEICA**). La technique utilisée est celle décrite par **Hould (1984)**.

7. Traitement statistique des résultats :

Tous les résultats des tests effectués sont exprimés, selon les paramètres, en moyenne \pm SEM pour les six rats de chaque groupe. Ces calculs ont été effectués à l'aide du logiciel Microsoft Excel. Les comparaisons de données entre les différents groupes traités ont été effectuées par le test "**t**" de **student** et les différences ont été considérées comme statistiquement significatives à $p < 0,05$.



CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

1. La composition chimique & les propriétés antioxydantes de l'huile de *Linum usitatissimum*

1.1. Dosage des composés phénoliques :

Les teneurs des flavonoïdes totaux, des tanins condensés, des phénols totaux, d'orto-diphénols et des flavanols sont effectués sur l'huile de lin et qui sont rapportés dans le tableau 07. L'analyse quantitative de ces composés révèle que la valeur des flavonoïdes est de l'ordre de 0,32mg EQ/g HLU. Tandis que la teneur des tanins est 0,25mg EQ/g HLU et la concentration en polyphénols est 0,11mg EAG /100 g HLU. Elle montre également que l'huile de *Linum usitatissimum* contient 0,35mg de R/g HLU en flavanols et de 218,71mg d'AC/g HLU d'orto-diphénols.

Tableau 07 : Teneur en composés phénoliques de l'huile de lin

Paramètres	Quantité
Flavonoïdes	0,32±0,01
Tanins condensés	0,25±0,02
Polyphénols totaux	0,11±0,01
Flavanols	0,35±0,04
Orto-diphénols	218,71±15,51

1.2. Activité anti-oxydante :

Le pouvoir antioxydant de *Linum usitatissimum* (**Tab. 08**) a été déterminé selon : le test de DPPH, la détermination de la capacité antioxydante totale, la méthode de FRAP et blanchissement de β carotènes..

❖ L'inhibition du DPPH radicalaire a été évaluée pour l'huile de lin ainsi que pour les deux témoins positifs : BHT et Vitamine C.

La comparaison des IC₅₀ par rapport aux deux témoins positifs montre que l'huile de lin possède une forte activité antioxydante 22,85 ±2,6 (mg/ml).

❖ le test d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplé à celle du β -carotène. D'après les résultats présentés dans le **tableau 08**, l'inhibition obtenu pour l'acide ascorbique (62,5mg/ml), est utilisée comme référence, est presque égale à notre huile (65,83) et donc, une activité antioxydante très élevé.

❖ D'après les résultats présentés dans le **tableau 08**, il apparait que l'huile de *Linum usitatissimum* possède une activité antioxydante avec un IC₅₀ 0.546±0.16mg EVitC/ml. Ainsi que, les résultats obtenus montrent que la capacité d'huile de réduire le Fer est largement inférieure à celle des standards. A la concentration de 10 mg/ml, le pouvoir réducteur est beaucoup plus important dans le vit C de 1 mg/ml.

Tableau 08 : Activité antioxydante de l'huile de lin

	DPPH IC50 de HLU (mg/ml)	Blanchissement de β carotènes	FRAP (EC50 mg/ml)	CAT (mg EAA/g HLU)
HLU	22,85±2,6	65,83±12,84	10,36±1,59	0,546±0.16
Vit C	3,45±0.56	62,5±17,5	1,33±0.13	--
BHT	36,24±1,36	29,33±8,08	--	--

Discussion :

Les tests phytochimiques effectués sur l'huile de *Linum usitatissimum* révèle la présence des flavonoïdes totaux, des tanins condensés, des phénols totaux, des flavonols et d'orto-diphénols.

De plus, **Kasote, (2013)** a révélé l'existence de différents types de polyphénols dans les grains de *L. usitatissimum*, comme les lignanes, l'acide phénolique et les flavonoïdes. Nos résultats sont plus faible par rapport aux résultats obtenus par **Anwar et Przybylski (2012)** qui ont trouvé 3 mg EAG/g de polyphénols et entre 1,9 et 4,8 EC/g EX de flavonoïdes. Une étude récente menée par **Alachaher et al., (2018)** sur les graines de lin a montré également une quantité de phénoliques totaux plus élevé que notre extrait, les valeurs vont de 43,33 à 47,01 mg EAG/g extrait et pour les flavonoïdes varié entre 29,55 et 30,89 mg EQ/g extrait). Ce taux élevé des composés phénolique est obtenu grâce à l'utilisation des différents solvants pour l'extraction comme le méthanol et le butanol.

L'activité antioxydante des extraits de la plante pourrait s'expliquer par leur richesse en substances polyphénoliques et plus particulièrement les composés flavoniques. Plusieurs publications **Kadri, et al., (2011)** et **Ghedadba et al., (2014)** qui ont rapporté une corrélation positive entre la teneur phénolique et l'activité antioxydante.

La capacité antioxydante d'un extrait végétal peut être évaluée par la détermination de la capacité d'inhibition de l'oxydation du β -carotène. Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique produit des radicaux peroxydes qui attaque les onze doubles liaisons du β -carotène (**Kubola et Siriamornpun 2008**). Nos résultats concordent **Bouaziz et al., (2016)** et **Shadyro et al., (2020)** qui ont trouvé que l'espèce *Linum usitatissimum* possède un bon pouvoir de neutralisation des radicaux libres.

Le pouvoir réducteur de l'huile de lin a été déterminé selon la méthode de **Pan et al., (2008)**. Ce test consiste à réduire les ions (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) (**Zemmouri et al., 2017**). Cette réduction est en relation directe avec le pouvoir antioxydant. D'après les résultats obtenus, le pouvoir réducteur de l'huile de lin présente un pouvoir réducteur intéressant. Ceci montre une corrélation positive entre la quantité de polyphénols dans l'huile de lin étudiée et son activité antioxydante.

2. Impact du Roundup sur la variation des paramètres physiologiques, hématologiques et biochimiques : effets protecteurs de la supplémentation en *Linum usitatissimum* ou en Zinc

2.1. Effet du Roundup sur l'état général de santé des rats

Pendant la période expérimentale, aucun décès n'a été observé chez les animaux. Les rats des groupes témoin, Zn et HLU n'ont montré aucun signe de toxicité systémique. Cependant, les rats du groupe RDP ont montré des signes cliniques tels qu'anorexie, perte de poids corporel, épuisement, et inflammation des glandes salivaires (la cause de la bave). Tous ces signes cliniques étaient liés à la toxicité aiguë du RDP. En outre, les rats du groupe RDP+Zn et RDP+HLU ont montré certains symptômes d'anorexie et de perte de poids corporel.

2.2. Etude pondérale

2.2.1. Variation du poids corporel

Durant les 30 jours de l'expérimentation, nos résultats (**tableau 09**) montrent une diminution très hautement significative du gain de poids corporel chez tous les groupes traités ; RDP (-129,76%), Zn (-71.57%) et HLU (-85.95%) par la combinaison RDP+HLU (-57.30%), et ce comparativement au groupe témoin. Tandis qu'on n'enregistre aucune différence significative n'apparaît entre les groupes comparativement au groupe traités par le Roundup (RDP).

2.2.2. Variation de la consommation quotidienne d'aliment et de l'eau de boisson

Les résultats obtenus pour le suivi de la consommation quotidienne d'aliment et de l'eau de boisson chez les rats témoins et les rats traités après 30 jours d'expérimentation sont représentés dans **le tableau 10**.

En effet, on note une diminution très hautement significative de la consommation d'aliments chez tous les groupes RDP (-19.54%), Zn (-5.7%), HLU (-13.73) comparativement au groupe témoin. Ainsi, on enregistre une diminution très hautement significative de la consommation d'eau chez le groupe traité par le RDP (-23.09%) comparativement au groupe témoin.

Tableau 09: Variation du poids corporel (g) chez les rats témoins et les rats traités.

Paramètres	Groupes expérimentaux					
	C	RDP	Zn	HLU	RDP+Zn	RDP+HLU
Poids initial (g)	249,6±2,7	250,33±4,64	250,6±5,9	250,5±7,29	250±8,2	249,66±7,86
Poids final (g)	299,5±11,4	235,5±4 ^{***}	264,83±8,4 ^{**}	257,5±11,94 ^{**}	243,6±5	233,5±8,68
%	/	-21,36	-11,57	-14,02	+3,46	-1,06
Gain de poids (g)	+49,83±11,16	-14,83±3,75 ^{***}	+14,16±2,87 ^{***}	+7±15,16 ^{**}	- 6,33±7,51 ^{***}	-16,66 ± 10,70 ^{***}
%	/	-129,76	-71,57	-85,95	+12,35	-57,30

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne ± SEM (n =6 rats) ;

(^{**}p< 0.01 ^{***}p<0.001) comparativement aux rats témoins.

Tableau 10: Consommation quotidienne de l'aliment et de l'eau de boisson chez les rats témoins et les rats traités.

Paramètres	Groupes expérimentaux					
	C	RDP	Zn	HLU	RDP+Zn	RDP+HLU
Quantité d'aliment Consommée (g/rat/j)	21,66±0,69	17,43±1,18 ^{***}	20,43±0,68 ^{**}	18,69±0,66 ^{***}	24,84±2,85 ^{***}	14,51±1,23 ^{###}
%	/	-19,54	-5,7	-13,73	+42,5	-16,73
Quantité d'eau Consommée (ml/rat/j)	32,65±2,34	24,84±2,85 ^{***}	30,94±2,05	29,52±2,44	26,07±2,38	20,31±2,02 [#]
%	/	-23,09	-5,24	-9,58	+4,92	-18,23
Quantité de RDP ingérée (mg/rat/j)	/	67,75 ±7,79	/	/	70,51±6,46	55,39±5,52 [#]

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne ± SEM (n =6 rats) ;

(^{**}p< 0.01, ^{***}p <0.001) comparativement aux rats témoins ;

([#]p<0.01, ^{###}p<0.001) comparativement aux rats traités par le RDP.

2.2.3. Poids absolu et relatif des organes étudiée

Les résultats obtenus de la variation du poids absolu et relatif des organes étudiés (**le tableau 11 et la figure 13**) montrent qu'il y a une diminution très hautement significative ($P \leq 0,001$) du poids absolu et du poids relatif du foie chez le groupe traité par RDP comparé au groupe témoin. Par contre, on enregistre un rétablissement par une augmentation hautement significative ($P \leq 0,01$) et même très hautement significative ($P \leq 0,001$) des poids absolus et relatifs de foie chez les rats traités par la combinaison (RDP+HLU) et (RDP+Zn) respectivement, par rapport aux rats traités uniquement avec le Roundup.

Concernant le poids absolu et relatif des reins, l'analyse des résultats obtenus montre une diminution hautement significative chez le groupe traité par le Roundup. Mais avec aucune déférence statistique chez les groupes traités avec l'huile ou Zinc.

Quant au poids absolu du cerveau, comparativement aux rats témoins, on note une diminution hautement significative chez le groupe toxique (RDP). On note aussi une variation statistiquement hautement significative des poids absolu et relatif du cerveau chez les rats recevant la combinaison RDP plus Zn ou HLU comparant au groupe recevant le RDP. Tandis que, on n'enregistre aucun changement statistique au niveau du poids relatif chez tous les groupes.

Tableau 11: Variation de poids absolu (PA) (g) du foie, des reins et du cerveau chez les rats témoins et les rats traités chez les rats témoins et les rats traités.

Paramètres	Groupes expérimentaux					
	C	RDP	Zn	HLU	RDP+Zn	RDP+HLU
PA du foie (g)	9,00±0,43	5,55±0,23 ^{***}	8,69 ± 0,38	7,79±0,21	6,91±0,19 ^{###}	6,70±0,49 ^{##}
%	/	-38,33	-3,51	-13,43	+24,41	+20,73
PA des reins (g)	1,85±0,09	1,59±0,03 ^{**}	1,72±0,1	1,61±0,07	1,71±0,06	1,59± 0,05
%	/	-13,85	-6,69	-12,92	+7,51	+0,17
PA du cerveau (g)	1,246±0,03	1,029±0,07 ^{**}	1,333±0,01	1,31±0,01	1,282±0,04 ^{##}	1,28±0,01 ^{##}
%	/	-18,52	+5,27	+3,74	+24,53	+25,00

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne ± SEM (n =6 rats) ;

(*p< 0.01, **p<0.001) comparativement aux rats témoins ;

(#p<0.01, ###p<0.001) comparativement aux rats traités par le RDP.

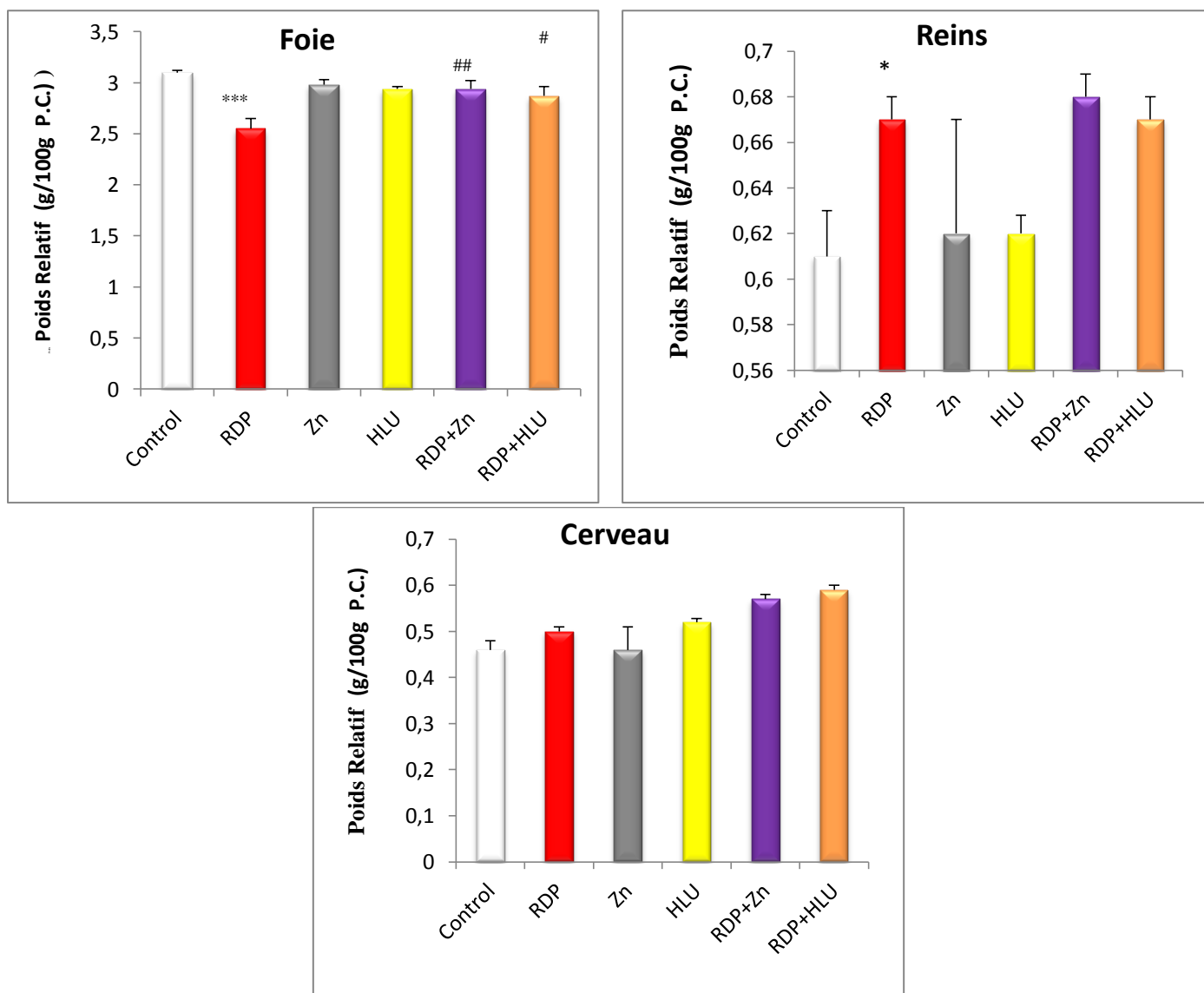


Figure 13 : Variation du poids relatif des organes (Foie, reins et cerveau) en g/100 g Pc chez les rats témoins et les rats traités.

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne ± SEM (n =6 rats) ;

(*p< 0.05, **P< 0.01, ***p<0.001) comparativement aux rats témoins ;

(#p< 0.05, ##P<0.01, ###p<0.001) comparativement aux rats traités par le RDP.

Discussion :

Au cours de ces dernières années, les connaissances sur la contamination des milieux et sur l'exposition de la population par les pesticides ont été approfondies. Ainsi, la mise en œuvre de travaux relatifs aux effets chroniques des pesticides sur la santé humaine a été poursuivie (**Rani et al., 2021**).

Le Roundup est un produit à base de glyphosate concentré à 450g/L, l'herbicide le plus utilisé au monde.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés à étudier l'impact du Roundup sur certains paramètres physiologique ainsi à la bonne compréhension du stress oxydatif, qui est l'un des mécanismes aggravant la toxicité des pesticides notamment les organophosphorés. Nous allons ainsi d'évaluer l'intérêt des antioxydants dans la lutte contre cet herbicide.

Au cours de notre expérimentation nous avons enregistré des signes d'intoxication cliniquement décelable comme l'anorexie, la diarrhée et perte du poids, nos résultats sont cohérents avec les recherches de **Bradberry et al., (2004)**. En effet, nous avons constaté une réduction du poids corporel ainsi que le poids absolu et relatif des organes étudiés (foie, reins et cerveau) du groupe des rats traités uniquement au RDP dans l'eau de boisson pendant 30 jours. Ces résultats suggèrent peut être dû à une réduction de la prise quotidienne en aliment et/ou à une malabsorption des nutriments. En outre, Cette variation du poids des organes est probablement due à une atrophie, et la dernière peut être expliquée par la stimulation des effets toxiques du glyphosate pour augmenter le mécanisme de détoxification. Ces résultats sont cohérents avec les travaux réalisés par **Tang et al., (2017)** qui ont montré que l'administration du glyphosate à une dose différente pendant 35 jours chez les rat pourrait affecter les performances de croissance des rats qui en raison de la diminution du poids corporel et celle du poids absolu et relatif du foie, des reins et du cerveau est affectée suite à l'intoxication par le glyphosate. En outre, la plupart des fonctions physiologiques ont été modifiées en corrélation avec des changements significatifs dans la consommation quotidienne d'aliment et d'eau. Les rats qui ont reçu le pesticide dans l'eau de boisson ont montré une réduction de la consommation de nourriture et d'eau. Cette réduction peut être causé par les inflammations du glande salivaire et au niveau de la bouche. Nos résultats étaient similaires à celles de **Çağlar et Kolankaya (2008)** qui ont étudié l'exposition à 56 et 560 mg/kg de Roundup pendant 5 et 13 semaines, induit des perturbations de la consommation de nourriture et d'eau.

Dans la médecine traditionnelle et les plantes médicinales utilisé l'huile de lin dans le régime alimentaire parce que lors de la consommation de l'huile de lin donne un sentiment de satiété qui dure pendant une longue période, ceci pourrait être expliqué par la diminution du gain de poids corporel et des prises quotidiennes en aliment chez le groupe traités par l'HLU comparativement au groupe témoin. Les travaux de **Qureshi et al., (2018)** ont observé une perte de poids importants

et réduction du tour de taille des animaux traités aux graines de lin qui est concordant avec nos résultats. Les mêmes auteurs ont attribué la perte de poids observée à la richesse des graines de lin en oméga-3 et d'acide α -linoléique.

De plus, **Soltanian et Janghorbani (2018)** ont montré que les patients atteints de diabète de type 2 pouvaient réduire considérablement leur poids corporel et leur IMC en consommant 10 g de graines de lin par jour (pré-mélangées dans des biscuits) pendant 12 semaines.

Alors que l'étude d'**Ahmad et al., (2012)** ont trouvé une augmentation significative du poids corporel chez les rates ayant reçu un extrait aqueux méthanolique de graines de lin à raison de 500 mg/kg à pendant 14 jours.

En revanche, l'administration de HLU chez les rats traités par le RDP empêche la diminution du poids absolu et relatif des organes étudiés.

L'administration combinée du RDP et du Zn a entraîné une amélioration du poids corporel ainsi que du poids absolu et relatif du foie et cerveau par rapport aux rats traités uniquement avec le RDP. Cette amélioration due au rôle protecteur du zinc contre la toxicité du RDP. En effet la présence de zinc maintient l'intégrité et la fonction des tissus en empêchant la formation de radicaux libres.

(**Elwej et al., 2018**). Dans ce sens **Goel et al.,(2005)** ont montré que l'effet protecteur de la supplémentation en zinc chez les animaux exposés au chlorpyrifos et aux OPs pourrait être attribué à sa capacité à réduire l'accumulation de collagène dans les tissus, et il joue un rôle physiologique vital dans la régulation de la structure et de la fonction cellulaire.

2.3. Etude des paramètres biochimiques:

Le tableau 12 présente quelques paramètres biochimiques des rats témoins et traités après 30 jours de traitement.

2.3.1. Bilan énergétique :

- **Glucose :**

D'après **le tableau 12** nous constatons une augmentation hautement significative (+10.3%) de la concentration sérique en glucose chez les animaux traités par le RDP par rapport aux témoins. Cette concentration diminue d'une manière hautement significative (-10.18%) chez les animaux traités par le Zn et d'une manière significative (-8.20%) chez les animaux traités par HLU par rapport à ceux intoxiqués au pesticide.

2.3.2. Bilan hépatique

- **Transaminases**

Les résultats illustrés montrent, une augmentation hautement significative ($p \leq 0,01$) de l'activité enzymatique de l'aspartate aminotransférase (ASAT) et de l'alanine aminotransférase (ALAT) chez

les animaux intoxiqués au RDP par rapport à ceux du groupe C. Par ailleurs nous avons enregistré une diminution hautement significative ($p \leq 0,01$) de l'ASAT et significative ($p \leq 0,05$) de l'ALAT chez les rats du groupe (RDP+Zn) par rapport à ceux du groupe RDP. Aussi, une diminution significative ($p \leq 0,05$) de l'ASAT et hautement significative ($p \leq 0,01$) de l'ALAT chez les rats du groupe (RDP+HLU) par rapport à ceux du groupe RDP (**tableau 12**).

- **Lactate déshydrogénase et Phosphatase alcaline**

Les résultats de la présente étude révèlent, une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) de l'activité enzymatique du LDH et hautement significative ($p \leq 0,01$) chez les animaux traités par l'organophosphate par rapport à ceux du groupe C. Par ailleurs l'administration orale du Zn diminue leurs activités d'une façon hautement significative ($p \leq 0,01$) par rapport à ceux intoxiqués au RDP. Cependant, la supplémentation d'huile de lin aux rats traités par le pesticide restauré les niveaux de l'activité enzymatique du LDH et PAL (**tableau 12**).

- **Gamma-glutamyl- transférase et la bilirubine**

L'administration du RDP chez les rats a provoqué une augmentation très hautement significative de γ -GT et significative de la Bil. T. Par contre, on note un rétablissement par une diminution significative de γ -GT chez les rats traités par les combinaisons de RDP plus Zinc ou *Linum usitatissimum* accompagnée d'une diminution remarquable de la concentration de la Bil.T comparativement aux rats recevant le pesticide seulement (**tableau 12**).

- **L'albumine et protéines totales**

D'après les résultats obtenus (**tableau 12**), on observe une augmentation hautement significative de la concentration sérique en protéines totales chez le groupe toxique, par contre on note une diminution significative de l'albumine comparativement au groupe témoin.

Tandis que chez les rats traités par la combinaison du (RDP+Zn) et (RDP+HLU), on enregistre une amélioration hautement significative comparativement au groupe traité par le RDP uniquement au niveau du taux de l'albumine ainsi que les protéines totales.

Tableau 12 : Variation de quelques paramètres biochimiques chez les rats témoins et traités.

Paramètres	Groupes expérimentaux					
	C	RDP	Zn	HLU	RDP+Zn	RDP+HLU
Glucose (mg/dl)	0,99±0,01	1,09±0,03**	0,97±0,01	0,96±0,02	0,98±0,02 ^{##}	1±0,03 [#]
%	/	+10,03	-1,83	-2,84	-10,18	-8,20
ASAT (U/L)	221,06±24,12	330,42±20,06**	243,16±15,85	272,42±6,21**	232, ±23,11 ^{##}	266,3±11,73 ^{**}
%	/	+49,47	+9,99	+23,23	-29,63	-19,40
ALAT (U/L)	66,5±1,75	91,5±7,20**	62,16±4,5	72,66±1,14*	72,16±4,40 [#]	66,5±4,95 ^{##}
%	/	+37,59	-6,51	+9,27	-21,12	-27,32
LDH (U/L)	2188±223,16	3472,6±205,67 ^{***}	2413±268,61	2406 ± 124,01 ^{###}	2852,1 ± 233,98 [#]	2085,5 ± 142,06 ^{###}
%	/	+58,71	+10,28	+9,96	-17,86	-39,94
PAL (U/L)	104,13±8,53	149,13±13,61**	79,24±4,26*	106,4±3,02	101,04±12,72 ^{##}	114,51±3,18 ^{##}
%	/	+43,21	-23,90	+2,17	-32,24	-23,21
GGT (U/L)	8,01±0,55	17,3±1,38 ^{***}	7,8±0,52	7,96 ±1,2	11,41±1,62 ^{##}	8,33 ± 1,24 ^{###}
%	/	+115,80	-2,7	-0,62	-34,00	-51,83
Bil.T (µmol/l)	1,03±0,07	1,33±0,13*	0,71±0,05**	0,66±0,05 ^{***}	0,81±0,05 ^{##}	0,43±0,04 ^{###}
%	/	+29,03	-30,64	-35,48	-38,75	-67,5
Alb (g/l)	33,42±2,27	26,98±1,62*	34,09±0,75	35,85±1	33,18±1,01 ^{##}	33,58±2,04 ^{##}
%	/	-19,25	+1,99	+7,28	+22,95	+24,43
Prot, T (g/l)	83,85±1,11	75,8±2,25**	79,8±0,5*	85,56±1,93	82,48±1,62 ^{##}	83,86±1,51 ^{##}
%	/	-9,60	-4,83	+2,03	+8,81	+10,64
Cho. T (mmol/l)	1,5±0,05	1,62±0,04*	0,74±0,06 ^{***}	1,49±0,05	1,56±0,06	1,34±0,04 ^{###}
%	/	+8,32	-50,49	-0,66	-3,99	-17,41
Trig (mmol/l)	0,57±0,02	0,69±0,04*	0,56±0,05	0,58±0,01	0,78±0,02	0,58±0,02 [#]
%	/	+21,44	-1,73	+1,73	+12,41	-16,70
HDL (mmol/l)	1,42±0,06	0,85±0,07 ^{***}	1,38±0,08	1,2±0,08	1,19±0,07 ^{##}	1,03±0,04 [#]
%	/	-40,49	-3,38	-15,40	+40,58	+21,17
LDL (mmol/l)	0,14±0,005	0,18±0,01**	0,11±0,02	0,10±0,009	0,11±0,03 [#]	0,16±0,02
%	/	+26,43	-18,39	-25,28	-38,18	-11,81

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne ± SEM (n =6 rats) ;

(* p< 0.05, ** p< 0.01, *** p<0.001) comparativement aux rats témoins ;

(#p< 0.05, ##p<0.01, ###p<0.001) comparativement aux rats traités par le RDP.

2.3.3. Bilan lipidique

- **Cholestérols totales et triglycéride**

Les résultats obtenus indiquent une augmentation significative du taux de cholestérols totaux chez le groupe RDP (+8.32%) comparativement au groupe témoin. Du même, le dosage du triglycéride révèle une augmentation significative (+21.44%) de sa concentration chez le même groupe. Par contre, on observe un rétablissement par une baisse significative de la concentration du cholestérol totale et du triglycéride chez les rats traités par les combinaisons RDP+Zn et RDP+HLU comparativement aux rats traités par RDP (**Tableau 12**).

2.3.4. Bilan rénal :

Les paramètres de la fonction rénale mesurés chez les rats témoins et traités l'urée, la créatinine et l'acide urique sont rapportés dans **la Figure 14**.

- **L'urée et la créatinine**

Les résultats obtenus montrent que le traitement par le Roundup provoque une augmentation significative de la concentration sérique en urée et en créatinine. Le traitement des rats par les combinaisons RDP+Zn, RDP+HLU a entraîné une amélioration de la concentration en urée et créatinine, figuré par une diminution statistiquement significative comparativement au groupe RDP (**Figure 15**).

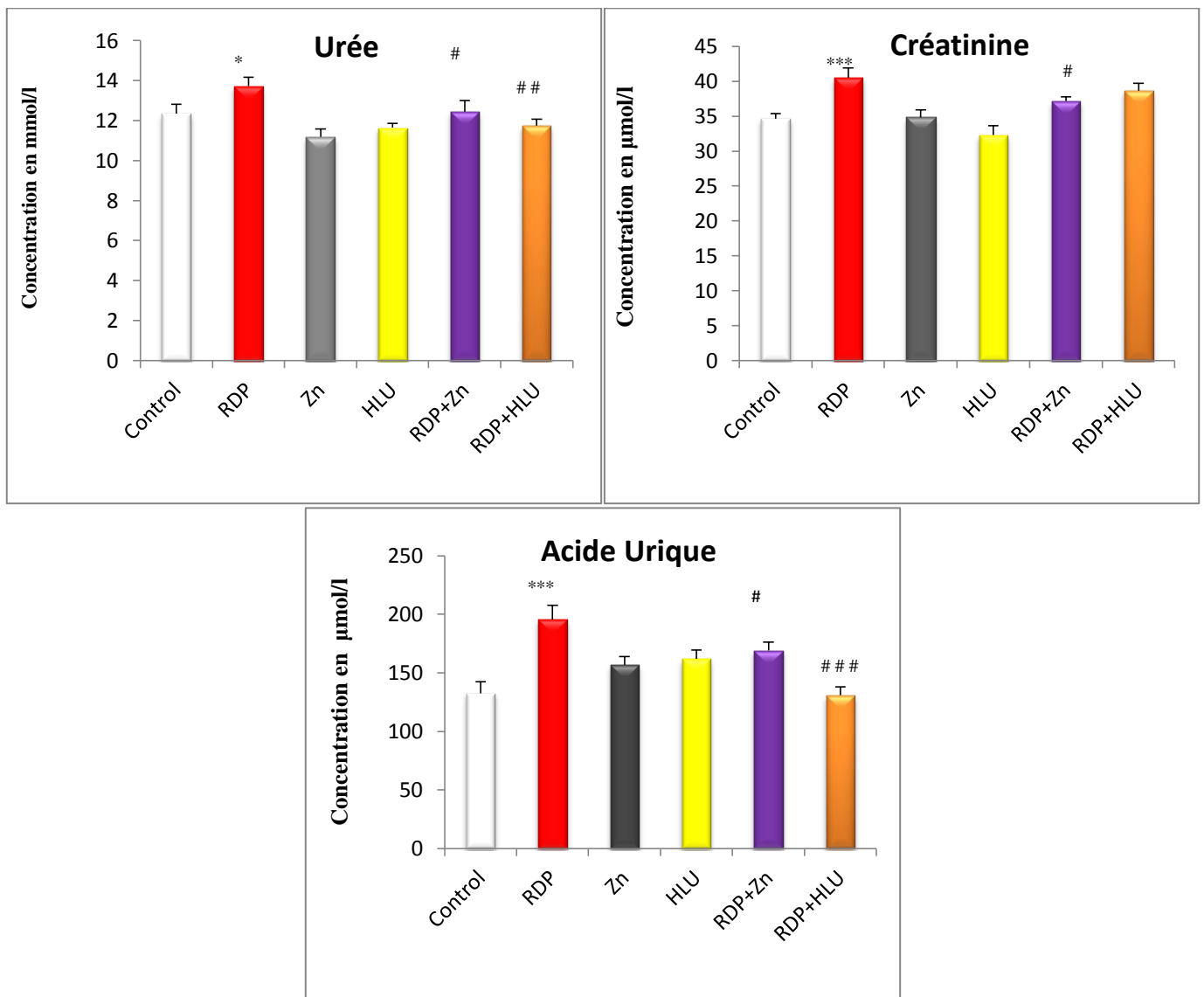


Figure 14 : Variation de la concentration plasmatique en urée (mmol/l), créatinine (µmol/l) et acide urique (µmol/l) chez les rats témoins et les rats traités après 30 jours de traitement.

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM (n=6 rats) ;

(* p< 0.05, *** p<0.001) comparativement aux rats témoins ;

(#p< 0.05, ##p<0.01, ###p<0.001) comparativement aux rats traités par le RDP.

- **L'acide urique**

Les résultats illustrés dans la **Figure 14** indiquent une augmentation significative de l'acide urique chez le groupe RDP comparativement au groupe control. La co-administration d'huile de lin ou Zinc aux rats recevant le RDP semble atténuer ces différences.

Discussion :

Des études récentes ont montré que les pesticides organophosphorés peuvent augmenter le taux d'insuline et provoquer une résistance à l'insuline accompagnée d'une inhibition de transport du glucose et en dérégulant la voie de signalisation de l'insuline (**Hunt et Ivy 2002; Peris-Sampedro et al, 2015**). Dans la présente étude, une augmentation significative de la glycémie a été enregistrée chez les rats traités au RDP comparé au groupe témoin. Cette hyperglycémie peut être due à une augmentation de la production d'insuline et à des lésions des îlots de Langerhans et des cellules acineuses provoquées par des dommages de stress oxydatif (**Kamath et Rajini 2007**).

D'autres auteurs suggèrent une diminution de la pénétration du glucose dans les tissus, cela se traduit par une diminution de la stimulation de l'absorption du glucose par l'insuline, ou peut indiquer une perturbation du métabolisme des glucides résultant d'une dégradation accrue du glycogène hépatique (**Baudler et al., 2003**). Ces résultats vont dans le même sens que ceux de (**Soltanian et Janghorbani 2018; Tizhe et al., 2018**).

Ces études sont en corrélation avec nos résultats, on note une diminution significative chez les rats traités par le pesticide et l'huile de lin comparativement au groupe traité avec le pesticide.

Cependant, **Rizwan et al., (2013)** ont découvert que les grains de lin réduisent l'activité du foie en réduisant la production de glucose par glucose-6-phosphatase, ce qui entraîne une réduction de la glycémie. Ceci suggère qu'un mécanisme extra-pancréatique est responsable de l'effet hypoglycémiant de *Linum usitatissimum*. Ces résultats confirment ceux rapportés par (**Pilar et al. 2017; da Costa et al. 2018**).

En outre, une diminution significative de la glycémie a été observée chez les animaux recevant la combinaison du pesticide et le zinc. Ceci pourrait être due aux propriétés anti-oxydantes qui ont été prouvé *in vitro* (**Aly et Mantawy 2012; Cruz et al., 2015**), en protégeant les cellules β pancréatiques contre les dommages causés par les ERO (**Maret 2017**).

Le foie est le premier organe qui protège le corps des xénobiotiques (**Bischoff et al., 2018**), et la fuite d'enzymes hépatiques telles que les transaminases (ASAT, ALAT), PAL et LDH dans le sérum sanguin est un signe de lésions hépatocellulaires et de dysfonctionnement hépatique (**El-Demerdash et al., 2001**).

Dans nos résultats, une augmentation significative du statut des activités sériques ALAT, ASAT, PAL, LDH et GGT chez les rats traités au RDP par rapport aux témoins. Cette élévation est

probablement due à l'utilisation excessive de ce pesticide causer des dommages critiques au foie. Ceci pourrait résulter de l'hépatotoxicité qui mène à une perturbation du métabolisme enzymatique, entraînant une perméabilité accrue de la membrane et une fuite de ces enzymes du cytosol hépatique dans le sang (**Djeffal et al., 2015**).

Ceci étant en accord avec les résultats de plusieurs recherches suite à l'administration du Roundup et d'autres organophosphates. **Dar et al., (2019)** ont trouvé une augmentation des taux des transaminases et de LDH chez les rats exposés au Roundup avec une dose de 500 mg/kg P.C. pendant 120 jours. Alors que **Çağlar et Kolankaya (2008)** ont observé une diminution des taux sériques d'AST et d'ALT chez les rats administrant du glyphosate pendant 5 et 13 semaines, cet écart est probablement dû à la longue durée d'exposition et l'organisme s'est adapté.

D'autres biomarqueurs de la toxicité hépatique ont également été étudiés. En fait, l'augmentation significative de la bilirubine chez le groupe toxique. Des niveaux accrus de bilirubine peuvent être associés à une perturbation de l'activité de liaison enzymatique qui assure la biosynthèse des glucuronides de bilirubine, à l'altération du parenchyme hépatique avec une perturbation de sa fonction d'excrétion de la bilirubine et de sa conjugaison ou à une augmentation de la production de bilirubine à partir de l'hémolyse, ce qui était cohérent avec les résultats rapportés par **Khan et al., (2013)** et **Kanbur et al., (2015)**.

Il est intéressant de noter que la co-administration de HLU a partiellement supprimé l'effet hépatotoxique du RDP. La réduction des taux d'ASAT, d'ALAT, d'PAL, de LDH et de GGT est une indication du processus de régénération des membranes des hépatocytes. Alors qu'une augmentation de la bilirubine dans le sérum peut être due à la stabilisation de la fonction biliaire. Des résultats similaires ont démontré que LuO atténuait les changements sévères des paramètres biochimiques hépatiques chez les rats traités avec des pesticides (**Hana et Saed 2013; Hendawi et al., 2016**).

La normalisation des activités d'ALAT et d'ASAT suite à la supplémentation en Zn de rats intoxiqués au RDP soutien substantiel des rapports antérieurs (**Sidhu et al., 2004**). Ces rapports ont souligné l'efficacité hépatoprotectrice de zinc en cas de lésion hépatique induite par le Nickel, en tant que traitement au zinc aidé au maintien de l'homéostasie par régulation de la synthèse des protéines et la stabilisation des biomembranes.

Cependant, la supplémentation du Zn a atténué l'activité enzymatique du PAL et du LDH provoqué par le Roundup. Cette amélioration est peut être expliqué par le rôle du zinc comme cofacteur pour leurs activités, et toute modification dans le statut de ce métal pourrait avoir des perturbations au niveau de leurs activités enzymatiques (**Baltaci et al., 2018**).

Cho et al., (2007) ont rapporté que les rats recevant un régime carencé en zinc ont présenté une diminution du PAL. Ces résultats ont été observés dans des études antérieures (**Barkat et al., 2015**).

Nos résultats ont montré une diminution de la concentration sérique de l'albumine et des protéines totales chez les groupes traités au RDP comparés au groupe témoin. Cette diminution explique l'accumulation de la bilirubine libre dans le sang (l'albumine est le principal transporteur sérique de la bilirubine).

Plusieurs études ont montré que de nombreux producteurs d'orchidées thaïlandaises utilisant des quantités excessives de pesticides sans équipement de protection adéquat ont montré une réduction de la concentration d'albumine sérique, entraînant une réduction significative des protéines sériques totales (**Aroonvilairat et al., 2015**). **Zhang et al., (2014)** suggèrent que l'hypoprotéïnémie et l'hypoalbuminémie peuvent être dues à une perturbation de la synthèse et/ou du métabolisme protéique résultant probablement des dommages hépatocellulaires. Nos résultats sont cohérents avec **Messarah et al., (2013)**; **Barkat et al., (2015)**; et **d'Uchendu al., (2017)** qui ont observé une diminution des taux de protéines totales et d'albumine chez le rat traité avec des pesticides organophosphorés.

L'augmentation significative des protéines totales et de l'albumine après l'administration de HLU en raison de l'effet hépatoprotecteur de l'huile de lin qui peut être due à une diminution des ROS formés. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Chavan et al., (2013)**.

Nos résultats ont également montré une amélioration significative du niveau d'albumine et de protéines totales après une supplémentation en zinc. Cette amélioration pourrait s'expliquer par leur rôle dans l'induction de la métallothionéine (protéine de liaison au zinc), régulant ainsi le précurseur d'acide aminé utilisé pour la synthèse de l'albumine (**Gatiatulina et al., 2020**).

De plus, l'exposition des rats au RDP a montré une augmentation significative des TG, du cholestérol sérique et du LDL-C par rapport aux rats témoins. L'hypertriglycémie et l'hypercholestérolémie peuvent s'expliquer par l'augmentation du taux de peroxydation des lipides et la libération des radicaux libres, le MDA a été dosé dans les organes étudiés et une forte peroxydation des lipides a été trouvée chez les rats traités au RDP. De plus, le HDL-C pourrait protéger le LDL-C contre l'oxydation in vivo, puisque les lipides du HDL-C sont préférentiellement oxydés avant ceux du LDL-C (**Bowry et al., 1992**). Nos résultats sont en accord avec d'autres études (**Al-Attar, 2015**; **Meligi et Hassan 2017**).

En effet, plusieurs études ont rapporté les effets bénéfiques du *Linum usitatissimum* dans la régulation des teneurs en lipides. Dans la présente étude, La supplémentation d'huile de lin aux rats toxiques (RDP+HLU) induit une réduction des teneurs plasmatiques en cholestérol total, en triglycérides et en LDL-C par rapport au groupe RDP. Là aussi, nos résultats sont en parfaite adéquation avec ceux obtenus par d'autres études (**Pilar et al., 2017**; **da Costa et al., 2018**).

Adolphe et al., (2010) ont démontré que les lignanes de lin réduisaient les niveaux du cholestérol total et du LDL chez l'animal et chez l'homme. Cette réduction est probablement due à l'action des

lignanes qui participent à la stimulation de cholestérol 7 α -hydroxylase, enzyme importante dans la synthèse des acides biliaires à partir du cholestérol.

Aussi, la richesse de ces graines en ALA qui réduit l'accumulation des lipides par la stimulation de la bêta-oxydation, voie métabolique principale de la dégradation des molécules d'acides gras, et la suppression des acides gras synthétisés (**Murase et al., 2005**).

La créatinine et l'urée sont deux des substances les plus importantes éliminées par les reins et peuvent également être utilisées pour évaluer la fonction rénale. Lorsque l'insuffisance rénale s'installe, les niveaux de ces paramètres augmentent dans le sang, ce que nous avons observé chez les rats traités au RDP. Cette augmentation peut être due à une lésion des cellules épithéliales tubulaires proximales du rein et à une chute brutale des taux de filtration glomérulaire (**Appenroth et al., 2001**). Des travaux antérieurs réalisés par **Dedeke et al., (2018)** avaient démontré, sur des rats ayant reçu quotidiennement par gavage 50.4 et 248.4 mg/kg PC de la formulation Roundup et de glyphosate respectivement durant 12 semaines, une augmentation des biomarqueurs rénal (urée sérique et créatinine), liée à une insuffisance rénale. **Wunnapuk et al., (2014)** ont rapporté que l'exposition au glyphosate chez les rats à des doses de 250, 500, 1200 et 2500 mg/kg a montré une élévation de la concentration de créatinine. L'acide urique est un produit final de la dégradation des purines et éliminé dans l'urine. Dans notre étude, l'augmentation de l'acide urique sérique s'explique probablement d'une part, par une forte dégradation des acides nucléiques (ADN et ARN). Ainsi, le taux élevé d'acide urique circulant, peut être un indicateur de défense de la cellule contre les effets délétères des radicaux libres, l'organisme augmente alors la production d'antioxydants endogènes dont l'acide urique. Ce dernier empêche les modifications oxydatives des enzymes endothéliales et préserve la capacité de l'endothélium à médier la dilatation vasculaire pour faire face au stress oxydatif (**Satarug et Moore 2004**). D'autre part, en cas de manque d'oxygène dans les tissus, cela se traduit par une diminution de l'ATP ce qui provoque l'accumulation d'hypoxanthine. Lorsque les tissus sont perturbés, l'enzyme xanthine déshydrogénase est convertie en xanthine oxydase par oxydation réversible du sulfhydryle (**Zhang et al., 2019**). Cela peut être la cause de l'augmentation de cette paramètres (**El-Shenawy, 2009**).

Dans nos conditions expérimentales, HLU administrée à des rats s'est avéré inhiber les effets de l'empoisonnement du pesticide sur les marqueurs de la dysfonction rénale.

En effet, plusieurs études indiquent que la graine de lin peut avoir des effets protecteurs sur le rein chez certains modèles animaux recevant le malathion qui a provoqué une insuffisance rénale chronique (**Hana et Saed 2013 ; Moneimt et al., 2011**).

2.4. Effet du traitement sur les paramètres hématologiques

Le **tableau 13**, illustre le profil hématologique chez les rats témoins et les traités après 30 jours de traitement dans les différents groupes. Nos résultats révèlent que le traitement par le RDP provoque une réduction très hautement significative de l'hémoglobine (-54%), de l'hématocrite (-37,29%) et des globules rouges (37,07%). Un effet inflammatoire a été constaté par l'augmentation des globules blancs par rapport au groupe témoin. Par ailleurs, la supplémentation en huile de lin ou en zinc montre une stabilité relative de ces paramètres.

Tableau 13 : Profil hématologique chez les rats témoins et les rats traités après 30 jours de traitement.

Paramètres	Groupes expérimentaux					
	C	RDP	Zn	HLU	RDP+Zn	RDP+HLU
Globules Blancs ($\times 10^3$ / μ l)	7,33 \pm 0,74	9,51 \pm 0,43**	10,24 \pm 0,48	7,18 \pm 0,27	11,68 \pm 0,33###	8,03 \pm 0,56#
Globules rouge ($\times 10^6$ / μ l)	8,46 \pm 0,22	5,32 \pm 0,46***	28,47 \pm 0,12	9,37 \pm 0,33	7,98 \pm 0,13###	7,70 \pm 0,32###
Taux d'hémoglobine (g/dl)	5 \pm 0,15	2,3 \pm 0,29***	3,46 \pm 0,06	4,81 \pm 0,40	4,90 \pm 0,48###	4,46 \pm 0,18###
HCT (%)	37,38 \pm 0,59	23,44 \pm 1,88***	39,4 \pm 0,18	39,14 \pm 1,52	35,72 \pm 1,17###	35,28###
Plaquettes (10^3 / μ l)	530,33 \pm 19,73	377,16 \pm 205,67***	480 \pm 11,18	474,5 \pm 13,41	441,4 \pm 23,23	484,5 \pm 16,91###

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM (n =6 rats) ;

(* p< 0.01, ***p<0.001) comparativement aux rats témoins ;

(# p< 0.05, ###p<0.001) comparativement aux rats traités par le RDP.

Discussion :

Les paramètres hématologiques constituent des indicateurs de la réponse de l'animal à l'environnement et sont utilisés comme des indices fiables de l'état de santé pour détecter toute perturbation physiologique vis à vis aux différentes conditions de stress (**Topashka-Ancheva et al., 2003**). En l'occurrence, les états de maladie et de stress révélés par les indices hématologiques sont d'une grande utilité pour la recherche toxicologique ainsi que pour la surveillance de l'environnement (**Ścibior et Zaporowska 2010**). En effet, le sang est le principal compartiment liquidien de l'organisme qui assure plusieurs fonctions vitales : nutritive, excrétoire, respiratoire, immunologique et hormonale. Le maintien de l'homéostasie serait donc nécessaire pour que le sang assure ses fonctions. Plusieurs recherches ont montré que ces facteurs hématologiques peuvent être influencés par de multiples agents stressants, tel que le stress oxydant (**Çimen, 2008**). Ainsi, les pesticides qui sont des polluants environnementaux toxiques pour l'organisme (**Aroonvilairat et al., 2018; Tonietto et al., 2022**).

Nos résultats montrent que le traitement des rats par le Roundup, provoque des perturbations hématologiques marquées par une diminution importante des globules rouges, de l'hémoglobine et de l'hématocrite. Ces perturbations prouvent que ce pesticide suscite un effet hémato-toxique traduisant l'installation d'une anémie.

Les érythrocytes possèdent des propriétés antioxydantes de défenses limitées, ce qui rend les cellules plus sensibles aux modifications de la balance antioxydant/pro-oxydant. Cette anémie est probablement due aux effets des radicaux libres sur les membranes des globules rouges, augmentant ainsi la peroxydation des lipides membranaires ce qui provoque l'hémolyse des érythrocytes. Nos constatations sont en accord avec celle de **Jasper et al., (2012)** qui suggère que le traitement des souris avec le glyphosate a entraîné un abaissement des GR, Hb et HCT. Cette baisse du NGR, Hb et Ht peut être due à une hémolyse en raison d'une toxicité ou d'un stress. En effet, la diminution de ces paramètres peut être due également à une réduction de la concentration du GSH et une augmentation de la lipoperoxydation dans ces cellules qui peut entraîner une lyse cellulaire.

Au contraire, une hyperleucocytose a été détectée chez rats traités au Roundup, cela peut être dû à l'activation du système immunitaire en réponse à l'inflammation et à la nécrose des tissus induite par le pesticide (**Kalender et al., 2006**).

Ces changements ont été améliorés en réponse à l'huile de lin, qui peut être due aux activités antioxydantes de cette huile et ses propriétés de piégeage des radicaux libres en protégeant la membrane érythrocytaire contre la formation du malondialdéhyde. Ce pouvoir protecteur observé pourrait être lié à l'action des composés phénoliques quantifiés précédemment au niveau de l'huile de lin. En effet, la peroxydation lipidique est le processus de dégradation par oxydation des acides gras polyinsaturés contenus dans les membranes biologiques, ayant pour conséquence des modifications dans la structure et la fonction des membranes. Nos résultats sont en accord avec des études effectuées par **Hendawi et al., (2016)**, Ces auteurs ont observé un effet protecteur de l'huile de lin contre la toxicité induite par le thiacloprid chez les rats.

La supplémentation en zinc a restauré les indices hématologiques à des valeurs assez proches par rapport au groupe témoin. Conformément à nos constatations, **Ambali et al., (2010)** ont également rapporté les effets antioxydants du zinc sur la variation des paramètres hématologiques lors d'une exposition au chloropyrifos chez le rat.

3. Stress oxydatif induit par le Roundup : Effets protecteurs de la supplémentation en zinc et en huile de *Linum usitatissimum*

3.1. Paramètres non-enzymatiques :

3.1.1. Taux de malondialdéhyde

D'après les résultats obtenus, on observe une augmentation hautement significative du taux de MDA au niveau de foie, reins et cerveau chez les rats recevant le Roundup comparativement au groupe témoin. Tandis que, après le traitement avec Zn ou HLU on enregistre un rétablissement par une diminution statistiquement très hautement significative du taux du MDA dans tous les organes chez les groupes traités par la combinaison RDP+Zn ou RDP+HLU (**Tableau 14**).

3.1.2. Taux des produits protéiques d'oxydation avancée

Le traitement des rats par le RDP à une dose de 269 mg/kg de poids corporel pendant 30 jours, a provoqué une augmentation hautement significative de la teneur cellulaire en AOPPs dans le foie (+46.64 %), les reins (+17.30%) et une augmentation très hautement significative de la teneur en AOPPs cérébrale (+40.35%) comparativement au groupe témoin. Par ailleurs la supplémentation en zinc et à la combinaison (RDP+Zn) montrent une variation très hautement significative du AOPPs ($p < 0.001$). Aussi, les rats traités avec HLU semble atténuer l'effet oxydatif de ce pesticide traduisant par une diminution du contenu en AOPPs hépatique, rénal et cérébral (**Tableau 15**).

3.1.3. Taux des protéines carbonylées

En ce qui concerne les protéines carbonylées, au niveau du foie et des reins, on note une augmentation hautement significative pour le groupe toxique comparativement au groupe témoin. Quant à la supplémentation avec HLU, elle a donné les résultats suivants : une diminution très hautement significative dans le groupe RDP+HLU au niveau du foie (-31,72%) et des reins (-36,92%) comparativement au groupe RDP. Ainsi qu' une diminution au niveau de PCO dans le groupe RDP+Zn au niveau du foie (-32,10%) et des reins (-75,24%) comparativement au groupe toxique (**Tableau 16**).

Tableau 14: Variation de la teneur en malondialdéhyde (nmol/mg de protéine) dans le foie, les reins et le cerveau

Les organes	groupes expérimentaux					
	C	RDP	Zn	HLU	RDP+Zn	RDP+HLU
Foie	23,41±3,13	34,33±1,71**	14,46±0,73**	16,13±1,35*	23,30±30###	23,43±1,34###
%	/	+46,64	-38,20	-31,10	-32,10	-31,72
Reins	28,07±1,18	32,92±1,31**	12,73±1,97***	18,89±1,92***	8,15±0,72###	20,76±2,72###
%	/	+17,30	-54,64	-32,68	-75,24	-36,92
Cerveau	16,75±0,86	23,82±0,8***	9,73±1,58***	7,25±0,8***	12,38±1,05###	12,79±2,66###
%	/	+40,35	-59,14	-69,56	-48,02	-46,29

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne ± SEM (n =6 rats) ;

(* p< 0.05, ** p< 0.01, *** p<0.001) comparativement aux rats témoins ;

(## p<0.01, ### p<0.001) comparativement aux rats traités par le RDP.

Tableau 15: Variation de la teneur en produits protéiques d'oxydation avancée (nmol/mg de protéine) dans le foie, les reins et le cerveau.

Les organes	Groupes expérimentaux					
	C	RDP	Zn	HLU	RDP+Zn	RDP+HLU
Foie	39,33±2,08	46,66±2,23**	38,16±0,91	38,66±1,05	34,66±1,14###	40,16±2,09#
%	/	+18,64	-2,96	-1,69	-48,67	-6,39
Reins	21,66±1,67	24,81±1,04*	22±1,63	22,5±2,04	19,66±0,21###	20,33±2,46#
%	/	+14,53	+1,53	+3,84	-20,74	-18,06
Cerveau	10,72±0,4	13,55±0,82**	6,15±0,45***	7,06±0,32***	8,30±0,58###	8,72±1,08###
%	/	+26,37	-42,62	-34,15	-38,69	-35,58

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne ± SEM (n =6 rats) ;

(* p< 0.05, ** p< 0.01, *** p<0.001) comparativement aux rats témoins ;

(# p< 0.05, ## p<0.01, ### p<0.001) comparativement aux rats traités par le RDP.

Tableau 16: Variation de la teneur en protéines carbonylées (nmol/mg de protéine) dans le foie, les reins et le cerveau.

Les organes	Groupes expérimentaux					
	C	RDP	Zn	HLU	RDP+Zn	RDP+HLU
Foie	23,41±3,13	34,33±1,71**	14,46±0,73**	16,13±1,35*	23,30±30###	23,43±1,34###
%	/	+46,64	-38,20	-31,10	-32,10	-31,72
Reins	28,07±1,18	32,92±1,31**	12,73±1,97***	18,89±1,92***	8,15±0,72###	20,76±2,72###
%	/	+17,30	-54,64	-32,68	-75,24	-36,92

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne ± SEM (n =6 rats) ;

(* p< 0.05, ** p< 0.01, *** p<0.001) comparativement aux rats témoins ;

(## p<0.001) comparativement aux rats traités par le RDP.

3.1.4. Taux du glutathion réduit

Le traitement des rats par le Roundup provoque une diminution significative de taux de la GSH dans le foie, les reins et le cerveau comparativement aux rats témoins. En revanche, on enregistre un rétablissement par une augmentation hautement significative de l'activité de GSH dans les organes étudiés chez les rats traités par les combinaisons Roundup plus zinc /ou HLU (Figure 15).

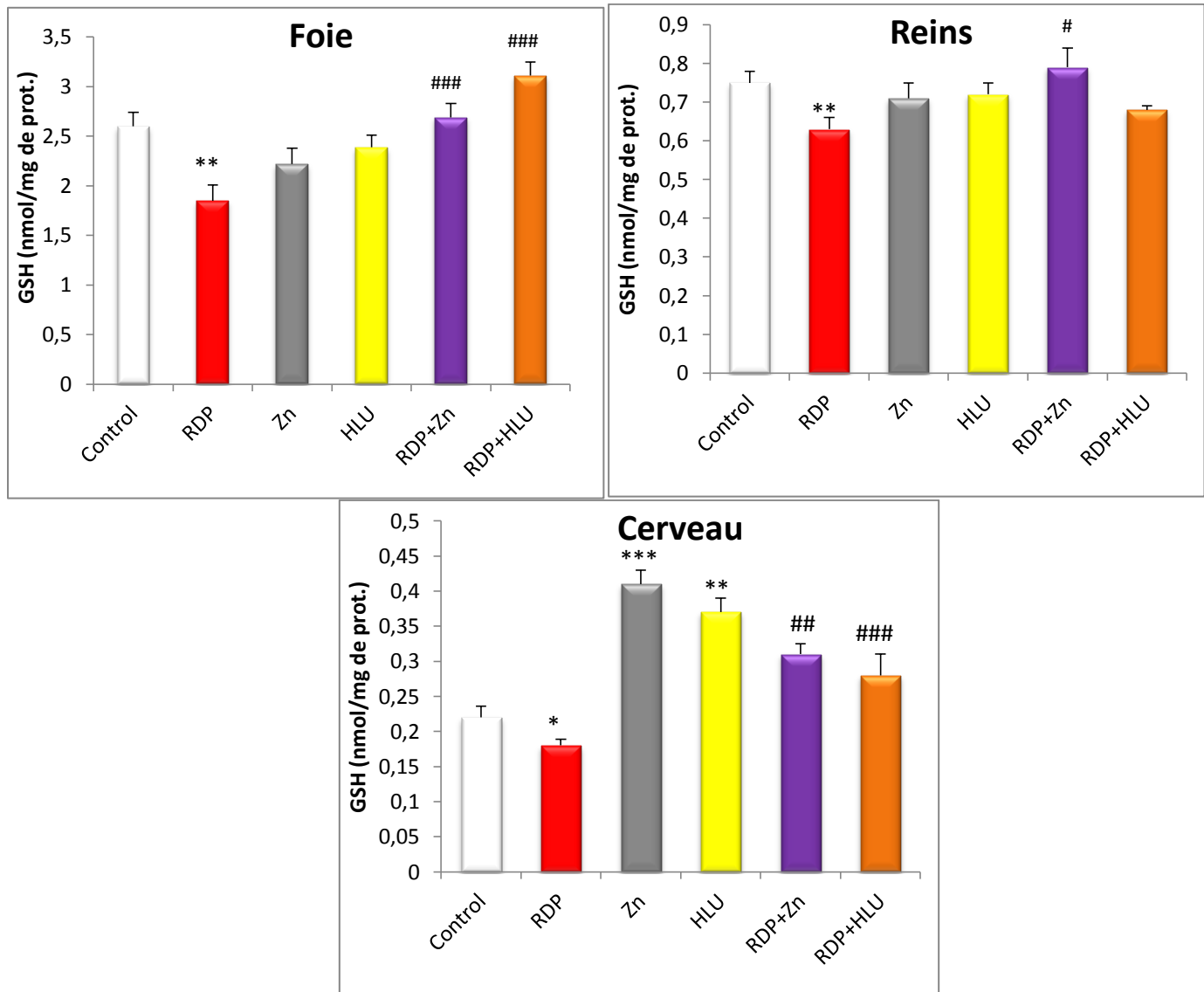


Figure 15 : Variation du taux de glutathion réducté (nmol/mg de protéine) dans le foie, les reins et le cerveau.

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM (n=6 rats) ;
 (* p< 0.05, ** p< 0.01, *** p<0.001) comparativement aux rats témoins ;
 (## p<0.01, ### p<0.001) comparativement aux rats traités par le RDP.

3.1.5. Taux d'acide ascorbique

Les niveaux de Vit C ont montré une diminution significative dans le groupe RDP comparativement au groupe témoin dans le foie et les reins. Cette diminution est améliorée d'une façon hautement significative par le traitement avec Zn dans le groupe RDP+Zn comparativement au groupe RDP et d'une façon significative dans le groupe traité par le HLU (RDP+HLU) par rapport au groupe RDP au niveau de foie (**Figure 16**).

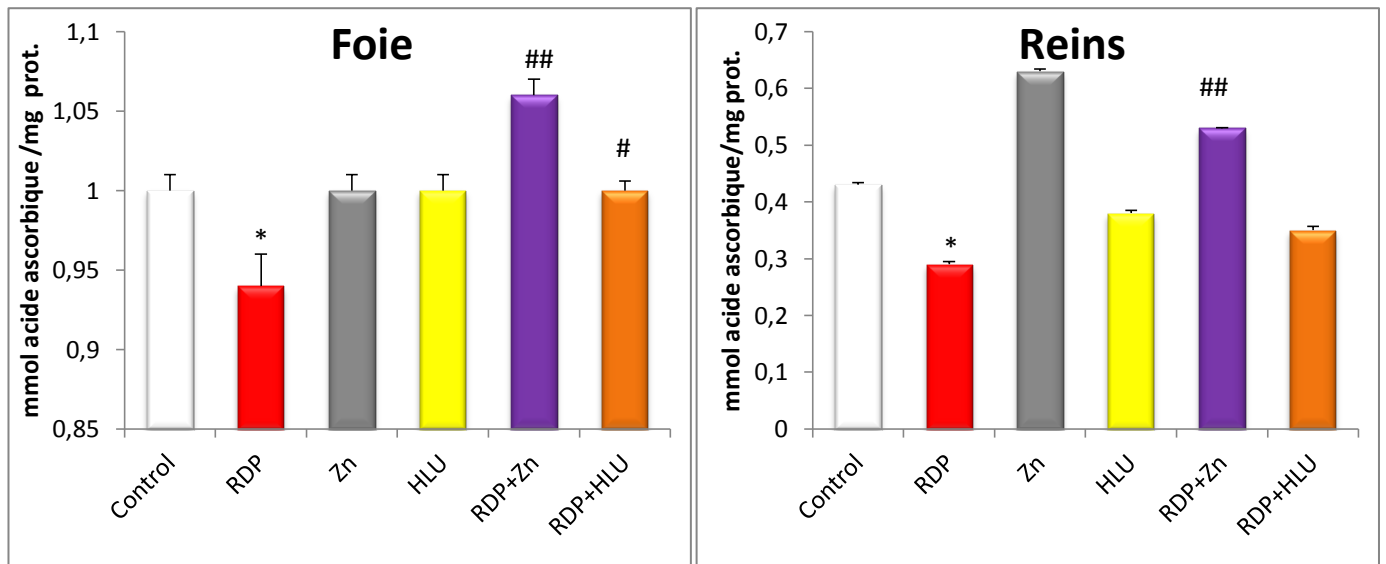


Figure 16 : Variation du taux d'acide ascorbique (nmol acide ascorbique/mg de protéine) dans le foie et les reins.

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM (n =6 rats) ;

(*p< 0.05) comparativement aux rats témoins ;

(#p< 0.05, ##p<0.01) comparativement aux rats traités par le RDP.

3.2. Paramètres enzymatiques

3.2.1. Taux du glutathion peroxydase

D'après les résultats obtenus (**tableau17**), on observe une augmentation très hautement significative ($p \leq 0.001$) de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase dans le foie (+80,94%), et le cerveau (+115,97%) et une augmentation significative ($p \leq 0.05$) dans les reins (+31,70%) En revanche, on enregistre une diminution significative de l'activité de la GPx dans les organes étudiés chez les rats traités par RDP+Zn comparaison avec le groupe traité uniquement par le Roundup au niveau du foie et cerveau mais, on n'enregistre aucune différence significative au niveau des reins. Et aussi une diminution hautement significative de l'activité enzymatique chez le groupe traité avec l'huile de lin (RDP+HLU) comparativement au groupe toxique.

3.2.2. Taux du glutathion - S- transférase

L'administration du Roundup, entraîne une diminution très hautement significative de l'activité enzymatique de la glutathion-S-transférase dans le foie (-60,87%), une diminution significative dans les reins (-14,40%) et avec une diminution hautement significative dans le cerveau (-48,62%). Tandis qu'on enregistre une amélioration par une augmentation significative de l'activité de la GST dans les organes étudiés du groupe traité par les 2 antioxydants RDP+Zn et RDP+HLU par rapport au groupe traité uniquement par le Roundup (**tableau 18**).

Tableau 17 : Variation de l'activité de GPx (nmol GSH/min/mg de protéine) dans le foie, les reins et le cerveau.

Les organes	Groupes expérimentaux					
	C	RDP	Zn	HLU	RDP+Zn	RDP+HLU
Foie	1,05±0,13	1,91±0,18 ^{***}	1,19±0,17	0,95±0,12	1,17±0,17 ^{##}	1,32±0,12 ^{##}
%	/	+80,94	+13,07	-9,92	-38,72	-30,98
Reins	0,57±0,07	0,76±0,06 [*]	0,61±0,03	0,56±0,04	0,7±0,02	0,45±0,05 ^{##}
%	/	+31,70	+6,28	-2,01	-8,09	-40,65
Cerveau	0,24±0,02	0,51±0,04 ^{***}	0,29±0,06	0,17±0,02 [*]	0,28±0,03 ^{###}	0,29±0,02 ^{###}
%	-	+115,97	+20,83	-27,08	-45,65	-44,05

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne ± SEM (n =6 rats) ;
 (* p< 0.05, ^{***}p<0.001) comparativement aux rats témoins ;
 (^{##}p<0.01, ^{###}p <0.001) comparativement aux rats traités par le RDP.

Tableau 18 : Variation de l'activité de GST (nmol CDNB/min/mg de protéine) dans le foie, les reins et le cerveau.

Les organes	Groupes expérimentaux					
	C	RDP	Zn	HLU	RDP+Zn	RDP+HLU
Foie	0,13±0,02	0,05±0,002 ^{***}	0,04±0,006 ^{***}	0,07±0,004 ^{**}	0,06±0,01	0,09±0,01 ^{##}
%	/	-60,87	-69,01	-47,63	+18,32	+78,26
Reins	0,06±0,004	0,051±0,002 [*]	0,063±0,004	0,066±0,006	0,054±0,004	0,054±0,006
%	/	-14,40	+6,09	+9,97	+6,14	+4,85
Cerveau	0,018±0,001	0,009±0,001 ^{**}	0,029±0,004 ^{**}	0,029±0,001 ^{***}	0,029±0,001 ^{####}	0,024±0,002 ^{####}
%	/	-48,62	+61,46	+64,22	+210,71	+158,92

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne ± SEM (n =6 rats) ;
 (* p< 0.05, ^{**}p< 0.01, ^{***}P<0.001) comparativement aux rats témoins ;
 (^{##}p<0.01, ^{###}P<0.001) comparativement aux rats traités par le RDP.

3.2.3. Taux de catalase

Les résultats obtenus dans le **tableau 19** montrent une diminution très hautement significative de l'activité de la catalase dans le foie (-61,19%) et avec une diminution hautement significative au niveau des reins (-30,82%) et le cerveau (-47,06) chez le groupe reçu le pesticide comparativement au groupe témoin. Cependant, le traitement avec le zinc et l'huile de lin aboutit à une augmentation très hautement significative au niveau de foie et cerveau dans le groupe RDP+Zn et RDP+HLU par rapport au groupe témoin. Alors que notre résultat ne montre aucun changement significatif dans les reins après le traitement avec l'huile de *Linum usitatissimum* comparativement au groupe Roundup.

3.2.4. Taux du superoxyde dismutase

Nos résultats montrent une diminution très hautement significative de l'activité enzymatique de la SOD dans le foie et les reins chez les rats ont reçu le RDP. De plus, le traitement avec Zn aboutit à une amélioration très hautement significative dans le groupe RDP+Zn par rapport au groupe RDP, ainsi que dans le lot RDP+HLU par rapport au lot RDP (**figure 17**).

Tableau 19 : Variation de l'activité de la catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) dans le foie, les reins et le cerveau

Les organes		Groupes expérimentaux					
		C	RDP	Zn	HLU	RDP+Zn	RDP+HLU
Catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$)	Foie	347,5±35,67	134,83±8,46 ^{***}	310,08±26,09	328,83±23,00	292,83±25,98 ^{###}	347,66±21,4 ^{###}
	%	/	-61,19	-10,76	-5,37	+117,18	+157,84
	Reins	605±8,72	418,5±52,02 ^{**}	250,54±26,16	571,83±68,04	230,35±23,61 ^{###}	471,01±35
	%	/	-30,82		-5,48		+12,54
	Cerveau	170,74±33,21	81,21±8 ^{**}	161,17±13,89	205,25±10,2	119,81±16,03 ^{###}	196,18±8,41 ^{###}
	%	/	-52,43	-5,60	+20,20	+47,52	+141,55

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM (n=6 rats) ;

(^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001) comparativement aux rats témoins ;

(^{###}p<0.001) comparativement aux rats traités par le RDP.

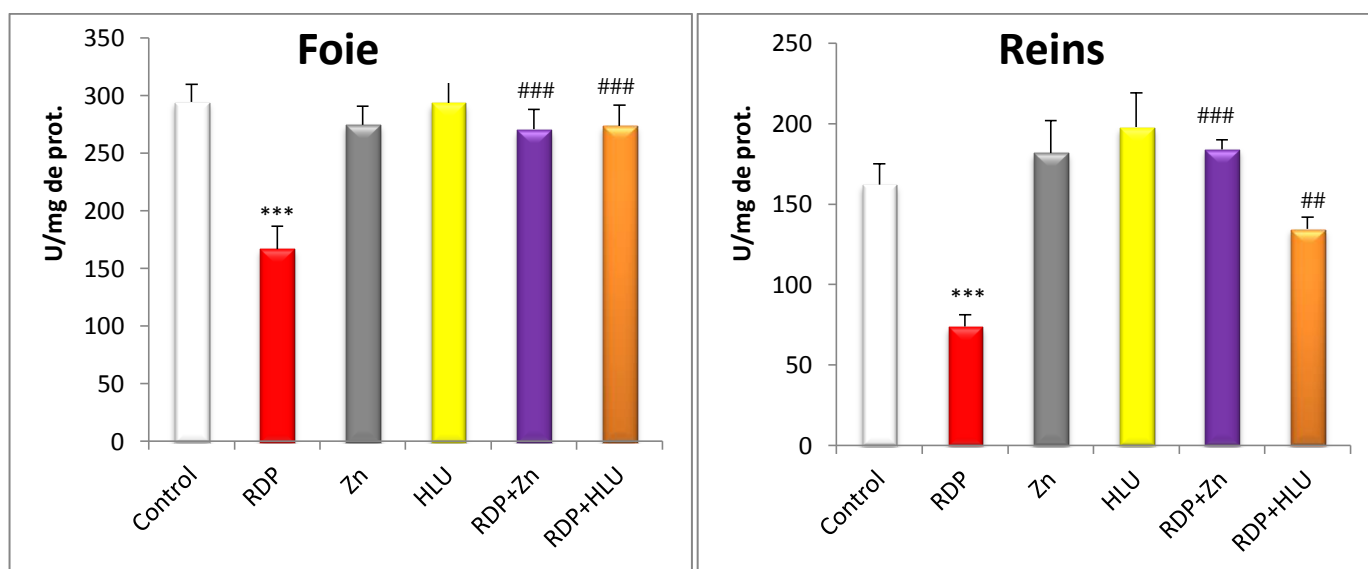


Figure 17 : Variation de l'activité de la SOD (U/mg de protéine) dans le foie et les reins.

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM (n=6 rats) ;

(^{***}p<0.001) comparativement aux rats témoins ;

(^{##}p<0.01, ^{###}p<0.001) comparativement aux rats traités par le RDP.

Discussion :

Le stress oxydatif est un facteur important impliqué dans les effets toxiques de nombreux contaminants environnementaux **(Cattani et al., 2017, Turkmen et al., 2019)**.

Le stress oxydant est également généré sous l'effet d'oxydants environnementaux. En effet, la vie moderne nous confronte à l'absorption d'alcool ou de médicaments, à l'exposition prolongée au soleil, au tabagisme et à la pollution, qui sont des situations provoquant une surproduction d'espèces réactives d'oxygène dans notre organisme. L'usage des pesticides est devenu une partie intégrante du système agricole moderne. Pendant des siècles, ces composés ont été utilisés en agriculture pour améliorer la production alimentaire par l'éradication des insectes indésirables et le contrôle des vecteurs de maladies **(Peris-Sampedro et al., 2015)**

Parmi les pesticides usuels, les organophosphorés (OP) sont largement utilisés en agriculture **(Ambali et al., 2010)**. Le RDP, un pesticide organophosphoré utilisé partout dans le monde en tant qu'un herbicide. **(Tang et al., 2017)**.

De plus, considérant que le stress oxydatif peut être impliqué dans les dommages tissulaires induits par les herbicides contenant du glyphosate au niveau du foie, des reins, du cerveau et du cœur **(Tizhe et al., 2014; Rebai et al., 2017)** conduisant de nombreuses maladies comme le cancer **(Li et al., 2013)** et les maladies reproductive **(de Liz Oliveira Cavalli et al., 2013)** et le diabète **(Tizhe et al., 2018)**.

L'utilisation d'oligo-éléments et les plantes médicinales aux propriétés antioxydantes pourraient prévenir ou remédier aux événements oxydatifs résultant de l'exposition à l'herbicide, La présente étude examine les effets de l'intoxication RDP sur les enzymes métabolisant les médicaments, qui jouent un rôle important dans la bio-activation et le métabolisme du Roundup dans le foie, les reins et le cerveau. Un objectif supplémentaire de cette étude était également de déterminer si l'huile de lin et le zinc pouvait atténuer la toxicité de ce pesticide en modifiant les activités de certaines ou de l'ensemble de ces enzymes métabolisant les médicaments, fournissant ainsi une justification de l'efficacité protectrice des ces antioxydants.

L'analyse de l'impact des ROS sur les membranes biologiques est réalisée par un test permettant de déterminer le degré de peroxydation des lipides et d'oxydation des protéines, L'augmentation du taux d'ERO à l'intérieur des cellules peut être due soit à une surproduction de ces substances réactives, soit à une diminution de leur capacité à les neutraliser **(Kirschvink et al., 2008)**.

Les cibles de l'oxydation des lipides sont les acides gras polyinsaturés (AGPI), C'est une réaction rapide d'ajout d'oxygène aux doubles liaisons d'acides gras, cette réaction conduit à la formation d'hydroperoxydes instables, ceux-ci sont rapidement décomposés pour produire de nombreux produits secondaires tels que les radicaux lipidiques libres qui contribuent à augmenter l'oxydation

d'autres molécules telles que les protéines, les acides nucléiques et d'autres lipides (**Cillard et Cillard 2006**).

Dans notre étude, le traitement des rats par le RDP a engendré une augmentation des niveaux de MDA et d'AOPPs par rapport au contrôle dans les organes étudiés. Cela indique que l'exposition au RDP peut entraîner une production excessive de MDA et donc un stress oxydatif par la génération non régulée des ROS (**El-Shenawy, 2009**). Cette production excessive de MDA peut s'expliquer par le fait que les défenses de l'organisme sont défaillantes et qu'elles sont devenues insuffisantes pour neutraliser les ROS. Cet échec de neutralisation a entraîné des dommages oxydatifs sous forme de peroxydation lipidique membranaire (LPO). Cette peroxydation est induite par la présence des peroxydes d'hydrogène (H_2O_2) formés lors du stress oxydatif et qui n'ont pas été convertis en eau et oxygène, mais ont été métabolisés en radicaux hydroxyles. Ces radicaux vont alors réagir avec les lipides des membranes plasmiques, induisant ainsi leurs peroxydations (**Drewa et al., 2002; Hermes-Lima, 2004**).

Les ROS attaquent particulièrement les acides aminés aromatiques qui possèdent un groupement thiol car ce sont les plus sensibles à l'oxydation des protéines (**Aydin et al., 2010**). En effet, nos résultats ont montré une augmentation des PCO. L'élévation de la concentration en PCO peut être due à la formation d'adduits entre certains résidus d'acides aminés et des produits de peroxydation lipidique tels que le MDA (**Stadtman et Levine 2006**).

Ces résultats ont été corrélés avec des rapports antérieurs d'**Abarikwu et al., (2015); Hamdaoui et al., (2016); Tang et al., (2017); et de Yazdinezhad et al., (2017)** qui suggéraient que le métabolisme des organophosphates (glyphosate et chlorpyrifos) pourrait générer des ROS, qui à leur tour pourraient conduire à une peroxydation lipidique et à une oxydation des protéines accrues. L'augmentation du taux de MDA suite à un traitement par le RDP est en accord avec les résultats de **Turkmen et al., (2019)** chez les rats qui ont signalé que l'augmentation des niveaux de MDA dans le foie, les reins, le cœur et le cerveau chez les rats recevant un herbicide à base de glyphosate.

En revanche, le traitement avec l'huile de *Linum usitatissimum* entraîne une diminution significative des dommages oxydatifs de la teneur en oxydation des protéines et des lipides au niveau du foie, des reins et du cerveau, chez le groupe traité RDP+HLU comparé au rats traité par le RDP. En conséquence, dans notre étude, la protection offerte par le HLU contre la toxicité de ce pesticide pourrait être due à la présence des antioxydants. L'acide gras oméga 3 et l'acide linoléique présents dans l'huile de lin crée un effet protecteur contre la peroxydation en régulation de la fluidité de la membrane cellulaire en limitant la réaction inflammatoire dans les différents tissus (**Karaca et Eraslan 2013**).

En outre, l'amélioration du profil lipidique est corrélée à l'amélioration des marqueurs de la peroxydation lipidique. Conformément à ces données, nos résultats ont montré que la diminution de

la cholestérolémie chez le groupe toxique traité avec l'huile de lin est accompagnée d'une diminution de la concentration en substances MDA, qui sont les marqueurs les plus utilisés pour l'évaluation de la peroxydation lipidique (Goyal et al., 2014). Nos résultats concordent avec ceux de plusieurs autres études comme celles publiées par Karaca et Eraslan (2013) et Saleem et al., (2020) qui ont constaté que le traitement avec la graine de lin provoque une diminution significative des teneurs de MDA hépatique et rénal chez des rats traité par les métaux lourds.

Ainsi, Pilar et al., (2017) qui ont conclu que l'huile de lin seul ou lignanes de graines de lin réduisait de manière significative le taux de MDA et PCO au niveau du plasma chez les rats à du syndrome métabolique, Ces résultats suggèrent que l'huile de lin a des propriétés apaisantes protège les tissus contre le stress oxydatif.

La normalisation des niveaux de LPO avec l'administration de zinc est naturellement attribuée à sa propriété anti-oxydante préventive qui empêche la formation d'espèces réactives de l'oxygène ou intercepte les espèces responsables de l'initiation de la lipoperoxydation ou peut également intercepter les propagateurs radicalaires de la peroxydation lipidique et retarder la peroxydation (période d'induction) (Schafer et Buettner 1999). Des études antérieures ont également proposé que le zinc provoque une inhibition endogène de la LPO pour stabiliser les biomembranes (Barkat et al., 2015). Afin de résister au désordre causé par le stress oxydatif, l'organisme dispose d'un ensemble complet d'enzymes et d'antioxydants endogènes pour résister à cette agression.

Pour se protéger des radicaux libres, les cellules ont développé des défenses antioxydantes endogènes et des systèmes de réparation qui empêchent l'accumulation de molécules endommagées (Favier, 2003), Le système de défense antioxydant non enzymatique telles que GSH et l'acide ascorbique (Vit C).

Dans notre étude expérimentale, nous avons constaté une réduction de taux cellulaire en GSH au niveau des tissus hépatiques, rénaux et nerveux des rats traités au RDP. Cette diminution de GSH observée indique qu'il y a eu activation des défenses antioxydantes, probablement en raison de la production accrue de H₂O₂ présente lors d'un stress oxydant et enclenchée dans notre cas par la toxicité de RDP (Almeida et al., 2017). En effet, le GSH participe dans plusieurs processus enzymatiques antioxydants intra et intercellulaires, Parmi ces processus, il y a son implication dans la détoxification des herbicides via le système glutathion S-transférase et aussi dans la détoxification contre des composés toxiques et les ERO (Sidhu et al., 2004). Effectivement, le GSH se comporte comme un co-substrat des enzymes antioxydants telles que le GPx qui va catalyser la conjugaison du GSH à des substrats endogènes tels que le H₂O₂, afin de former la glutathionne disulfure oxydée (GSSG) ainsi que de l'eau (Balszuweit et al., 2016).

De même, Lee et al., (2009) et Akaydin et al., (2020) ont suggéré que la diminution de la teneur cellulaire en GSH après le traitement des rats par le RDP pourraient être attribuées à l'activation de

la gamma glutamyl transférase (GGT) pour reconstituer le glutathion intracellulaire sur la surface sinusoidale des cellules hépatiques, car l'enzyme de dégradation du GSH est la GGT et par conséquent, une réduction de taux de glutathion.

La similarité de nos résultats dans la réduction accrue du taux de GSH dans les organes a été observée dans d'autres études rapportés par **Almeida et al., (2017)** qui ont montré que l'exposition des rats au Roundup entraîne une aggravation des signes de stress oxydatif hépatique. Aussi, **Turkmen et al., (2019)** ont trouvé des résultats similaires en termes de diminution du taux en GSH dans le foie, le cœur, les reins et le cerveau, Cependant, une autre étude rapportée par **Larsen et al., (2012)** a révélé que les niveaux de GSH dans le foie, les reins et l'intestin grêle des rats exposés au glyphosate avaient augmenté. Il a suggéré que cette synthèse accrue de GSH, en tant que réponse adaptative lors d'un stress oxydatif modéré.

La Vit C joue un rôle de protecteur du compartiment cellulaire contre les radicaux libres tels que les radicaux d'hydroxyle et de superoxyde et éteindre leur réactivité (**Djeffal et al., 2015**). Les rats traités au RDP présentaient un faible niveau significatif de cet antioxydant dans les tissus rénaux et hépatiques par rapport aux rats témoins. Nos résultats sont en accord avec les travaux d' **Hamdaoui et al., (2016)** réalisés sur des rates femelle traités par le glyphosate a entraîné une diminution de la vitamine C au niveau des reins. Une autre étude similaire réalisée par **Kasmi, et al., (2018)** indique que l'exposition au difenoconazole engendre un abaissement de l'acide ascorbique dans le foie.

Nos résultats montrent que la supplémentation en zinc a entraîné une amélioration importante au niveau de GSH, ce qui confère au zinc en tant que capteur de radicaux libres où a empêché l'oxydation des groupes sulfhydrile grâce aux propriétés de la métallothionéines (protéine riche en S). De manière constante, il a été suggéré que le zinc peut se lier aux groupes sulfhydriles et les protéger contre l'oxydation (**Ferretti et al., 2007**). En accord avec les données antérieures de qui ont montré que la supplémentation en zinc a considérablement augmenté le taux de GSH tissulaire au niveau du foie, des reins et cerveaux chez des rats traités par le méthidathion.

En revanche, l'administration de l'huile de lin aux rats traités par le RDP a amélioré la teneur de GSH et accompagnée par une augmentation du vit C. Ceci peut être expliqué par la présence des substances bioactives dans l'huile de lin qui augmente les défenses antioxydantes via la réduction des ROS (**Lee et al., 2010**). En effet, le lin contenait d'autres composants bioactives tels que les tocophérols huiles, graisses enrichies en acides gras oméga-3, fibres brutes et protéines responsables de son activité antioxydante (**Zou et al., 2017**).

La diminution significative de la GST dans les différents tissus chez les rats traités au RDP peuvent être une conséquence de la diminution du niveau de GSH qui est utilisé pour inhiber les enzymes et induire leur inactivation en cas de production excessive de H₂O₂ due à la peroxydation des lipides

(Bhondave et al. 2014). L'activité enzymatique de la GST est en bon accord avec d'autres études **(Abarikwu et al., 2015; Tang et al., 2017; Dar et al., 2018).**

Dans la présente étude, nous avons constaté que l'augmentation hautement significative de la GPx des rats après exposition au RDP peut être due au mécanisme de synthèse accrue de cette enzyme, qui est activement impliquée dans la réduction de la génération de H₂O₂. Cependant, **Djeffal et al., (2015)** ont suggéré qu'une activité enzymatique du CAT élevée sert à contrecarrer le stress oxydatif induit par le pesticide ou c'est aussi un moyen d'adaptation de l'organisme.

En revanche, d'autre étude **Daret al., (2019)** montre une diminution au taux de GPx au rats traités avec le Roundup avec une dose de 500 mg/kg P.C. pendant 120 jours.

Ainsi en matière de protection contre les altérations peroxidatives, les organes cibles (foie, rein, cerveau) font recours à l'action des enzymes antioxydantes qui sont essentielles pour le maintien de la balance prooxidant/antioxydant. Par suite nos résultats montrent que deux facteurs importants de la barrière enzymatique endogène responsable de la conversion des radicaux libres et protégeant les cellules de lésions oxydatives, c'est à dire la SOD et la CAT, sont nettement affectés par le RDP. Comparativement aux témoins, les activités des enzymes antioxydantes sont largement modifiées dans les foies, les reins et les cerveaux des rats traités.

En accord avec les données antérieures d'**Abbassy et al., (2014); Zemmouri et al., (2017).** Nous avons obtenu une diminution des activités de CAT et SOD chez des rats traités par le Roundup en comparaison avec celles des témoins. De telles diminutions peuvent être associées à la production des aldéhydes durant le phénomène de la peroxydation lipidique. Ces composés ont la capacité d'augmenter le stress oxydatif, par activation de la consommation cellulaire du glutathion. Plusieurs travaux récents ont trouvé une diminution significative de la CAT et la SOD chez les rats traités par le RDP ce qui confirme nos résultats **(Astiz et al. 2009; Cavalli et al., 2013; Hamdaoui et al., 2019).**

De nombreux auteurs ont montré que l'induction de ces enzymes antioxydantes indiquait un début d'adaptation du système de défense d'oxydo-réduction, alors que l'inhibition est censée contribuer au stress oxydatif suite à une intoxication au RDP **(Astiz et al., 2009; Cavalli et al., 2013; Hamdaoui et al., 2019).** En effet, les travaux de recherche de **Tang et ses collaborateurs (2017)** ont montré une augmentation significative de l'activité enzymatique de la CAT dans le sérum des rats traités au glyphosate ainsi que le taux de H₂O₂ dans les tissus hépatiques.

Par ailleurs, le traitement des rats par l'huile de *Linum usitatissimum* a engendré une amélioration importante des activités enzymatiques de la GPx, la GST de la SOD et de la CAT dans le foie, les reins et le cerveau qui reviennent à la normale.

L'effet antioxydant de l'huile observé dans notre étude pouvait être dû à la présence de lignanes qui sont les plus efficaces pour le piégeage des radicaux libres (radical OH notamment) et qui induit la réduction du stress oxydant (**Kaur et al., 2017**).

Plusieurs travaux de recherche ont soulignés que l'huile de lin présente une source importante d'oligoéléments qui sont des cofacteurs pour les enzymes antioxydantes.

Ainsi, *Linum usitatissimum* appartient à la famille *Linacea*, est riche en minéraux qui sont généralement associés à de grandes quantités de magnésium et de chrome (**Zhang et al., 2008**). Les résultats obtenus chez les rats traités avec la graine de lin peuvent être une indication de la biodisponibilité de ces substances minérales pour la formation de ces enzymes.

Plus récemment **Pilar, et al., (2017)** ont démontré que l'huile de lin et leurs lignanes provoquent une diminution au niveau de la CAT, la SOD et la GPx au niveau de plasma et foie des rats atteint de syndrome métabolique.

Après la supplémentation au zinc, les niveaux d'enzymes GST, GPx, CAT et SOD ont eu tendance à se normaliser en raison de la propriété antioxydante du zinc. Il a une relation avec de nombreuses enzymes de l'organisme (**Powell, 2000**). En effet, le zinc protège les cellules contre les espèces réactives oxygénées et les toxines bactériennes, il augmente l'activation des protéines et des enzymes antioxydantes tels que le glutathion, la catalase et la superoxyde dismutase (**Salehipour et al., 2017**).

D'autre part, l'amélioration du taux de la SOD peut être expliquée par le fait que le zinc est un cofacteur important pour de nombreuses enzymes antioxydantes et que sa présence est essentielle et permet d'améliorer l'activité de la superoxyde dismutase (**Lee et al., 2012**). Le zinc est aussi impliqué dans la stabilisation de la structure de l'enzyme SOD, qui est importante pour le maintien de l'activité catalytique du SOD. Donc la supplémentation en zinc dans notre expérimentation a permis de restaurer l'activité enzymatique antioxydante de la SOD.

Les travaux de recherche d'**Elwej et al., (2018)** ont révélé que le Zn a montré des effets prometteurs sur la CAT, la SOD, la GPx, et la GST contre la toxicité du barium dans le cervelet des rats chez la mère à ses petits à travers le lait maternel. En outre, l'effet protecteur du zinc a été aussi rapporté par **Mard et al. (2017)** sur les lésions hépatiques induites par l'ischémie reperfusion chez les rats et par l'étude de **Bhardwaj et Dhawan (2019)** contre la toxicité induite par l'arsenic chez le rat.

4. L'activité de l'acétylcholinestérase au niveau cérébrale :

Les résultats obtenus montrent qu'il a eu une diminution significative de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (AChE) dans le cerveau des rats traités par le Roundup comparativement au groupe témoin. Par contre, on enregistre un rétablissement par une augmentation statistiquement hautement significative de l'activité enzymatique de l'AChE chez les groupes traités par les combinaisons Roundup plus Zinc et une augmentation très hautement significative chez les rats traités au pesticide et huile de lin par rapport aux rats recevant que l'organophosphate (**Figure 18**).

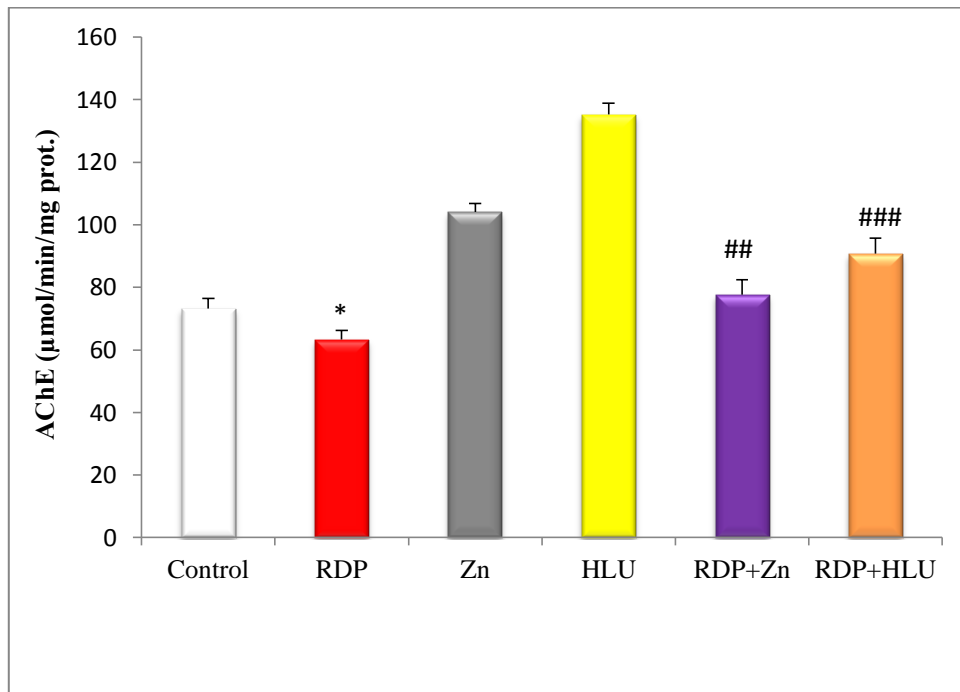


Figure 18: Variation de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protéine) dans le cerveau.

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM (n =6 rats) ;
(* $p < 0.05$) comparativement aux rats témoins ;
(## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$) comparativement aux rats traités par le RDP.

Discussion :

Le Roundup provoque un stress oxydatif dans divers types de cellules/tissus, ce qui entraîne la formation de radicaux libres, la peroxydation des lipides et des altérations du système antioxydant. Il modifie les profils d'expression de l'ARNm dans les cellules du cerveau, inhibe la synthèse des protéines et de l'ADN, à la fois *in vitro* et *in vivo*. Plusieurs études ont suggéré un potentiel génotoxique du Roundup et neuroinflammatoire (**El-Shenawy, 2009; Rebai et al., 2017**).

La réduction de l'activité de l'AChE cérébrale observée dans notre étude suite à l'exposition des rats au RDP est en accord avec des études antérieures d'**El-Demerdash et al., (2001)** qui ont rapporté que le RDP exerce un effet inhibiteur sur l'enzyme AChE sérique. D'autres travaux de recherche ont rapporté l'effet inhibiteur de RDP sur l'AChE murin et ce dans les érythrocytes (**Kwiatkowska et al., 2014**), et à la fois dans le plasma et le cerveau (**Larsen et al., 2016**).

L'accumulation d'acétylcholine due à la réduction de l'activité de l'enzyme, l'inhibition à long terme de l'AChE par l'OP dans le cerveau peut conduire à un excès d'acétylcholine dans les synapses cholinergiques, entraînant une excitation prolongée des neurones post-synaptiques, des dommages excitotoxiques et une dégénérescence du système cholinergique (**Gallegos et al., 2018**). En effet, **Cattani et al., (2017)** ont démontré que l'exposition maternelle au Roundup diminue l'activité de la cholinestérase dans l'hippocampe des descendants immatures et jeunes adultes exposés. De même, **Bali et al., (2019)** ont montré que le traitement subchroniques et chroniques des souris par le GBH (glyphosate à base d'herbicide) diminuent l'activité de l'AChE dans le cerveau et dans l'hippocampe.

Le traitement des rats avec l'huile de lin entraîne une augmentation de l'activité enzymatique de l'AChE dans le cerveau, cela grâce à la richesse des graines de *Linum usitatissimum* en acide linoléique et oméga-3, neutralisant l'effet des radicaux libres et limitant la réaction inflammatoire (**Purushothaman et al. 2014**).

Des résultats similaires publiés par **Akay et al., (2022)**, ont montré que les acides gras oméga-3 permet de protéger contre le stress oxydatif induit par le RDP via la réduction de la production de radicaux libres oxygénés et l'amélioration de l'activité antioxydante de l'AChE.

De plus, nos résultats ont montré que l'administration du zinc avec le RDP augmente l'activité de l'AChE dans le cerveau. Cela peut être dû au fait que le zinc agit comme un neuro-modulateur dans divers processus de transduction du signal, où que son fort comportement antioxydant régule le métabolisme neuronal (**Singla et Dhawan 2014**).

5. Etude histologique

5.1. Etude histologique du foie :

La figure 20 montre des coupes histologiques colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (H-E) réalisées au niveau du foie chez différents groupes. Nos résultats montre que chez les rats témoins (C), le tissu hépatique se présente sous la forme de lobules hépatiques hexagonaux et chaque

lobule est formé par des hépatocytes bien anastomosés qui sont disposés en travées aplaties autour d'une veine centro-lobulaire, et à la périphérie de chaque lobule naissent des sinusoides cheminant entre les lames hépatocytaires, menés chacun d'une cellule endothéliale rappelant une structure hépatique ordinaire (**Fig. 20A**). Cependant, les sections du foie chez les rats traités par le RDP ont montré des changements remarquables, en comparaison avec ceux du témoin, reflétant la présence d'une infiltration de cellules mononucléaires, une expansion péri-portale, un gonflement et une dégénérescence des hépatocytes, grande zone de nécrose, congestion vasculaire et espaces sinusoidaux dilatés (**Fig. 20B à E**).

Toutefois, l'association du Zn (Zn+RDP) ou de l'HLU (HLU+RDP), a révélé une protection contre la toxicité de le RDP, qui se traduit par l'amélioration des atteintes structurales mises en évidence chez les animaux traités au RDP seul, ainsi, nous avons noté une amélioration de l'architecture des hépatocytes avec atténuation du nombre des dilatations sinusoidales et de la régression du foyer des nécroses (**Fig. 20F et G**). Aucune altération histologique du foie n'a été observée chez les groupes Zn, HLU et témoin (**Fig. 20H et I**).

5.2. Etude histologique des reins:

L'examen histopathologique des reins a montré une histologie normale dans le groupe témoin (**Fig. 21A**). Cependant, les reins des rats exposés au Roundup présentaient des lésions glomérulaires caractérisées par un espace de Bowman réduit, atrophié et effondrement des glomérules de Malpighi, atteinte tubulo-interstitielle des zones de suffusion hémorragique et dilatation des tubules contournés proximaux (**Fig. 21B**). Toutefois,, la co-administration de Zn ou HLU avec RDP a entraîné une réduction de l'espace de Bowman et de la morphologie cellulaire normale dans le rein par rapport au groupe traité par Roundup (**Fig. 21C et D**). Aucune altération histologique des reins n'a été observée entre le groupe Zn ou HLU et le groupe témoin de rats (**Fig.21E et F**).

5.3. Etude histologique du cerveau:

L'examen histopathologique du cerveau a montré une histologie normale dans le groupe témoin (**Fig. 22A**). Le groupe auquel le Zn et HLU a été administré (**Fig. 22E et F**), des modifications histopathologiques ont été observées comme normales dans le cerveau. Des modifications dégénératives et une gliose focale (**Fig. 22B**) ont été observées dans les tissus cérébraux dans le groupe RDP. Cependant, la co-administration de Zn ou HLU avec RDP a entraîné très peu de changements histopathologiques ont été observés dans les tissus cérébraux dans les groupes (**Fig.22C et D**).

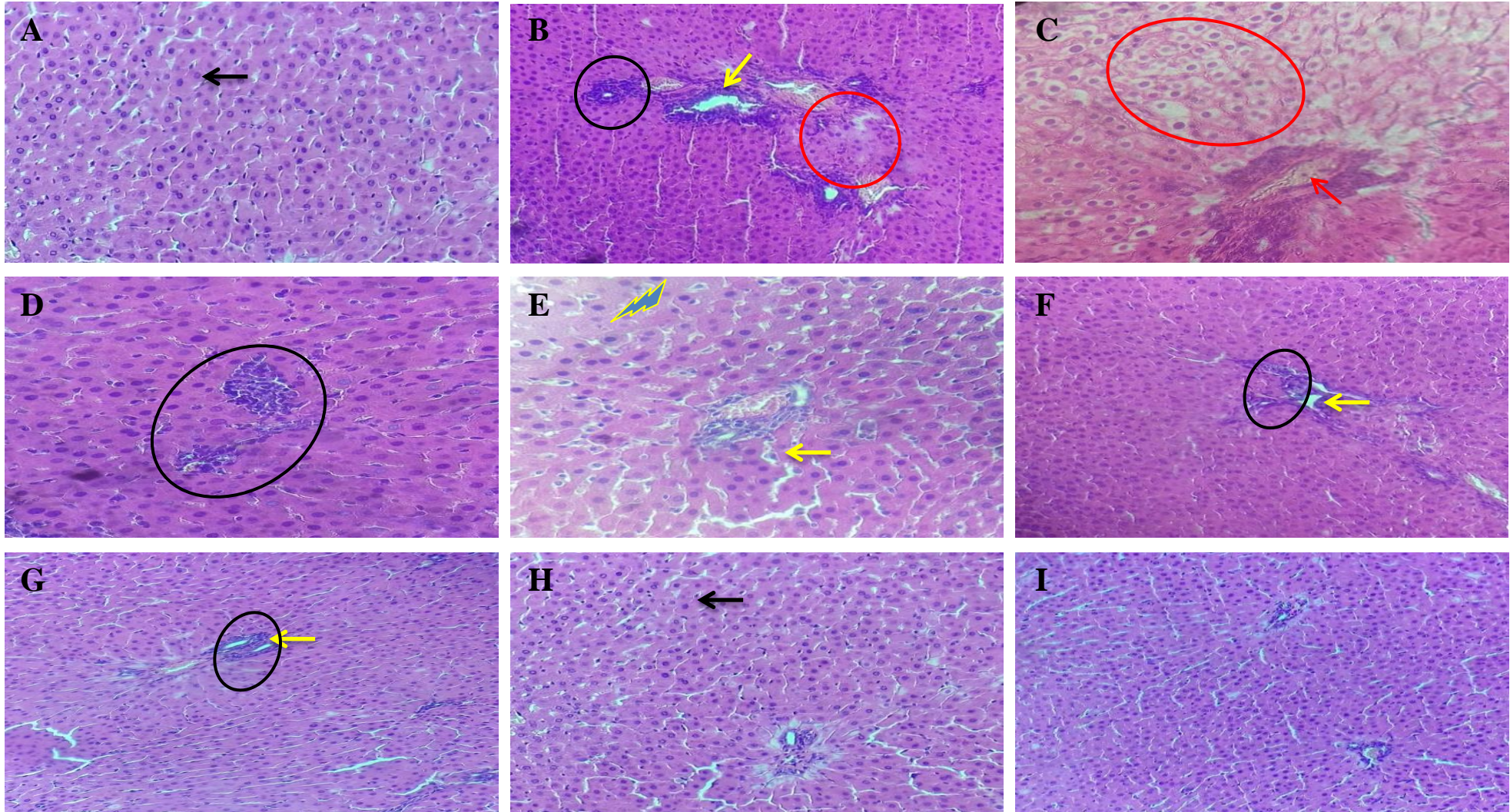


Figure 19: Les coupes histologiques colorées H & E du foie ($\times 40$) du foie Contrôles (A), traités avec RDP (B à E), Zn co-administré avec RDP (F) et HLU co-administré avec RDP (G), Zinc (H), *Linum usitatissimum* (I) après 4 semaines de traitement. Congestion vasculaire (flèche rouge), infiltration mononucléaire (cercle noir), hépatocyte (flèche noire) et dilatation des sinusoides (flèche jaune), nécrose (⚡) et dégénérescence et gonflement des hépatocytes (cercle rouge).

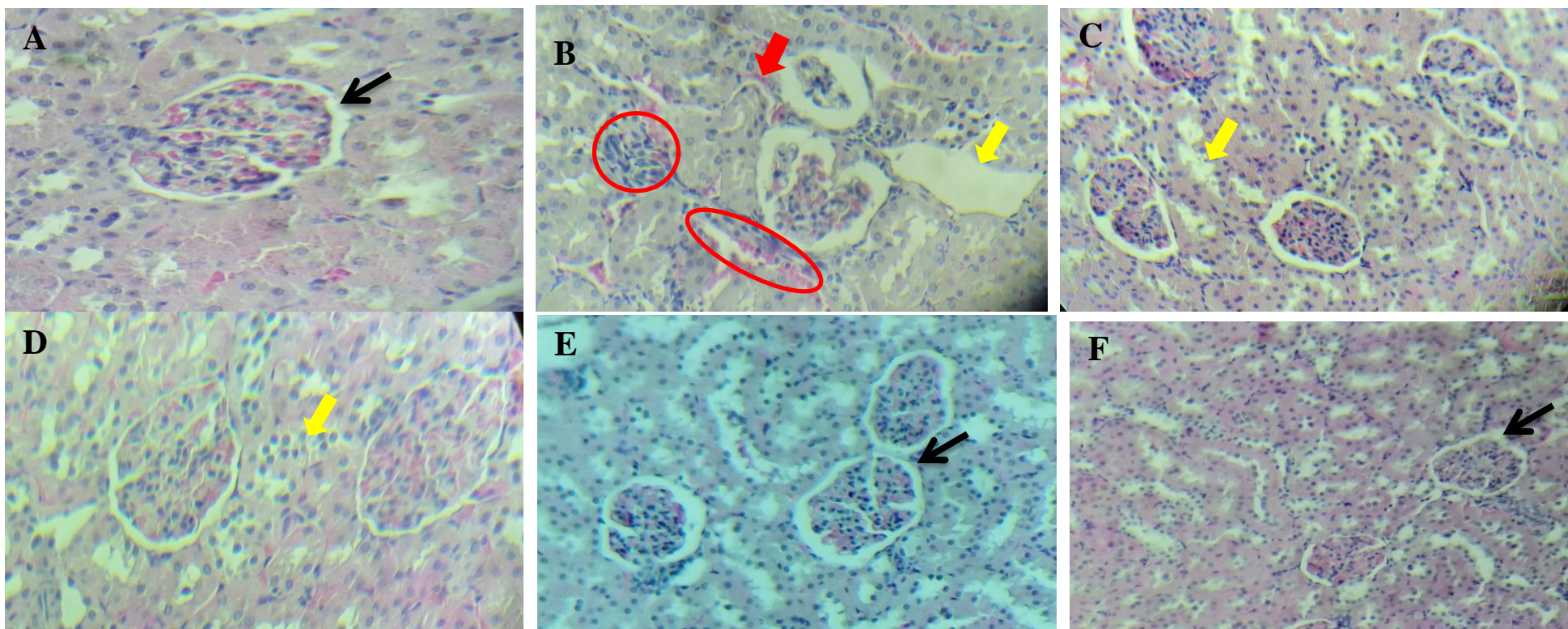


Figure 20 : Les coupes histologiques colorées H & E des reins ($\times 40$). Contrôles (A), traités avec RDP (B), Zn co-administré avec RDP (C) et HLU co-administré avec RDP (D), Zinc (E), *Linum usitatissimum* (F) après 4 semaines de traitement. Espace de Bowman (flèche noire), dilatation tubulaire (flèche jaune), hémorragique (cercle) et Malpighien atrophié et effondré (flèche rouge).

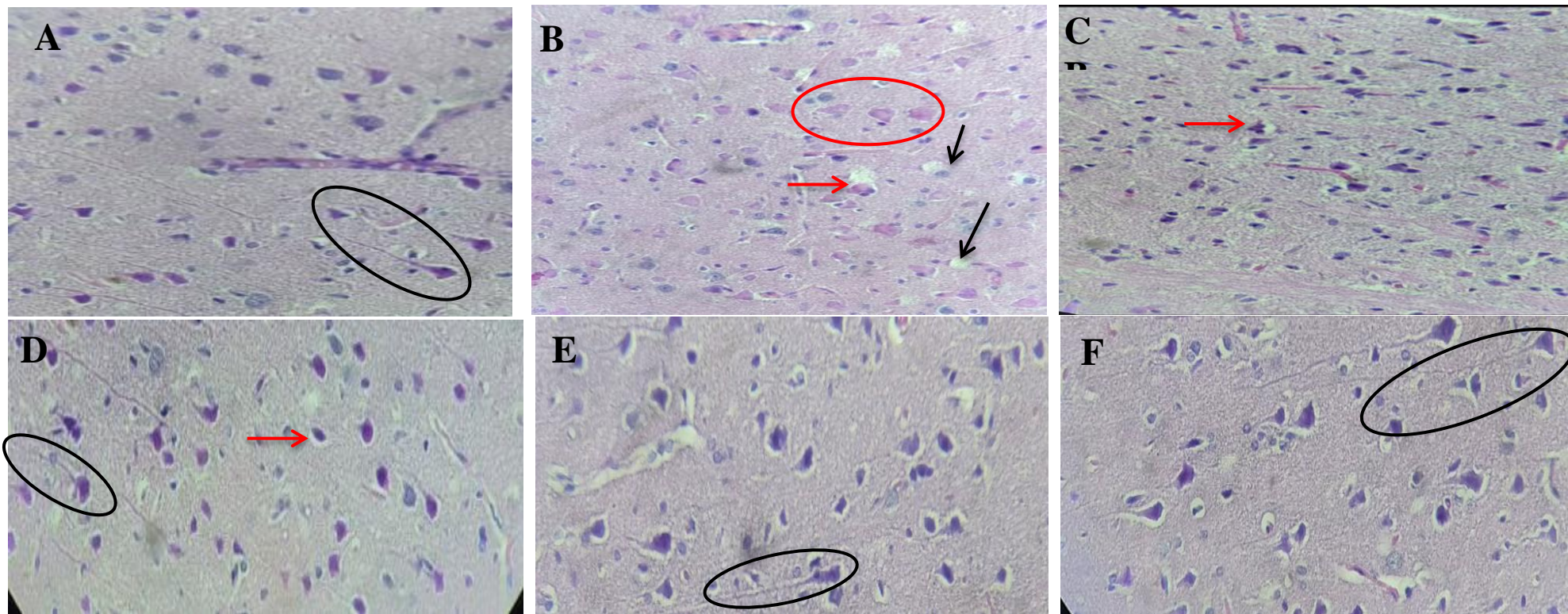


Figure 21 : Les coupes histologiques colorées H & E du cerveau ($\times 40$). Contrôles (A), traités avec RDP (B), Zn co-administré avec RDP (C) et HLU co-administré avec RDP (D), Zinc (E), *Linum usitatissimum* (F) après 4 semaines de traitement. Neurones (cercle noir), dégénérescence neuronale (cercle rouge), vacuoles (flèche noire), gliose focale autour des neurones (flèche rouge).

Discussion :

Dans le but de conforter les résultats précédents sur la toxicité du Roundup, ainsi que l'étude de l'effet antioxydant de l'huile de *Linum usitatissimum* et le Zinc, une analyse histopathologique a été effectuée au niveau des tissus hépatiques, rénaux et cérébraux.

L'étude histologique figure en étroite corrélation avec l'étude biochimique et a montré que le RDP a induire un grand nombre des changements histologiques au niveau du foie. Parmi les symptômes pathologiques observés dans le présent travail, nous avons noté l'abondance remarquable d'infiltration leucocytaire, l'augmentation du nombre des cellules de Kupffer, la dilatation des sinusoides et la vacuolisation cytoplasmique. Ces mêmes observations ont été également signalées par **Tang et al., (2017)**. Tandis que dans les reins, des modifications dégénératives des cellules épithéliales du tubule et des zones de dilatation et de génération vacuolaire ont été observées dans la capsule de Bowman du glomérule. Par ailleurs, les paramètres biochimiques sont compatibles avec les observations microscopiques du foie et des reins. La nécrose observée chez les rats au niveau des tissus hépatiques et rénaux est très cohérente avec nos résultats relatifs à l'exploration biochimique.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par d'autres études qui ont démontré que l'organophosphate, à savoir le RDP, produisait des changements histopathologiques dans les tissus hépatiques et rénaux chez les rats (**Larsen et al., 2012; Abarikwu et al., 2015; Al-Attar, 2015**). Ces résultats sont cohérents avec des études récentes de **Turkmen et al., (2019)** qui ont mentionnés que le glyphosate est à l'origine des changements histopathologiques chez les rats mâles. Ces résultats ont montré des lésions hépatiques objectivées par la présence d'une dilatation des sinusoides, d'une hyperémie et d'une dégénérescence des hépatocytes. Des changements au niveau des neurones et gliose focale autour des neurones du cerveau ont été signalés.

Nos résultats sont en conformité avec les travaux d' **Hamdaoui et al., (2016) et d'Hamdaoui et al., (2019)**, qui ont démontré que l'exposition des rats au Kalach 360 KL par voie orale pendant 60 jours peut engendrer un état de stress oxydant mis en évidence par la production des radicaux libres qui s'accompagne par une réaction inflammatoire péri-tubulaire, une néphrose, un glomérule fragmenté, des cellules épithéliales nécrotiques et une dilatation tubulaire se sont produits dans le rein. Une atteinte du parenchyme hépatique provoque l'activation des cellules de Kupffer (macrophages du foie), et les hépatocytes occasionnant la production de nombreuses cytokines (réaction inflammatoire). L'exploration

histopathologique du cerveau a montré une neuronophagie et une gliose focale qui ont été observés autour des neurones dans le cerveau des rats traités par le RDP. Des enquêtes antérieures ont montré que le glyphosate avait été détecté dans le cerveau de porcelets malformés (**Krüger et al., 2014**) et s'est également avéré avoir un effet neurotoxique et on suppose que le substantia nigra, le cortex cérébral et l'hippocampe sont les régions cérébrales les plus vulnérables altérées par le stress oxydatif causé par le glyphosate. En conséquence, les hydroperoxydes accumulés dans les tissus ont assurément provoqué une cytotoxicité associée à la peroxydation des phospholipides membranaires, qui endommage divers composants de la membrane cellulaire (**Cattani et al., 2014**).

Le zinc a amélioré les changements histologiques du foie et du cervelet induits par le RDP. Le Zn exerce ses propriétés antioxydantes par la régénération d'enzymes liées à la membrane. Il répare efficacement les dommages à l'ADN en éliminant les signaux d'apoptose et en inhibant la LPO et l'oxydation des protéines (**Sidhu et al. 2004; Varghese et al., 2009**). Nos résultats sont cohérents avec ceux de **Sidhu et al., (2004)** qui ont observé cet effet hépatoprotecteur du zinc lors de l'évaluation du potentiel de toxicité du nickel. En outre, **Elwej et al., (2018)**, ont noté que le Zn et le Se amélioreraient les changements histologiques cérébelleux induits par le Barium.

La co-administration en HLU a amélioré les altérations histologiques induites par le RDP en présentant moins de dégâts au niveau histologique. Cette amélioration peut être attribuée à l'efficacité de HLU en réduisant le niveau intracellulaire des radicaux libres dans les hépatocytes afin d'éviter ces dommages cellulaires induits par le stress oxydatif. Cet effet protecteur de HLU a été établie par les recherches de **Pilar et al., (2017)**.

L'activité protectrice d'HLU a été démontrée chez le rat avec une toxicité hépatique, rénale, cervical induite par le RDP. Ceci suggère, grâce à ses constituants phénoliques, peut protéger contre l'oxydation et les dommages membranaires cellulaires. En effet, la présence des composés bioactifs notamment les acides gras oméga-3 et d'ALA dans l'huile de *L. usitatissimum* pouvait supprimer les radicaux libres générés et atténuer l'état de stress oxydatif (**Yang et al., 2012**).

Par ailleurs, un effet protecteur des graines de lin a également été rapporté contre le thioclopride (**Hendawi et al., 2016**), le cadmium (**Karaca et Eraslan 2013**), l'astaxanthine (**Xu et al., 2017**) , et la stéatose hépatique (**Gonçalves et al., 2018**).

***CONCLUSION ET
PERSPECTIVE***

Conclusion :

Linum usitatissimum, de la famille des *Linaceae*, a été largement utilisée, depuis des siècles, pour la prévention et le traitement de différentes pathologies.

Les résultats de la présente étude ont montré que l'huile de lin possède des propriétés antioxydantes importantes grâce à ces métabolites secondaires (polyphénols totaux, flavonoïdes, les tanins et flavonols).

Dans le cadre de la valorisation du potentiel thérapeutique de cette huile, nous avons étudié son effet contre la cytotoxicité induite par le Roundup.

En ce qui concerne l'administration Roundup dans l'eau du boisson à raison de 269,9mg/kg chez les rats pendant 30 jours, nos résultats montrent dans un premier temps que ce pesticide provoque des perturbations au niveau de la fonction hépatique, rénale et au niveau cérébral, se traduisant par une augmentation des marqueurs biochimiques de la fonction hépatique, rénale et métabolisme lipidique.

Aussi, nos résultats montrent clairement une perturbation du système de défense antioxydant, d'une part, par l'augmentation de la peroxydation lipidique et de l'oxydation des protéines, et d'autre part, via l'épuisement du système de défense enzymatique. Ce déséquilibre de la balance entre les radicaux libres et les systèmes antioxydants est confirmé par des lésions au niveau des membranes cellulaires.

La supplémentation du zinc ou huile de *Linum usitatissimum* chez les rats administrés le Roundup a provoquée:

- ❖ L'amélioration des paramètres physiologique.
- ❖ Une réduction de l'activité des biomarqueurs de la cytolyse et de l'état inflammatoire (ASAT, ALAT, LDH, et PAL).
- ❖ Une correction des taux plasmatiques en créatinine, urée et en acide urique.
- ❖ Une correction des taux plasmatiques en glucose, en bilirubine, en triglycérides et en cholestérol total.
- ❖ Une baisse de la peroxydation lipidique et oxydation des protéines engendrant une protection contre les lésions des membranes cellulaires.
- ❖ Restauration du taux de glutathion réduit (GSH) et Vit C en amplifiant sa synthèse et en réduisant sa dégradation.
- ❖ Une régulation de l'activité des enzymes antioxydantes (GPx, GST, SOD et CAT).
- ❖ Atténuation des effets cytotoxiques de RDP sur l'histoarchitecture des organes étudiés.

En perspective, il serait intéressant de développer ces recherches d'un point de vue opérationnel par approfondissement de la connaissance sur l'appréciation de la détoxification de l'organisme. Ces travaux ouvrent un certain nombre de perspectives qu'il serait souhaitable de :

- ✓ La réalisation des études approfondies et complémentaires de l'activité antibactérienne des composés phénoliques.
- ✓ La détermination des composés phénoliques par des méthodes chromatographiques (HPLC).
- ✓ Étudier les capacités de détoxification à travers les dosages de métallothionines ainsi que les protéines de stress Heat Shock Protein (HSP).
- ✓ Approfondir les recherches du mécanisme d'action du pesticide in vivo : des études plus approfondies (étude de génotoxicité pour la recherche d'un dommage de l'ADN ou des études de biologie moléculaire permettant de savoir si une atteinte de l'ADN serait déclenchée de façon directe).



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUE

Références bibliographique

*A*barikwu, S. O., O. F. Akiri, M. A. Durojaiye and A. Adenike (2015). "Combined effects of repeated administration of Bretmont Wipeout (glyphosate) and Ultrazin (atrazine) on testosterone, oxidative stress and sperm quality of Wistar rats." *Toxicol Mech Methods* **25**(1): 70-80.

Abbassy, M. A., M. A. Marzouk, S. A. Mansour, H. A. Shaldam and A. Mossa (2014). "Impact of oxidative stress and lipid peroxidation induced by lambda-cyhalothrin on p450 in male rats: the ameliorating effect of zinc." *J. Environ. Anal. Toxicol* **4**(4): 1-5.

Abidi, A., S. Bahri and S. B. K. JAMELEDDINE (2019). "CARACTERISTIQUES PHYTOCHIMIQUES ET THERAPEUTIQUES DU LIN OU LINUM USITATISSIMUM: REVUE DE LA LITTÉRATURE".

Adolphe, J. L., S. J. Whiting, B. H. Juurlink, L. U. Thorpe and J. Alcorn (2010). "Health effects with consumption of the flax lignan secoisolariciresinol diglucoside." *British Journal of Nutrition* **103**(7): 929-938.

Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, Elsevier. **105**: 121-126.

Ahmad, N., N. Akhtar and S. Ali (2012). "Effects of Aqueous Methanolic Extract of Flax Seeds (*Linum usitatissimum*) on Serum Estradiol, Progesterone, Kidney and Liver Functions and Some Serum Biochemical Metabolites in Immature Female Rats." *Pakistan Veterinary Journal* **32**(2).

Akay, M. B., K. Şener, S. Sari and E. Bodur (2022). "Inhibitory Action of Omega-3 and Omega-6 Fatty Acids Alpha-Linolenic, Arachidonic and Linoleic acid on Human Erythrocyte Acetylcholinesterase." *The Protein Journal*: 1-8.

Akaydın, S. Y., E. M. Salihoğlu, D. G. Güngör, H. Karanlık and S. Demokan (2020). "Correlation between gamma-glutamyl transferase activity and glutathione levels in molecular subgroups of breast Cancer." *European Journal of Breast Health* **16**(1): 72.

Al-Attar, A. M. (2015). "Effect of grapeseed oil on diazinon-induced physiological and histopathological alterations in rats." *Saudi J Biol Sci* **22**(3): 284-292.

Alachaher, F., S. Dali, N. Dida and D. Krouf (2018). "Comparison of phytochemical and antioxidant properties of extracts from flaxseed (*Linum usitatissimum*) using different solvents." *International Food Research Journal* **25**(1).

Almeida, L. L., A. A. C. Teixeira, A. F. Soares, F. M. D. Cunha, V. A. D. J. Silva, L. D. Vieira Filho and V. Wanderley-Teixeira (2017). "Effects of melatonin in rats in the initial

third stage of pregnancy exposed to sub-lethal doses of herbicides." *Acta Histochem* **119**(3): 220-227.

Alu'datt, M. H., T. Rababah, K. Ereifej and I. Alli (2013). "Distribution, antioxidant and characterisation of phenolic compounds in soybeans, flaxseed and olives." *Food chemistry* **139**(1-4): 93-99.

Aly, H. and M. Mantawy (2012). "Comparative effects of zinc, selenium and vitamin E or their combination on carbohydrate metabolizing enzymes and oxidative stress in streptozotocin induced-diabetic rats." *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **16**(1): 66-78.

Ambali, S., A. Abubakar, M. Shittu, L. Yaqub, S. Anafi and A. Abdullahi (2010). "Chlorpyrifos-induced alteration of hematological parameters in Wistar rats: ameliorative effect of zinc." *Research Journal of Environmental Toxicology* **4**(2): 55-66.

Anadón, A., M. Martínez-Larrañaga, M. Martínez, V. Castellano, M. Martínez, M. Martín, M. Nozal and J. Bernal (2009). "Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats." *Toxicology Letters* **190**(1): 91-95.

Anwar, F. and R. Przybylski (2012). "Effect of solvents extraction on total phenolics and antioxidant activity of extracts from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.)." *ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* **11**(3): 293-302.

Appenroth, D., E. Karge, G. Kießling, W. J. Wechter, K. Winnefeld and C. Fleck (2001). "LLU- α , an endogenous metabolite of γ -tocopherol, is more effective against metal nephrotoxicity in rats than γ -tocopherol." *Toxicology letters* **122**(3): 255-265.

Aroonvilairat, S., W. Kespichayawattana, T. Sornprachum, P. Chaisuriya, T. Siwadune and K. Ratanabanangkoon (2015). "Effect of pesticide exposure on immunological, hematological and biochemical parameters in Thai orchid farmers—a cross-sectional study." *International journal of environmental research and public health* **12**(6): 5846-5861.

Aroonvilairat, S., C. Tangjarukij, T. Sornprachum, P. Chaisuriya, T. Siwadune and K. Ratanabanangkoon (2018). "Effects of topical exposure to a mixture of chlorpyrifos, cypermethrin and captan on the hematological and immunological systems in male Wistar rats." *Environmental toxicology and pharmacology* **59**: 53-60.

Astiz, M., M. J. de Alaniz and C. A. Marra (2009). "Antioxidant defense system in rats simultaneously intoxicated with agrochemicals." *Environ Toxicol Pharmacol* **28**(3): 465-473.

Ayad, A., H. Merzouk, S. A. Merzouk and M. Narce (2013). "Blood oxidant/antioxidant status in overfed aging rats: comparative effects of sunflower and olive-linseed mixture oil rich diets." *Biomed Environ Sci* **26**(9): 765-768.

Aydin, S., P. Atukeren, U. Cakatay, H. Uzun and T. Altug (2010). "Gender-dependent oxidative variations in liver of aged rats." *Biogerontology* **11**(3): 335-346.

- Bali, Y. A., N. E. Kaikai, S. Ba-M'hamed and M. Bennis (2019). "Learning and memory impairments associated to acetylcholinesterase inhibition and oxidative stress following glyphosate based-herbicide exposure in mice." *Toxicology* **415**: 18-25.
- Balszuweit, F., G. Menacher, A. Schmidt, K. Kehe, T. Popp, F. Worek, H. Thiermann and D. Steinritz (2016). "Protective effects of the thiol compounds GSH and NAC against sulfur mustard toxicity in a human keratinocyte cell line." *Toxicology letters* **244**: 35-43.
- Baltaci, A. K., K. Yuce and R. Mogulkoc (2018). "Zinc metabolism and metallothioneins." *Biological trace element research* **183**: 22-31.
- Barakat, L. A. and R. H. Mahmoud (2011). "The antiatherogenic, renal protective and immunomodulatory effects of purslane, pumpkin and flax seeds on hypercholesterolemic rats." *North American journal of medical sciences* **3**(9): 411.
- Barkat, L., A. Boumendjel, C. Abdennour, M. S. Boulakoud, A. El Feki and M. Messarah (2015). "Methidathion-induced hematological, biochemical and hepatohistological alterations in rat: Ameliorative effects of selenium and zinc." *African Journal of Biotechnology* **14**(21): 1796-1806.
- Bashandy, S. A., A. Alaamer, S. A. A. Moussa and E. A. Omara (2018). "Role of zinc oxide nanoparticles in alleviating hepatic fibrosis and nephrotoxicity induced by thioacetamide in rats." *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **96**(4): 337-344.
- Baudler, S., W. Krone and J. Brüning (2003). "Genetic manipulation of the insulin signalling cascade in mice—potential insight into the pathomechanism of type 2 diabetes." *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* **17**(3): 431-443.
- Bekhit, A. E.-D. A., A. Shavandi, T. Jodjaja, J. Birch, S. Teh, I. A. M. Ahmed, F. Y. Al-Juhaimi, P. Saeedi and A. A. Bekhit (2018). "Flaxseed: Composition, detoxification, utilization, and opportunities." *Biocatalysis and agricultural biotechnology* **13**: 129-152.
- Beliles, R. (1994). "The metals." *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology*. **2**: 2183-2201.
- Ben Mansoura Rayene Raoudha, M. R. (2021). "Intérêts des vitamines et des sels minéraux pour le système immunitaire."
- Benachour, N. and G.-E. Séralini (2009). "Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells." *Chemical research in toxicology* **22**(1): 97-105.
- Beroual, K., A. Agabou, M.-C. Abdeldjelil, N. Boutaghane, s. Haouam and y. Hamdi-Pacha (2017). "EVALUATION OF CRUDE FLAXSEED (*Linum usitatissimum* L.) OIL IN BURN WOUND HEALING IN NEW ZEALAND RABBITS." *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines* **14**(3): 280-286.
- Beroual, K., Z. Maameri, S. Halmi, B. Benleksira, A. Agabou and Y. Hamdi-Pacha (2013). "Effects of *Linum usitatissimum* L. ingestion and oil topical application on hair growth in rabbit." *Int. J. Med. Arom. Plants* **3**(4): 459-463.

- Beyer Jr, W. F. and I. Fridovich (1987). "Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions." *Analytical biochemistry* **161**(2): 559-566.
- Bhardwaj, P. and D. K. Dhawan (2019). "Zinc treatment modulates hematological and morphological changes in rat erythrocytes following arsenic exposure." *Toxicol Ind Health* **35**(9): 593-603.
- Bhondave, P. D., P. P. Devarshi, K. R. Mahadik and A. M. Harsulkar (2014). "‘Ashvagandharishta’ prepared using yeast consortium from *Woodfordia fruticosa* flowers exhibit hepatoprotective effect on CCl₄ induced liver damage in Wistar rats." *Journal of ethnopharmacology* **151**(1): 183-190.
- Bischoff, K., M. Mukai and S. K. Ramaiah (2018). "Liver Toxicity." 239-257.
- Blackburn, L. G. and C. Boutin (2003). "Subtle effects of herbicide use in the context of genetically modified crops: a case study with glyphosate (Roundup®)." *Ecotoxicology* **12**(1): 271-285.
- Bonnefont-Rousselot, D. (2014). "Obésité et stress oxydant." *Obésité* **9**(1): 8-13.
- Bosco, M. D., D. M. Mohanasundaram, C. J. Drogemuller, C. J. Lang, P. D. Zalewski and P. T. Coates (2010). "Zinc and zinc transporter regulation in pancreatic islets and the potential role of zinc in islet transplantation." *The review of diabetic studies: RDS* **7**(4): 263.
- Bouaziz, F., M. Koubaa, F. J. Barba, S. Roohinejad and S. E. Chaabouni (2016). "Antioxidant properties of water-soluble gum from flaxseed hulls." *Antioxidants* **5**(3): 26.
- Bouaziz, M., I. Feki, M. Ayadi, H. Jemai and S. Sayadi (2010). "Stability of refined olive oil and olive- pomace oil added by phenolic compounds from olive leaves." *European Journal of Lipid Science and Technology* **112**(8): 894-905.
- Bouaziz, M., R. J. Grayer, M. S. Simmonds, M. Damak and S. Sayadi (2005). "Identification and antioxidant potential of flavonoids and low molecular weight phenols in olive cultivar Chemlali growing in Tunisia." *Journal of agricultural and food chemistry* **53**(2): 236-241.
- Bowry, V. W., K. K. Stanley and R. Stocker (1992). "High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**(21): 10316-10320.
- Bradberry, S. M., A. T. Proudfoot and J. A. Vale (2004). "Glyphosate poisoning." *Toxicological reviews* **23**(3): 159-167.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical biochemistry* **72**(1-2): 248-254.
- Brewster, D. W., J. Warren and W. E. Hopkins II (1991). "Metabolism of glyphosate in Sprague-Dawley rats: tissue distribution, identification, and quantitation of glyphosate-derived materials following a single oral dose." *Fundamental and applied toxicology* **17**(1): 43-51.

Bronaugh, R. L. and H. I. Maibach (2002). Topical absorption of dermatological products, CRC Press.

Brzozowska, A. and J. Sulkowska (1996). Mineral and trace element intake and status of Seneca participants in Poland. Annual Meeting, The Role of Trace Elements for Health Promotion and Disease Prevention.

Buege, J. A. and S. D. Aust (1978). [30] Microsomal lipid peroxidation. Methods in enzymology, Elsevier. **52**: 302-310.

Çağlar, S. and D. Kolankaya (2008). "The effect of sub-acute and sub-chronic exposure of rats to the glyphosate-based herbicide Roundup." Environmental toxicology and pharmacology **25**(1): 57-62.

Caligiuri, S. P., H. M. Aukema, A. Ravandi, R. Guzman, E. Dibrov and G. N. Pierce (2014). "Flaxseed consumption reduces blood pressure in patients with hypertension by altering circulating oxylipins via an α -linolenic acid-induced inhibition of soluble epoxide hydrolase." Hypertension **64**(1): 53-59.

Cattani, D., V. L. d. L. O. Cavalli, C. E. H. Rieg, J. T. Domingues, T. Dal-Cim, C. I. Tasca, F. R. M. B. Silva and A. Zamoner (2014). "Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: involvement of glutamate excitotoxicity." Toxicology **320**: 34-45.

Cattani, D., P. A. Cesconetto, M. K. Tavares, E. B. Parisotto, P. A. De Oliveira, C. E. H. Rieg, M. C. Leite, R. D. S. Prediger, N. C. Wendt and G. Razzera (2017). "Developmental exposure to glyphosate-based herbicide and depressive-like behavior in adult offspring: Implication of glutamate excitotoxicity and oxidative stress." Toxicology **387**: 67-80.

Cavalli, V. L. d. L. O., D. Cattani, C. E. H. Rieg, P. Pierozan, L. Zanatta, E. B. Parisotto, D. Wilhelm Filho, F. R. M. B. Silva, R. Pessoa-Pureur and A. Zamoner (2013). "Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells." Free Radical Biology and Medicine **65**: 335-346.

Chang, R. (2005). Physical chemistry for the biosciences, University Science Books.

Chavan, T., S. Khadke, S. Harke, A. Ghadge, M. Karandikar, V. Pandit, P. Ranjekar, O. Kulkarni and A. Kuvalekar (2013). "Hepatoprotective effect of polyunsaturated fatty acids against repeated subacute acetaminophen dosing in rats." Int J Pharm Bio Sci **4**(2): 286-295.

Cho, Y.-E., R.-A. R. Lomeda, S.-H. Ryu, H.-Y. Sohn, H.-I. Shin, J. H. Beattie and I.-S. Kwun (2007). "Zinc deficiency negatively affects alkaline phosphatase and the concentration of Ca, Mg and P in rats." Nutrition research and practice **1**(2): 113-119.

Cillard, J. and P. Cillard (2006). "Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations." Oléagineux, Corps gras, Lipides **13**(1): 24-29.

Çimen, M. B. (2008). "Free radical metabolism in human erythrocytes." Clinica chimica acta **390**(1-2): 1-11.

Couplan, F. and G. Debuigne (2013). "Le petit Larousse des plantes qui guérissent 500 plantes et leurs remèdes." Larousse, Paris: 232-233.

Cousins, R. J., R. K. Blanchard, J. B. Moore, L. Cui, C. L. Green, J. P. Liuzzi, J. Cao and J. A. Bobo (2003). "Regulation of zinc metabolism and genomic outcomes." *The Journal of nutrition* **133**(5): 1521S-1526S.

Cruz, K. J. C., A. R. S. de Oliveira and D. do Nascimento Marreiro (2015). "Antioxidant role of zinc in diabetes mellitus." *World journal of diabetes* **6**(2): 333.

da Costa, C. A. S., B. F. da Camara Boueri, C. R. Pessanha and G. T. Boaventura (2018). "Effects of flour or flaxseed oil upon testis mass in rats subjected to early weaning." *Nat Prod Res* **32**(8): 987-990.

Dai, P., P. Hu, J. Tang, Y. Li and C. Li (2016). "Effect of glyphosate on reproductive organs in male rat." *Acta Histochem* **118**(5): 519-526.

Dar, M. A., M. Sultana, A. H. Mir, R. Raina and S. Prawez (2018). "Effect of Repeated Oral Administration of Roundup® and Ammonium Nitrate on Liver of Wistar Rats." *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*.

Dar, M. A., M. Sultana, A. H. Mir, R. Raina and S. Prawez (2019). "Effect of Repeated Oral Administration of Roundup® and Ammonium Nitrate on Liver of Wistar Rats." *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* **89**(2): 505-510.

Daun, J., V. Barthet, T. Chomick and S. Duguid (2003). *Structure, composition, and variety development of flaxseed* In: *Flaxseed in human nutrition*, By LU Thompson and SC Cunnae, AOCS Press, Champaign, Illinois, USA.

de l'Anses, A. (2011). "Étude de l'alimentation totale française 2 (EAT 2) Tome 2."

de Liz Oliveira Cavalli, V. L., D. Cattani, C. E. Heinz Rieg, P. Pierozan, L. Zanatta, E. Benedetti Parisotto, D. Wilhelm Filho, F. R. Mena Barreto Silva, R. Pessoa-Pureur and A. Zamoner (2013). "Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells." *Free Radic Biol Med* **65**: 335-346.

Dedeke, G. A., F. O. Owagboriaye, K. O. Ademolu, O. O. Olujimi and A. A. Aladesida (2018). "Comparative Assessment on Mechanism Underlying Renal Toxicity of Commercial Formulation of Roundup Herbicide and Glyphosate Alone in Male Albino Rat." *Int J Toxicol* **37**(4): 285-295.

Diederichsen, A. and K. Richards (2003). *Cultivated flax and the genus Linum L.: Taxonomy and germplasm conservation*. flax, CRC Press: 34-66.

Djeffal, A., M. Messarah, A. Boumendjel, L. Kadeche and A. E. Feki (2015). "Protective effects of vitamin C and selenium supplementation on methomyl-induced tissue oxidative stress in adult rats." *Toxicol Ind Health* **31**(1): 31-43.

Drewa, G., E. Krzyżyńska-Malinowska, A. Woźniak, F. Protas-Drozd, C. Mila-Kierzenkowska, M. Rozwodowska, B. Kowaliszyn and R. Czajkowski (2002). "Activity of superoxide dismutase and catalase and the level of lipid peroxidation products reactive with TBA in patients with psoriasis." *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* **8**(8): BR338-343.

El-Demerdash, F., M. Yousef and E. Elagamy (2001). "Influence of paraquat, glyphosate, and cadmium on the activity of some serum enzymes and protein electrophoretic behavior (in vitro)." *Journal of Environmental Science and Health, Part B* **36**(1): 29-42.

El-Demerdash, F. M., M. I. Yousef and E. I. Elagamy (2006). "Influence of Paraquat, Glyphosate, and Cadmium on the Activity of Some Serum Enzymes and Protein Electrophoretic Behavior (in Vitro)." *Journal of Environmental Science and Health, Part B* **36**(1): 29-42.

El-Shenawy, N. S. (2009). "Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate." *Environ Toxicol Pharmacol* **28**(3): 379-385.

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

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

Elwej, A., I. Ghorbel, M. Chaabane, N. Soudani, H. Mnif, T. Boudawara, N. Zeghal and M. Sefi (2018). "Zinc and selenium modulate barium-induced oxidative stress, cellular injury and membrane-bound ATPase in the cerebellum of adult rats and their offspring during late pregnancy and early postnatal periods." *Arch Physiol Biochem* **124**(3): 237-246.

Favier, A. (2003). "Le stress oxydant." *L'actualité chimique* **108**(10): 863-832.

Ferretti, L., L. Elviri, M. A. Pellinghelli, G. Predieri and M. Tegoni (2007). "Glutathione and N-acetylcysteinylglycine: protonation and Zn²⁺ complexation." *Journal of inorganic biochemistry* **101**(10): 1442-1456.

Flohé, L. and W. A. Günzler (1984). "[12] Assays of glutathione peroxidase." *Methods in enzymology* **105**: 114-120.

Gallegos, C. E., C. J. Baier, M. Bartos, C. Bras, S. Dominguez, N. Monaco, F. Gumilar, M. S. Gimenez and A. Minetti (2018). "Perinatal Glyphosate-Based Herbicide Exposure in Rats Alters Brain Antioxidant Status, Glutamate and Acetylcholine Metabolism and Affects Recognition Memory." *Neurotox Res* **34**(3): 363-374.

Gasnier, C., C. Dumont, N. Benachour, E. Clair, M.-C. Chagnon and G.-E. Séralini (2009). "Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines." *Toxicology* **262**(3): 184-191.

Gatiatulina, E. R., E. A. Sheina, O. N. Nemereshina, E. V. Popova, V. S. Polyakova, E. F. Agletdinov, A. I. Sinitskii, A. V. Skalny, A. A. Nikonorov and A. A. Tinkov (2020). "Effect of Zn Supplementation on Trace Element Status in Rats with Diet-Induced Non-alcoholic Fatty Liver Disease." *Biol Trace Elem Res* **197**(1): 202-212.

Ghedadba, N., H. Bousselsela, L. Hambaba, S. Benbia and Y. Mouloud (2014). "Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L." *Phytothérapie* **12**(1): 15-24.

Giesy, J. P., S. Dobson and K. R. Solomon (2000). "Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide." *Reviews of environmental contamination and toxicology*: 35-120.

Goel, A., V. Dani and D. K. Dhawan (2005). "Protective effects of zinc on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and hepatic histoarchitecture in chlorpyrifos-induced toxicity." *Chem Biol Interact* **156**(2-3): 131-140.

Gonçalves, N. B., R. F. Bannitz, B. R. Silva, D. D. Becari, C. Poloni, P. M. Gomes, M. C. Foss and M. C. Foss-Freitas (2018). "α-Linolenic acid prevents hepatic steatosis and improves glucose tolerance in mice fed a high-fat diet." *Clinics* **73**.

Goyal, A., V. Sharma, N. Upadhyay, S. Gill and M. Sihag (2014). "Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food." *Journal of food science and technology* **51**(9): 1633-1653.

Guilloux, K., I. Gaillard, J. Courtois, B. Courtois and E. Petit (2009). "Production of arabinoxylan-oligosaccharides from flaxseed (*Linum usitatissimum*)." *Journal of agricultural and food chemistry* **57**(23): 11308-11313.

Gutiérrez, C., M. Rubilar, C. Jara, M. Verdugo, J. Sineiro and C. Shene (2010). "Flaxseed and flaxseed cake as a source of compounds for food industry." *Journal of soil science and plant nutrition* **10**(4): 454-463.

Habig, W. H., M. J. Pabst and W. B. Jakoby (1974). "Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation." *Journal of biological Chemistry* **249**(22): 7130-7139.

Halligudi, N. (2012). "Pharmacological propertie."

Hamdaoui, L., M. Naifar, M. Mzid, M. Ben Salem, A. Chtourou, F. Makni-Ayadi, Z. Sahnoun and T. Rebai (2016). "Nephrotoxicity of Kalach 360 SL: biochemical and histopathological findings." *Toxicology Mechanisms and Methods* **26**(9): 685-691.

Hamdaoui, L., M. Naifar, F. Rahmouni, F. Ayadi and T. Rebai (2019). "Sub-chronic exposure to Kalach 360 SL-induced damage in rats' liver and hematological system." *Environ Sci Pollut Res Int* **26**(36): 36634-36646.

Hana, R. S. and N. Saed (2013). "Alteration in oxidants, antioxidants and cytokines levels in blood of malathion exposed human and animal groups and the effect of flaxseed oil in alleviating malathion toxic effects." *Eur J Biotechnol Biosci* **1**(1): 8-19.

Hendawi, M. Y., R. T. Alam and S. A. Abdellatief (2016). "Ameliorative effect of flaxseed oil against thiacloprid-induced toxicity in rats: hematological, biochemical, and histopathological study." *Environ Sci Pollut Res Int* **23**(12): 11855-11863.

Hermes-Lima, M. (2004). "Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals." *Functional metabolism: regulation and adaptation* **1**: 319-366.

Hirano, T., M. Murakami, T. Fukada, K. Nishida, S. Yamasaki and T. Suzuki (2008). "Roles of zinc and zinc signaling in immunity: zinc as an intracellular signaling molecule." *Advances in immunology* **97**: 149-176.

Hould, R. (1984). "Methode de Fontana." *Techniques d'histopathologie et de cytopathologie*. Maloine, Paris.

Hrabeta, J., T. Eckschlager, M. Stiborova, Z. Heger, S. Krizkova and V. Adam (2016). "Zinc and zinc-containing biomolecules in childhood brain tumors." *Journal of Molecular Medicine* **94**: 1199-1215.

Hunt, D. G. and J. L. Ivy (2002). "Epinephrine inhibits insulin-stimulated muscle glucose transport." *Journal of applied physiology* **93**(5): 1638-1643.

Jbañez, M., Ó. J. Pozo, J. V. Sancho, F. J. López and F. Hernández (2005). "Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* **1081**(2): 145-155.

Imoberdorfa, R., M. Rühlinb and P. E. Ballmera (2010). Zinc—un oligoélément vital à grand potentiel. *Forum Med Suisse* 2010; 10: 764.

Iserin, P., M. Masson, J. Restellini, E. Ybert, A. De Laage de Meux, F. Moulard and P. Vican (2001). "Larousse des plantes médicinales: identification." *préparation, soins*. 2ième édition Larousse, VUEF, pp13-16: 291-296.

Jacques- Silva, M. C., C. W. Nogueira, L. C. Broch, E. M. Flores and J. B. T. Rocha (2001). "Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice." *Pharmacology & toxicology* **88**(3): 119-125.

Jasper, R., G. O. Locatelli, C. Pilati and C. Locatelli (2012). "Evaluation of biochemical, hematological and oxidative parameters in mice exposed to the herbicide glyphosate-Roundup®." *Interdisciplinary toxicology* **5**(3): 133-140.

Jhala, A. J. and L. M. Hall (2010). "Flax (*Linum usitatissimum* L.): current uses and future applications." *Aust. J. Basic Appl. Sci* **4**(9): 4304-4312.

Jollow, D., J. Mitchell, N. Zampaglione and J. Gillette (1974). "Bromobenzene-induced liver necrosis. Protective role of glutathione and evidence for 3, 4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolite." *Pharmacology* **11**(3): 151-169.

Julkunen-Tiitto, R. (1985). "Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics." *Journal of agricultural and food chemistry* **33**(2): 213-217.

Kadri, A., Z. Zarai, A. Békir, N. Gharsallah, M. Damak and R. Gdoura (2011). "Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. essential oil from Tunisia." *African journal of biotechnology* **10**(19): 3908-3914.

Kaithwas, G., A. Mukerjee, P. Kumar and D. K. Majumdar (2011). "Linum usitatissimum (linseed/flaxseed) fixed oil: antimicrobial activity and efficacy in bovine mastitis." *Inflammopharmacology* **19**: 45-52.

Kalender, Y., M. Uzunhisarcikli, A. Ogutcu, F. Acikgoz and S. Kalender (2006). "Effects of diazinon on pseudocholinesterase activity and haematological indices in rats: the protective role of vitamin E." *Environmental toxicology and pharmacology* **22**(1): 46-51.

Kamath, V. and P. S. Rajini (2007). "Altered glucose homeostasis and oxidative impairment in pancreas of rats subjected to dimethoate intoxication." *Toxicology* **231**(2-3): 137-146.

Kanbur, M., G. Eraslan, S. Ince, L. Altintas, B. C. Liman and L. Bayram (2015). "The Effects of Propetamphos, Cypermethrin and Propetamphos-Cypermethrin Combination on Some Biochemical and Histopathological Parameters in Mice." *J KafKas Univ Vet Fakultesi Dergisi* **21**(2): 187-194.

Karaca, S. and G. Eraslan (2013). "The effects of flaxseed oil on cadmium-induced oxidative stress in rats." *Biol Trace Elem Res* **155**(3): 423-430.

Kasmi, S., I. Bkhairia, B. Harrabi, H. Mnif, R. Marrakchi, H. Ghozzi, C. Kallel, M. Nasri, K. Zeghal, K. Jamoussi and A. Hakim (2018). "Modulatory effects of quercetin on liver histopathological, biochemical, hematological, oxidative stress and DNA alterations in rats exposed to graded doses of score 250." *Toxicol Mech Methods* **28**(1): 12-22.

Kasote, D. (2013). "Flaxseed phenolics as natural antioxidants." *International Food Research Journal* **20**(1).

Kasote, D., M. Hegde and K. Deshmukh (2011). "Antioxidant activity of phenolic components from n-butanol fraction (PC-BF) of defatted flaxseed meal." *American Journal of Food Technology* **6**(7): 604-612.

Kaur, N., L. Kishore and R. Singh (2017). "Therapeutic effect of *Linum usitatissimum* L. in STZ-nicotinamide induced diabetic nephropathy via inhibition of AGE's and oxidative stress." *Journal of food science and technology* **54**(2): 408-421.

Kay, A. R. and K. Toth (2008). "Is zinc a neuromodulator?" *Science signaling* **1**(19): re3-re3.

Kayali, R., U. Çakatay, T. Akçay and T. Altuğ (2006). "Effect of alpha- lipoic acid supplementation on markers of protein oxidation in post- mitotic tissues of ageing rat." *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease* **24**(1): 79-85.

Khan, H. A. A., W. Akram, S. A. Shad and J.-J. Lee (2013). "Insecticide mixtures could enhance the toxicity of insecticides in a resistant dairy population of *Musca domestica* L." *PloS one* **8**(4): e60929.

Kirschvink, N., B. de Moffarts and P. Lekeux (2008). "The oxidant/antioxidant equilibrium in horses." *The Veterinary Journal* **177**(2): 178-191.

Kremer, R., T. Yamada, P. R. de Camargo e Castro and B. W. Wood (2009). "Glyphosate interactions with physiology, nutrition, and diseases of plants: Threat to agricultural sustainability?" *European journal of Agronomy* **31**(3): 111-176.

Krieger, R. (2010). *Hayes' handbook of pesticide toxicology*, Academic press.

Krüger, M., P. Schledorn, W. Schrödl, H.-W. Hoppe, W. Lutz and A. A. Shehata (2014). "Detection of glyphosate residues in animals and humans." *Journal of Environmental & Analytical Toxicology* **4**(2): 1.

Kubola, J. and S. Siriamornpun (2008). "Phenolic contents and antioxidant activities of bitter melon (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro." *Food chemistry* **110**(4): 881-890.

Kulusic, T., A. Radonic, V. Katalinic and M. Milos (2004). "Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil." *Food chemistry* **85**(4): 633-640.

Kwiatkowska, M., H. Nowacka-Krukowska and B. Bukowska (2014). "The effect of glyphosate, its metabolites and impurities on erythrocyte acetylcholinesterase activity." *Environmental Toxicology and Pharmacology* **37**(3): 1101-1108.

Larsen, K., R. Najle, A. Lifschitz and G. Virkel (2012). "Effects of sub-lethal exposure of rats to the herbicide glyphosate in drinking water: glutathione transferase enzyme activities, levels of reduced glutathione and lipid peroxidation in liver, kidneys and small intestine." *Environ Toxicol Pharmacol* **34**(3): 811-818.

Larsen, K. E., A. L. Lifschitz, C. E. Lanusse and G. L. Virkel (2016). "The herbicide glyphosate is a weak inhibitor of acetylcholinesterase in rats." *Environ Toxicol Pharmacol* **45**: 41-44.

Le Mer, C., R. L. Roy, J. Pellerin, C. M. Couillard and D. Maltais (2013). "Effects of chronic exposures to the herbicides atrazine and glyphosate to larvae of the threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*)." *Ecotoxicology and environmental safety* **89**: 174-181.

Le Pabic, C. (2014). *Effets du zinc sur la physiologie du stade juvénile de la seiche commune *Sepia officinalis* et étude du système immunitaire pour le développement d'outils in vitro*, Université de Caen Basse-Normandie.

Lee, D.-H. and D. R. Jacobs Jr (2009). "Is serum gamma-glutamyltransferase a marker of exposure to various environmental pollutants?" *Free radical research* **43**(6): 533-537.

Lee, H. J., J. Kweon, E. Kim, S. Kim and J.-S. Kim (2012). "Targeted chromosomal duplications and inversions in the human genome using zinc finger nucleases." *Genome research* **22**(3): 539-548.

Lee, Y. S., J. H. Yang, M. J. Bae, W. K. Yoo, S. Ye, C. C. Xue and C. G. Li (2010). "Anti-oxidant and anti-hypercholesterolemic activities of *Wasabia japonica*." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **7**(4): 459-464.

Lepiniec, L., I. Debeaujon, J.-M. Routaboul, A. Baudry, L. Pourcel, N. Nesi and M. Caboche (2006). "Genetics and biochemistry of seed flavonoids." *Annual review of plant biology* **57**(1): 405-430.

Levine, D. I. (1990). "Participation, productivity, and the firm's environment." *California Management Review* **32**(4): 86-100.

Li, M. S., S. E. Adesina, C. L. Ellis, J. L. Gooch, R. S. Hoover and C. R. Williams (2017). "NADPH oxidase-2 mediates zinc deficiency-induced oxidative stress and kidney damage." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **312**(1): C47-C55.

Li, Q., M. J. Lambrechts, Q. Zhang, S. Liu, D. Ge, R. Yin, M. Xi and Z. You (2013). "Glyphosate and AMPA inhibit cancer cell growth through inhibiting intracellular glycine synthesis." *Drug Des Devel Ther* **7**: 635-643.

Liang, D., L. Xiang, M. Yang, X. Zhang, B. Guo, Y. Chen, L. Yang and J. Cao (2013). "ZnT7 can protect MC3T3-E1 cells from oxidative stress-induced apoptosis via PI3K/Akt and MAPK/ERK signaling pathways." *Cellular Signalling* **25**(5): 1126-1135.

*M*alik, J., G. Barry and G. Kishore (1989). "The herbicide glyphosate." *BioFactors* (Oxford, England) **2**(1): 17-25.

Marambe, P., P. Shand and J. Wanasundara (2008). "An in-vitro investigation of selected biological activities of hydrolysed flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) proteins." *Journal of the American Oil Chemists' Society* **85**(12): 1155-1164.

Mard, S. A., G. Akbari, M. Dianat and E. Mansouri (2017). "Protective effects of crocin and zinc sulfate on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats: a comparative experimental model study." *Biomedicine & Pharmacotherapy* **96**: 48-55.

Maret, W. (2008). "Metallothionein redox biology in the cytoprotective and cytotoxic functions of zinc." *Experimental gerontology* **43**(5): 363-369.

Maret, W. (2013). "Zinc biochemistry: from a single zinc enzyme to a key element of life." *Advances in nutrition* **4**(1): 82-91.

Maret, W. (2017). "Zinc in pancreatic islet biology, insulin sensitivity, and diabetes." *Preventive nutrition and food science* **22**(1): 1.

Maret, W. (2019). "Regulation of cellular zinc ions and their signaling functions." *Zinc Signaling*: 5-22.

Marreiro, D. D. N., K. J. C. Cruz, J. B. S. Morais, J. B. Beserra, J. S. Severo and A. R. S. De Oliveira (2017). "Zinc and oxidative stress: current mechanisms." *Antioxidants* **6**(2): 24.

Mateos, R., J. L. Espartero, M. Trujillo, J. J. Ríos, M. León-Camacho, F. Alcludia and A. Cert (2001). "Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**(5): 2185-2192.

Meligi, N. M. and H. F. Hassan (2017). "Protective effects of *Eruca sativa* (rocket) on abamectin insecticide toxicity in male albino rats." *Environ Sci Pollut Res Int* **24**(10): 9702-9712.

Messarah, M., W. Amamra, A. Boumendjel, L. Barkat, I. Bouasla, C. Abdenmour, M. S. Boulakoud and A. E. Feki (2013). "Ameliorating effects of curcumin and vitamin E on diazinon-induced oxidative damage in rat liver and erythrocytes." *Toxicol Ind Health* **29**(1): 77-88.

Modesto, K. A. and C. B. Martinez (2010). "Effects of Roundup Transorb on fish: hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity." *Chemosphere* **81**(6): 781-787.

Modesto, K. A. and C. B. Martinez (2010). "Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*." *Chemosphere* **78**(3): 294-299.

Moneim, A. E. A., M. A. Dkhil and S. Al-Quraishy (2011). "The protective effect of flaxseed oil on lead acetate-induced renal toxicity in rats." *Journal of hazardous materials* **194**: 250-255.

Morris, D. H. (2007). *Flax: A health and nutrition primer*, Flax Council of Canada.

Murase, T., M. Aoki and I. Tokimitsu (2005). "Supplementation with α -linolenic acid-rich diacylglycerol suppresses fatty liver formation accompanied by an up-regulation of β -oxidation in Zucker fatty rats." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1733**(2-3): 224-231.

*N*azarizadeh, A. and S. Asri-Rezaie (2016). "Comparative study of antidiabetic activity and oxidative stress induced by zinc oxide nanoparticles and zinc sulfate in diabetic rats." *AAPS PharmSciTech* **17**: 834-843.

*O*liveira, A. G., L. F. Telles, R. A. Hess, G. A. Mahecha and C. A. Oliveira (2007). "Effects of the herbicide Roundup on the epididymal region of drakes *Anas platyrhynchos*." *Reproductive Toxicology* **23**(2): 182-191.

Oomah, B. D. (2001). "Flaxseed as a functional food source." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81**(9): 889-894.

Oomah, B. D. (2003). "Processing of flaxseed fiber, oil, protein, and lignan." *Flaxseed in human nutrition*(Ed. 2): 363-386.

Pan, Y., K. Wang, S. Huang, H. Wang, X. Mu, C. He, X. Ji, J. Zhang and F. Huang (2008). "Antioxidant activity of microwave-assisted extract of longan (*Dimocarpus Longan* Lour.) peel." *Food chemistry* **106**(3): 1264-1270.

Peris-Sampedro, F., M. Cabré, P. Basaure, I. Reverte, J. L. Domingo and M. T. Colomina (2015). "Adulthood dietary exposure to a common pesticide leads to an obese-like phenotype and a diabetic profile in apoE3 mice." *Environmental research* **142**: 169-176.

Pilar, B., A. Gullich, P. Oliveira, D. Stroher, J. Piccoli and V. Manfredini (2017). "Protective Role of Flaxseed Oil and Flaxseed Lignan Secoisolariciresinol Diglucoside Against Oxidative Stress in Rats with Metabolic Syndrome." *J Food Sci* **82**(12): 3029-3036.

Pousset, J. (2003). *Agricultures sans herbicides*, France Agricole Editions.

Powell, S. R. (2000). "The antioxidant properties of zinc." *The Journal of nutrition* **130**(5): 1447S-1454S.

Pratt, D. E. (1980). "Natural antioxidants of soybeans and other oil-seeds." *Autoxidation in food and biological systems*: 283-293.

Prieto, P., M. Pineda and M. Aguilar (1999). "Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E." *Analytical biochemistry* **269**(2): 337-341.

Program, N. T. (2006). "National Institute of Environmental Health Sciences." National Institutes of Health, US Department of Health and Human Services, Research Triangle Park, NC, Chemical Information Review Document for Arbutin [CAS No. 497-76-7] and Extracts from *Arctostaphylos uva-ursi*-Supporting Nomination for Toxicological Evaluation by the National Toxicology Program.

Purushothaman, D., W. Brown, B. Vanselow, K. Quinn and S. Wu (2014). "Flaxseed oil supplementation alters the expression of inflammatory-related genes in dogs." *Genetics and Molecular Research* **13**(3): 5322-5332.

Qureshi, J. A., Z. Memon, K. M. Mirza, S. Agha, F. Saher and N. F. Sunderjee (2018). "Anti hyperglycemic and anti hyperlipidemic activity of *linum usitatissimum* and *glycyrrhiza glabra* extracts in streptozotocin-induced diabetic rats." *Asian J. Res. Med Pharm. Sci* **5**: 1-10.

Rani, L., K. Thapa, N. Kanojia, N. Sharma, S. Singh, A. S. Grewal, A. L. Srivastav and J. Kaushal (2021). "An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment." *Journal of Cleaner Production* **283**: 124657.

Rebai, O., M. Belkhir, A. Boujelben, S. Fattouch and M. Amri (2017). "Morus alba leaf extract mediates neuroprotection against glyphosate-induced toxicity and biochemical alterations in the brain." *Environ Sci Pollut Res Int* **24**(10): 9605-9613.

Reeves, T., G. Thomas and G. Ramsay (2016). "Produire plus avec moins en pratique: le maïs, le riz, le blé. Guide pour une production céréalière durable."

Rizwan, S., A. Naqshbandi and F. Khan (2013). "Dietary flaxseed oil supplementation mitigates the effect of lead on the enzymes of carbohydrate metabolism, brush border membrane, and oxidative stress in rat kidney tissues." *Biological trace element research* **153**: 279-290.

Roohani, N., R. Hurrell, R. Kelishadi and R. Schulin (2013). "Zinc and its importance for human health: An integrative review." *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences* **18**(2): 144.

Rott, M. E., T. S. Lawrence, E. M. Wall and M. J. Green (2004). "Detection and quantification of roundup ready soy in foods by conventional and real-time polymerase chain reaction." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**(16): 5223-5232.

Roussel, A.-M. (2014). "Éléments-trace (zinc, sélénium, chrome, fer), syndrome métabolique et diabète de type 2." *Médecine des Maladies Métaboliques* **8**(5): 489-493.

Roy, H., S. Lundy and C. Eriksen (2007). "Healthier lives through education in nutrition and preventive medicine. Flaxseed a review of health benefits." *Pennington Nutrition Series*(5): 1-4.

Rueda-Ruzafa, L., F. Cruz, P. Roman and D. Cardona (2019). "Gut microbiota and neurological effects of glyphosate." *Neurotoxicology* **75**: 1-8.

Jaint-Pierre, G. (2010). "Mots dérivés: quand le mot souche s'obscurcit." *Correspondance: Prendre le taureau par les cornes*. vol. 16, no. 2 (2010).

Saleem, M. H., S. Fahad, S. U. Khan, M. Din, A. Ullah, A. E. Sabagh, A. Hossain, A. Llanes and L. Liu (2020). "Copper-induced oxidative stress, initiation of antioxidants and phytoremediation potential of flax (*Linum usitatissimum* L.) seedlings grown under the mixing of two different soils of China." *Environmental Science and Pollution Research* **27**: 5211-5221.

Salehipour, M., A. Monabbati, M. R. Ensafdaran, A. Adib and A. H. Babaei (2017). "The effect of zinc on healing of renal damage in rats." *Journal of nephropathology* **6**(3): 157.

Santo, G. D., A. Grotto, A. A. Boligon, B. Da Costa, C. L. Rambo, E. A. Fantini, E. Sauer, L. M. V. Lazzarotto, K. T. Bertoncello, O. T. Junior, S. C. Garcia, A. M. Siebel, D. B. Rosemberg, J. D. Magro, G. M. M. Conterato and L. Zanatta (2018). "Protective effect of *Uncaria tomentosa* extract against oxidative stress and genotoxicity induced by glyphosate-Roundup(R) using zebrafish (*Danio rerio*) as a model." *Environ Sci Pollut Res Int* **25**(12): 11703-11715.

- Satarug, S. and M. R. Moore (2004). "Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke." *Environmental health perspectives* **112**(10): 1099-1103.
- Schafer, F. Q. and G. R. Buettner (1999). "Singlet oxygen toxicity is cell line- dependent: a study of lipid peroxidation in nine leukemia cell lines." *Photochemistry and photobiology* **70**(6): 858-867.
- Schlegel, P. (2010). Facteurs de variation de la biodisponibilité du zinc, ajouté sous forme organique ou inorganique, chez deux espèces monogastriques en croissance (poulet et porcelet), AgroParisTech.
- Ścibior, A. and H. Zaporowska (2010). "Effects of combined vanadate and magnesium treatment on erythrocyte antioxidant defence system in rats." *Environmental Toxicology and Pharmacology* **30**(2): 153-161.
- Semercioz, A., A. K. Baltaci, R. Mogulkoc and M. C. Avunduk (2017). "Effect of zinc and melatonin on oxidative stress and serum inhibin-B levels in a rat testicular torsion–detorsion model." *Biochemical genetics* **55**: 395-409.
- Seve, M. and A. Favier (2002). "Métabolisme du zinc." Paris **58207173**.
- Shadyro, O., A. Sosnovskaya and I. Edimecheva (2020). "Effect of biologically active substances on oxidative stability of flaxseed oil." *Journal of food science and technology* **57**: 243-252.
- Shim, Y. Y., B. Gui, P. G. Arnison, Y. Wang and M. J. Reaney (2014). "Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) bioactive compounds and peptide nomenclature: A review." *Trends in food science & technology* **38**(1): 5-20.
- Sidhu, P., M. Garg and D. Dhawan (2004). "Protective effects of zinc on oxidative stress enzymes in liver of protein deficient rats." *Nutr Hosp* **19**(6): 341-347.
- Sidhu, P., M. L. Garg and D. K. Dhawan (2004). "Protective role of zinc in nickel induced hepatotoxicity in rats." *Chem Biol Interact* **150**(2): 199-209.
- Silvy, C. (1995). "Quantifions le phytosanitaire II." *Le Courrier de l'environnement de l'INRA* **25**(25): 80-91.
- Singla, N. and D. K. Dhawan (2014). "Influence of zinc on calcium-dependent signal transduction pathways during aluminium-induced neurodegeneration." *Mol Neurobiol* **50**(2): 613-625.
- Slama, K., M. Boumendjel, F. Taibi, A. Boumendjel and M. Messarah (2018). "Atriplex halimus aqueous extract abrogates carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity by modulating biochemical and histological changes in rats." *Arch Physiol Biochem*: 1-12.
- Smith, E. A. and F. Oehme (1992). "The biological activity of glyphosate to plants and animals: a literature review." *Veterinary Human Toxicology* **34**(6).

Solomon, K. and D. Thompson (2003). "Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate." *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* **6**(3): 289-324.

Soltanian, N. and M. Janghorbani (2018). "A randomized trial of the effects of flaxseed to manage constipation, weight, glycemia, and lipids in constipated patients with type 2 diabetes." *Nutrition & metabolism* **15**(1): 1-9.

Stadtman, E. R. and R. L. Levine (2006). "Chemical modification of proteins by reactive oxygen species." *Redox proteomics: from protein modifications to cellular dysfunction and diseases* **9**(3): 293-304.

Jabatabaie, M., H. Aliarabi, A. Saki, A. Ahmadi and S. Siyar (2007). "Effect of different sources and levels of zinc on egg quality and laying hen performance." *Pak J Biol Sci* **10**(19): 3476-3478.

Tang, J., P. Hu, Y. Li, T. T. Win-Shwe and C. Li (2017). "Ion Imbalance Is Involved in the Mechanisms of Liver Oxidative Damage in Rats Exposed to Glyphosate." *Front Physiol* **8**: 1083.

Testud, F. and J.-P. Grillet (2007). *Produits phytosanitaires: intoxications aiguës et risques professionnels*, Éditions Eska.

Tizhe, E., N. Ibrahim, M. Fatihu, S. Ambali, I. Igbokwe and U. Tizhe (2018). "Pancreatic function and histoarchitecture in Wistar rats following chronic exposure to Bushfire(R): the mitigating role of zinc." *J Int Med Res* **46**(8): 3296-3305.

Tizhe, E. V., N. D. Ibrahim, M. Y. Fatihu, I. O. Igbokwe, B. D. George, S. F. Ambali and J. M. Shallangwa (2014). "Serum biochemical assessment of hepatic and renal functions of rats during oral exposure to glyphosate with zinc." *Comp Clin Path* **23**: 1043-1050.

Tonietto, B. D., A. O. M. Laurentino, M. T. Costa-Valle, L. V. Cestonaro, B. P. Antunes, C. Sates, N. G. Dos Santos, E. Dallegrave, S. C. Garcia and M. B. Leal (2022). "Imidacloprid-based commercial pesticide causes behavioral, biochemical, and hematological impairments in Wistar rats." *Environmental Toxicology and Pharmacology* **94**: 103924.

Topashka-Ancheva, M., R. Metcheva and S. Teodorova (2003). "A comparative analysis of the heavy metal loading of small mammals in different regions of Bulgaria II: chromosomal aberrations and blood pathology." *Ecotoxicology and environmental safety* **54**(2): 188-193.

Tóth, K. (2011). "Zinc in neurotransmission." *Annual review of nutrition* **31**: 139-153.

TRAN-THI, N.-T., N. Mazzella, B. DELEST, F. DELMAS and U. REBX (2009). "Développement et validation d'une méthode permettant le dosage du glyphosate et de l'AMPA dans les eaux surface par HPLC-ESI-MS/MS." XXXIXème congrès. Groupe Français des Pesticides, Toulouse.

Turkmen, R., Y. O. Birdane, H. H. Demirel, M. Kabu and S. Ince (2019). "Protective effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress, biochemical and histopathological changes

induced by sub-chronic oral glyphosate-based herbicide in rats." *Toxicol Res (Camb)* **8**(2): 238-245.

Uchendu, C., S. F. Ambali, J. O. Ayo and K. A. Esievo (2017). "The protective role of alpha-lipoic acid on long-term exposure of rats to the combination of chlorpyrifos and deltamethrin pesticides." *Toxicol Ind Health* **33**(2): 159-170.

Vardatsikos, G., N. R. Pandey and A. K. Srivastava (2013). "Insulino-mimetic and anti-diabetic effects of zinc." *Journal of inorganic biochemistry* **120**: 8-17.

Varghese, J., M. Faith and M. Jacob (2009). "Zinc prevents indomethacin-induced renal damage in rats by ameliorating oxidative stress and mitochondrial dysfunction." *European journal of pharmacology* **614**(1-3): 114-121.

Venglat, P., D. Xiang, S. Qiu, S. L. Stone, C. Tibiche, D. Cram, M. Alting-Mees, J. Nowak, S. Cloutier and M. Deyholos (2011). "Gene expression analysis of flax seed development." *BMC plant biology* **11**(1): 1-15.

Wani, P. and C. Blanco-Garcia (2016). "A round-up on cost-effectiveness of hypertension therapy based on the 2014 guidelines." *Current cardiology reports* **18**: 1-5.

Wester, R. C., J. Melendres, R. Sarason, J. McMaster and H. I. Maibach (1991). "Glyphosate skin binding, absorption, residual tissue distribution, and skin decontamination." *Toxicological Sciences* **16**(4): 725-732.

Williams, G. M., M. Aardema, J. Acquavella, S. C. Berry, D. Brusick, M. M. Burns, J. L. V. de Camargo, D. Garabrant, H. A. Greim and L. D. Kier (2016). "A review of the carcinogenic potential of glyphosate by four independent expert panels and comparison to the IARC assessment." *Critical Reviews in Toxicology* **46**(sup1): 3-20.

Williams, G. M., R. Kroes and I. C. Munro (2000). "Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans." *Regulatory toxicology and pharmacology* **31**(2): 117-165.

Worthing, C. and R. Hance (2000). *Electronic Pesticide Manual*, British Crop Protection Council,(London).

Wunnapuk, K., G. Gobe, Z. Endre, P. Peake, J. E. Grice, M. S. Roberts, N. A. Buckley and X. Liu (2014). "Use of a glyphosate-based herbicide-induced nephrotoxicity model to investigate a panel of kidney injury biomarkers." *Toxicology letters* **225**(1): 192-200.

Xu, J., S. Rong, H. Gao, C. Chen, W. Yang, Q. Deng, Q. Huang, L. Xiao and F. Huang (2017). "A Combination of Flaxseed Oil and Astaxanthin Improves Hepatic Lipid Accumulation and Reduces Oxidative Stress in High Fat-Diet Fed Rats." *Nutrients* **9**(3).

Yang, W., J. Fu, M. Yu, Q. Huang, D. Wang, J. Xu, Q. Deng, P. Yao, F. Huang and L. Liu (2012). "Effects of flaxseed oil on anti-oxidative system and membrane deformation of human peripheral blood erythrocytes in high glucose level." *Lipids in health and disease* **11**: 1-10.

Yazdinezhad, A., M. Abbasian, S. Hojjat Hosseini, P. Naserzadeh, A. H. Agh-Atabay and M. J. Hosseini (2017). "Protective effects of *Ziziphora tenuior* extract against chlorpyrifos induced liver and lung toxicity in rat: Mechanistic approaches in subchronic study." *Environ Toxicol* **32**(9): 2191-2202.

Yermakov, A., V. Arasimov and N. Yarosh (1987). "Methods of biochemical analysis of plants." Agropromizdat, Leningrad: 122-142.

Zemmouri, H., O. Sekiou, S. Ammar, A. El Feki, M. Bouaziz, M. Messarah and A. Boumendjel (2017). "*Urtica dioica* attenuates ovalbumin-induced inflammation and lipid peroxidation of lung tissues in rat asthma model." *Pharm Biol* **55**(1): 1561-1568.

Zhang, L.-f., L.-s. Liu, X.-m. Chu, H. Xie, L.-j. Cao, C. Guo, B. Cao, M.-j. Li, G.-j. Wang and H.-p. Hao (2014). "Combined effects of a high-fat diet and chronic valproic acid treatment on hepatic steatosis and hepatotoxicity in rats." *Acta Pharmacologica Sinica* **35**(3): 363-372.

Zhang, L., S. Li, J. Xin, H. Ma, H. Pang, L. Tan and X. Wang (2019). "A non-enzymatic voltammetric xanthine sensor based on the use of platinum nanoparticles loaded with a metal-organic framework of type MIL-101 (Cr). Application to simultaneous detection of dopamine, uric acid, xanthine and hypoxanthine." *Microchimica Acta* **186**(1): 9.

Zhang, Z.-S., L.-J. Wang, D. Li, S.-S. Jiao, X. D. Chen and Z.-H. Mao (2008). "Ultrasound-assisted extraction of oil from flaxseed." *Separation and Purification Technology* **62**(1): 192-198.

Zhao, J., Q. Wu, X. Hu, X. Dong, L. Wang, Q. Liu, Z. Long and L. Li (2016). "Comparative study of serum zinc concentrations in benign and malignant prostate disease: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Scientific reports* **6**(1): 1-9.

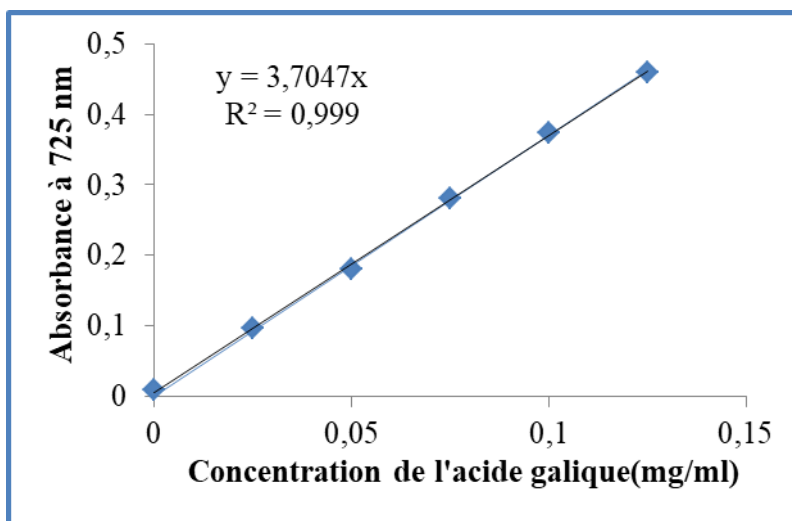
Zhishen, J., T. Mengcheng and W. Jianming (1999). "The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals." *Food chemistry* **64**(4): 555-559.

Zou, X.-G., X.-L. Chen, J.-N. Hu, Y.-F. Wang, D.-M. Gong, X.-M. Zhu and Z.-Y. Deng (2017). "Comparisons of proximate compositions, fatty acids profile and micronutrients between fiber and oil flaxseeds (*Linum usitatissimum* L.)." *Journal of Food Composition and Analysis* **62**: 168-176.

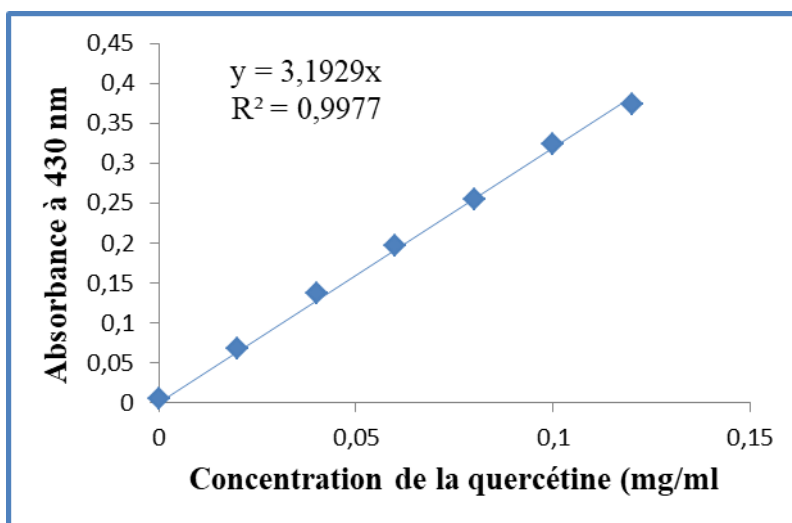
Żuk, M., A. Kulma, L. Dymińska, K. Szoltysek, A. Prescha, J. Hanuza and J. Szopa (2011). "Flavonoid engineering of flax potentiate its biotechnological application." *BMC biotechnology* **11**(1): 1-19.

ANNEXE

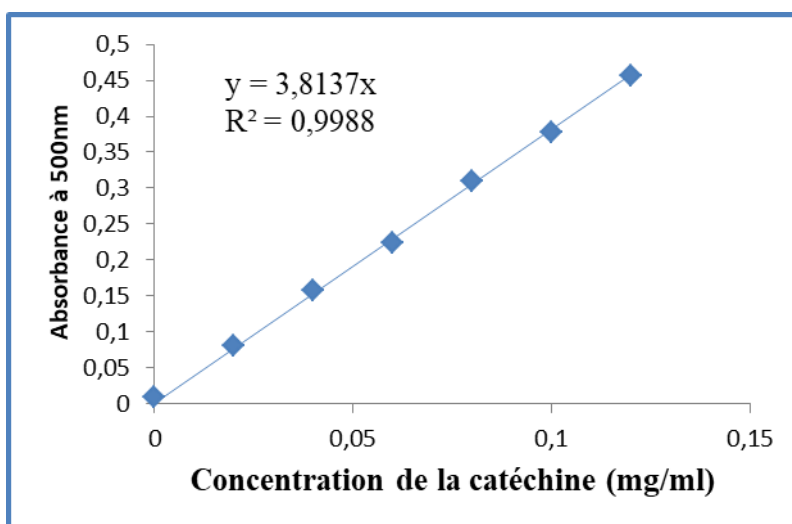
Annexe:



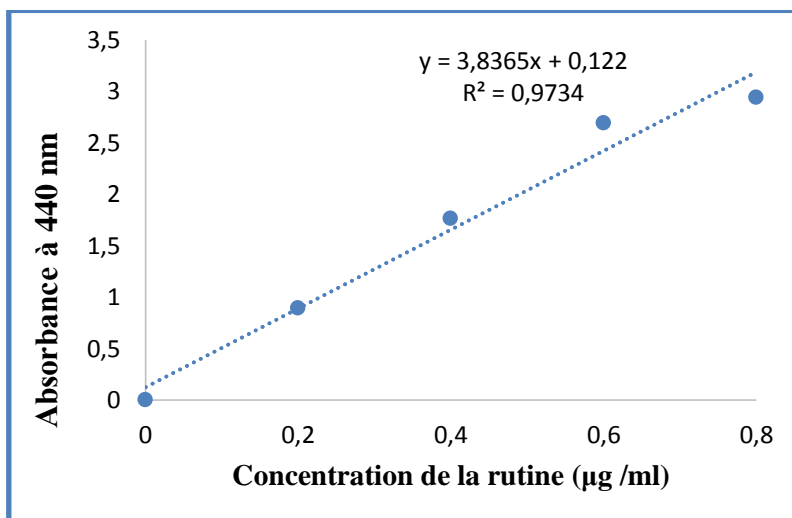
Annexe 01 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (0.2mg/ml).



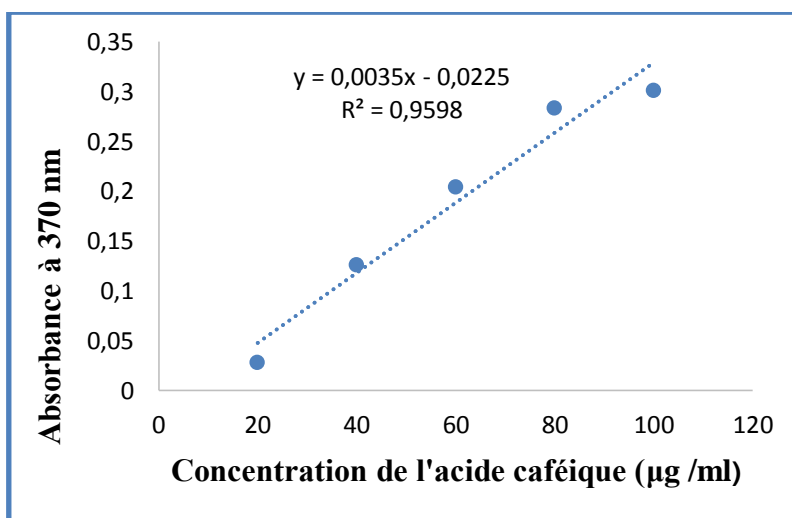
Annexe 02: Courbe d'étalonnage de la quercetine (0.15mg/ml).



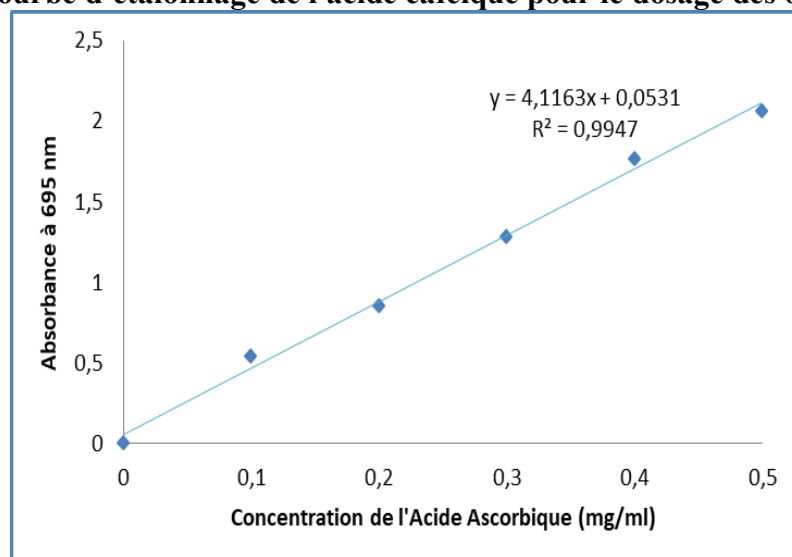
Annexe 03 : Courbe d'étalonnage de la catéchine (0.3mg/ml).



Annexe 04 : Courbe d'étalonnage de la rutine pour le dosage des flavonols.



Annexe 05 : Courbe d'étalonnage de l'acide caféique pour le dosage des ortho-diphénols.



Annexe 06 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique. (CAT)



ACTIVITE ET RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Roundup-induced biochemical and histopathological changes in the liver and kidney of rats: the ameliorative effects of *Linum usitatissimum* oil

Nesrine Djaber, Lynda Sabrina Ounaceur, Baya Nouha Moubine, Taha Khaldi, Mereim Rouag, Salma Berrouague, Hichem Amara, Faiza Taibi, Mahieddine Boumendjel, Amel Boumendjel and Mahfoud Messarah[✉]

Laboratory of Biochemistry and Environmental Toxicology, Faculty of Sciences, University of Badji Mokhtar, Annaba, Algeria

The present study was undertaken to evaluate the protective effects of *Linum usitatissimum* oil (LuO) against sub-chronic Roundup (RDP)-induced toxicity and oxidative stress in rats. Rats were divided into four groups: control group (no treatment), RDP group (Roundup at 269.9 mg/kg b.w.), LuO group (0.5 g/kg b.w. of LuO) and RDP+LuO group (RDP and LuO simultaneously). LuO decreased the ferric reducing antioxidant power (FRAP) ($IC_{50}=10.36 \mu\text{g/ml}$) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ($IC_{50}=22.85 \text{ mg/ml}$) in the tested tissues. The 30-day exposure of rats to RDP caused an increase in serum hepatic and renal markers: AST, ALT, ALP, LDH, γ GT, bilirubin, urea, and creatinine. In addition, SOD, CAT and GST activities decreased by 43%, 61%, and 61%, respectively, while GPx activity, MDA and PCOs levels increased by 80%, 46%, 25%, respectively. LuO treatment alleviated hepatotoxicity in RDP-treated rats, showing improved levels of oxidative stress biomarkers and plasma biochemical parameters. The histological examination of the liver and kidney confirmed the changes in Roundup-treated rats and demonstrated the protective role of LuO.

Key words: roundup, linseed oil, oxidative stress, hepatotoxicity, nephrotoxicity, rats

Received: 25 October, 2019; **revised:** 18 January, 2020; **accepted:** 13 February, 2020; **available on-line:** 18 March, 2020

[✉]e-mail: mahfoud.messarah@univ-annaba.dz; mmessarahdz@yahoo.fr

Acknowledgements of Financial Support: The present work was supported by DG-RSDT (General Directorate of Scientific Research and Technological Development-Algeria) via the Laboratory of Biochemistry and Environmental Toxicology, Faculty of Sciences, University of Badji Mokhtar-Annaba, Algeria.

Abbreviations: ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; LDH, lactate dehydrogenase; γ -GT, gamma glutamyl-transpeptidase; GSH, reduced glutathione; GPx, glutathione peroxidase; LPO, lipid peroxidation; MDA, malondialdehyde; TBA, thiobarbituric acid; TBARS, TBA reactive substances; NO, nitric oxide; AOPP, advanced oxidation protein product; PCO, protein carbonyl; RDP, Roundup; SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; GST, glutathione-S-transferase; DNPH, carbonyl group with 2,4-dinitrophenylhydrazine.

INTRODUCTION

Organophosphate (OP) pesticides are among the most widely used synthetic chemicals to control a wide variety of pests and insects in agriculture, homes, gardens, veterinary practice and industry (Dar *et al.*, 2019). Roundup (RDP) is an organophosphorus compound glyphosate (N-(phosphonomethyl)glycine), an active ingredient

of many herbicides, such as Roundup® TURBO, and the most commonly used herbicide active ingredient in the world (El-Shenawy 2009). Glyphosate and its primary degradation product aminomethylphosphonic acid (AMPA) are detected in soils and sediment, ditches, drains, rainwater, rivers, and streams (Rebai *et al.*, 2017). Roundup is marketed as a non-selective, broad spectrum and post-emergence herbicide due to its high water solubility. It kills plants by inhibiting the synthesis of aromatic amino acids needed for protein formation (Battaglin *et al.*, 2014). Roundup is slightly toxic to fish, practically non-toxic to amphibians and aquatic invertebrate animals, and exhibits low oral and dermal acute toxicity to humans (Larsen *et al.*, 2012). Over the last two decades, toxicological research has shown the induction of oxidative stress after exposure to pesticides as a possible mechanism of toxicity. According to several studies, the pesticides, including roundup, cause overproduction of reactive oxygen species (ROS) in intra- and extracellular spaces, resulting in the disruption of pro-oxidant equilibrium/cellular oxidative balance and leading to the oxidative stress state (El-Shenawy, 2009; Heritier *et al.*, 2017). In humans, glyphosate is not fully absorbed after oral administration (approximately 20% of the dose administered is excreted in the urine after 48 h), being mainly eliminated unchanged via the feces. The absorbed glyphosate is poorly metabolized, gets widely distributed in the body, does not undergo enterohepatic circulation and is rapidly eliminated without bioaccumulation (“Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate”, 2015).

Indeed, in a study conducted in 2011 and 2012 in Denmark (Knudsen *et al.*, 2017), urine spot samples of mothers (n=13) and children (n=14) revealed concentrations of glyphosate above the limit of detection (LOD, 2.5 $\mu\text{g/L}$) in both urban and rural dwelling populations. It was found that when ROS formation exceeded the scavenging ability of antioxidant defenses, free radicals accumulated and increased oxidative damage to critical biomolecules such as enzymes, proteins, membrane lipids and DNA (Mohammadirad & Abdollahi, 2011). Several studies indicate that glyphosate and GLP-based herbicide (GBH) intoxication causes oxidative stress by generating free radicals and induces tissue lipid peroxidation. In response to oxidative damage, organisms have developed enzymatic antioxidant defense systems, which are represented mainly by superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), and glutathione reductase. These enzymes detoxify ROS and maintain a healthy redox state in a highly synchronized

and cooperative manner (Tang *et al.*, 2017; Yazdinezhad *et al.*, 2017). Organophosphate pesticides was found to repress cytochrome P450 and two other enzymes (glutathione-S-transferase and G-6-P dehydrogenase) essential for xenobiotics detoxication in the body (Almeida *et al.*, 2017). However, RDP toxicity towards serum acetylcholinesterase (AChE), lactate dehydrogenase (LDH), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), and acid phosphatase (AP) has been recently determined (Rebai *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2017). RDP poisoning can affect several organs, including the brain, heart, kidney, liver and reproductive system (Dai *et al.*, 2016; Tizhe *et al.*, 2014; Turkmen *et al.*, 2019). Several epidemiological studies have shown the importance of increasing the antioxidant capacity of the body with exogenous antioxidants such as vitamins, carotenoids, trace elements and minerals (Djeffal *et al.*, 2015; Barkat *et al.*, 2015). Flaxseed or linseed (*Linum usitatissimum*) is an annual plant that belongs to the family Linaceae (Varghese *et al.*, 2017). The research study of Hendawi and others (Hendawi *et al.*, 2016) has shown that linseed oil obtained by the company EL-captan contains high levels of unsaturated fatty acid: C18:1 (Oleic) (45.63%), C18:3 (γ -Linolenic) (8.93%) and C18:2 (Linoleic) (4.19%), as evaluated with gas liquid chromatography (GLC) of fatty acid methyl esters. In addition, it has been reported that linseed oil is among the most well-known edible oils in the world and is in demand as a nutritional supplement (Ye *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2008). Being a source of α -Linolenic acid, it is a precursor of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) (Rubilar *et al.*, 2010) and plays an active role in the cell membrane integrity (Karaca & Eraslan, 2013). Linseed is rich in n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA), especially omega-3 fatty acid that has pharmacological and therapeutic effects, in particular, antidiabetic, antioxidant, anti-inflammatory, anti-cancer and immunomodulatory. Linseed is also used for the treatment of cardiovascular diseases, dermatological, neurological and hormonal disorders, and metabolic syndromes such as obesity (Hendawi *et al.*, 2016; Jamilian *et al.*, 2017; Varghese *et al.*, 2017). *L. usitatissimum* is a source of healthy oil that has good anti-free radical properties and good oxidation stability, probably due to the changes in its fatty acid profile (Jamilian *et al.*, 2017). To the best of our knowledge, no study has examined the protective effects of LuO on RDP-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. Therefore, the present study was conducted to assess some biochemical parameters, antioxidant status and histopathological alterations in the liver and kidney of RDP-exposed rats. It also tried to determine whether the treatment with LuO could alleviate RDP-induced toxicity.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. The herbicide used in this study was a commercial formulation (Roundup® TURBO) containing the active ingredient glyphosate 450 g/l. The chemical name for glyphosate is N-phosphonomethyl glycine (C₃H₈NO₃P) (Fig. 1), with a CAS registry number 1071-

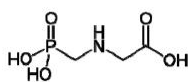


Figure 1. Chemical structure of glyphosate

83-6 and homologation number 05 43 087. This product is made by MONSANTO firm and distributed by Agro Consulting International, Algeria.

Linseed Oil Resource. *Linum usitatissimum* oil was obtained from a local commercial market El-Captain (El-Obour City, Cairo, Egypt), a company for Extracting Natural Oils, Plants and Cosmetics. All the other reagents used in this study were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Total phenolic acids content. Total phenolic acids content was measured using Folin-Ciocalteu reagent, following Wolfe and others (Wolfe *et al.*, 2003). The total phenolic acids content of plant fragments was expressed in mg of gallic acid equivalents per gram of plant dry matter (mg GAE/g DM) through the calibration curve with gallic acid.

Total flavonoids content. Total flavonoid content was measured using a colorimetric assay according to the method of Poumorad and others (Poumorad *et al.*, 2006). The concentrations of flavonoids, calculated based on a standard curve, were expressed in mg quercetin equivalent to (QE)/g dry matter (DM).

Total tannins content. Total tannins content was estimated according to the protocol developed by Julkunen-Tiitto (Julkunen-Tiitto, 1985). The results are expressed in mg of catechin equivalent (CE)/g DM.

DPPH radical scavenging activity. The antioxidant activity of LuO was measured in context of radical scavenging ability using the DPPH method of Blois (Blois, 1958). The antiradical activity was expressed as IC₅₀ (mg/ml). The percent inhibition of DPPH free radical was calculated as follows:

$$I\% = \left(\frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}} \right) \times 100$$

Ferric reducing antioxidant power (FRAP) activity. The reducing power of a sample was determined using the method of Pan and others (Pan *et al.*, 2008), where absorbance of a sample was measured at 700 nm. An increase in absorbance of the reaction mixture indicated increased reduction of Fe⁺³.

Animals and experimental design. All the protocols used in this study were approved by the Ethical Committee of Directorate General for Scientific Research and Technological Development at Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research, permit no PNR/SF 08/2012. Twenty-four male albino Wistar rats weighing 250±13 g (aged 8-9 weeks) were provided by Pasteur Institute (Algiers, Algeria). They were housed in cages at room temperature of 23±2°C and kept under standard conditions of an average relative humidity of 40% and a natural photoperiod. The rats were fed a standard laboratory diet (standard food, supplied by the "ONAB of Bejaia", Algeria) and water was available *ad libitum*. The animals were habituated to these conditions for one month prior the experiments. The rats were randomly divided into four groups of six animals each:

Control: rats had free access to water and commercial standard pelleted food;

RDP (RDP-Treated group): received RDP in their drinking water (269.9 mg/kg B.W.);

LuO (LuO-Treated group): rats were force-fed with LuO (0.5 g/kg B.W.);

RDP+ LuO (RDP+LuO-Treated group): rats received both RDP and LuO.

The dose of RDP used in this study represented 1/18 of LD₅₀ (269.9 mg/kg B.W.). This dose was used in pre-

vious investigations as it is toxic, but not lethal to rats (El-Shenawy, 2009). The dose of LuO (0.5 g/kg B.W.) gave a good protection against Roundup toxicity (Hendawi *et al.*, 2016). During the treatment period (30 days), food intake and water consumption, as well as body weight of the animals, were monitored regularly. At the end of the experiment, the animals fasted overnight and their total body weight was recorded. They were then sacrificed by cervical decapitation without anesthesia in order to minimize the animals' stress.

Biochemical analysis. Rats' blood was collected into non-heparinized tubes and centrifuged for 15 min at 3000 rpm at 4°C. Serum samples were stored at -20°C for subsequent analysis of glucose, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), lactate dehydrogenase (LDH), gamma-glutamyl transferase (GGT), total bilirubin, total proteins, albumin, cholesterol, triglycerides, HDL, LDL, creatinine, urea and uric acid. All parameters were estimated using commercial kits from COBAS INTEGRA400 (glucose, ref. 2172682; AST, ref. 2056097; ALT, ref. 2056119; ALP, ref. 20766739 and 20759961; LDH, ref. 2055503; GGT, ref. 20759996; total bilirubin, Ref. 20737488; total proteins, ref. 2053039; albumin, ref. 20737461; Cholesterol, Ref. 20763012; Triglycerides, Ref. 2144620; HDL, Ref. 03038637; LDL, Ref. 03038866; creatinine, Ref. 20764345; urea, Ref. 2055660; uric acid, Ref. 2054728).

Tissue preparation. After the animals were sacrificed, their livers and kidneys were immediately removed, washed in a 0.9% NaCl solution and weighed. The relative weight of these organs (%) was calculated as g/100 g body weight. Then, one lobe of liver and another of kidney were used for histological examination. The remaining lobes of liver and kidney were homogenized on ice in Tris-Buffered Saline (1:2 *w/v*; 1 g of tissue with 2 ml TBS: 50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH 7.4) and the cell suspension was centrifuged (9000 rpm, 15 min at 4°C). The supernatants were divided into aliquots and then stored at -20°C for oxidative parameters analysis.

Histopathological examination. Samples of tissues (livers and kidneys) were fixed in 10% formaldehyde. They were dehydrated in a series of increasing alcohol concentrations (70–100%) (LEICA TP1020) and embedded in paraffin. The tissues were cut in 5 µm thick slices using microtome (LEICA RM2235), then deparaffinized and stained with hematoxylin and eosin (H&E) and examined using LEICA DM 1000LED microscope, following the method of Hould (Hould, 1984).

Measurement of lipid peroxidation levels. Malondialdehyde (MDA), which is the end product of oxidation of polyunsaturated fatty acids, was assessed as a marker for lipid peroxidation. MDA reacts with thiobarbituric acid (TBA) as TBARS to produce a red colored complex that has a peak absorbance at 532 nm (Buege & Aust, 1978). The amount of TBARS in a sample was calculated using an extinction coefficient of $1.56 \times 10^5 \text{ M/cm}$ and expressed in nmol MDA/mg of protein.

Measurement of advanced oxidation protein product contents. The advanced oxidation protein product (AOPP) is a marker of oxidant-mediated protein damage. Its level was determined according to the method of Kayali and others (Kayali *et al.*, 2006) by the formation of dityrosine-containing and cross-linking protein products. The absorbance of the reaction mixture was immediately recorded at 340 nm. The concentration of AOPP was expressed in nmol/mg of protein.

Content of reduced glutathione. Reduced glutathione (GSH) content of liver and kidney homogenates was determined using a colorimetric technique described by Ellman (Ellman, 1959) and modified by Jollow and others (Jollow *et al.*, 1974), which is based on measuring optical absorbance at 412 nm that reflects the reduction of DTNB [5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)] by -SH groups of glutathione. The total GSH content is expressed in nmol GSH/mg protein.

Content of vitamin C. Vitamin C (ascorbic acid) level measurement was performed as described by Jacques-Silva and others (Jacques-Silva *et al.*, 2001), using the oxidation of vitamin C with copper to form dehydroascorbic acid. This product was further treated with 2,4-dinitrophenylhydrazine to form an osazone, which, when treated with sulphuric acid, resulted in a colored product. Absorbance of the sample was measured at 540 nm and the result was expressed in mmol of ascorbic acid/mg of protein.

Measurement of antioxidant enzyme activities. The glutathione peroxidase (GPx) (E.C.1.11.1.9) activity in a sample was measured using the method of Flohé and Günzler (Flohé & Günzler, 1984), based on the reduction of hydrogen peroxide (H₂O₂) in the presence of reduced glutathione (GSH). The absorbance of the sample was recorded at 420 nm. Specific GPx activity was expressed in mmol GSH/mg protein.

The glutathione-S-transferase (GST) (E.C.2.5.1.18) activity in the tissues was measured spectrophotometrically using the method of Habig *et al.*, (1974). It is based on the conjugated reaction of glutathione and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) which, in turn, results in a new molecule that absorbs light at 340 nm. The GST activity is expressed in µmol CDNB/GSH /min/mg protein.

The catalase (CAT) (E.C.1.11.1.6) activity was measured according to Aebi (Aebi, 1984). This assay is based on the ability of the enzyme to degrade hydrogen peroxide followed by the decrease in absorbance at 240 nm using a UV/visible light measured for 1 min. CAT activity is expressed in µmol H₂O₂ consumed/min/mg protein.

The superoxide dismutase (SOD) (E.C.1.15.1.1) activity in a sample was determined with the method of Beyer Jr and Fridovich (Beyer Jr & Fridovich, 1987), using nitrotriazolium blue tetrazolium (NBT) test and photo-reduction of riboflavin/methionine, which generates superoxide anion. In aerobic conditions, the mixture of riboflavin, methionine and NBT is blue. The presence of SOD inhibits the oxidation of NBT and changes the absorbance at 560 nm. The changes in samples absorbance were recorded after 20 min of incubation of the reagents and tissue samples. Units of SOD activity were expressed as the amount of enzyme required to inhibit the reduction of NBT by 50%. The activity was expressed as units/mg of protein.

Content of protein carbonyl groups. Protein carbonyl levels in the samples were estimated with the method described by Levine and others (Levine *et al.*, 1990). The homogenates were incubated with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) in 6M guanidine hydrochloride. As DNPH binds selectively to the protein carbonyl groups the absorbance at 370 nm changes. The level of protein carbonyls was expressed in nmol/mg of protein.

Protein content estimation. The protein content of tissue samples was measured spectrophotometrically at 595 nm using the method of Bradford (Bradford, 1976), with bovine serum albumin as a standard.

Statistical analysis. All data were expressed as means ± standard error means (S.E.M) for six rats in each

Table 1. Amounts of total phenols content, total flavonoids, condensed tannins and anti-radicular DPPH scavenging activity in LuO

Studied parameters	Values
Total phenolic acids content (mg GAE/100 g of LuO)	0.11±0.01
Total flavonoid content (mg QE/g LuO)	0.32±0.01
Condensed tannins (mg CE/g LuO)	0.25±0.02
50% scavenging concentration (mg/ml) on DPPH radical	22.85±2.6
FRAP test (EC50 mg/ml)	10.36±1.59

n=3, GAE, gallic acid equivalents; QE, quercetin equivalents; CE, catechin equivalents.

group. The statistical analysis (comparison between all the groups) was performed with one-way ANOVA followed by Student's *t*-test to evaluate the significance of differences. *P*<0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Antioxidant activity of LuO

The total phenolic content of LuO product was 0.11 mg of CAE per 100 g of extract as shown in Table 1. The total flavonoid content is expressed as 0.32 mg of quercetin equivalent per gram of LuO. In addition, LuO contained 0.25 mg of condensed tannins, expressed as mg of catechin equivalent per gram. The antioxidant activity (DPPH) IC₅₀ was 22.85 mg/ml, and ferric reducing antioxidant power (FRAP) was IC₅₀=10.36 µg/ml, showing the reductive potential of LuO.

Effects of treatment on general rat health

During the experimental period no deaths were observed in any group. The rats in the control and LuO groups showed no signs of systemic toxicity. However, the rats in RDP group showed clinical signs such as anorexia, loss of body weight, exhaustion, and inflammation of the salivary glands (the cause of drooling). All these clinical signs were related to the acute toxicity of RDP. Furthermore, the rats in RDP+LuO group

showed some symptoms of anorexia and loss of body weight.

Effect of treatment on body, liver and kidney weight, food intake and water consumption

As shown in Table 2, the final body weight and the absolute liver and kidney weight of rats decreased significantly in the RDP, LuO and RDP+LuO groups of (-38%, -13% and -25%), (-21%, -14% and -22%), (-21%, -14% and -22%) and (-14%, -13% and -13%), respectively, compared to the control group. This decrease was associated with the reduction in food intake and water consumption in RDP, LuO and RDP+LuO groups (-19%, -14% and -33%), (-24%, -9% and -37%, respectively), when compared to the control group. However, the administration of LuO correlated with a significant increase in absolute liver and kidney weight when compared to rats from the RDP group.

Effect of treatment on serum biochemical parameters

As shown in Table 3, administration of RDP caused hepatic toxicity in rats. Serum glucose levels in rats from the RDP group tended to be higher than in control. Furthermore, the enzymatic activity of AST, ALT, ALP, LDH, total bilirubin and GGT was significantly higher in rats exposed to RDP than in the control group (48%, 37%, and 43%, 58%, 29% and 115%, respectively). In addition, urea and creatinine levels increased significantly in RDP group compared to the control group (11% and 16%), indicating nephrotoxicity. The levels of total protein and albumin in the serum were significantly lower in the RDP group. Similarly, the serum lipid profile in the RDP group showed a significant decrease in total cholesterol and triglycerides as compared to the control group (8% and 21%). However, the co-administration of LuO alleviated the RDP effect on blood biochemical variables.

Antioxidant defense status in the liver and kidney

Table 4 and Table 5 summarize the effects of RDP exposure and LuO administration on antioxidant defense systems in rat liver and kidneys. An increase in MDA (46%, 17% respectively), AOPP (18%, 14% respectively), and PCOs (25%, 15% respectively) was observed in the RDP and LuO-RDP groups compared to the control. On the

Table 2. Effects of treatments on body weight (g), absolute (g) and relative liver and kidneys weights (g/100 g bw), daily food intake (g) and drinking water consumption (ml) in experimental groups.

Studied parameters	Control	RDP	LuO	RDP+LuO
Initial Body weights (g)	249.6±2.7	250.33±4.64	250.5±7.29	249.66±7.86
Final Body weights (g)	299.5±11.4	235.5±4* <i>p</i> =0.0001	257.5±11.94	233.5±8.68 <i>p</i> =0.33
Absolute liver weights (g)	9.00±0.43	5.55±0.23** <i>p</i> =0.001	7.79±0.21	6.70±0.49** <i>p</i> =0.004
Absolute kidney weights (g)	1.85±0.09	1.59±0.03** <i>p</i> =0.013	1.61±0.07	1.59±0.05 <i>p</i> =0.48
Food intake (g/day/rat)	21.66± 0.69	17.43±1.18*** <i>p</i> =0.0002	18.69±0.66	14.51±1.23*** <i>p</i> =0.0001
Quantities of drinking water consumption (ml/day/rat)	32.65± 2.34	24.84±2.85*** <i>p</i> =0.00002	29.52 ±2.44	20.31± 2.02 *** <i>p</i> =0.0003
Quantities of RDP ingested (mg/day/rat)	-	67.75 ±7.79	-	55.39±5.52** <i>p</i> =0.002

Values are given as mean ±SEM for groups of 6 animals each. Significant difference: LuO, RDP groups compared to the control (***p*<0.01, ****p*<0.001), RDP+LuO compared to the RDP group (***p*<0.01, ****p*<0.001).

Table 3. Effects of treatments on serum biochemical parameters

Parameters studied	Control	RDP	LUO	RDP+LUO
Glucose	0.99±0.01	1.09±0.03** p=0.01	0.96±0.02	1.00±0.03# p=0.04
ASAT	221.06±24.12	330.42±20.06** p=0.004	272.42±6.21	266.3±11.73# p=0.05
ALAT	66.5 ±1.75	91.5±7.20** p=0.003	72.66±1.14	66.5±2# 0.003
LDH	2188±223.16	3472.6±205.67*** p=0.0008	2406±124.01	2085.5±142.06### p=0.001
ALP	104.13±8.53	149.13±13.61** p=0.009	106.4±3.02	114.51±3.18## p=0.01
GGT	8.01±0.55	17.3±1.38*** p=0.00001	7.96 ±1.2	8.33±1.24### p=0.0003
Bil.T	1.03±0.07	1.33±0.13* p=0.04	0.66±0.05	0.43±0.04### p=0.00002
Prot.T	83.85±1.11	75.8±2.25** p=0.004	85.56±1.93	83.86±1.51 ## p=0.006
Alb	33.42±2.27	26.98±1.62* p=0.02	35.85±1	33.58±2.04## p=0.01
Cholesterol	1.5±0.05	1.62±0.04* p=0.05	1.49±0.05	1.34±0.04### p=0.0004
Triglycerides	0.57±0.02	0.69±0.04* p=0.02	0.58±0.01	0.58±0.02# p=0.02
HDL	1.42±0.06	0.85±0.07*** p=0.0001	1.2±0.08	1.03±0.04# p=0.04
LDL	0.14±0.005	0.18±0.01** p=0.01	0.10 ±0.009	0.16±0.02 p=0.22
Urea	12.35±0.47	13.72±0.45* p=0.03	11.64±0.23	12.45±0.55## p=0.003
Creatinine	34.66±0.71	40.5±1.38*** p=0.001	32.33±1.31	38.66±1.02## p=0.15

Values are given as mean ±S.E.M. for groups of 6 animals each. Significant difference: LuO, RDP groups compared to the control (*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001), *RDP+LuO compared to the RDP group (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

Table 4. Antioxidant defense status in liver of treated and control rats.

Studied parameters	Control	RDP	LuO	RDP+LuO
MDA (nmol/mg protein)	23.41±3.13	34.33±1.71** p=0.005	16.13±1.35	23.43±1.34### 0.0002
AOPP (nmol/mg protein)	0.039±0.002	0.046±0.002** p=0.01	0.038±0.001	0.04±0.002# p=0.02
PCO (nmol/mg prot.)	80.46±3.68	100.53±2.8*** p=0.0007	81.16±2.25	82.83 ±4.75## p=0.004
GSH (µmol/mg prot.)	2.6±0.14	1.85±0.16** p=0.003	2.39±0.12	3.11±0.14### p=0.00003
Vitamin C (mmol ascorbic acid/mg of protein)	1.0±0.01	0.94±0.02* p=0.03	1.0±0.01	1.0±0.006# p=0.03
CAT (µmol H2O2/min/mg protein)	347.5±35.67	134.83±8.46*** p=0.00002	328.83±23	347.66±21.41### p=0.00003
GPx (nmol GSH/min/mg protein)	1.05±0.13	1.91±0.18*** p=0.001	0.95±0.12	1.32±0.12## p=0.01
GST (nmol/mg protein)	0.13±0.02	0.05±0.002*** p=0.001	0.1±0.007	0.08±0.01# p=0.006
SOD (U/mg de protein)	294.16±15.54	166.83±19.74*** p=0.0002	293.33±20.38	273.66±17.71### p=0.001

Values are given as mean ±S.E.M. for groups of 6 animals each. Significant difference: LuO, RDP groups compared to the control (*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001), *RDP+LuO compared to the RDP group (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Table 5. Antioxidant defense status in kidney of treated and control rats.

Studied parameters	Control	RDP	LuO	RDP+LuO
MDA (nmol/mg protein)	28.07±1.18	32.92±1.31** <i>p</i> =0.01	18.89±1.92***	20.76±2.72## <i>p</i> =0.001
AOPP (nmol/mg of protein)	0.021±0.001	0.024±0.0007* <i>p</i> =0.05	0.023±0.002	0.02±0.002* <i>p</i> =0.08
PCO (nmol/mg prot.)	74.83±3.66	86.16±4.14* <i>p</i> =0.03	73.33±3.58	74.66±3.77* <i>p</i> =0.03
GSH (μmol/mg prot.)	0.75±0.03	0.63±0.03** <i>p</i> =0.01	0.72±0.03	0.68±0.01 <i>p</i> =0.14
Vitamin C	0.43±0.010	0.029±0.014* <i>p</i> =0.05	0.038 ±0.015	0.035±0.018 <i>p</i> =0.36
CAT (μmol H ₂ O ₂ /min/mg protein)	605± 8.72	418.5±52.02** <i>p</i> =0.002	571.83 ±68.04	471.01±35 <i>p</i> =0.21
GPx (nmol of GSH/min/mg protein)	0.57±0.07	0.76±0.06* <i>p</i> =0.05	0.56±0.04	0.45±0.05## <i>p</i> =0.002
GST (nmol/mg protein)	0.06±0.004	0.051±0.002* <i>p</i> =0.05	0.066±0.006	0.054±0.006 <i>p</i> =0.36
SOD (U/mg de protein)	162.16±13.03	73.83±7.3*** <i>p</i> =0.00002	197.83±21.45	134.5±7.31## <i>p</i> =0.00004

Values are given as mean ±S.E.M. for groups of 6 animals each. Significant difference: LuO, RDP groups compared to the control (**p*<0.05,***p*<0.01,****p*<0.001), RDP+LuO compared to the RDP group (**p*<0.05, ***p*<0.01****p*<0.001).

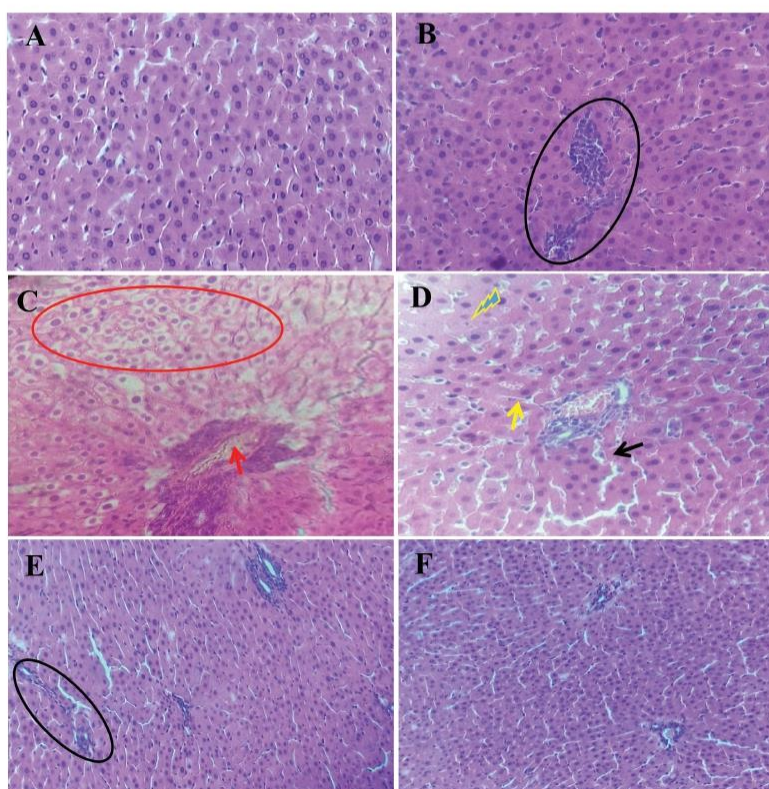


Figure 2. Effect of Roundup (RDP) and Linseed oil co-administrated with RDP on histopathological damages in the liver. Controls (A, x40), treated with RDP (B to D, x40), LuO co-administrated with RDP (E, x40) and LuO (F, x40) after 4 weeks of treatment, as revealed by photomicrograph of H&E. Vascular congestion (red arrow), mononuclear infiltration (black circle), dilation of sinusoids (black arrow), and hemorrhage (yellow arrow), necrosis () and degeneration and ballooning of hepatocyte (red circle).

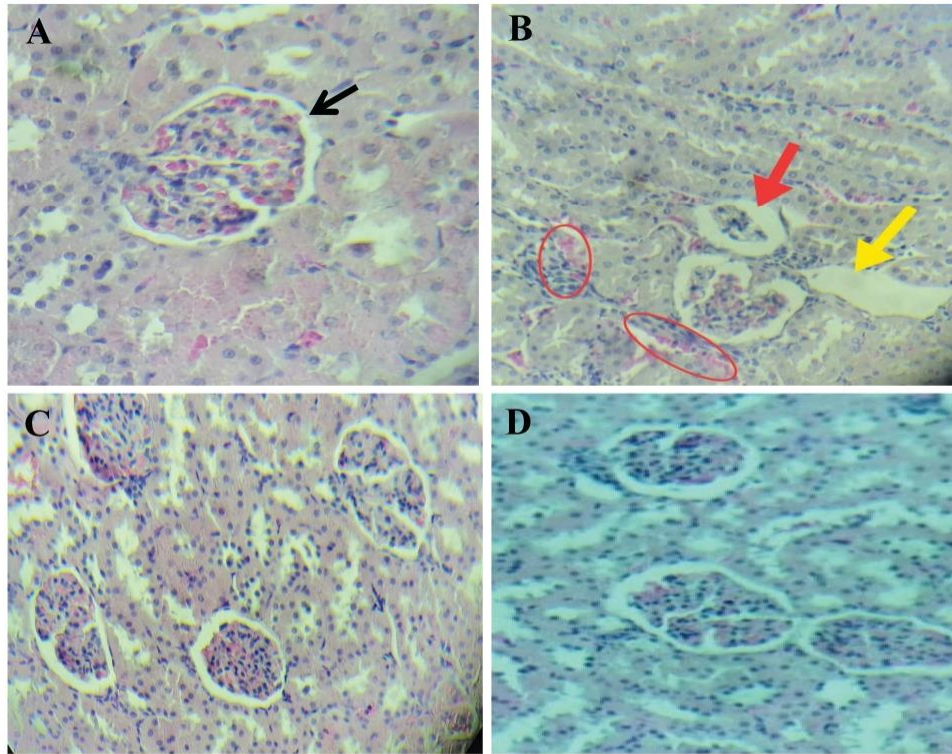


Figure 3. Effect of Roundup (RDP) and Linseed oil co-administrated with RDP on histopathological damages in the liver. Controls (A, x40), treated with RDP (B, x40), LuO co-administrated with RDP (C, x40) and LuO (D, x40) after 4 weeks of treatment, as revealed by photomicrograph of H&E. Space of Bowman (black arrow), tubular dilatation (yellow arrow), hemorrhagic (circle) and atrophied and collapsed malpighian (red arrow).

other hand, the activity of enzymatic and non-enzymatic antioxidants significantly decreased in the RDP and LuO-RDP groups as compared to the control: GSH (-28%, -15% respectively), Vit C (-6%, -14% respectively), CAT (-61%, -30% respectively), GST (-60%, -14% respectively) and SOD (-43%, -54% respectively), and the level of GPx increased (80%, 31% respectively). In general, administration of LuO significantly improved the antioxidant parameters in the studied organs of rats treated with RDP.

Histopathological Results

Histopathological changes in rat liver and kidney resulting from RDP treatment are shown in Figs 2 and 3, Tables 6 and 7, respectively. The control rats presented

normal hepatic morphology with distinct hepatocytes with prominent nuclei and no tissue damage (Fig. 2A). In contrast, liver sections of Roundup-treated rats showed severe structural damage characterized by mononuclear cell infiltration, periportal expansion, ballooning and degeneration of hepatocytes, necrosis, vascular congestion and sinusoidal dilatation (Fig. 2B to D). However, the livers of the rats from the LuO and RDP treated group had healthier histology than the rats from RDP-only treated group (Fig. 2E). No histological alteration in the liver was observed between the LuO and control groups (Fig. 2F). The histopathological kidney examination showed normal histology in the control group (Fig. 3A). However, the kidneys of rats exposed to Roundup exhibited glomerular dam-

Table 6. Semi quantitative scoring of histopathological changes in the liver sections of control and rats treated with Roundup (RDP), linseed oil (LuO) or their combination (RDP+LuO) after 4- week treatment.

Studied parameters	Control	RDP	LuO	RDP+LuO
Mononuclear cell infiltration	-	+++	-	+
Hepatic hemorrhage	-	+	-	-
Necrosis	-	++	-	-
Vascular congestion	-	+++	-	-
Ballooning and degeneration of hepatocyte	-	+++	-	-

(-) indicates normal, (+) indicates mild, (++) indicates moderate, and (+++) indicates severe.

Table 7. Semi quantitative scoring of histopathological changes in the kidney sections of control and rats treated with Roundup (RDP), linseed oil (LuO) or their combination (RDP+LuO) after 4-week treatment.

Studied parameters	Control	RDP	LuO	RDP+LuO
Atrophied Malpighian	-	++	-	+
Tubular dilatation	-	+++	-	-
Hemorrhagic	-	++	-	-

(-) indicates normal, (+) indicates mild, (++) indicates moderate, and (+++) indicates severe.

age characterized by reduced Bowman space, atrophied and collapsed Malpighian glomeruli, tubulo-interstitial involvement of hemorrhagic suffusion zones, and dilation of proximal convoluted tubules (Fig. 3B). However, the co-administration of LuO with RDP resulted in a reduction in Bowman's space and normal cell morphology in the kidney when compared to Roundup-treated group (Fig. 3C). No histological alteration in the kidneys was observed between the LuO and control group of rats (Fig. 3D).

DISCUSSION

Exposure to toxic substances such as pesticides in the environment can contribute to the emergence of oxidative stress in biological systems and metabolic imbalance (Djeffal *et al.*, 2015). Many studies have been conducted to relate Roundup® use to liver damage and renal failure in animals (Tang *et al.*, 2017) and a number of human diseases (Seneff & Orlando, 2018). Natural antioxidants have been considered to play an important role in counteracting the oxidative stress induced by various xenobiotics in tissues (Bouasla *et al.*, 2014). In our experiments, the phytochemical analysis of flaxseed oil revealed the presence of phenolic acids compounds, flavonoids and condensed tannins, with a noticeable antioxidant activity. The antioxidant activity of LuO has been evaluated on the basis of radical scavenging effect on the free radical DPPH, which has been widely accepted as a tool for estimating the activities of antioxidants on free radicals (Beroual *et al.*, 2017).

The obtained results demonstrated that exposure to Roundup® TURBO at 269.9 mg RDP/kg/day b.w. in drinking water for 30 days caused a significant decrease in the rats' body weight and their liver and kidneys weight. These results were consistent with previous studies in adult rats exposed to various pyrethroid insecticides widely used in agriculture: imidacloprid, deltamethrin and methomyl (Kapoor *et al.*, 2011; Saoudi *et al.*, 2011; Djeffal *et al.*, 2015). We supposed that the decrease in body weight observed in RDP-treated rats was probably due to the lower food intake, as RDP exposure may account for a reduced water and food intake. Our results are in agreement with those published by Tang and others (Tang *et al.*, 2017) who have stated that the exposure to Roundup evokes a significant reduction in body weight, in liver and kidneys weight. Moreover, most physiological functions were modified in correlation with significant changes in food and water consumption. These observations were similar to those of the Çağlar and Kolankaya (Çağlar & Kolankaya, 2008) and Barkat and others (Barkat *et al.*, 2015). RDP and LuO treated rats also showed a significant reduction in body weight compared to control rats.

Flax is low in carbohydrates but extremely high in both soluble and insoluble fiber (Zhang *et al.*, 2008). In traditional medicine, linseed oil is used in the diet be-

cause taking flaxseed oil gives a feeling of fullness that lasts for a long time. As a result, the co-administration of LuO to RDP-treated group prevents the decrease in rats' absolute weight of liver and kidneys.

In the present study, a significant increase in blood glucose levels was recorded in Roundup-treated rats. This hyperglycemia may be due to an increase in insulin production and lesions in the islets of Langerhans and acinar cells caused by oxidative stress damage (Tizhe *et al.*, 2018). Many authors report that the elevation of glucose rate in organophosphorus may indicate the disruption of carbohydrate metabolism emanating from the increased degradation of hepatic glycogen (Al-Attar, 2015). On the other hand, the RDP-treated rats exhibited a significant increase in TG, serum cholesterol, and LDL-C compared to the control rats. Hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia can be explained by an increase in lipid peroxidation and free radicals release. MDA tested in the liver and kidneys in RDP-treated rats suggested a high lipid peroxidation. HDL-C could protect LDL-C against oxidation *in vivo*, since the lipids of HDL-C are preferentially oxidized before those of LDL-C (Bowry *et al.*, 1992). Our results agree well with those obtained by (Al-Attar, 2015; Meligi & Hassan, 2017).

Flaxseed oil is rich in alpha-linolenic acid (ALA). It was shown that ALA supplementation improves glucose tolerance and reduces insulin resistance (Goncalves *et al.*, 2018). The obtained results indicate that LuO administered orally attenuates the extensive changes in the energetic profile parameters such as glucose and lipid profile in RDP-treated rats (Costa *et al.*, 2018; Pilar *et al.*, 2017).

The liver is the first organ that protects the body from xenobiotics. Leak of liver enzymes such as ALT, AST, and ALP into the blood serum is a sign of hepatocellular damage and hepatic dysfunction (Bischoff *et al.*, 2018). In our results, a significant increase in the activity of ALT, AST, ALP, LDH, and GGT occurred in the serum of RDP-treated rats as compared to the control ones. This elevation is probably due to a disruption of enzyme metabolism due to increased membrane permeability and leakage of these enzymes from hepatocytes into the blood (Dar *et al.*, 2019). The present results were in line with the previous reports, which demonstrated that an increase in hepatic parameters was induced in rats exposed to Roundup and deltamethrin (Dar *et al.*, 2019; Saoudi *et al.*, 2011). Nevertheless, Çağlar and Kolankaya (Çağlar & Kolankaya, 2008) observed a decrease in transaminase activity in rats that received glyphosate-based herbicide during 5 to 13 weeks. This discrepancy is probably due to the body adaptation during long exposure to the chemical. A significant increase in bilirubin blood levels was also observed in the Roundup-treated rats compared to the control group, confirming liver damage and its histopathological changes. Our data are in line with the observation that pesticides exposure exhibits clear-cut abnormalities in the biomarkers of tissue damage (Kanbur *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2013). In our study, long-lasting exposure to RDP caused a significant

decrease in total protein and albumin levels in serum. These results are consistent with the findings of many other studies (Barkat *et al.*, 2015; Uchendu *et al.*, 2017), in which total protein and albumin levels in rats treated with organophosphorus pesticides were decreased. Irreversible changes induced by ROS, such as the formation of carbonylated proteins and the accumulation of these products in tissues, are usually associated with a permanent loss of protein function and are considered as indicators of oxidative damage and protein dysfunction (Fagan *et al.*, 1999). It is interesting to note that the co-administration of RDP and LuO partially suppressed the hepatotoxic effect of RDP. The reduction in activity of the key hepatic enzymes indicates the regeneration process of hepatocyte membranes. An increase in blood bilirubin and normalization of both albumin and total proteins was also noticed. Similar results demonstrated that LuO attenuated severe changes in hepatic biochemical parameters in rats treated with pesticides (Chavan *et al.*, 2013; Hana & Sae, 2013; Hendawi *et al.*, 2016). Another organ vulnerable to pesticide damage is the kidney, due to larger perfusion and increased concentration of excreted compounds that occur in renal tubular cells (Messarah *et al.*, 2013). Serum levels of creatinine and urea were used as indicators of renal function. Elevated blood urea is known to be linked with an increased protein catabolism as a result of increased synthesis of arginase enzyme involved in urea production (Saoudi *et al.*, 2011). In this study, increased serum creatinine and urea levels in rats treated with RDP reflected renal failure. Our results are similar to those obtained by Dedeke and others (Dedeke *et al.*, 2018) who monitored changes in the kidney biomarkers in rats exposed to RDP. Uric acid is a final product of purine degradation and is eliminated in the urine. In our study, the increase in serum uric acid may be explained by a strong degradation of nucleic acids (DNA and RNA). Therefore, the high level of circulating uric acid may be an indicator of the effectiveness of cellular defense against the deleterious effects of free radicals. This may be the cause of the increase of uric acid in Roundup-treated rats (El-Shenawy, 2009). LuO administered to rats was found to inhibit the RDP poisoning effects on the renal dysfunction markers (Hana & Saed, 2013). Indeed, the imbalance between antioxidants and pro-oxidants causes damage to the integrity of the cell membrane (Slama *et al.*, 2018). The impact of ROS on biological membranes is analyzed using a test determining the degree of lipid peroxidation and protein oxidation. The increase in ROS level in the cell may be due to either overproduction of these reactive substances, or a decrease in the cell's capacity to neutralize them (Kirschvink *et al.*, 2008). Our research work demonstrated a significant increase in the level of MDA and AOPP in the liver and kidney in the RDP-treated group compared to the control group. The aromatic amino acids with a thiol group are the most sensitive to the oxidation and are a particular ROS target in proteins (Aydin *et al.*, 2010). Moreover, our results showed an increase in PCO, whose elevation may be due to the formation of adducts between certain amino acid residues and lipid peroxidation products such as MDA (Stadtman & Levine, 2006). These results are in correlation with previous reports (Abarikwu *et al.*, 2015; Hamdaoui *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2017; Yazdinezhad *et al.*, 2017), which suggested that organophosphate (glyphosate and chlorpyrifos) metabolism might generate reactive oxygen species (ROS), which in turn could lead to enhanced lipid peroxidation and protein oxidation. However, LuO supplementation causes a significant decrease in oxida-

tive damage of protein and lipid peroxidation content in RDP/LuO rats. Accordingly, in our study, the LuO protection against RDP could be based on the presence of the above-mentioned antioxidants. The linseed oil could transfer phenolic hydrogen to a peroxy free radical of a peroxidized n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) (Yang, 2012). Similar findings are reported by Karaca and Eraslan (Karaca & Eraslan, 2013) and Pilar and others (Pilar *et al.*, 2017). In fact, the body is able to produce endogenous antioxidants to reduce the damage caused by ROS, including GSH, Vit C and certain enzymes, such as SOD, CAT, GST and GPx (Khaldi *et al.*, 2018). This thiol is abundant in living organisms in its reduced form (GSH). The reaction of glutathione with free radicals generates superoxide anion and glutathione in its oxidized form (GSSG). This could explain the fact that the cell attempts to maintain a low level of GSSG under physiological conditions and that some organs such as the liver and kidneys eliminate GSSG under oxidative stress (Cossu *et al.*, 1997). Vit C plays a role of a protector of the cell compartment against free radicals (Djeflal *et al.*, 2015). RDP-treated rats exhibited a significantly lower level of this antioxidant in the renal and hepatic tissues compared to the control rats. Our results revealed that the RDP administered in rats' drinking water caused a decrease in glutathione and vitamin C levels in the liver and kidneys. This was due to the oxidation of GSH to GSSG to protect cells against oxidative damage (El-Shenawy, 2009; Hamdaoui *et al.*, 2016; Kasmi *et al.*, 2018).

The treatment with LuO was confirmed to increase the level of GSH and vit C. This result may be due to the protection mechanism of linseed oil against Roundup-induced toxicity by the reduction of GSSH and stabilized GSH level. The GPx and GST antioxidant enzymes found in the cytoplasm play a major role in the conversion of H₂O₂ and organic hydro-peroxides into water and alcohol using GSH as a cofactor (Slama *et al.*, 2018). The significantly lower levels of GST in hepatic and kidney tissues in Roundup-treated rats may be a consequence of the decreased GSH level that is used to inhibit the enzymes and induce their inactivation in the case of excessive production of H₂O₂ due to lipid peroxidation (Bhondave *et al.*, 2014). In fact, the results of our experiment also showed a highly significant increase in GPx of rats after exposure to RDP. However, (Djeflal *et al.*, 2015) have described an increase in GPx activity, suggesting that elevated enzymatic activity counteracts the oxidative stress induced by methomyl, and affirming that it is a way of adaptation of the body. The activities of GPx and GST enzymes are in concordance with the study of (Abarikwu *et al.*, 2015). CAT and SOD antioxidant enzymes are the first line of defense against the detrimental effects of free radical damage. They also convert superoxide radicals into H₂O₂. This function is only effective if it is followed by the actions of CAT, since the H₂O₂ produced by SOD is subsequently cleaned by the CAT (Zemmouri *et al.*, 2017). This explains why in this study we found a decrease in enzymatic activity of SOD and CAT in the treated rats compared to the control group, in all the studied tissue compartments (Abdel-Daim *et al.*, 2019; Turkmen *et al.*, 2019). Rats co-treated with LuO showed a significant improvement of the antioxidant enzymes GPx, GST, CAT and SOD activity when compared to RDP-treated rats. These findings constitute further evidence of LuO powerful antioxidant potential (Hendawi *et al.*, 2016; Pilar *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2017; Wei Yang *et al.*, 2012).

Histopathological studies corroborated the biochemical analysis. In particular, Roundup-exposed rats showed the infiltration of inflammatory cells, presence of degenerating and ballooning hepatocytes, necrosis, glomerular damage, and dilation of proximal convoluted tubules impairment in rats' hepatic and kidney cells. These results are in agreement with those obtained in other studies (Abarikwu *et al.*, 2015; Al-Attar 2015; Hamdaoui *et al.*, 2016; Larsen *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2017; Turkmen *et al.*, 2019), showing that Roundup evoked histopathological changes in liver and kidney tissue in rats. The protective activity of LuO has been demonstrated in rats with RDP-induced hepatic and renal toxicity. This is due to its high levels of omega-3 and ALA, which can protect against the oxidative damage of liver and kidney cell membranes via the free radical scavenging (Yang *et al.*, 2012). Furthermore, a protective effect of linseed has been reported against thiacloprid, cadmium, astaxanthin and hepatic steatosis (Goncalves *et al.*, 2018; Hendawi *et al.*, 2016; Karaca & Eraslan, 2013; Xu *et al.*, 2017).

CONCLUSION

In conclusion, the present study showed that Roundup was able to induce oxidative damage in adult rats by increasing lipid peroxidation, protein carbonylation, and protein oxidation associated with decreased antioxidant enzymatic activity, reduced glutathione content in the liver and kidneys. Given the biochemical effects of RDP in serum, there is a risk of cytotoxicity in farmers and other people who may be in contact with RDP-containing pesticides. Furthermore, the aggravation of inflammation and oxidative stress was confirmed with histological changes observed in our study. The use of linseed oil as an antioxidant proved effective in reducing oxidative stress in liver and kidney and preserved the integrity of tissue structure.

Acknowledgments

The authors also wish to extend their thanks to Mrs. Leila MAHFOUDHI, Emeritus Teacher of English at the Sfax Faculty of Sciences, for having proofread and polished the language of the manuscript.

Interest conflict

The authors reported no potential conflict of interest.

REFERENCES

- Abankwu SO, Akiri OF, Durojaiye MA, Adenike A (2015) Combined effects of repeated administration of Brestmont Wipeout (glyphosate) and Ultrazin (atrazine) on testosterone, oxidative stress and sperm quality of Wistar rats. *Toxicol Mech Methods* **25**: 70–80. <https://doi.org/10.3109/15376516.2014.989349>
- Abdel-Daim MM, Dessouki AA, Abdel-Rahman, HG, Eltaysh R, Alkahtani S (2019) Hepatorenal protective effects of taurine and N-acetylcysteine against fipronil-induced injuries: The antioxidant status and apoptotic markers expression in rats. *Sci Total Environ* **650**: 2063–2073. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.313>
- Aebi H (1984) Catalase *in vitro*. *Methods in enzymology* **105**: 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Al-Attar AM (2015) Effect of grapeseed oil on diazinon-induced physiological and histopathological alterations in rats. *Saudi J Biol Sci* **22**: 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.12.010>
- Almeida LL, Teixeira AAC, Soares AF, Cunha FMD, Silva VADJ, Vieira Filho LD, Wanderley-Teixeira V (2017) Effects of melatonin in rats in the initial third stage of pregnancy exposed to sub-lethal doses of herbicides. *Acta Histochem* **119**: 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2017.01.003>
- Aydin S, Atukeren P, Cakatay U, Uzun H, Altug T (2010) Gender-dependent oxidative variations in liver of aged rats. *Biogerontology* **11**: 335–346. <https://doi.org/10.1007/s10522-009-9257-8>
- Barkat L, Boumendjel A, Abdennour C, Boulakoud MS, El Feki A, Messarah M (2015) Methidathion-induced hematological, biochemical and hepatohistological alterations in rat: Ameliorative effects of selenium and zinc. *African J Biotechnol* **14**: 1796–1806. <https://dx.doi.org/10.5897/AJB2015.14466>
- Battaglin WA, Meyer MT, Kurvira KM, Dietze JE (2014) Glyphosate and its degradation product ampa occur frequently and widely in u.s. soils, surface water, groundwater, and precipitation. *JAWRA Journal of the American Water Resources Association* **50**: 275–290. <https://doi.org/10.1111/jawr.12159>
- Beroual K, Agabou A, Abdeldjelil MC, Boutaghane N, Haouam S, Hamdi-Pacha Y (2017) Evaluation of crude flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) oil in burn wound healing in New Zealand rabbits. *African J Trad Comp Altern Med* **14**: 280–286. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v14i3.29>
- Beyer Jr, WF, Fridovich I (1987) Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal Biochem* **161**: 559–566. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90489-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90489-1)
- Bhondave PD, Devarshi PP, Mahadik KR, Harsulkar AM (2014) Ashvagandharishta prepared using yeast consortium from *Woodsfordia fruticosa* flowers exhibit hepatoprotective effect on CCl4 induced liver damage in Wistar rats. *J Ethnopharmacol* **151**: 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.10.025>
- Bischoff K, Muleki M, Ramani SK (2018) Liver Toxicity. 239–257. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811410-0.00015-5>
- Blois MS (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**: 1199. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- Bouasla I, Bouasla A, Boumendjel A, Messarah M, Abdennour C, Boulakoud MS, El Feki A (2014) *Nigella sativa* oil reduces aluminum chloride-induced oxidative injury in liver and erythrocytes of rats. *Biol Trace Elem Res* **162**: 252–261. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-0114-5>
- Bowry VW, Stanley KK, Stocker R (1992) High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors. *Proc Natl Acad Sci* **89**: 10316–10320. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.21.10316>
- 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**: 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4298>
- Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* **52**: 302–310. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)
- Çağlar S, Kolankaya D (2008) The effect of sub-acute and sub-chronic exposure of rats to the glyphosate-based herbicide Roundup. *Environ Toxicol Pharmacol* **25**: 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2007.08.011>
- Chavan T, Khadke SP, Haikar SM, Ghadge AA, Karandikar M, Pandit VA, Ranekar PK, Kulkarni OS, Kurvalekar A (2013) Hepatoprotective effect of polyunsaturated fatty acids against repeated subacute acetaminophen dosing in rats. *Int J Pharm Bio Sci* **4**: 286–295
- European Food Safety Authority (EFSA) (2015) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA J* **13**. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4302>
- Cossu C, Doyotte A, Jacquin M, Babut M, Exinger A, Vasseur P (1997) Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unionia tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicol Environ Saf* **38**: 122–131. <https://doi.org/10.1006/eesa.1997.1582>
- DA Costa CAS, DA Camara Boueni BF, Pessanha CR, Boaventura GT (2018) Effects of flour or flaxseed oil upon testis mass in rats subjected to early weaning. *Nat Prod Res* **32**: 987–990. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1374262>
- Dai P, Hu P, Tang J, Li Y, Li C (2016) Effect of glyphosate on reproductive organs in male rat. *Acta Histochem* **118**: 519–526. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2016.05.009>
- Dar MA, Sultana M, Mir AH, Raina R, Pratez S (2019) Effect of repeated oral administration of Roundup® and ammonium nitrate on liver of wistar rats. *Proc Natl Acad Sci, India Section B: Biol Sci* **89**: 505–510. <https://doi.org/10.1007/s40011-017-0961-x>
- Dedeke GA, Owagboniye FO, Ademolu KO, Oshimi OO, Aladesida AA (2018) Comparative assessment on mechanism underlying renal toxicity of commercial formulation of roundup herbicide and glyphosate alone in male albino rat. *Int J Toxicol* **37**: 285–295. <https://doi.org/10.1177/1091581818779553>
- Djeffal A, Messarah M, Boumendjel A, Kadeche L, Feki AE (2015) Protective effects of vitamin C and selenium supplementation on methomyl-induced tissue oxidative stress in adult rats. *Toxicol Ind Health* **31**: 31–43. <https://doi.org/10.1177/0748233712468020>
- El-Shenawy NS (2009) Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. *Environ Toxicol Pharmacol* **28**: 379–385. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.06.001>

- Ellman GL (1959) Tissue sulphhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82: 70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
- Fagan JM, Slezcka BG, Sohar I (1999) Quantitation of oxidative damage to tissue proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 751–757. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(99\)00034-5](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(99)00034-5)
- Flohé L, Günzler WA (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 105: 114–120. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)0501](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)0501)
- Gonçalves NB, Bannitz RF, Silva BR, Becari DD, Poloni C, Gomes PM, Foss MC, Foss-Freitas MC (2018) Alpha-Linolenic acid prevents hepatic steatosis and improves glucose tolerance in mice fed a high-fat diet. *Chimica (Sao Paulo)* 73: e150. <https://doi.org/10.6061/clinics/2018/e150>
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974). Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249: 7130–7139
- Hamdaoui L, Naifar M, Mzid M, Ben Salem M, Chtourou A, Ayedi F, Sahnoun Z, Rebai T (2016). Nephrotoxicity of Kalach 360 SL: biochemical and histopathological findings. *Toxicol Mechanisms Methods* 26: 685–691. <https://doi.org/10.1080/15376516.2016.1230918>
- Hana RS, Saed N (2013) Alteration in oxidants, antioxidants and cytokines levels in blood of malathion exposed human and animal groups and the effect of flaxseed oil in alleviating malathion toxic effects. *Eur J Biotechnol Biosci* 1: 8–19
- Hendavi YH, Alam RIM, Abdellatif SA (2016) Ameliorative effect of flaxseed oil against thiacloprid-induced toxicity in rats: hematological, biochemical, and histopathological study. *Environ Sci Pollut Res Int* 23: 11855–11863. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6376-z>
- Hentier L, Duval D, Galnier R, Meistertzheim AL, Verneau O (2017). Oxidative stress induced by glyphosate-based herbicide on freshwater turtles. *Environ Toxicol Chem* 36: 3343–3350. <https://doi.org/10.1002/etc.3916>
- Hould R (1984) Methode de Fontana: Techniques d'histopathologie et de cytopathologie.
- Jacques-Silva MC, Nogueira CW, Broch L C, Flores ÉM, Rocha JBT (2001) Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacol Toxicol* 88: 119–125. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0773.2001.d01-92.x>
- Jamilian M, Hashemi Dizaji S, Bahmani F, Taghizadeh M, Memarizadeh MR, Karanali M, Akbani M, Asemi Z (2017). A Randomized controlled clinical trial investigating the effects of omega-3 fatty acids and vitamin E co-supplementation on biomarkers of oxidative stress, inflammation and pregnancy outcomes in gestational diabetes. *Can J Diabetes* 41: 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.cjcd.2016.09.004>
- Jollow D, Mitchell J, Zampaglione Na, Gillette J (1974) Bromobenzene-induced liver necrosis. Protective role of glutathione and evidence for 3, 4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolite. *Pharmacology* 11: 151–169. <https://doi.org/10.1159/000136485>
- Julkunen-Tiitto R (1985) Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *J Agricult Food Chem* 33: 213–217. <https://doi.org/10.1021/jf00062a012>
- Kanbur M, Eraslan G, Ince S, Altıntaş L, Liman BC, Bayram L (2015) The effects of propetamphos, cypermethrin and propetamphos-cypermethrin combination on some biochemical and histopathological parameters in mice. *J Kafkas Univ Vet Fakültesi Dergisi* 21: 187–194. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2014.12004>
- Kapoor U, Saravastava MK, Saravastava LP (2011) Toxicological impact of technical imidacloprid on ovarian morphology, hormones and antioxidant enzymes in female rats. *Food Chem Toxicol* 49: 3086–3089. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.09.009>
- Karaca S, Eraslan G (2013) The effects of flaxseed oil on cadmium-induced oxidative stress in rats. *Biol Trace Elem Res* 155: 423–430. <https://doi.org/10.1007/s12011-013-9804-7>
- Kasmi S, Bkhaina I, Harrabi B, Mnif H, Marzakchi R, Ghozzi H, Kallel C, Nasri M, Zeghal K, Jamoussi k, Hakim, A. (2018) Modulatory effects of quercetin on liver histopathological, biochemical, hematological, oxidative stress and DNA alterations in rats exposed to graded doses of score 250. *Toxicol Mech Methods* 28: 12–22. <https://doi.org/10.1080/15376516.2017.1351507>
- Kayali R, Çakıratay U, Akçay T, Altuğ T (2006) Effect of alpha-lipoic acid supplementation on markers of protein oxidation in post-nitrotic tissues of ageing rat. *Cell Biochem Funct* 24: 79–85. <https://doi.org/10.1002/cbf.1190>
- Khaldi T, Chekchaki N, Boumendjel M, Taibi F, Abdellaoui M, Messarah M, Boumendjel A (2018) Ameliorating effects of *Nigella sativa* oil on aggravation of inflammation, oxidative stress and cytotoxicity induced by smokeless tobacco extract in an allergic asthma model in Wistar rats. *Allergol Immunopathol (Madr)* 46: 472–481. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2018.02.005>
- Khan HAA, Akram W, Shad SA, Lee JJ (2013). Insecticide mixtures could enhance the toxicity of insecticides in a resistant dairy population of *Musca domestica* L. *PLoS One* 8: e60929. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060929>
- Kirschvink N, de Moffarts B, Lekeux P (2008). The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *Vet J* 177: 178–191. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.07.033>
- Knudsen LE, Hansen PW, Mizrak V S, Hansen HK, Morck TA, Nielsen F, Siersma V Mathiesen L (2017). Biomonitoring of Danish school children and mothers including biomarkers of PBDE and Glyphosate. *Rev Environ Health* 32: 279–290
- Larsen K, Najle R, Lifschitz A, Virkel G (2012) Effects of sub-lethal exposure of rats to the herbicide glyphosate in drinking water: glutathione transferase enzyme activities, levels of reduced glutathione and lipid peroxidation in liver, kidneys and small intestine. *Environ Toxicol Pharmacol* 34: 811–818. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.09.005>
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz, AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186: 464–478. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-h](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-h)
- Meligi NM, Hassan HF (2017) Protective effects of *Eruca sativa* (rocket) on abamectin insecticide toxicity in male albino rats. *Environ Sci Pollut Res Int* 24: 9702–9712. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8671-8>
- Messarah M, Saoudi M, Boumendjel A, Kadeche L, Boulakoud M S, El Feki A (2013) Green tea extract alleviates arsenite-induced biochemical toxicity and lipid peroxidation in rats. *Toxicol Ind Health* 29: 349–359. <https://doi.org/10.1177/0748233711433934>
- Mohammadiad A, Abdollahi M (2011) A systematic review on oxidant/antioxidant imbalance in aluminum toxicity. *Int J Pharmacol* 7: 12–21. <https://doi.org/10.3923/ijp.2011.12.21>
- Pan Y, Wang K, Huang S, Wang H, Mu X, He C, Ji X, Zhang J, Huang F (2008) Antioxidant activity of microwave-assisted extract of longan (*Dimocarpus Longan* Loux) peel. *Food Chemistry* 106: 1264–1270
- Pilar B, Gullich A, Oliveira P, Stroher, D, Piccoli J, Manfredini V (2017) Protective role of flaxseed oil and flaxseed lignan secosolanicresinol diglucoside against oxidative stress in rats with metabolic syndrome. *J Food Sa* 82: 3029–3036. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13964>
- Pourmorad F, Hosseini-mehr S, Shahabimajid N (2006) Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African J Biotechnol* 5: ??? pages, doi
- Rebai O, Belkhir M, Boujelben A, Fattouch S, Ammi M (2017) Morus alba leaf extract mediates neuroprotection against glyphosate-induced toxicity and biochemical alterations in the brain. *Environ Sci Pollut Res Int* 24: 9605–9613. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8584-6>
- Rubilar M, Gutiérrez C, Verdugo M, Shene C, Sineiro J (2010) Flaxseed as a source of functional ingredients. *J Soil Sci Plant Nutr* 10: 373–377. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162010000100010>
- Saoudi M, Messarah M, Boumendjel A, Jamoussi K, El Feki AF (2011) Protective effects of vitamin C against haematological and biochemical toxicity induced by deltamethrin in male Wistar rats. *Ecotoxicol Environ Saf* 74: 1765–1769. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.04.003>
- Seneff S, Orlando L (2018) Is glyphosate a key factor in mesoamerican nephropathy. *J Environ Anal Toxicol* 7: 2161–0525.1000542. <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0525.1000542>
- Slama K, Boumendjel M, Taibi F, Boumendjel A, Messarah M (2018) *Atriplex halimus* aqueous extract abrogates carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity by modulating biochemical and histological changes in rats. *Arch Physiol Biochem* 1–12. <https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1489852>
- Stadtman ER, Levine RL (2006) Chemical modification of proteins by reactive oxygen species. *Redox proteomics: from protein modifications to cellular dysfunction and diseases* 9: 293–304
- Tang J, Hu P, Li Y, Win-Shwe TT, Li C (2017) Ion imbalance is involved in the mechanisms of liver oxidative damage in rats exposed to glyphosate. *Front Physiol* 8: 1083. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01083>
- Tizhe E, Ibrahim N, Fatihu M, Ambali S, Igboke I, Tizhe U (2018) Pancreatic function and histoarchitecture in Wistar rats following chronic exposure to Bushfire(R): the mitigating role of zinc. *J Int Med Res* 46: 3296–3305. <https://doi.org/10.1177/0300060518778640>
- Tizhe EV, Ibrahim ND, Fatihu MY, Onyebuchi II, George BD, Ambali SF, Shallahwa JM (2014) Influence of zinc supplementation on histopathological changes in the stomach, liver, kidney, brain, pancreas and spleen during subchronic exposure of Wistar rats to glyphosate. *Comp Clin Path* 23: 1535–1543. <https://doi.org/10.1007/s00580-013-1818-1>
- Turkmen R, Birdane YO, Demirel HH, Yavuz H, Kabu M, Ince S (2019) Antioxidant and cytoprotective effects of N-acetylcysteine against subchronic oral glyphosate-based herbicide-induced oxidative stress in rats. *Environ Sci Pollut Res Int* 26: 11427–11437. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04585-5>
- Uchendu C, Ambali SF, Ayo JO, Eseio KA (2017) The protective role of alpha-lipoic acid on long-term exposure of rats to the combination of chlorpyrifos and deltamethrin pesticides. *Toxicol Ind Health* 33: 159–170. <https://doi.org/10.1177/0748233715616553>
- Varghese MV, Abhilash M, Alex M, Paul MVS, Prathapan A, Raghu KG, Nair RH (2017). Attenuation of arsenic trioxide induced car-

- diotoxicity through flaxseed oil in experimental rats. *Redox Report* 22: 346–352. <https://doi.org/10.1080/13510002.2017.1289313>
- Wolfe K, Wu X, Liu RH (2003). Antioxidant activity of apple peels. *J. Agric Food Chem* 51: 609–614. <https://doi.org/10.1021/jf020782a>
- Xu J, Rong S, Gao H, Chen C, Yang W, Deng Q, Huang Q, Xiao L, Huang F (2017). A combination of flaxseed oil and astaxanthin improves hepatic lipid accumulation and reduces oxidative stress in high fat-diet fed rats. *Nutrients* 9. <https://doi.org/10.3390/nu9030271>
- Yang W, Fu J, Yu M, Huang Q, Wang D, Xu J, Deng Q, Yao P, Huang F, Liu L (2012). Effects of flaxseed oil on anti-oxidative system and membrane deformation of human peripheral blood erythrocytes in high glucose level. *Lipids Health Disease* 11: 88. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-11-88>
- Yazdinezhad A, Abbasian M, Hojjat Hosseini S, Naserzadeh P, Agh-Atabay AH, Hosseini MJ (2017). Protective effects of *Ziziphora tenuifolia* extract against chlorpyrifos induced liver and lung toxicity in rat: Mechanistic approaches in subchronic study. *Environ Toxicol* 32: 2191–2202. <https://doi.org/10.1002/tox.22432>
- Ye Z, Li R, Cao C, Xu YJ, Cao P, Li Q, Liu Y (2019). Fatty acid profiles of typical dietary lipids after gastrointestinal digestion and absorption: A combination study between *in-vitro* and *in-vivo*. *Food Chem* 280: 34–44. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.032>
- Zemmoui H, Sekiou O, Ammar S, El Feki A, Bouaziz M, Messarah M, Boumendjel A (2017). *Urtica dioica* attenuates ovalbumin-induced inflammation and lipid peroxidation of lung tissues in rat asthma model. *Pharm Biol* 55: 1561–1568. <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1310905>
- Zhang ZS, Wang IJ, Li D, Jiao SS, Chen XD, Mao ZH (2008). Ultrasound-assisted extraction of oil from flaxseed. *Separation Purif Technol* 62: 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.014>



Oxidative stress induced by Roundup in rat liver and brain: attenuation by zinc sulfate

Nesrine Djaber¹ · Yahia Khelef² · Lynda Sabrina Ounaceur¹ · Baya Nouha Moubine¹ · Meriem Rouag¹ · Salma Berrouague¹ · Hichem Amara³ · Faiza Taibi¹ · Mahieddine Boumendjel¹ · Amel Boumendjel¹ · Mahfoud Messarah¹

Received: 12 May 2021 / Accepted: 8 February 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag London Ltd., part of Springer Nature 2022

Abstract

The aim of this study was to investigate the propensity of Roundup (RDP) to induce oxidative stress in the liver and brain of male Wistar rats and its possible attenuation by zinc sulfate. Rats were randomly divided into four groups: group I served as control rats, group II was treated with 269.9 mg RDP/kg bw administered in drinking water, group III rats have received Zn (277 mg/l) through oral way as zinc sulfate (ZnSO₄), and group IV animals were treated with RDP and Zn. The exposure of rats to RDP, during 30 days, caused the increase of the following serum hepatic markers: glucose, aminotransferases (ALT, AST), alkaline phosphatase (ALP), lactate dehydrogenase (LDH), gamma-glutamyl transferase (GGT), and total bilirubin (TB), along with reduced total protein content and albumin. Besides, this toxicity associated with an increase of lipid peroxidation (malondialdehyde) and advanced oxidation protein product (AOPP). Also, the antioxidant defense system such as reduced glutathione (GSH), glutathione *S*-transferase (GST), catalase (CAT), and superoxide dismutase (SOD) in both the brain and liver is reduced compared with the control group, while the level of glutathione peroxidase (GPx) activity is increased. The treatment with zinc significantly restored the majority of these biochemical and oxidative stress parameters to normal levels, as well as improved the inhibition of AChE activity in the brain caused by RDP, thus emphasizing the protective potential of zinc in restoring the altered hepatic and cerebrum histoarchitecture. In conclusion, this study indicates that Zn protects against the toxicity of Roundup by providing hepatoprotective and neuroprotective effects.

Keywords Brain · Liver · Oxidative stress · Rat · Roundup · Zinc

Introduction

Pesticides are used worldwide to destroy harmful species, the most common being herbicides. However, they generally damage the ecosystem and therefore alter the food chain (Maroni et al. 2000). Chronic exposure of non-target organisms, such as animals and humans, to such xenobiotics

leads to a large number of diseases. In fact, this can lead to biochemical disturbances, causing cellular and genetic damages (Tuzmen et al. 2008). Roundup (RDP) is a glyphosate-based formulation that represents one of the most commonly applied herbicides in the world, in particular agriculture forestry, industrial weeds control, and aquatic environments (Williams et al. 2000). It can be considered as one of the most popular commercial formulations in which glyphosate is included as *N*-(phosphonomethyl)glycine (Fig. 1) (active ingredient) and contains another surfactant. Glyphosate is slightly to moderately toxic to animals, but Roundup, the commercial formulation, is considered to be more toxic, perhaps due to the addition of polyoxyethylene amine (POEA) surfactants (Bradberry et al. 2004; Williams et al. 2000). Several studies have demonstrated that RDP is toxic to rats and can give rise to morphology and functional changes in tissues. Dai et al. (2016) and Turkmen et al. (2019a) demonstrated that exposure to RDP induces biochemical changes

✉ Mahfoud Messarah
mahfoud.messarah@univ-annaba.dz; mmessarahdz@yahoo.fr

¹ Laboratory of Biochemistry and Environmental Toxicology, Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Badji Mokhtar, BP 12 Sidi Amar, Annaba, Algeria

² Laboratory of Biology, Environment and Health, Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Natural Science and Life, El Oued University, El Oued, Algeria

³ Anatomic Pathology Services, Eph El Hadi Bendjedid, El Tarf, Algeria

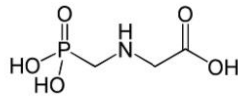


Fig. 1 Chemical structure of glyphosate

and histological alterations in the liver, kidney, brain, heart, and testis of rats. The experimental studies have shown that RDP has an inhibitory effect on acetylcholinesterase (AChE) in rat brains exposed *in vivo* (Cattani et al. 2017) and *in vitro* (Larsen et al. 2016). In contrast, several studies proved that the neurotoxicity of RDP is not entirely caused by the disorder of the cholinergic system. Indeed, oxidative stress may be another key mechanism underlying the neuroinflammation of this herbicide (de Souza et al. 2019). Oxidative stress in cells caused by overproduction of reactive oxygen species (ROS) or insufficient antioxidant defense (especially in older people) can damage cellular proteins, lipids, and DNA and activate the apoptotic pathways (Rouag et al. 2020). Currently, oxidative stress is one of the most important subjects in pesticide toxicology (Berrouague et al. 2019). The study of Turkmen et al. (2019b) and Hamdaoui et al. (2019) on rats has shown an alteration of certain antioxidant enzymes such as catalase (CAT) following exposure to 2,4-D and alteration of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione *S*-transferase enzymes, and non-enzymatic antioxidants such as reduced glutathione (GSH) and vitamin C (Vit C). Protection against free radicals can be achieved through supplementation of dietary and endogenous antioxidants. The trace elements present in many foods play a crucial role in various pathologies. Zinc is a structural constituent of many proteins, hormones, and hormone receptors, which plays a fundamental role in a wide range of biochemical processes, and it is an important modulator in the mammalian central nervous system (CNS). In addition, zinc exhibits both neurotoxic and neuroprotective effects (Nowak 2000). A wide range of biological activities such as immune response regulation (Wintergerst et al. 2007); epithelial cell integrity (Lansdown et al. 2007); cell signaling; the proper function of more than 300 enzymes from all enzyme families (Maret 2019); metabolism of carbohydrates, proteins, and lipids; antioxidant defense; regulation of insulin biosynthesis, storage, and secretion (Nazarizadeh and Asri-Rezaie 2016); and regulation of mRNA expression (Maret 2013) are tightly correlated with zinc. Zn is an important cofactor of many antioxidant enzymes, such as induction of metallothioneins that protects cellular components from oxidation (Semercioz et al. 2017), protection of sulfhydryl groups from oxidation, maintenance of reduced intracellular level of glutathione, and reduction of the production of lipid peroxidation products (Bashandy et al. 2018). Zinc is an essential

component of Cu/Zn SOD which controls free radicals and oxidative stress (Cruz et al. 2015). On the other hand, zinc deficiency has been shown to have adverse effects on growth rate, hematological parameters, and essential elements (El Hendy et al. 2001). Furthermore, a decrease in its levels is also responsible for various neurological deficits and disease conditions (Takeda 2001). Studies from our laboratory have also shown beneficial effects of zinc in containing adverse effects of organophosphate (methidathion) on hematological, biochemical, and liver functions (Barkat et al. 2015). However, at the best of our knowledge, no studies are available showing comparisons of RDP exposure compared to rats treated with zinc. Therefore, the present study was conducted to assess some biochemical parameters, antioxidant status, and histopathological alterations in the liver and brain of RDP-exposed rats. It also tried to determine whether the treatment with Zn could alleviate RDP-induced toxicity.

Materials and methods

Chemicals

The herbicide used in this study was a commercial formulation (Roundup® TURBO) containing the active ingredient glyphosate (450 g/l; chemical name: *N*-(phosphonomethyl) glycine; molecular formula: C₃H₈NO₅P; CAS RN 1071–83–6). All other chemical products used in this study were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Animals

This study was performed on healthy male albino Wistar rats of age 8–9 weeks old (250 ± 13.12 mg) obtained from Pasteur Institute (Algiers, Algeria). Rats were housed in cages at a room temperature of 23 ± 2 °C and kept under standard conditions of an average relative humidity of 40% and a natural photoperiod. They were fed a standard laboratory diet purchased from ONAB of Bejaia, Algeria, with free access to water. All the protocols used in this study were approved by the Ethical Committee of Directorate General for Scientific Research and Technological Development at Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research, permit no. PNR/SF 08/201.

Experimental protocol

The rats were randomly divided into four groups of six animals each ($n=6$): group I (C) served as a control, group II (RDP) received through drinking water 269.9 mg/kg bw of RDP, group III (Zn) received zinc sulfate (277 mg/l) through oral way, and group IV (RDP + Zn) received RDP and Zn in the same way as in groups II and III.

The dose of RDP was selected on the basis of a previous study of El-Shenawy (2009), with 1/18 of LD₅₀ (269.9 mg/kg bw). The dose of zinc used was chosen according to a method which has been suggested to protect against the oxidative stress induced by pesticide in several tissues (Barkat et al. 2015). During the treatment period (30 days), the body weight of the animals was recorded regularly every 1 week. At the end of the experiment, the animals fasted overnight and their total body weight was recorded. They were then sacrificed by cervical decapitation without anesthesia in order to minimize the animals' stress. Anesthesia in rats was avoided for several reasons, including the metabolic rate and the high risk of hypothermia and hypoglycemia. Moreover, anesthetic agents influence physiological parameters, further interfering with experimental results (Gargiulo et al. 2012).

Biochemical analysis

Blood was collected into non-heparinized tubes (3 to 3.5 ml) and centrifuged for 15 min at 3000 rpm at 4 °C. Serum samples were stored at -20 °C for subsequent analysis of alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), lactate dehydrogenase (LDH), gamma-glutamyl transferase (GGT), total bilirubin, total proteins, albumin, glucose, and levels were estimated using commercial kits from COBAS INTEGRA 400 (AST, ref. 2,056,097; ALT, ref. 2,056,119; ALP, refs. 20,766,739 and 20,759,961; LDH, ref. 2,055,503; GGT, ref. 20,759,996; total bilirubin; total proteins, ref. 2,053,039; albumin, ref. 20,737,461 and ref. 20,737,488; glucose, ref. 2,172,682). Enzyme activity was expressed in international units per liter (IU/l).

Tissue preparation

Liver and brain were immediately removed, washed in 0.9% NaCl solution, and weighed. The relative mass of organs (%) was calculated as g/100 g body mass. Then, we took the lobe of liver and brain which has brown or white spots for histological examination. The other samples of liver and brain were homogenized on ice cold in Tris-buffered saline (1:2 w/v; 1 g tissue with 2 ml TBS: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4), and the cell suspension was centrifuged at 9000 rpm for 15 min at 4 °C. The supernatants were divided into aliquots and then stored at -20 °C for analysis of oxidative stress parameters.

Histopathological examination

Samples of tissue (livers and brains) were immediately fixed in 10% formaldehyde. They were dehydrated in a series of increasing alcohol concentrations (70–100%) (Leica TP1020) and embedded in paraffin. The paraffin

sections were cut into 5- μ m thick slices by microtome (Leica RM2235), then deparaffinized and stained with hematoxylin and eosin (H&E) for light microscopic examination (Leica DM 1000LED) according to the method of Hould (1984).

Measurement of lipid peroxidation

Malondialdehyde (MDA), the end product of lipid peroxidation, was assessed as a marker for lipid peroxidation, and it reacts with thiobarbituric acid (TBA) as thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) to produce a red-colored complex that has peak absorbance at 532 nm. This assay is performed according to the method of Buege and Aust (1978) in liver and brain tissues. A quantity of 375 ml of the supernatant was homogenized by sonication with 150 ml of TBS and 375 μ l of trichloroacetic acid-butylhydroxytoluene (TCA-BHT) to precipitate proteins and then centrifuged (1000 g, 10 min, and 4 °C). Afterwards, 400 ml of the obtained supernatant was mixed with 80 μ l of HCl (0.6 M) and 320 ml of TBA dissolved in Tris. The mixture was then incubated at 80 °C for 10 min. The absorbance of the resultant supernatant was read at 53 nm. Next, the amount of TBARS was calculated by using an extinction coefficient of 1.56×10^5 M/cm and expressed in nmol MDA/mg of protein.

Measurement of advanced oxidation protein product

The advanced oxidation protein product (AOPP) was determined according to the method of Kayali et al. (2006). It is a marker of oxidant-mediated protein damage. It was determined by the formation of dityrosine-containing and cross-linking protein products. Briefly, 0.4 ml of the kidney extract supernatant was treated with 0.8 ml phosphate buffer (0.1 M; pH 7.4), after 2 min, and 0.1 ml of 1.16 M potassium iodide was added to the tube followed by 0.2 ml of acetic acid. The absorbance of the reaction mixture was immediately recorded at 340 nm. The concentration of AOPP was expressed in nmol/mg of protein.

Measurement of antioxidant non-enzyme activities

Reduced GSH concentrations in liver and brain homogenates were determined using a colorimetric technique by Ellman (1959) and modified by Jollow et al. (1974). Determination of GSH is based on the development of a yellow color when 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) is added to compounds containing sulfhydryl (SH) groups. Briefly, 0.8 ml of the liver supernatant was added to 0.2 ml of 0.25% sulfosalicylic acid then tubes were centrifuged at 2500 g for 15 min. The resulting supernatant (0.5 ml) was mixed with 0.025 ml of 0.01 M DTNB and 1 ml phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4). Finally, absorbance at 412 nm was

recorded. The amount of GSH was expressed as nmol of GSH/mg of protein.

Measurement of antioxidant enzyme activities

GPx activity was measured according to the procedure of Flohé and Günzler (1984). This method is based on the reduction of hydrogen peroxide (H_2O_2) in the presence of reduced GSH. The latter is transformed to glutathione disulfide (GSSG) under the influence of GPx. The reaction mixture which contained 0.2 ml of the homogenate, 0.4 ml of GSH (0.1 mM), and 0.2 ml of Tris-buffered saline (pH 7.4) was allowed to equilibrate for 5 min at room temperature. The reaction was started by adding 0.2 ml of H_2O_2 (1.3 mM) and set for 10 min of rest, and the reaction was stopped by the addition of 1 ml of 1% TCA. The mixture was allowed to stand for 30 min in an ice bath prior to centrifugation at 2000 g for 10 min. Then, 0.48 ml of the supernatant, 2.2 ml of Na_2HPO_4 (0.32 M), and 0.32 ml of DTNB (1 mM) were added and the yellow color developed was read at 412 nm immediately within 5 min. The specific activity of this enzyme is expressed as mmol of GSH/mg of protein.

Glutathione *S*-transferase (GST) activity of tissues was measured spectrophotometrically by the method of Habig et al. (1974). 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) was used as an electrophilic substrate that binds to GSH with the participation of the enzyme and forms a colored GSH-substrate complex. Briefly, the volume of 1 ml which contained 830 μ l of phosphate buffer (pH 6.5, 0.1 M), 50 μ l of CDNB (0.02 M), 100 μ l of GSH (0.1 M), and 20 μ l of the homogenate was then read in the absorbance every minute during 5 min at 340 nm. The GST activity was expressed in terms of μ mol CDNB/GSH/min/mg of protein.

The CAT activity was measured according to Aebi (1984). This assay is based on the ability of the enzyme to induce the disappearance of hydrogen peroxide. Then, 780 μ l of phosphate buffer (pH 7.5), 200 μ l of hydrogen peroxide (500 mM), and 20 μ l of the supernatant were mixed in a final volume of 1 ml. Absorbance was recorded at 240 nm every 15 s for 1 min. The enzyme activity was calculated by using an extinction coefficient of 0.043 mM/cm and was expressed as mmol of H_2O_2 /min/mg of protein.

The SOD activity was determined using a method of Beyer and Fridovich (1987). SOD activity was evaluated by measuring its ability to inhibit the photoreduction of nitroblue tetrazolium (NBT) (Fig. 2). Briefly, 1 ml of EDTA (0.1 mM)/methionine (13 mM), 1830 μ l of phosphate buffer (pH 7.8), 85 μ l of NBT (75 μ M), and 22 μ l of riboflavin (2 μ M) were mixed in a final volume of 3 ml (blank). To this same reaction mixture, 50 μ l of liver homogenate was added (sample tube). The developed blue color in the reaction was measured at 560 nm against a white tube stored in the dark. The units of SOD activity were expressed as the amount of enzymes required to inhibit the reduction of NBT by 50%, and the activity was expressed as units per milligram of protein.

Measurement of acetylcholinesterase activity

The AChE method used is that described by Ellman et al. (1961). The acetylcholinesterases contained in the tissue react with acetylthiocholine (ASCh) by releasing acetate and thiocholine (SCh) (Fig. 3). The latter reacts, in turn, with 5'-5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoate) (DTNB) by donating TNB produced from yellow color. Briefly, 1000 μ l of phosphate buffer (pH 7.5, 0.1 M) and 5 μ l of DTNB were mixed with 50 μ l of ASCh. The absorbance is read at 412 nm at

Fig. 2 Changes in SOD activity in the liver of control and treated rats. Values are given as mean \pm SEM for groups of 6 animals each. Significant difference: RDP group compared to the control (** p < 0.001), and RDP+Zn compared to the RDP group (### p < 0.001)

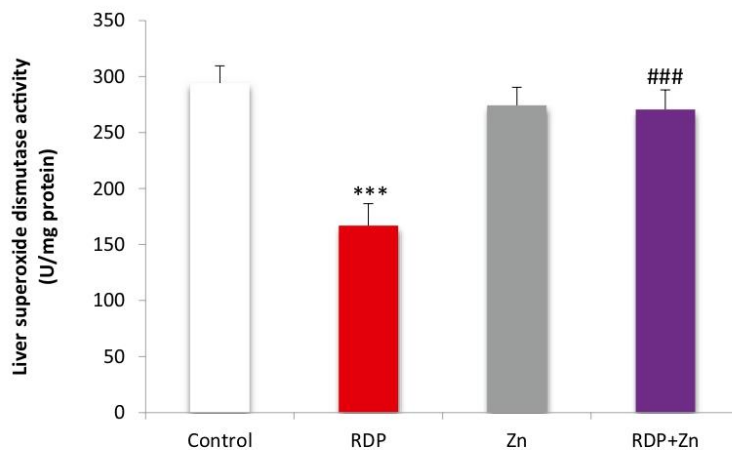
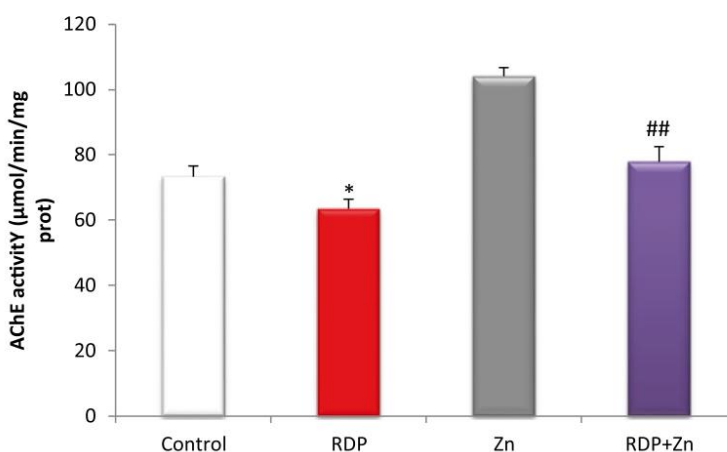


Fig. 3 Changes in AChE activity in the brain of control and treated rats. Values are given as mean \pm SEM for groups of 6 animals each. Significant difference: RDP groups compared to the control ($p < 0.05$), and RDP+Zn compared to the RDP group ($^{##}p < 0.01$)



a time interval of 25 min every 3 min. AChE activity was expressed as nmol/min/mg of protein and calculated with the following formula:

$$\text{AChE} = \frac{\Delta\text{DO}/\Delta t \times 169.18}{P}$$

Protein estimation

The protein content of tissue samples was measured spectrophotometrically at 595 nm by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as a standard. We assay the proteins to calculate the specific activities (expressed as units per milligram of protein).

Statistical analysis

All data were expressed as means \pm standard error of the mean (SEM) for six rats in each group. The statistical

analysis (comparison between all the groups) was performed with one-way ANOVA followed by Student's *t* test to evaluate the significance of differences. A *p* value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Effect of treatment on body, brain, and liver weights

The results obtained show that there is a significant decrease in the body and in the absolute and relative weights of the liver and brain of rats treated with the herbicide RDP compared to the control group (Table 1).

On the other hand, recovery is recorded by a significant increase in the absolute and relative liver and brain weights in rats treated with the combination of RDP + Zn compared to rats treated only with Roundup.

Table 1 Effects of treatments on body weight (g), absolute (g) and relative liver and brain weights (g/100 g bw), daily food intake (g), and drinking water consumption (ml) in the experimental groups

Parameters studied	Control	RDP	Zn	RDP + Zn
Initial body weights (g)	249.6 \pm 2.7	250.33 \pm 4.64	250.6 \pm 5.9	250 \pm 8.2
Final body weights (g)	299.5 \pm 11.4	235.5 \pm 4 ^{***}	264.83 \pm 8.4	243.6 \pm 5
Absolute liver weights (g)	9.00 \pm 0.43	5.55 \pm 0.23 ^{***}	8.69 \pm 0.38	6.91 \pm 0.19 ^{###}
Absolute brain weights (g)	1.246 \pm 0.03	1.029 \pm 0.07 ^{**}	1.333 \pm 0.01	1.282 \pm 0.04 ^{##}
Relative liver weights (g/100 g bw)	3.1 \pm 0.02	2.56 \pm 0.10 ^{***}	2.98 \pm 0.05	2.95 \pm 0.08 ^{##}
Relative brain weights (g/100 g bw)	0.463 \pm 0.01	0.506 \pm 0.04	0.468 \pm 0.02	0.576 \pm 0.04 ^{##}

Values are given as mean \pm SEM for groups of 6 animals each. Significant difference: Zn and RDP groups compared to the control (^{**} $p < 0.01$, ^{***} $p < 0.001$), and RDP+Zn compared to the RDP group (^{##} $p < 0.01$, ^{###} $p < 0.001$)

Table 2 Effects of treatments on serum biochemical parameters

Parameters studied	Control	RDP	Zn	RDP + Zn
Glucose	0.99±0.01	1.09±0.03**	0.97±0.01	0.98±0.02##
ASAT	221.06±24.12	330.42±20.06**	243.16±15.85	232.5±23.11##
ALAT	66.5±1.75	91.5±7.20**	72.16±4.40	62.16±4.50#
LDH	2188±223.16	3472.6±205.67***	2413±268.61	2858.16±233.98#
ALP	104.13±8.53	149.13±13.61**	79.04±4.26	101.04±12.72##
GGT	8.01±0.55	17.3±1.38***	7.8±1.28	11.41±1.62###
Bil. T	1.03±0.07	1.33±0.13*	0.71±0.05	0.81±0.05##
Prot.T	83.85±1.11	75.8±2.25**	79.8±0.5	82.48±1.62##
Alb	33.42±2.27	26.98±1.62*	34.09±0.75	33.18±1.01##

Values are given as mean±SEM for groups of 6 animals each. Significant difference: Zn and RDP groups compared to the control (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001), and RDP+Zn compared to the RDP group (# p <0.05, ## p <0.01)

Effect of treatment on serum biochemical parameters

Our data indicated that the use of RDP can cause liver toxicity. As shown in Table 2, compared to the control, rats exposed to RDP had a significant increase in concentrations of hepatic enzymes AST, ALT, LDH, ALP, GGT, and Bil. T. In addition, rats treated with RDP showed a significant increase in blood glucose level compared to the normal rats, while the levels of total protein and albumin were significantly reduced in the RDP group compared to the control. Supplementation of Zn restored all biochemical parameters studied.

Histopathological results

Histopathological changes in the rat liver and brain resulting from RDP treatment are shown in Figs. 4 and 5. The control rats presented normal hepatic morphology with distinct hepatocytes with prominent nuclei and no tissue damage (Fig. 4A). On the other hand, liver sections of Roundup-treated rats showed severe structural damage characterized by mononuclear cell infiltration with degeneration of hepatocytes, vascular congestion, and sinusoidal dilatation (Fig. 4B). In contrast, Zn administration revealed reduction inflammatory cell infiltration, a lesser degree of sinusoidal dilatation, and morphology of normal cells compared to

Fig. 4 Effect of Roundup (RDP) and zinc co-administered on histopathological damages in the liver. Controls (A, ×40), treated with RDP (B, ×40), Zn co-administered with RDP (C, ×40) and Zn (D, ×40) after 4 weeks of treatment, as revealed by the photomicrograph of H&E. Hepatocyte (black arrow), vein congestion (red arrow), dilation of sinusoids (yellow arrow), mononuclear infiltration (black circle), degenerative changes in hepatocytes (red circle)

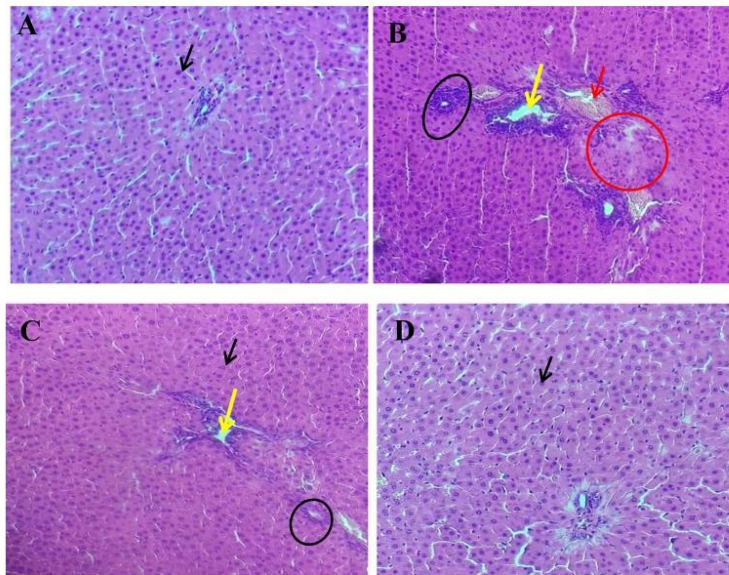
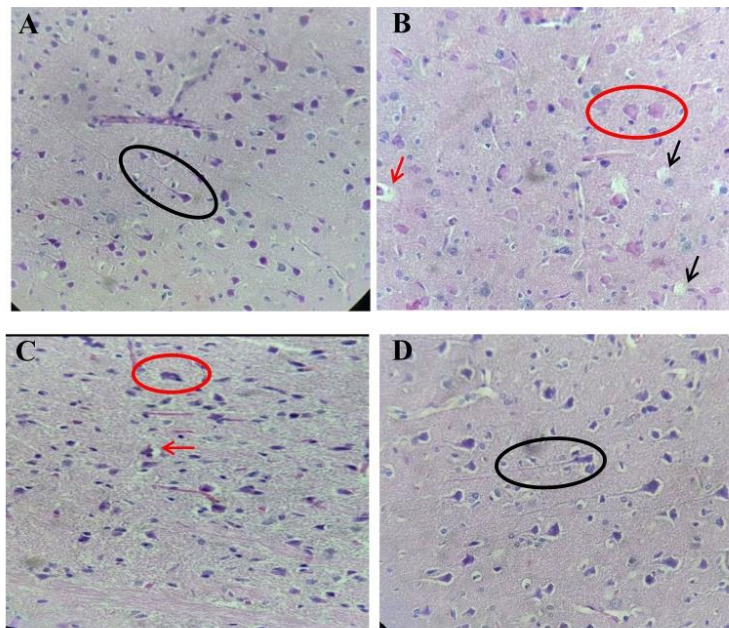


Fig. 5 Effect of Roundup (RDP) and zinc co-administered on histopathological damages in the brain. Controls (A, $\times 40$), treated with RDP (B, $\times 40$), Zn co-administered with RDP (C, $\times 40$) and Zn (D, $\times 40$) after 4 weeks of treatment, as revealed by the photomicrograph of H&E. Neurons (black circle), neuronal degeneration (red circle), vacuoles (black arrow), focal gliosis around neurons (red arrow)



RDP (Fig. 4C). No histological alteration in the liver was observed (Fig. 4D). In the control group (Fig. 5A) and the group to which Zn was administered (Fig. 5D), histopathological changes were observed to be normal in the brain. Degenerative changes and focal gliosis (Fig. 5B) were encountered in the brain tissues in the glyphosate-based herbicide (GBH) group. In the GBH group, to which Res was administered, very few histopathological changes were observed in the brain and heart tissues (Fig. 5C).

Effects of treatments on liver and brain oxidative stress parameters

Roundup exposure considerably increased the levels of MDA and AOPP and decreased the levels of GSH, CAT, and GST in the liver and brain tissues of the treated group compared with the control group, while the activities of GPx were increased in the RD group compared to the control group. Moreover, Zn administration resulted in a significant improvement in the activity of enzymatic and non-enzymatic activities, and antioxidants significantly decreased in the Zn+RDP group compared to the RDP group (Table 3). Treatment with RDP caused a significant reduction of SOD activity compared to the control group. However, the co-administration of RDP+Zn produced recovery in SOD activity by a significant augmentation of SOD compared to the treated group (Fig. 2).

Effects of treatments on acetylcholinesterase activity

AChE activity showed a significant decrease in the brain of rats exposed to RDP compared to the control group in the brain (Fig. 3). However, Zn administration brought about an important improvement in the RDP group.

Discussion

Oxidative stress is an important factor involved in the toxic effects of numerous environmental contaminants. But, some toxicological studies consider that organophosphate causes toxicity in several organs (Messarah et al. 2013) and prevents oxidant potential (Cattani et al. 2017; Turkmen et al. 2019a). Additionally, considering that the oxidative stress may be involved in the tissue damage induced by herbicides containing glyphosate, the use of trace element with antioxidant properties could prevent or remedy the oxidative events arising from the herbicide exposure. The present study investigates the effects of RDP intoxication on the drug-metabolizing enzymes, which play an important role in the bioactivation and metabolism of Roundup in the liver and brain. An additional aim of this study was also to determine whether zinc might mitigate the toxicity of this

Table 3 Antioxidant defense status in the liver and brain of treated and control rats

Parameters studied	Control	RDP	Zn	RDP + Zn
MDA (nmol/mg of protein)				
Liver	23.41 ± 3.13	34.33 ± 1.71**	14.46 ± 0.73	23.30 ± 2.09###
Brain	16.97 ± 0.86	23.82 ± 0.8***	9.73 ± 1.58	12.38 ± 1.05###
AOPP (nmol/mg of protein)				
Liver	0.039 ± 0.002	0.046 ± 0.002**	0.038 ± 0.0009	0.34 ± 0.001###
Brain	0.010 ± 0.0004	0.013 ± 0.008*	0.007 ± 0.0006	0.006 ± 0.0006###
GSH (μmol/mg of protein)				
Liver	2.6 ± 0.14	1.85 ± 0.16**	2.22 ± 0.16	2.69 ± 0.14###
Brain	0.22 ± 0.01	0.18 ± 0.009*	0.41 ± 0.02	0.31 ± 0.01###
CAT (μmol H₂O₂/min/mg of protein)				
Liver	347.5 ± 35.67	134.83 ± 8.46***	310.08 ± 26	292.83 ± 25.98###
Brain	170.74 ± 33.21	81.21 ± 8.00**	161.17 ± 13.89	119.81 ± 16.03 [#]
GPx (nmol of GSH/min/mg of protein)				
Liver	1.05 ± 0.13	1.91 ± 0.18***	1.19 ± 0.17	1.17 ± 0.17##
Brain	0.24 ± 0.02	0.51 ± 0.04***	0.29 ± 0.06	0.28 ± 0.03###
GST (nmol/mg of protein)				
Liver	0.13 ± 0.02	0.05 ± 0.002***	0.04 ± 0.006	0.06 ± 0.01
Brain	0.018 ± 0.001	0.009 ± 0.001**	0.029 ± 0.004	0.029 ± 0.004###

Values are given as mean ± SEM for groups of 6 animals each. Significant difference: RDP groups compared to the control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$), and RDP + Zn compared to the RDP group ([#] $p < 0.05$, ^{##} $p < 0.01$, ^{###} $p < 0.001$)

pesticide by altering the activities of some or all of these drug-metabolizing enzymes, thus providing a rationale for the protective efficacy of this metal.

During the experimental period, no deaths were observed in any of the different groups. The rats in the control and Zn groups did not show any sign systemic of toxicity. However, RDP group of rats showed clinical signs such as anorexia, loss of body weight, exhaustion, and inflammation of the salivary glands (the cause of drooling). All these clinical signs were related to the acute toxicity of organophosphate. Also, the RDP + Zn group showed some of the symptoms (anorexia and loss of body weight), and our results are consistent with those in the research of Bradberry et al. (2004). During our experimentation, we found a reduction in the body weight of the toxic group, and a reduction in the absolute and relative liver and brain weights was also recorded in rats treated with RDP. This weight variation is probably due to atrophy, and the latter can be explained by stimulating the toxic effects of herbicides to increase the detoxification mechanism. These results were consistent with previous studies in rats exposed to Roundup (Abarikwu et al. 2015; Hamdaoui et al. 2019). In addition, the combined administration of RDP and Zn resulted in an improvement in body weight and absolute and relative liver and brain weights compared to rats treated with RDP only. This improvement can be explained by the protective role of zinc against Roundup toxicity. The presence of zinc prevents the formation of free radicals and thus maintains the integrity and

function of tissues. In this sense, Goel et al. (2005) showed that the protective effect of zinc supplementation in animal's exposure to chlorpyrifos, an organophosphate, could be attributed to its ability to reduce collagen accumulation in the tissue, and it plays a vital physiological role in regulating cell structure and function. The liver is the target organ of organophosphate toxicity (Al-Attar 2015), and the leakage of hepatic enzymes such as ALT, AST, ALP, and LDH is commonly used as an indirect biochemical index of hepatocellular injury (Mard et al. 2017). Roundup treatment groups showed a significant increase in glucose and enzymatic activity of transaminases (AST, ALT), LDH, ALP, GGT, and bilirubin, with a reduction in total protein and albumin levels. Several studies have reported the impact of oxidation protein on the disturbance of glucose metabolism and the risk of type 2 diabetes (Lasram et al. 2009). The hepatic toxicity of Roundup is related to its pro-oxidant effect, which may explain the involvement of liver cells. Free radicals produced during the metabolism of RDP damage the plasma membrane and release these enzymes in the blood. Our present results are in agreement with those of Dar et al. (2019) who reported similar results of elevated AST, ALT, and LDH activities in the serum. Djaber et al. (2020) reported that administration of Roundup in drink water caused a significant elevation in the levels of glucose, AST, ALT, ALP, LDH, GGT, and bilirubin and a reduction of total protein concentration in the serum. The results of this study showed that Zn supplementation alleviated the

extensive changes in biochemical profiles in rats exposed to RDP. Previous studies showed that high levels of extracellular zinc can improve insulin metabolism and lower blood glucose by various mechanisms. The effect of zinc on blood sugar is provided by an interaction with insulin receptors or regulation of the insulin-signaling pathway (Gatiatulina et al. 2020). Treatment of rats with Zn protects liver tissue from RDP injury by stabilization of enzymatic activity. There are reports of the hepatoprotective effect of zinc in hepatic lesions induced by nickel as a method of treatment of zinc (Sidhu et al. 2004b). Our results also showed a significant improvement in the level of albumin and total protein after zinc supplementation.

The oxidative damage to DNA, lipids, and proteins induced by pesticides appears to be a consequence of the generation of ROS (Berrouague et al. 2019). The targets of lipid oxidation are the polyunsaturated fatty acids (PUFAs). This reaction leads to the formation of unstable hydroperoxides. These are rapidly decomposed to produce many secondary products such as free lipid radicals that help to increase the oxidation of other molecules such as proteins, nucleic acids, and other lipids (Cillard and Cillard 2006). In the present study, RDP administration indicated an increase in MDA and AOPP levels as compared to the control in liver and brain. This excessive production of MDA may be explained by the fact that the body's defenses have failed and they have become insufficient to neutralize ROS. This neutralization failure resulted in oxidative damage in the form of membrane lipid peroxidation (LPO). In this context, Turkmen et al. (2019a) noted an increase in liver, kidney, heart, and brain MDA levels in rats' administration of glyphosate-based herbicide. They proved that the ROS formation could occur as a result of oxidative stress. Moreover, Hamdaoui et al. (2019) indicated the toxic effects of this herbicide on lipid peroxidation and AOPP in the liver and erythrocyte, which can be due to enhanced ROS production and decreased antioxidant levels. The normalization of LPO levels with zinc administration is naturally attributed to its preventive antioxidant property which prevents the formation of ROS or intercepts the species responsible for the initiation of lipoperoxidation or can also intercept radical propagators of lipid peroxidation and delay peroxidation (induction period) (Schafer and Buettner 1999). In order to resist the disorder caused by oxidative stress, the body has a complete set of enzymes and endogenous antioxidants to resist this aggression. The latter is considered the first line of defense against oxidative damage (Rouag et al. 2020). However, the organophosphate affects these enzymes (such as SOD, CAT, GPx, and GSH endogenous antioxidant) (Messarah et al. 2013). Therefore, it seems necessary to measure their activity to evaluate the effect of Roundup as an oxidative stress inducer. In our study, exposure to RDP caused a significant decrease in the cellular content of reduced GSH. The present

observations could be attributed to the activation of GGT to replenish intracellular glutathione on the sinusoidal surface of the liver cells, because of the GSH-degrading enzyme, gamma glutamyl transferase, and thus, a decreased concentration of glutathione, and it is an important component of the detoxification mechanism (Sidhu et al. 2004a). GSH is involved in herbicide detoxification via the GST system, and as a co-substrate of antioxidant enzymes such as GPx (Berrouague et al. 2019). The significant exhaustion of GSH levels in this study confirms the potential of RDP to induce oxidant stress in the liver and brain. It is also found that the increase in lipid peroxidation expressed by MDA is a consequence of exhaustion of GSH reserves that are capable of moderating membrane lipid peroxidation. Turkmen et al. (2019b) found similar results in terms of decreased GSH level in the liver, heart, kidney, and brain. However, another study reported by Larsen et al. (2012) revealed that the levels of GSH in the liver, kidneys, and small intestine of rats exposed to glyphosate increase. Normalization of the level of GSH in the RDP + Zn group is apparently has been suggested that zinc can bind to sulfhydryl groups and protect them against oxidation (Ferretti et al. 2007). These results seem to be in agreement with the previous findings (Barkat et al. 2015; Goel et al. 2005a). In the present study, we have observed increased levels of GPx in rats' treatment with RDP in drink water. This elevation in the activity of GPx could be explained by an activation of the compensatory mechanism through the effect of the RDP on target cells, and its extent depends on the severity of oxidative stress and hence on the dose and the route of stress or administration (Altuntas et al. 2004). Our results corroborated with previous studies (Ahmed et al. 2000; Altuntas et al. 2004; Sharma et al. 2005) which found an increased activity of these enzymes after an administration of organophosphorus pesticides such as dimethoate, malathion, and diazinon.

Furthermore, a significant decrease in the SOD, CAT, and GST activities has been observed in RDP-treated rats, which could possibly be owed to the consumption of CAT in converting H_2O_2 to H_2O . In addition, GST enzymes are utilized more to incorporate tripeptide GSH to the substrate (Astiz et al. 2009; Djaber et al. 2020; Djefal et al. 2015; Rebai et al. 2017). However, modulation of enzymatic activities by zinc is apparently due to antioxidative potential or regulation of activities at the transcriptional level. Zinc has also been shown to regulate the catalase activity in other toxic conditions (Bhardwaj and Dhawan 2019; Elwej et al. 2018; Mard et al. 2017).

The reduction of AChE activity observed in this study on brain exposed to RDP is in agreement with previous studies, showing that GLP is an inhibitor of AChE in human serum (El-Demerdash et al. 2001), in erythrocytes (Kwiatkowska et al. 2014), and in both plasma and brain in rats (Larsen et al. 2016). Long-term inhibition of AChE by OP in the

brain can lead to excessive acetylcholine in cholinergic synapses, resulting in prolonged excitation of postsynaptic neurons, excitotoxic damage, and degeneration of the cholinergic system (Gallegos et al. 2018). Similarly, Bali et al. (2019) showed that mice administered with GBH had decreased activity of AChE in the total brain, PFC, and hippocampus following both sub-chronic and chronic treatments. Therefore, although Gly is a weak inhibitor of AChE activity compared to other OPs (Larsen et al. 2016), zinc treatment to RDP-treated rat increased the AChE activity in the brain. This may be because zinc acts as a neuromodulator in various signal transduction processes, or its strong antioxidant behavior regulates neuronal metabolism (Singla and Dhawan 2014).

According to the conducted histopathologic examination, RDP caused substantial changes in the liver and brain from the aspect of histopathology. The liver histopathological finding of this study showed inflammatory reaction, dilatation of the sinusoids, degeneration of hepatocytes, and activation of Kupffer cells. Also, we demonstrated that chronic exposure to RDP induced neuronal changes and focal gliosis which were observed around the neurons in the brains of rats. Current observations show that in response to RDP treatment, the overall histoarchitecture of liver and brain tissue has structural changes, which could be explained by the fact that Roundup mainly exhibits toxic effects by the generation of reactive oxygen species. The resulting effect was the production of large amounts of lipid peroxidation, which damages various components of the cell membrane. The necrosis observed in these animals is very consistent with the results of our biochemical studies. We noticed that the increased levels of lipid peroxidation indicate liver and brain damages. Similarly, Turkmen et al. (2019b) identified histopathologic changes induced by G-based herbicide in male rats. Zinc improved the histological changes of the hepatic and cerebellum induced by RDP. Zn exerts its antioxidant properties through the regeneration of enzymes bound to the membrane. It effectively compensates or repairs DNA and tissue damage by eliminating apoptosis signals and inhibiting LPO and protein oxidation (Sidhu et al. 2004a; Varghese et al. 2009). Our results are consistent with those of Sidhu et al. (2004a b) who observed this hepatoprotective effect of zinc during the evaluation nickel toxicity potential and those of Yan et al. (2019) who showed that the structure of liver cells and hepatic lobules is intact and the fat bubbles are significantly reduced, which are due to the protective effect of Zn against alcoholic liver injury. Likewise, Elwej et al. (2018) noted that Zn and Se improved cerebellar histological changes induced by barium.

In conclusion, the present data provide hepatotoxicity and neurotoxic effects of RDP in Wistar rats as demonstrated by inhibition of AChE activity, increased LPO and AOPP, disruption of the antioxidant system, and histological damage in

target organs. However, supplementation of ZnSO₄ reduces the toxicity of this herbicide in rats, which is targeted by improved biochemical parameters and hepatic and cerebellar histoarchitecture. Based on this study, the results suggest that nutritional supplementation of ZnSO₄ could act as a protective agent against exposure to RDP.

Funding The present work was supported by DG-RSDT (General Directorate of Scientific Research and Technological Development, Algeria) via the Laboratory of Biochemistry and Environmental Toxicology, Faculty of Sciences, University of Badji Mokhtar, Annaba, Algeria.

Declarations

Ethics approval The experimental procedures were performed according to the Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals of Algeria University and approved by the Animal Ethics Committee of National Institutes of Health (ILAR 1985). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

References

- Abarikwu SO, Akiri OF, Durojaiye MA, Adenike A (2015) Combined effects of repeated administration of Bretmont Wipeout (glyphosate) and Ultrazin (atrazine) on testosterone, oxidative stress and sperm quality of Wistar rats. *Toxicol Mech Methods* 25:70–80
- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126
- Ahmed RS, Seth V, Pasha ST, Banerjee BD (2000) Influence of dietary ginger (*Zingiber officinales* Rosc) on oxidative stress induced by malathion in rats. *Food Chem Toxicol* 38:443–450
- Al-Attar AM (2015) Effect of grapeseed oil on diazinon-induced physiological and histopathological alterations in rats. *Saudi Journal of Biological Sciences* 22:284–292
- Astiz M, de Alaniz MJ, Marra CA (2009) Antioxidant defense system in rats simultaneously intoxicated with agrochemicals. *Environ Toxicol Pharmacol* 28:465–473
- Altuntas I, Kilinc I, Orhan H, Demirel R, Koylu H, Delibas N (2004) The effects of diazinon on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in erythrocytes in vitro. *Hum Exp Toxicol* 23(1):9–13
- Bali YA, Kaikai NE, Ba-M'hamed S, Bennis M (2019) Learning and memory impairments associated to acetylcholinesterase inhibition and oxidative stress following glyphosate based-herbicide exposure in mice. *Toxicology* 415:18–25
- Barkat L, Boumendjel A, Abdenmour C, Boulakoud MS, El Feki A, Messarah M (2015) Methidathion-induced hematological, biochemical and hepatohistological alterations in rat: ameliorative effects of selenium and zinc. *Afr J Biotech* 14:1796–1806
- Bashandy SA, Alaamer A, Moussa SAA, Omara EA (2018) Role of zinc oxide nanoparticles in alleviating hepatic fibrosis and nephrotoxicity induced by thioacetamide in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 96:337–344
- Berrouague S, Rouag M, Khaldi T, Boumendjel A, Boumendjel M, Taibi F, Messarah M (2019) Efficacy of Allium sativum oil to alleviate tebuconazol-induced oxidative stress in the liver of adult rats. *Cell Mol Biol (noisy-Le-Grand)* 65:23–31

- Beyer WF Jr, Fridovich I (1987) Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal Biochem* 161:559–566
- Bhardwaj P, Dhawan DK (2019) Zinc treatment modulates hematological and morphological changes in rat erythrocytes following arsenic exposure. *Toxicol Ind Health* 35:593–603
- Bradberry SM, Proudfoot AT, Vale JA (2004) Glyphosate poisoning. *Toxicol Rev* 23:159–167
- 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* 72:248–254
- Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Elsevier* 302–310
- Cattani D, Cesconetto PA, Tavares MK, Parisotto EB, De Oliveira PA, Rieg CEH, Leite MC, Prediger RDS, Wendt NC, Razzera G (2017) Developmental exposure to glyphosate-based herbicide and depressive-like behavior in adult offspring: implication of glutamate excitotoxicity and oxidative stress. *Toxicology* 387:67–80
- Cillard J, Cillard P (2006) Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oligéineux, Corps Gras, Lipides* 13:24–29
- Cruz KJC, de Oliveira ARS, do Nascimento Marreiro D (2015) Antioxidant role of zinc in diabetes mellitus. *World J Diabetes* 6:333
- Dai P, Hu P, Tang J, Li Y, Li C (2016) Effect of glyphosate on reproductive organs in male rat. *Acta Histochem* 118:519–526
- Dar MA, Sultana M, Mir AH, Raina R, Prawez S (2019) Effect of repeated oral administration of Roundup® and ammonium nitrate on liver of Wistar rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* 89:505–510
- de Souza JS, Laureano-Melo R, Herai RH, da Conceicao RR, Oliveira KC, da Silva I, Dias-da-Silva MR, Romano RM, Romano MA, Maciel RMB, Chiamolera MI, Giannocco G (2019) Maternal glyphosate-based herbicide exposure alters antioxidant-related genes in the brain and serum metabolites of male rat offspring. *Neurotoxicology* 74:121–131
- Djaber N, Ounaceur LS, Moubine BN, Khaldi T, Rouag M, Berrouague S, Amara H, Taibi F, Boumendjel M, Boumendjel A, Messarah M (2020) Roundup-induced biochemical and histopathological changes in the liver and kidney of rats: the ameliorative effects of *Linum usitatissimum* oil. *Acta Biochim Pol* 67:53–64
- Djeflal A, Messarah M, Boumendjel A, Kadeche L, Feki AE (2015) Protective effects of vitamin C and selenium supplementation on methomyl-induced tissue oxidative stress in adult rats. *Toxicol Ind Health* 31:31–43
- El-Demerdash F, Yousef M, Elagamy E (2001) Influence of paraquat, glyphosate, and cadmium on the activity of some serum enzymes and protein electrophoretic behavior (in vitro). *J Environ Sci Health B* 36:29–42
- El-Shenawy NS (2009) Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. *Environ Toxicol Pharmacol* 28:379–385
- El Hendy HA, Yousef MI, El-Naga NIA (2001) Effect of dietary zinc deficiency on hematological and biochemical parameters and concentrations of zinc, copper, and iron in growing rats. *Toxicology* 167:163–170
- Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82:70–77
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88–95
- Elwej A, Ghorbel I, Chaabane M, Soudani N, Mnif H, Boudawara T, Zeghal N, Sefi M (2018) Zinc and selenium modulate barium-induced oxidative stress, cellular injury and membrane-bound ATPase in the cerebellum of adult rats and their offspring during late pregnancy and early postnatal periods. *Arch Physiol Biochem* 124:237–246
- Ferretti L, Elviri L, Pellinghelli MA, Predieri G, Tegoni M (2007) Glutathione and N-acetylcysteinylglycine: protonation and Zn²⁺ complexation. *J Inorg Biochem* 101:1442–1456
- Flohé L, Günzler WA (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 114–120
- Gallegos CE, Baier CJ, Bartos M, Bras C, Dominguez S, Monaco N, Gumilar F, Gimenez MS, Minetti A (2018) Perinatal glyphosate-based herbicide exposure in rats alters brain antioxidant status, glutamate and acetylcholine metabolism and affects recognition memory. *Neurotox Res* 34:363–374
- Gatiatulina ER, Sheina EA, Nemereshina ON, Popova EV, Polyakova VS, Agletdinov EF, Sinitiskii AI, Skalny AV, Nikonorov AA, Tinkov AA (2020) Effect of Zn supplementation on trace element status in rats with diet-induced non-alcoholic fatty liver disease. *Biol Trace Elem Res* 197:202–212
- Goel A, Dani V, Dhawan D (2005) Protective effects of zinc on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and hepatic histoarchitecture in chlorpyrifos-induced toxicity. *Chem Biol Interact* 156:131–140
- Gargiulo S, Greco A, Gramanzini M, Esposito S, Affuso A, Brunetti A, Vesce G (2012) Mice anesthesia, analgesia, and care, part I: anesthetic considerations in preclinical research. *ILAR J* 53(1):E55–E69
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:7130–7139
- Hamdaoui L, Naifar M, Rahmouni F, Ayadi F, Rebai T (2019) Sub-chronic exposure to Kalach 360 SL-induced damage in rats' liver and hematological system. *Environ Sci Pollut Res Int* 26:36634–36646
- Hould R (1984) *Méthode de Fontana. Techniques d'histopathologie et de cytopathologie*. Maloine, Paris
- Institute of Laboratory Animal Resources (ILAR) (1985) Committee on Care, Use of Laboratory Animals & National Institutes of Health (US), Division of Research Resources. *Guide for the care and use of laboratory animals*. National Academies
- Jollow D, Mitchell J, Na Z, Gillette J (1974) Bromobenzene-induced liver necrosis. Protective role of glutathione and evidence for 3, 4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolite. *Pharmacology* 11:151–169
- Kayali R, Çakatay U, Akçay T, Altuğ T (2006) Effect of alpha-lipoic acid supplementation on markers of protein oxidation in post-mitotic tissues of ageing rat. *Cell Biochemistry and Function: Cellular Biochemistry and Its Modulation by Active Agents or Disease* 24:79–85
- Kwiatkowska M, Nowacka-Krukowska H, Bukowska B (2014) The effect of glyphosate, its metabolites and impurities on erythrocyte acetylcholinesterase activity. *Environ Toxicol Pharmacol* 37:1101–1108
- Lansdown AB, Mirastschijski U, Stubbs N, Scanlon E, Ågren MS (2007) Zinc in wound healing: theoretical, experimental, and clinical aspects. *Wound Repair and Regeneration* 15:2–16
- Larsen, Najle R, Lifschitz A, Virkel G (2012) Effects of sub-lethal exposure of rats to the herbicide glyphosate in drinking water: glutathione transferase enzyme activities, levels of reduced glutathione and lipid peroxidation in liver, kidneys and small intestine. *Environ Toxicol Pharmacol* 34:811–818
- Larsen KE, Lifschitz AL, Lanusse CE, Virkel GL (2016) The herbicide glyphosate is a weak inhibitor of acetylcholinesterase in rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 45:41–44
- Lasram MM, Annabi AB, El Elj N, Selmi S, Kamoun A, El-Fazaa S, Gharbi N (2009) Metabolic disorders of acute exposure to malathion in adult Wistar rats. *J Hazard Mater* 163:1052–1055
- Mard SA, Akbari G, Dianat M, Mansouri E (2017) Protective effects of crocin and zinc sulfate on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats: a comparative experimental model study. *Biomed Pharmacother* 96:48–55

- Maret W (2013) Zinc biochemistry: from a single zinc enzyme to a key element of life. *Adv Nutr* 4:82–91
- Maret W (2019) Regulation of cellular zinc ions and their signaling functions. *Zinc Signaling*. Springer, pp 5–22
- Maroni M, Colosio C, Ferioli A, Fait A (2000) Biological monitoring of pesticide exposure: a review. *Introduction Toxicology* 143:1–118
- Messarah M, Amamra W, Boumendjel A, Barkat L, Bouasla I, Abdennour C, Boulakoud MS, Feki AE (2013) Ameliorating effects of curcumin and vitamin E on diazinon-induced oxidative damage in rat liver and erythrocytes. *Toxicol Ind Health* 29:77–88
- Nazarizadeh A, Asri-Rezaie S (2016) Comparative study of antidiabetic activity and oxidative stress induced by zinc oxide nanoparticles and zinc sulfate in diabetic rats. *AAPS PharmSciTech* 17:834–843
- Nowak G (2000) Zinc neurotransmission and the mechanism of antidepressant action. In: Centeno JA, Collery P (eds) *Metal ions in biology and medicine*. Eurotext, Paris, pp 437–439
- Rebai O, Belkhir M, Boujelben A, Fattouch S, Amri M (2017) Morus alba leaf extract mediates neuroprotection against glyphosate-induced toxicity and biochemical alterations in the brain. *Environ Sci Pollut Res Int* 24:9605–9613
- Rouag M, Berrouague S, Djaber N, Khaldi T, Boumendjel M, Taibi F, Abdennour C, Boumendjel A, Messarah M (2020) Pumpkin seed oil alleviates oxidative stress and liver damage induced by sodium nitrate in adult rats: biochemical and histological approach. *Afr Health Sci* 20:413–425
- Schafer FQ, Buettner GR (1999) Singlet oxygen toxicity is cell line-dependent: a study of lipid peroxidation in nine leukemia cell lines. *Photochem Photobiol* 70:858–867
- Semericioz A, Baltaci AK, Mogulkoc R, Avunduk MC (2017) Effect of zinc and melatonin on oxidative stress and serum inhibin-B levels in a rat testicular torsion-detorsion model. *Biochem Genet* 55:395–409
- Sharma Y, Bashir S, Irshad M, Gupta SD, Dogra TD (2005) Effects of acute dimethoate administration on antioxidant status of liver and brain of experimental rats. *Toxicology* 206:49–57
- Sidhu P, Garg M, Dhawan D (2004a) Protective effects of zinc on oxidative stress enzymes in liver of protein deficient rats. *Nutr Hosp* 19:341–347
- Sidhu P, Garg ML, Dhawan DK (2004b) Protective role of zinc in nickel induced hepatotoxicity in rats. *Chem Biol Interact* 150:199–209
- Singla N, Dhawan DK (2014) Influence of zinc on calcium-dependent signal transduction pathways during aluminium-induced neurodegeneration. *Mol Neurobiol* 50:613–625
- Takeda A (2001) Zinc homeostasis and functions of zinc in the brain. *Biomaterials* 14:343–351
- Turkmen R, Birdane YO, Demirel HH, Kabu M, Ince S (2019a) Protective effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress, biochemical and histopathological changes induced by sub-chronic oral glyphosate-based herbicide in rats. *Toxicology Research* 8:238–245
- Turkmen R, Birdane YO, Demirel HH, Yavuz H, Kabu M, Ince S (2019b) Antioxidant and cytoprotective effects of N-acetylcysteine against subchronic oral glyphosate-based herbicide-induced oxidative stress in rats. *Environ Sci Pollut Res Int* 26(11):11427–11437
- Tuzmen N, Candan N, Kaya E, Demiryas N (2008) Biochemical effects of chlorpyrifos and deltamethrin on altered antioxidative defense mechanisms and lipid peroxidation in rat liver. *Cell Biochem Funct* 26:119–124
- Varghese J, Faith M, Jacob M (2009) Zinc prevents indomethacin-induced renal damage in rats by ameliorating oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Eur J Pharmacol* 614:114–121
- Williams GM, Kroes R, Munro IC (2000) Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regul Toxicol Pharmacol* 31:117–165
- Wintergerst ES, Maggini S, Hornig DH (2007) Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. *Ann Nutr Metab* 51:301–323
- Yan Y, Wu W, Lu L, Ren J, Mi J, Liu X, Cao Y (2019) Study on the synergistic protective effect of Lycium barbarum L. polysaccharides and zinc sulfate on chronic alcoholic liver injury in rats. *Food Sci Nutr* 7:3435–3442



atp_be
Association Tunisienne de Physiologie
et de Biosurveillance de L'Environnement



Certificate of participation

We affirm that

Mr, Mrs : Nesrine Djaber

has presented a **poster presentation** entitled

« Etude de l'effet hépatoprotecteur du zinc sur la cytotoxicité induite par le glyphosate chez le rat de la souche wistar »

**At the 6th International Congress of Physiology and Environmental
Biomonitoring 18-21 December 2017, Douz, Tunisia**

Scientific committee



Une vision de pro ... Pour un meilleur avenir

Association Tunisienne
de Biotechnologie et
Valorisation des Bio-Ressources

Tunisian Association
of Biotechnology
and Bio-Resources Valorization

**ATTESTATION
DE PARTICIPATION**

Le Président de l'AT-BVBR, atteste que

DJABER Nesrine

a présenté au VI^{ème} congrès international de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources,
organisé par l'AT-BVBR du 20 au 23 Mars 2018 à Tabarka - Tunisie,
une communication par Affiche intitulée

C. AFFICHE N°419.

ETUDE DE L'EFFET PROTECTEUR DE SULFATE DU ZINC CONTRE LA NEPHROTOXICITE

INDUITE PAR LE GLYPHOSATE CHEZ LE RAT DE LA SOUCHE WISTAR

DJABER N. , ROUAG . , BOUMENDJEL A. & MESSARAH M.



Président de l'AT-BVBR
Prof. Mohamed Lamjed MARZOUKI



Association Tunisienne des Sciences Biologiques • Membre de l'IUBMB • Membre de la FASBMB • Membre de l'IUSB • Membre de la FEBS	الجمعية التونسية للعلوم البيولوجية 	Tunisian Association of Biological Sciences • Member of the IUBMB • Member of the FASBMB • Member of the IUSB • Member of the FEBS
---	--	---

ATTESTATION DE PARTICIPATION

Le comité d'organisation du 29ème congrès international des sciences biologiques et de biotechnologie de l'ATSB, tenu à l'Hôtel Mouradi Palace Sousse, Tunisie, du 26 au 29 Mars 2018, atteste que M. / Mme :

Nom : DJABER

Prénom : Nesrine

a participé activement aux journées et a présenté une communication par affiche,

dont l'intitulé est : Oxidative stress induced by glyphosate (GLP) in rat testis:

Attenuation by Zinc Sulfate

Pour le comité d'organisation
Le Secrétaire Général de l'ATSB
Dr. Manel Ben M'hadheb

Association Tunisienne des Sciences Biologiques
الجمعية التونسية للعلوم البيولوجية

IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) - FASBMB (Federation of African Societies of Biochemistry and Molecular Biology) - IUSB (International Union of Biological Sciences) - FEBS (Federation of European Biochemical Societies)



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ SAÏD DAHALI BUDA I
FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
en collaboration avec le
LABORATOIRE DE BIOTECHNOLOGIE, S. ENVIRONNEMENT ET SANTÉ



ATTESTATION DE PARTICIPATION

Le comité d'organisation du Séminaire National de Biochimie et Doctoriales de Biologie et Santé -FSNV- USB1 attribue cette présente attestation à :

Djaber Nesrine

Pour sa communication affichée intitulée
Étude de l'effet protecteur de sulfate du zinc contre la cytotoxicité induite par le glyphosate chez le rat de la souche wistar

Djaber N., Rouag M., Berouag S., Boumendjel A. et Messarab M.

Dr Kobbas Salima, Présidente du Comité d'organisation

Pr Saïdi Faïrouz, Présidente du Comité Scientifique - Directeur du Laboratoire BES - FSNV - USB1

Pr Benrima Athina, Doyenne de la Faculté FSNV - USB1







Séminaire National de Biochimie
19-20 Juin 2018

