

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement supérieur et de la recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biologie



THÈSE

Présentée par

M^{me} BOKRETA Soumya Epouse TOUATI

En vue de l'obtention du titre de

DOCTEUR EN SCIENCES BIOLOGIQUES

THÈME

**Etude de la toxicité de Voliam Targo[®] (Abamectine +
Chlorantraniliprole) chez le lapin d'une souche locale
en Algérie**

Soutenue publiquement le 29/01/2022

Devant le jury composé de:

M^{me} BENABDESSALEM R.	Professeur	UMMTO	Présidente
M^{me} DAOUDI ZERROUKI N.	Professeur	UMMTO	Directrice de thèse
M^{me} KHALDOUN OULARBI H.	MCA	USDB1	Co-directrice de thèse
M^{me} CHARALLAH S.	Professeur	USTHB	Examinatrice
M^{me} BOUMEHDI MERRAD Z.	Professeur	USDB1	Examinatrice
M^r BOUAZZA B.	MCA	UMMTO	Examinateur

Année universitaire : 2021-2022

Remerciements

Gloire et louange à DIEU, le Tout Puissant, qui m'a éclairée le bon chemin, et m'a donnée le courage et la persévérance pour l'accomplissement de ce projet, qui représente une étape conséquente dans mon parcours professionnel.

*Je tiens tout d'abord à remercier ma Directrice de thèse, Madame **DAOUDI ZERROUKI Nacira**, Professeur à la FSB, UMMTO, qui a dirigé ce travail, ça ne sera jamais suffisant pour lui exprimer ma grande reconnaissance pour la confiance qu'elle m'a accordée pour faire avancer ce travail, pour sa patience, sa gentillesse, et son esprit responsable et rigoureux.*

*Je tiens également à remercier très chaleureusement ma co-directrice de thèse, Madame **KHALDOUN OULARBI Hassina**, Maître de conférences à la FSNV, Université de Blida 1, pour m'avoir insufflé le désir et la passion de la recherche. Je vous remercie vivement pour toutes vos orientations judicieuses qui ont été de grande utilité ainsi que pour vos conseils précieux. Je vous remercie pour vos encouragements continus et votre soutien inestimable pendant les moments difficiles que j'ai vécus.*

*J'adresse mes remerciements les plus sincères à Monsieur **FARHAT Mohamed Amine**, Professeur à l'ENS de Kouba, pour sa contribution inestimable au bon avancement de ce travail de thèse. Je voudrais qu'il trouve ici l'assurance et l'hommage de mes sentiments respectueux.*

J'adresse mes vifs remerciements à tous les membres du jury pour avoir bien voulu accepter de juger ce travail.

*Je tiens à exprimer ma très grande considération, et mon profond respect à Madame **BENABDESSELAM Rosa**, Professeur à la FSB, UMMTO, qui m'a fait l'honneur de présider ce Jury.*

*Je tiens également à remercier Madame **CHARALLAH Salima**, Professeur à la FSB, USTHB, Madame **BOUMAHDI MERRAD Zoubida**, Professeur à l'ISV, Université de Blida 1 et Monsieur **BOUAZZA Belaïd**, Maître de Conférences A à FSB, UMMTO, pour avoir bien voulu juger ce manuscrit.*

*Je vous suis très reconnaissante du temps que vous y avez consacré
Je vous prie de trouver ici l'expression de mon profond respect
Et de mon entière reconnaissance.*

Je tiens à remercier profondément et sincèrement tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail

A toutes et tous, un grand merci !

Dédicaces

*À mon cher regretté **Papa**, celui qui a fait de moi tout ce je suis, qui brille tellement par son absence et demeurera ainsi pour toujours dans mon cœur*

*À ma chère **Maman**, merci de m'avoir toujours soutenu tout au long de ces études et en particulier durant ces années de thèse. Merci de toujours croire en moi et de me donner autant d'amour. ... Que Dieu vous protège et vous accorde une longue vie pleine de santé et de bonheur*

*A **mon mari**, merci pour tes encouragements et ton soutien irremplaçable durant ces années de thèse. Merci de ta patience et merci de tout l'amour que tu me donnes au quotidien. Sans toi, la vie ne serait pas la même*

*A **Samy et Yasmine**, mes chers enfants, Merci pour votre joie de vivre et vos sourires qui illuminent mes journées... Vous êtes le meilleur cadeau divin que j'ai reçu dans ma vie...*

*A ma précieuse sœur **Sara** et mes chers frères **Oussama, Zakaria, Youcef et Mohamed**,
Merci pour vos soutiens moraux et vos aides
Merci d'être là pour moi.*

A tous ceux qui m'ont encouragé et m'ont Apporté leur soutien.

Liste des Tableaux

Tableau I	Propriétés physico-chimiques principales du Voliam Targo® (Syngenta, 2009).	09
Tableau II	Propriétés physico-chimiques principales de l'abamectine (Bloom et Matheson, 1993).	11
Tableau III	Classification botanique du <i>Thymus vulgaris</i> (Goetz and Ghedira, 2012).	22
Tableau IV	Rôles alternatifs pour Bcl-2, autres que l'apoptose	50
Tableau V	Coordonnées géographique et caractéristiques bioclimatiques de la région de récolte (Meddour, 2002).	57
Tableau VI	Variation du poids corporel moyens des lapins pendant la période d'acclimatation (21 jours) et la période expérimentale (21 jours).	83
Tableau VII	Variation de la consommation moyenne d'aliments chez les lapins pendant la période d'acclimatation (21 jours) et la période expérimentale (21 jours).	84
Tableau VIII	Variation de la consommation moyenne de l'eau chez les lapins pendant la période d'acclimatation (21 jours) et la période expérimentale (21 jours).	85
Tableau IX	Effet du traitement sur le poids absolu (g) et relatif des organes des lapins expérimentaux.	86
Tableau X	Rendements de l'huile essentielle de Thym en continu durant la même extraction par hydrodistillation.	113
Tableau XI	Propriétés physiques et organoleptiques de l'huile essentielle du Thym.	113
Tableau XII	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> identifiée par CG-SM.	115
Tableau XIII	Activité antioxydante de l'huile essentielle de <i>T. vulgaris</i> et de BHT obtenues par le test de DPPH.	116

Liste des Figures

Figure 1	Voies d'exposition de l'homme aux pesticides (CPP, 2002).	06
Figure 2	Structure chimique de l'Abamectine (INRS, 2016).	10
Figure 3	Mécanisme d'action des avermectines (El-Saber Batiha, 2021).	14
Figure 4	Structure chimique du chlorantraniliprole (Jeanguenat, 2013).	16
Figure 5	Voie métabolique proposée du chlorantraniliprole (DPX-E2Y45) chez le rat (Bentley <i>et al.</i> , 2010).	17
Figure 6	Mode d'action de Chlorantraniliprole (Bentley <i>et al.</i> , 2010).	18
Figure 7	Illustration de l'aspect morphologique de <i>Thymus vulgaris</i> (images.google.fr).	21
Figure 8	La chaîne biosynthétique prévue pour la production de monoterpènes dans <i>Thymus vulgaris</i> (Thompson <i>et al.</i> , 2003).	26
Figure 9	Représentation des différents lobes hépatiques chez le lapin (Pignon <i>et al.</i> , 2013).	30
Figure 10	Organisation du lobule hépatique et de sa vascularisation (Tortora, 2015).	32
Figure 11	Structure et aspect histologique du tissu hépatique (Joli, 2008)	33
Figure 12	Anatomie et vascularisation rénale (Gueutin <i>et al.</i> , 2012).	35
Figure 13	Schéma représentatif montrant l'histologie du néphron (Marieb, 2005).	37
Figure 14	Vues dorsale (A) et latérale (B) du cerveau non conservé du lapin domestique néo-zélandais (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) (Osofsky <i>et al.</i> , 2007).	39
Figure 15	Coupe histologique du cortex cérébral (substance grise) après imprégnation argentique (Eroschenko, 2008).	41
Figure 16	Coupe horizontale de l'hippocampe chez le lapin mâle Néo-Zélandais. H&E, x40 (Mazher et Hassan, 2021).	42
Figure 17	Histologie de cortex cérébelleux (H&E, x100, x400) (El-Azab <i>et al.</i> , 2018)	44
Figure 18	Anatomie du cœur et des vaisseaux associés (Cabasson, 2008).	45
Figure 19	Structure histologique du tissu cardiaque (Tortora et Derrickson, 2009).	46

Figure 20	Deux principales voies d'apoptose (Braun <i>et al.</i> , 2010).	48
Figure 21	Structure protéique de Bcl-2 (Warren <i>et al.</i> , 2019).	49
Figure 22	Structure protéique de l'AFP (Mizejewski, 2016).	51
Figure 23	Rôle de l'AFP dans la transformation maligne des cellules cancéreuses du foie (Lin <i>et al.</i> , 2021).	53
Figure 24	Différents phénotypes des lapins utilisés (<i>Oryctolagus cuniculus</i>).	56
Figure 25	<i>Thymus vulgaris</i> (A) ; parties de la plante utilisées pour l'extraction de l'huile essentielle (B).	57
Figure 26	Situation géographique de la région de récolte de l'espèce étudiée	58
Figure 27	Réaction de réduction du radical DPPH par un antioxydant (Matkowski <i>et al.</i> , 2008)	80
Figure 28	Chromatogramme CG-SM de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> .	114
Figure 29	Pourcentages du piégeage du radical libre en fonction de la concentration de l'huile essentielle de <i>T. vulgaris</i> et du BHT.	116

Liste des Planches

Planche 1	Effet du traitement sur les paramètres biochimiques de la fonction rénale (acide urique et créatinine) chez les lapins expérimentaux.	87
Planche 2	Effet du traitement sur les paramètres biochimiques de la fonction hépatique (ASAT, ALAT, γ -GT et glucose) chez les lapins expérimentaux.	89
Planche 3	Effet du traitement sur les paramètres biochimiques du bilan lipidique (CT, TG, HDL-c, LDL-c, VLDL-c, IAP, LDL-c/HDL-c et TC/HDL-c) chez les lapins expérimentaux.	91
Planche 4	Aspect histologique du cortex rénal des lapins expérimentaux (A, C, E, G): X 100, (B, D, F, H) : X 400 coloration H&E.	94
Planche 5	Histologie du cortex rénal des lapins expérimentaux (A, C, E, G): X 100, (B, D, F, H) : X 400 coloration Trichrome de Masson.	95
Planche 6	Aspect histologique du cortex cérébral des lapins expérimentaux (A, C, E, G): X 40, (B, D, F, H) : X 100 coloration H&E.	97
Planche 7	Aspect histologique de l'hippocampe des lapins expérimentaux (A, C, E, G): X 100, (B, D, F, H) : X 400 coloration H&E.	99
Planche 8	Aspect histologique du cervelet des lapins expérimentaux (A, C, E, G): X 100, (B, D, F, H) : X 400 coloration H&E.	101
Planche 9	Aspect histologique du parenchyme cardiaque des lapins expérimentaux (A, C, E, G): X 100, (B, D, F, H) : X 400 coloration H&E.	103
Planche 10	Histologie du parenchyme cardiaque des lapins expérimentaux (A, C, E, G): X 100, (B, D, F, H) : X 400 coloration Trichrome de Masson.	104
Planche 11	Aspect histologique du parenchyme hépatique des lapins expérimentaux (A, C, E, G): X 100, (B, D, F, H) : X 400 coloration H&E.	107
Planche 12	Histologie du parenchyme hépatique des lapins expérimentaux (A, C, E, G): X 100, (B, D, F, H) : X 400 coloration Trichrome de Masson.	108
Planche 13	Expression immunohistochimique de la protéine Bcl-2 dans le parenchyme hépatique chez les lapins expérimentaux (A, C E et G): X 100, (B, D, F et H) : X 400.	110
Planche 14	Expression immunohistochimique de l'AFP dans le parenchyme hépatique chez les lapins expérimentaux (A, C E et G): X 100, (B, D, F et H) : X 400.	112

Liste des Abréviations

ABA : Abamectine

ABC : ATP Binding Cassette

Abs : Absorbance

AFNOR : Association française de normalisation

AFP : Alpha FoetoProtéine

AFPR : Récepteur de l'Alpha FoetoProtéine

ALAT : Alanine Amino-Transférase

AP1 : Activator Protein 1

APE1 : Apurinic/Apyrimidinic endonuclease

ASAT : Aspartate Amino-Transférase

BAK : Bcl-2 Antagonist/Killer

BAX : Bcl-2 Associated X protein

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2

Bcl-xL : Bcl-2 Like 1

BER : Base Excision Repair

BID : BH3 Interacting Domain death agonist

BIM : Bcl-2 Like 11 (apoptosis facilitator)

BH : Bcl-2 Homology

BHT : Butyl Hydroxy Toluène

CG/SM : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

CI50 : Concentration Inhibitrice à 50 %

CRD-Saidal : Centre de Recherche Saidal

CRE : cAMP/calcium-response element

CT : Cholestérol Total

DISC : Death Inducing Signaling Complex

DJA : Dose Journalière Admissible

DL50 : Dose Letale 50

DO : Densité Optique

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

EP : Espace Porte

ERO : Espèces Réactivés d'Oxygène

FAAD : Fas Associated Death Domain
FAO : Food and Agriculture Organisation
FXR : Récepteur Farnésoïde X
GABA: Acide Gamma-Amino-Butyrique
 γ -GT : Gamma Glutamyl Transférase
GLDH : Glutamate deshydrogénase
GluCl : Canaux Chlorures Glutamate-dépendants
GOD : Glucose oxydase
GPNA : L- γ -Glutamyl-p-nitroanilide
HDL-C: High density lipoprotein cholesterol
H&E : Hématoxyline Eosine
HE : Huile Essentielle
HET : Huile essentielle du thym
IAA : Indice de l'Activité Antioxydante
IAP: Indice Athérogène du Plasma
IHC : Immunohistochimique
kDa : Kilo Daltons
LDH : Lactate déshydrogénase
LDL-C: Low Density Lipoprotein Cholesterol
MCV : Maladies Cardiovasculaires
MDH : malate deshydrogénase
MMR : Mismatch Repair
NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Hydrogéné
NFAT : Nuclear Factor of Activated T-cells
NF- κ B : Nuclear Factor-Kappa B
NOAEL : No Observed Adverse Effect Level
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
P.C. : Poids Corporel
P-gp: glycoprotéine P
PI : Pourcentage d'Inhibition
POD : Peroxydase
RyR : Récepteurs de la ryanodine
SD : Standard de Déviation

SNC : Système Nerveux Central

TCD : Tube Contourné Distal

TCP : Tube Contourné Proximal

TG: Triglycérides

TGO : Oxaloacétate de Glutamate Transaminase

TGP: Pyruvate de Glutamate Transaminase

TNF : Facteur de Nécrose Tumorale

VCL : Veine CentroLobulaire

VLDL-C: very low density lipoprotein cholesterol

VT : Voliam Targo[®]

Production Scientifique Liée au Thème de la Thèse

▪ Publications

-Bokreta Soumya, Khaldoun Hassina, Ferhat Mohamed Amine, Makhlof Chahrazed, Daoudi Zerrouki Nacira. Protective Effects of *Thymus vulgaris* Essential Oil Against Voliam Targo® Induced Kidney and Brain Toxicity in Male Rabbits. Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, D. Histology & Histochemistry, 2021, 13(1) : 79-95.

-Bokreta Soumya, Khaldoun Hassina, Makhlof Chahrazed, Daoudi Zerrouki Nacira. The Possible Alleviating Effect Of *Thymus vulgaris* Essential Oil Against Voliam Targo® Induced Cardiotoxicity In Rabbits Of A Local Ppopulation (*Oryctolagus cuniculus*). Accepted as a proceeding paper in the 12th World Rabbits Congress (WRC), 3-5 Novembre 2021.

▪ Communications

- Communications Internationales

- **Bokreta Soumya**, Khaldoun Hassina, Oularbi Yasmine, Makhlof Chahrazed, Daoudi Zerrouki Nacira. *Thymus vulgaris* Essential Oil Alleviates Voliam Targo® Induced Hepatotoxicity In Male Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). The 1st International Webinar on Biological and Chemical Engineering, Faculté de SNV, Université Saad DAHLAB-Blida 1. De 10-11 Novembre 2021.

-Bokreta Soumya, Khaldoun Hassina, Makhlof Chahrazed, Daoudi Zerrouki Nacira. Therapeutic potential of *Thymus vulgaris* and its phytochemical component carvacrol against coronavirus infection COVID 19 : A review and perspective. 1^{er} Séminaire International « Impact du COVID-19 sur l'environnement », Faculté des sciences, Université Saad DAHLAB-Blida 1. De 30-31 Décembre 2020.

- Communications Nationales

- **Bokreta Soumya**, Khaldoun Hassina, Makhlof Chahrazed, Daoudi Zerrouki Nacira. Protective Effect of *Thymus vulgaris* Essential Oil On Nephrotoxicity Induced By An Abamectin-Based Insecticide In Male Rabbits. 1^{er} Séminaire National sur les Produits Bioactifs et Valorisation de la Biomasse (SNPBVB-1), ENS de Kouba. 16-17 Novembre 2021.

-Bokreta Soumya, Khaldoun Hassina, Makhlof Chahrazed, Daoudi Zerrouki Nacira. The possible alleviating effect of *Thymus vulgaris* essential oil against Voliam Targo® induced cardiotoxicity in male rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). 1^{er} Séminaire National sur les ressources naturelles face aux contraintes d'usage et du changement climatique (SENACUC), Faculté de SNV, Université de Mila. 04 Juillet 2021.

-Bokreta Soumya, Khaldoun Hassina, Makhlof Chahrazed, Daoudi Zerrouki Nacira. Composition Chimique et Activité Antibactérienne de l'Huile Essentielle de *Thymus vulgaris* L. de la Région de Hammam Melouane (Blida- Algérie). 2^{eme} Séminaire National

d'ethnobotanique et la valorisation des substances naturelles, Faculté des Sciences, Université Ben Youcef Ben Khedda Alger 1. 06-07 Juin 2021.

-Bokreta Soumya, Khaldoun Hassina, Makhlouf Chahrazed, Daoudi Zerrouki Nacira. Modulatory role of *Thymus vulgaris* essential oil against voliam tatgo® induced intestinal toxicity in male rabbits. Premier congrès national sur la Valorisation des Substances et Matériaux Naturels, Université de Tlemcen. 05-06 Juin 2021.

-Bokreta Soumya, Khaldoun Hassina, Makhlouf Chahrazed, Daoudi Zerrouki Nacira. Neurotoxic effects of sub-acute exposure of male rabbits to Voliam Targo insecticide and possible ameliorative role of *Thymus vulgaris* essential oil. 2^{ème} Séminaire National des Sciences d'Interface Chimie-Biologie, Faculté des Sciences et de la Technologie, Université de Souk-Ahras. 20 Février 2021.

Autres Contributions Scientifiques

▪ Publication

-Khaldoun Hassina, Bouzid Noura, **Bokreta Soumya**, Makhlouf Chahrazed, Derriche Fayza, Djennas Nadia. Thiamethoxam Actara® Induced Alterations In Kidney Liver Cerebellum and Hippocampus Of Male Rats. Journal of Xenobiotics, 2017, 7(1) : 25-30.

▪ Communication Internationale

- Khaldoun Oularbi Hassina, Makhlouf Chahrazed, **Bokreta Soumya**, Settar Amina, Zerrouki-Daoudi Nacira. Ampligo Insecticide Induces Injuries on the Testes of Rabbits *Oryctolagus cuniculus* : Alleviating Effects of Vitamins C and E. 12th World Rabbits Congress (WRC), Nantes, France. 3-5 Novembre 2021.

-Bokreta Soumya, Khaldoun Hassina, Makhlouf Chahrazed, Settar Amina, Oularbi Yasmin, Zerrouki-Daoudi Nacira. Drugs as endocrine disruptors : Is medication exposing us to hormone-disrupting chemicals ? 1^{er} Séminaire International Perturbateurs Endocriniens Environnement & Reproduction (PEER). 7-8 Juillet 2021.

-Bokreta Soumya, Khaldoun Hassina, Makhlouf Chahrazed, Settar Amina, Oularbi Yasmin, Zerrouki-Daoudi Nacira. Menopausal Hormonal Therapy and Breast Cancer Risk. 1^{er} Séminaire International Perturbateurs Endocriniens Environnement & Reproduction (PEER). 7-8 Juillet 2021.

-Khaldoun Hassina, Bourdi Manel, **Bokreta Soumya**, Makhlouf Chahrazed, Djennas Nadia. Effet de la vitamine C sur les variations des paramètres biochimiques et l'histologie du foie chez le lapin traité par le lambda cyalothrin. 6^{ème} congrès International de l'Association Tunisienne de Physiologie et de Biosurveillance de l'Environnement. 18-21 Décembre 2017.

Résumé

La présente étude vise à évaluer l'effet toxique d'une formulation insecticide « Voliam Targo® 063SCe » (VT), composée de deux molécules actives l'abamectine et le chlorantraniliprole, sur les paramètres biochimiques et les aspects histologiques et immunohistochimiques chez le lapin male *Oryctolagus cuniculus*. D'autre part, nous nous sommes intéressées à rechercher l'effet protecteur possible d'une supplémentation de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* (HET) contre la toxicité expérimentale du VT. Vingt lapins mâles ont été répartis en quatre groupes (n = 5) et traités oralement pendant 21 jours : groupe témoin; groupe traité par le VT; groupe traité par HET et groupe traité par VT + HET. À la fin de l'expérimentation, des échantillons de sang ont été collectés pour l'analyse biochimique (créatinine, acide urique, ALAT, ASAT, γ GT, glucose et bilan lipidique). Par la suite, les lapins ont été sacrifiés et les organes cibles (rein, cerveau, cœur et foie) ont été soigneusement prélevés et fixés dans du formol à 10% pour l'étude histologique et immunohistochimique. L'extraction de l'HET par hydrodistillation nous a permis d'obtenir une huile essentielle avec un rendement de 0.30% et la caractérisation de cette huile par CG/SM indique que le composant majeur est le carvacrol (86,25%). L'évaluation de l'activité anti-radicalaire de l'huile essentielle nous amène à déduire que l'extrait du thym présente un fort pouvoir antioxydant en piégeant les radicaux DPPH (CI50= 28.15 ± 0.04 mg/ml, IAA=3.03). Nos résultats indiquent que le traitement par le VT a provoqué des variations des paramètres biochimiques de la fonction rénale et hépatique, notamment une augmentation significative ($p < 0.05$) du taux plasmatique de la créatinine, l'acide urique, ALAT, ASAT, γ -GT et glucose ainsi une diminution significative du taux de TC, LDL-C et LDL-C/HDL-C chez le lot VT par rapport au lot témoin. De plus, l'étude histologique a montré que le VT a causé des lésions très marquées au niveau des différents tissus: rénal (une congestion vasculaire, dilatation des tubes proximaux et distaux, et infiltration des leucocytes) ; nerveux (vacuolisation de neuropile avec une perte de la structure tissulaire de cortex cérébral, œdème importante au niveau de l'hippocampe et du cervelet avec des changements dégénératifs des neurones pyramidaux et des cellules du Purkinjie) ; cardiaque (congestion vasculaire avec infiltration des cellules inflammatoires) et hépatique (dilatation des veines, infiltration des leucocytes et une stéatose hépatocytaire, avec accumulation des fibres de collagène au niveau des espaces portes). Par ailleurs, la supplémentation de l'huile essentielle de thym avec le VT a diminué remarquablement le niveau de la toxicité de ce dernier, en modulant les niveaux des marqueurs biochimiques et en améliorant la structure tissulaire des organes touchés (rein, cerveau, cœur, foie). En outre, l'examen immunohistochimique montre un immuno-marquage cytoplasmique positif de l'expression des protéines Bcl-2 et AFP au niveau hépatique chez le groupe traité par VT+HET, alors qu'une expression négative a été observée dans le groupe traité par le VT. À la lumière de nos résultats, on peut conclure que le VT est potentiellement toxique chez le lapin et la supplémentation de l'huile essentielle de thym riche en carvacrol procure un effet protecteur contre la néphro-hépatotoxicité, la neurotoxicité et la cardiotoxicité induite par ce pesticide.

Mots clés: VoliamTargo®, Biochimie, Histopathologie, Immunohistochimie, *Thymus vulgaris* L., Huile essentielle, Lapin.

Abstract

The present study aims to evaluate the toxic effect of an insecticide formulation « Voliam Targo® 063SCe » (VT), composed of two active molecules abamectin and chlorantraniliprole, on biochemical parameters, histological and immunohistochemical aspects in male rabbit *Oryctolagus cuniculus*. On the other hand, we aim to investigate the possible protective effect of *Thymus vulgaris* essential oil of (TEO) supplementation against the experimental toxicity of VT. Twenty male rabbits were allocated into four groups (n = 5) and treated orally for 21 days: Control group, VT-group, TEO-group, and VT + TEO-group. At the end of the experiment, blood samples were collected for biochemical analysis (creatinine, uric acid, ALT, AST, γ GT, glucose, and lipid profile). The rabbits were then sacrificed and the target organs (kidney, brain, heart and liver) were carefully removed and fixed in 10% formalin for histological and immunohistochemical analysis. The extraction of TEO by hydrodistillation allowed us to obtain an essential oil with a yield of 0.30% and the characterization of this oil by GC/MS indicates that the major component is carvacrol (86.25%). The evaluation of the anti-free radical activity of the essential oil show that the thyme extract has a strong antioxidant capacity by scavenging DPPH radicals (IC₅₀ = 28.15 ± 0.04 mg/ml, IAA = 3.03). Our results revealed that VT treatment caused changes in kidney and liver function biomarkers, as evidenced by the significant increase (p <0.05) in the plasma level of creatinine, uric acid, ALT, AST, γ -GT and glucose, as well as a significant decrease in the level of TC, LDL-C and LDL-C/HDL-C in the VT-group compared to the control group. In addition, VT was found to induce marked histopathological alterations in various tissues of treated rabbits, mainly kidney (vascular congestion, dilation of the proximal and distal tubules, and infiltration of leukocytes) ; brain (vacuolation of neuropil with loss of tissue structure of the cerebral cortex, significant edema in the hippocampus and cerebellum with degenerative changes in pyramidal neurons and Purkinje cells) ; heart (vascular congestion with infiltration of inflammatory cells), and liver tissues (dilation of the veins, infiltration of leukocytes and hepatocytic steatosis, with accumulation of collagen fibers in the portal area). Furthermore, supplementation of thyme essential oil with VT significantly reduced the level of toxicity of the latter, by modulating the biochemical markers levels and by improving the tissue structure of the affected organs (kidney, brain, heart, liver). Moreover, the immunohistochemical study showed positive cytoplasmic staining for Bcl-2 and AFP proteins in liver of VT+TEO-group, while a negative expression was noted in VT-group. In the light of our findings, it can be concluded that VT is potentially toxic in rabbits and supplementation with carvacrol-rich thyme essential oil exerts a protective effect against VT-induced nephro-hepatotoxicity, neurotoxicity and cardiotoxicity.

Keywords: VoliamTargo®, Biochemistry, Histopathology, Immunohistochemistry, *Thymus vulgaris* L., Essential oil, Rabbit.

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم التأثير السام الناتج عن المبيد الحشري الفوليام تارغو و الذي يحتوي على مكونين نشيطين الأباكتين و كلورنترونيبيرو، على المؤشرات البيوكيميائية، النسيجية و الكيميائية المناعية عند ذكور الأرانب *Oryctolagus cuniculus* . و من جهة أخرى تهدف لفحص التأثير الوقائي للزيت العطري لعشبة الزعيترة ضد السمية التجريبية التي يسببها هذا المبيد الحيوي. تم تقسيم عشرين أرنباً ذكراً إلى أربع مجموعات (ن = 5)، كما تم معالجتهم عن طريق الفم لمدة 21 يوماً : مجموعة الشواهد، المجموعة المعالجة بالفوليام تارغو، المجموعة المعالجة بالعطر الأساسي للزعيترة و المجموعة المعالجة بالفوليام تارغو + العطر الأساسي للزعيترة. في نهاية التجربة، تم جمع عينات الدم من أجل إجراء التحاليل الكيميائية الحيوية لوظائف الكلى و الكبد (الكرياتينين، حمض اليوريك، ASAT، ALAT، γGT، الجلوكوز و فحص الدهون). بعد ذلك، تم ذبح الأرانب و تثبيت بعض الأعضاء كالكلية، الدماغ، القلب و الكبد في محلول الفورمول ذو التركيز 10% من أجل الدراسة النسيجية و الدراسة الكيميائية المناعية. أظهرت دراستنا أن إستخراج العطر الأساسي لنبته الزعيترة عن طريق عملية التقطير المائي كان بمرادود 0.30% ، كما تم تحديد مركبات العطر بإستخدام كروماتوغرافيا الغاز- مطياف الكتلة و التي أظهرت أن المركب الرئيسي لهذا الزيت هو الكارفاكرو (86.25%). أظهر تقييم النشاط المضاد للجذور الحرة DPPH للزيت العطري أن مستخلص الزعتر لديه قدرة قوية مضادة للأكسدة (CI50= 28.15±0.04) (mg/ml, IAA= 3.03). تشير نتائج دراستنا أن المعالجة بالفوليام تارغو تسببت في إختلال المؤشرات البيوكيميائية لوظائف الكلى و الكبد مع زيادة معتبرة (p<0.05) في مستويات البلازما من الكرياتينين، حمض اليوريك، ALAT، γGT و الجلوكوز، و إنخفاض كبير في مستوى TC، LDL-C و LDL-C/HDL-C، بالنسبة للأرانب المعالجة مقارنة بالشاهدة. بالإضافة الى ذلك، تسبب إعطاء الفوليام تارغو في تغيرات واضحة في البنية النسيجية لمختلف الأعضاء المدروسة، و المتمثلة في نسيج الكلى (إحتقان في الأوعية الدموية، توسع الأنابيب القريبة و البعيدة مع تسلل كريات الدم البيضاء)، نسيج الدماغ (فجوات على مستوى اللبد العصبي، فقدان للبنية النسيجية للفشرة الدماغية، وذمة في نسيج الحصين و المخيخ مع تغيرات تنكسية في الخلايا العصبية الهرمية و خلايا بركنجي)، نسيج القلب (إحتقان الأوعية الدموية مع تسلل الخلايا الإتهابية) و كذا نسيج الكبد (توسع الأوردة، تسلل الكريات البيض، تشحم الخلايا الكبدية مع تراكم ألياف الكولاجين في المنطقة البابية). بالإضافة إلى ذلك، ساهم العطر الأساسي لنبته الزعيترة في تقليل سمية المبيد الحشري الفوليام تارغو بشكل مثير للإنتباه حيث لوحظ تحسن كبير في مستوى العلامات البيوكيميائية المختلفة، و كذلك على المستوى النسيجي للأعضاء المصابة. إضافة لهاته النتائج، أظهر الفحص الكيميائي المناعي لأنسجة الكبد نتائج ايجابية سيتوبلازمية للتعبير عن بروتينات بي سي إل 2 و ألفا فيتو بروتين في المجموعة المعالجة بالعطر الأساسي لنبته الزعيترة + فوليام تارغو ، بينما لوحظ تعبير سلبي لهاته البروتينات في المجموعة المعالجة بالفوليام تارغو لوحده. على ضوء هذه النتائج، أثبتت دراستنا سمية الفوليام تارغو لدى الأرانب كما أثبتت الأثر الإيجابي لإستعمال العطر الأساسي لنبته الزعيترة الغني بمادة الكارفاكروول ضد السمية الكلوية، الكبدية، العصبية و القلبية للمبيد الحشري فوليام تارغو.

الكلمات المفتاحية: فوليام تارغو، الكيمياء الحيوية، التشريح المرضي، الكيمياء النسيجية المناعية، نبته الزعيترة، العطر الأساسي، الأرنب.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
--------------------	---

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 PESTICIDES & VOLIAM TARGO®

1. Généralités sur les pesticides.....	4
1.1. Définition des pesticides	4
1.2. Classification des pesticides	4
1.3. Voies d'exposition de l'homme aux pesticides	5
1.4. Impact des pesticides sur la santé humaine.....	6
2. Voliam Targo® (Abamectine + Chlorantraniprole).....	8
2.1. Abamectine	9
2.1.1. Structure chimique.....	10
2.1.2. Propriétés physico-chimiques.....	10
2.1.3. Toxicocinétique de l'abamectine.....	11
2.1.4. Mode d'action.....	13
2.1.5. Toxicité de l'abamectine	15
2.2. Chlorantraniprole.....	15
2.2.1. Structure chimique.....	16
2.2.2. Toxicocinétique du Chlorantraniprole.....	16
2.2.3. Mode d'action	18
2.2.4. Toxicité du Chlorantraniprole	18

CHAPITRE 2 THYM « *THYMUS VULGARIS* » & HUILE ESSENTIELLE

1. Monographie de la plante étudiée: Le Thym commun (<i>Thymus vulgaris</i> L.).....	20
1.1. Historique.....	20
1.2. Description botanique	21
1.3. Dénominations internationales	22
1.4. Position systématique	22
1.5. Habitat et répartition géographique	23
1.6. Bienfaits et vertus thérapeutiques de la plante	23
1.7. Précautions d'emploi et effets secondaires	24
1.8. Toxicité	24

2. Huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i>	25
2.1. Production et composition.....	25
2.2. Notion de chémotype	26
2.3. Bienfaits thérapeutiques de l'huile essentielle de thym.....	27
2.4. Contre-indications de l'huile essentielle de thym	28

CHAPITRE 3 RAPPELS ANATOMO-HISTOLOGIQUES DES ORGANES CIBLES

1. Foie	30
1.1. Rappels anatomiques	30
1.2. Rappels histologiques	31
2. Rein	34
2.1. Rappels anatomiques	34
2.2. Rappels histologiques	35
3. Système Nerveux Central.....	37
3.1. Rappels anatomiques	37
3.2. Rappels histologiques	40
4. Cœur	44
4.1. Rappels anatomiques	44
4.2. Rappels histologiques	45

CHAPITRE 4 MARQUEURS DE PROLIFÉRATION CELLULAIRE

1. Protéine B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) : Une protéine anti-apoptotique	47
1.1. Apoptose	47
1.2. Structure de la protéine Bcl-2.....	48
1.3. Fonctions de Bcl-2.....	49
2. Alpha-FoetoProtéine (AFP) : un marqueur de régénération hépatique	50
2.1. Structure de la protéine AFP	51
2.2. Fonctions de l'AFP	52

ÉTUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE 1 MATERIEL & METHODES

1. Objectifs de l'étude.....	54
2. Matériel.....	54
2.1 Matériel biologique	54
2.1.1. Matériel animal.....	54

2.1.2. Matériel végétal	56
2.2 Matériel non biologique	58
3. Méthodes.....	59
3.1. Etude toxicologique	59
3.1.1. Protocole expérimental	59
3.1.2. Sacrifice des animaux et prélèvement des échantillons	60
3.1.3. Etude biochimique	61
3.1.3.1. Dosage de la créatinine	61
3.1.3.2. Dosage de l'acide urique	62
3.1.3.3. Dosage de la glycémie	62
3.1.3.4. Dosage des transaminases plasmatiques	63
3.1.3.5. Dosage des paramètres lipidiques.....	65
3.1.4. Etude histologique	68
3.1.4.1. Coloration à l'hématoxyline-éosine	69
3.1.4.2. Coloration au trichrome de Masson.....	70
3.1.5. Etude immunohistochimique.....	70
3.2. Extraction de l'huile essentielle	75
3.2.1 Rendement de l'extraction de l'huile essentielle.....	75
3.3. Etude analytique de l'huile essentielle.....	75
3.3.1. Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle.....	76
3.3.2. Mesure des constantes physiques	76
3.3.3. Analyse chromatographique de l'huile essentielle de thym.....	77
3.4. Evaluation de l'activité anti-oxydante	79
3.5. Analyse statistique	81

CHAPITRE 2 RÉSULTATS

1. Résultats de l'étude toxicologique	83
1.1. Effet du traitement sur l'évolution pondérale des lapins	83
1.2. Effet du traitement sur la prise de l'aliment.....	84
1.3. Effet du traitement sur la prise de boisson.....	84
1.4. Variation du poids absolu et relatif des organes.....	85
1.5. Paramètres biochimiques	86
1.5.1. Paramètres biochimiques la fonction rénale	86

1.5.2. Paramètres biochimiques de la fonction hépatique	88
1.5.3. Paramètres biochimiques du bilan lipidique	90
1.6. Aspects histologiques	92
1.6.1. Histopathologie du rein	92
1.6.2. Histopathologie du tissu nerveux	96
1.6.3. Histopathologie du cœur	102
1.6.4. Histopathologie du foie	105
1.7. Résultats de l'étude immunohistochimique	109
1.7.1. Etude IHC de l'expression de Bcl-2 dans le foie.....	109
1.7.2. Etude IHC de l'expression de l'AFP dans le foie.....	111
2. Résultats de l'extraction de l'huile essentielle de thym.....	113
2.1. Rendement en huile essentielle	113
2.2. Résultats de l'étude analytique de l'huile essentielle	113
2.3. Résultats de l'activité antioxydante de l'huile essentielle de thym.....	116
CHAPITRE 3 DISCUSSION GÉNÉRALE.....	117
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	135
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	138
ANNEXES	

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'organisme humain est constamment et inévitablement exposé à une variété de contaminants ; parmi lesquels figurent les pesticides. Ces derniers sont devenus la pierre angulaire des systèmes agricoles mondiaux, permettant une amélioration substantielle des rendements des cultures afin de répondre aux besoins alimentaires d'une population mondiale grandissante (Carvalho, 2017). Toutefois, derrière ces bienfaits, se cachent des effets nocifs sur l'environnement et la santé humaine (Benedetti *et al.*, 2017).

L'utilisation intensive des pesticides a conduit à leur dissémination dans tous les milieux de l'environnement. De nombreux pesticides ne sont pas facilement dégradables, ils persistent dans le sol, s'infiltrant dans les eaux souterraines et dans les eaux de surface. En fonction de leurs propriétés chimiques, ils sont susceptibles d'être progressivement bio-accumulés tout au long de la chaîne alimentaire, voire même dans différentes matrices biologiques (sang, urine, liquide céphalorachidien...) (Ali *et al.*, 2000 ; Rubensam *et al.*, 2013 ; Khaldoun Oularbi *et al.*, 2017 ; Zheng *et al.*, 2020).

Au cours des dernières années, des données scientifiques établissent un lien causal entre l'exposition aux pesticides et la survenue de plusieurs pathologies humaines, en particulier le cancer, les maladies neurologiques et cardio-vasculaires ainsi que les troubles de la reproduction. Ces polluants peuvent aussi affecter les fonctions rénales, hépatiques et respiratoires (Pereira *et al.*, 2015; Nicolopoulou-Stamati *et al.*, 2016 ; Kalyabina *et al.*, 2021) .

Le «Voliam Targo® 063SCe» (VT) est un nouvel insecticide et acaricide à large spectre commercialisé en Algérie depuis 2011 (ACTA, 2015). Il s'agit d'un mélange de deux insecticides, l'abamectine (ABA) et le chlorantraniliprole, appartenant à deux familles chimiques différentes : les avermectines et les diamides anthraniliques respectivement. La synergie de ces deux principes actifs offre une meilleure efficacité du VT chez les insectes grâce à son action sur les récepteurs de la ryanodine et les canaux chlorures. Ce biopesticide est efficace sur plusieurs ravageurs clés des fruits et légumes. Le Voliam Targo® est considéré comme étant l'insecticide redoutable contre *Tuta absoluta* sur tomate, carpocapse et acariens sur le pommier (Diaz-Fleischer *et al.*, 2016).

L'ABA est une lactone macrocyclique ; un mélange d'ivermectines contenant plus de 80 % d'ivermectine B1a et moins de 20 % d'ivermectine B1b. Les ivermectines sont largement utilisées dans le monde entier en médecine vétérinaire et humaine pour se protéger contre un large spectre d'infections parasitaires et en agriculture pour la lutte antiparasitaire. L'ABA est

généralisé sous forme d'un produit de fermentation par l'actinomycète *Streptomyces avermitilis* (Fent, 2014). Il exerce son effet par une liaison de haute affinité aux canaux chlorure glutamate-dépendants (Kolar *et al.*, 2008) ; il est considéré comme très toxique pour les insectes et les poissons et peut également être toxique pour les mammifères (Jenčič *et al.*, 2006 ; Bai et Ogbourne, 2016 ; Disner *et al.*, 2021).

Le chlorantraniliprole est un nouvel insecticide à base de diamide anthranilique, efficace pour lutter contre les parasites lépidoptères et certaines espèces des ordres Coléoptères, Diptères et Hémiptères (He *et al.*, 2019). Cet insecticide possède un mode d'action unique ; il se lie sélectivement et active les récepteurs de la ryanodine des insectes, ce qui stimule la libération et l'épuisement des réserves internes de calcium du réticulum sarcoplasmique dans les muscles, provoquant ainsi une altération de la régulation des muscles, la paralysie et finalement la mort des espèces sensibles (Lai et Su, 2011). Le chlorantraniliprole est non polluant et est considéré comme une alternative prometteuse des insecticides conventionnels les plus toxiques, en raison de sa très faible toxicité vis-à-vis des animaux non cibles (Han *et al.*, 2012 ; Lavtžar *et al.*, 2016 ; Nawaz *et al.*, 2017).

C'est ainsi que, nous nous sommes intéressés à entreprendre ce travail de thèse qui a pour objectif principal d'examiner l'impact toxicologique de l'insecticide VoliamTargo® sur les paramètres biochimiques, les aspects histologiques et l'examen des marqueurs de la prolifération cellulaire chez le lapin mâle de souche synthétique (*Oryctolagus cuniculus*). Cette étude s'intéresse plus précisément à la mise en évidence des effets neurotoxiques, néphro-hépatotoxiques et cardiotoxique du Voliam Targo® en mettant l'accent sur l'expression de quelques marqueurs de prolifération cellulaire, à savoir la Bcl-2 et l'alpha fœtoprotéine, au niveau de l'organe de détoxification « le foie ».

Aujourd'hui, alors que la thérapeutique moderne se développe, il y a une tendance croissante à la phytothérapie pour traiter divers problèmes de santé. Le recours au traitement par les plantes ainsi que la recherche des nouvelles substances à activités biologiques constituent une des plus grandes préoccupations scientifiques.

La flore algérienne est caractérisée par sa diversité florale : Méditerranéenne, Saharienne et une flore paléo tropicale, estimée à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques. Ces espèces sont pour la plupart spontanées avec un nombre non-négligeable (15%) d'espèces endémiques (Ozenda, 1977). De par sa situation géographique, d'une grande variation climatique et de grandes ressources hydriques, l'Algérie abrite un ensemble d'espèces végétales

dotées de pouvoirs thérapeutiques divers, témoignant ainsi d'une richesse inestimable de la pharmacopée traditionnelle.

Dans la présente étude, nous avons mis en lumière l'huile essentielle d'une espèce très répandue en Algérie et largement utilisée en médecine traditionnelle, le thym (*Thymus vulgaris* L.). Le thym est une plante aromatique vivace de la Famille des Lamiacées, originaire de la région méditerranéenne (Patil *et al.*, 2021). Les feuilles du thym et son huile essentielle sont couramment utilisées en culinaires, comme conservateurs alimentaires naturels et également dans la médecine traditionnelle. En effet, il a été rapporté que le thym est doué de nombreuses propriétés thérapeutiques intéressantes, notamment des propriétés antimicrobiennes, anticancéreuses, anti-inflammatoires, analgésiques et antioxydantes ; il a également été suggéré comme un substitut naturel des antioxydants synthétiques (Rasooli *et al.*, 2006 ; Galovičová *et al.*, 2021 ; Patil *et al.*, 2021 ; Rizwan, 2021).

Ainsi, le deuxième objectif de ce travail de thèse portera sur l'étude de l'éventuel effet protecteur d'une supplémentation de l'huile essentielle de thym (*Thymus vulgaris*) suite à une toxicité subaiguë induite par le Voliam Targo® chez le lapin male (*Oryctolagus cuniculus*), en se focalisant sur les paramètres biochimiques de la fonction rénale, hépatique et le bilan lipidique ainsi que l'histopathologie de certains organes vitaux (rein, cerveau, cœur et le foie) et l'expression de la Bcl-2 et l'alpha foetoprotéine au niveau hépatique.

Le présent manuscrit comporte deux grandes parties. La première englobera quatre chapitres sur une synthèse bibliographique. Dans le premier chapitre, nous exposons des généralités sur les pesticides et en particulier le Voliam Targo®. Le deuxième chapitre portera sur une description botanique générale de l'espèce étudiée (*Thymus vulgaris*), sa répartition géographique et son utilisation en médecine traditionnelle ainsi qu'un aperçu sur son huile essentielle. Dans le troisième chapitre, seront abordés les aspects anatomo-histologiques des organes cibles. Une attention particulière sera apportée, dans le quatrième chapitre, sur les deux marqueurs de prolifération cellulaire : Bcl-2 et l'alpha foetoprotéine.

Nous présenterons ensuite, dans une seconde partie expérimentale, le dispositif expérimental et les techniques utilisées au cours de la thèse. Enfin, nous présenterons les résultats obtenus au cours de notre étude et une discussion globale sera faite relativement aux apports de cette thèse et aux nouvelles questions qui en découlent en perspectiv

1. Généralités sur les pesticides

1.1. Définition des pesticides

Le terme « pesticide » provient de l'association du mot anglais « pest », lequel provient du latin « pestis » (fléau, calamité), qui signifie animal, insecte, plante ou nuisible (virus, bactérie, champignon, ver, mollusque, insecte, rongeur, oiseau et mammifère) susceptibles d'être nuisible à l'homme et à son environnement et du suffixe « cide » ((latin -cida, du verbe latin caedo, caedere) qui signifie tuer (Cotonat, 1996 ; Couteux et Salaün, 2009). Il désigne donc toutes substances chimiques ou biologiques destinées à prévenir, contrôler, attirer, repousser, détruire ou combattre tout organisme biologique considéré comme nuisible (Abubakar *et al.*, 2020).

L'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO) définit le terme pesticide comme : «toute substance ou association de substances qui est destinée à repousser, détruire ou combattre les ravageurs, y compris les vecteurs de maladies humaines ou animales, les espèces indésirables de plantes ou d'animaux causant des dommages ou se montrant autrement nuisibles durant la production, la transformation, le stockage, le transport ou la commercialisation des denrées alimentaires, des produits agricoles, du bois et des produits ligneux, des aliments pour animaux, ou qui peut être administrée aux animaux pour combattre les insectes, les arachnides et autres endo ou ecto-parasites » (FAO, 1998).

1.2. Classification des pesticides

L'hétérogénéité de ce vaste ensemble de produits rend difficile toute classification. Certains auteurs séparent les pesticides minéraux de pesticides organiques (organochlorés et organophosphorés), d'autres préfèrent classer les produits selon la cible visée (insecticides, herbicides, fongicides, etc.), le domaine d'utilisation, leur toxicité, la capacité de dégradation ou le mode d'action sur les organismes cibles, il y a alors plusieurs possibilité de classification (Fenik *et al.*, 2011). Actuellement, il existe trois méthodes largement répandues de classification des pesticides recommandées par Drum, (1980). Ces trois systèmes de classification de pesticides englobent: (i) la structure chimique du pesticide, (ii) l'action du pesticide et des organismes qu'ils tuent, et (iii) le mode d'entrée (Yadav *et al.*, 2015).

Sur la base des sources d'origine, les pesticides peuvent être classés en pesticides chimiques et biopesticides. Les biopesticides sont d'origine biologique, c'est-à-dire, organismes vivants ou de substances d'origine naturelle synthétisées par les plantes, les champignons, les bactéries, etc. Les biopesticides sont divisés en trois grands groupes: les pesticides biochimiques,

les pesticides microbiens et les phytoprotecteurs incorporés dans les plantes (Hassaan et El Nemr, 2020).

1.2.1. Classification chimique

La méthode la plus courante et la plus appropriée de classification des pesticides est basée sur leur composition chimique et la nature des ingrédients actifs. C'est ce genre de classification qui fournit des preuves sur l'efficacité et les propriétés physico-chimiques des pesticides (Hassaan and El Nemr, 2020). En fonction de la composition chimique, les pesticides sont classés en 4 grandes catégories à savoir; organochlorés, organophosphorés, carbamates, pyrèthrine et pyrèthroïde (Buchel, 1983).

1.2.2. Classification basée sur l'action du pesticide et la nature du ravageur visé

En se basant sur le deuxième critère, les pesticides sont classés en fonction de l'organisme du ravageur cible et reçoivent des noms spécifiques pour refléter leurs activités. Les noms des catégories de ces pesticides proviennent du mot latin cide (qui signifie tuer), qui est utilisé comme suffixe après le nom du ravageur cible. Ainsi, on peut classer les pesticides en : insecticides, acaricides, fongicides, antibiotiques à usage agricole, herbicides, molluscicides, rodenticides, nematicides, corvicides etc... (Hassaan and El Nemr, 2020).

1.2.3. Classification selon le mode d'entrée

Les moyens par lesquels les pesticides entrent en contact avec l'organisme nuisible cible ou y pénètrent sont appelés modes d'entrée (Gerolt, 1969). Ceux-ci comprennent les pesticides systémiques, de contact, d'ingestion, les fumigants et les répulsifs (Yadav *et al.*, 2015).

1.3. Voies d'exposition de l'homme aux pesticides

Les pesticides sont utilisés, non seulement dans l'agriculture, mais aussi dans de nombreux secteurs différents (industrie alimentaire, foresterie, santé publique) ainsi qu'en usage domestique et vétérinaire (Aktar *et al.*, 2009). Des problèmes de résidus des pesticides dans les légumes, les fruits, l'air, l'eau des rivières et les eaux souterraines sont aussi mis en évidence (Mebdoua, 2019).

L'exposition aux pesticides peut se produire directement dans le cadre de leurs utilisations professionnelles, agricoles et domestiques, alors qu'ils peuvent également être transférés indirectement par l'air et l'alimentation (Kim *et al.*, 2017). La chaîne alimentaire, l'air, l'eau, le sol, la flore et la faune sont les principales voies d'exposition humaine aux pesticides (Anderson et Meade, 2014). Ainsi, ces xénobiotiques peuvent pénétrer dans l'organisme par contact cutané,

par ingestion, par inhalation ou par voie oculaire. La figure 1 résume les principaux modes d'exposition de l'homme aux pesticides.

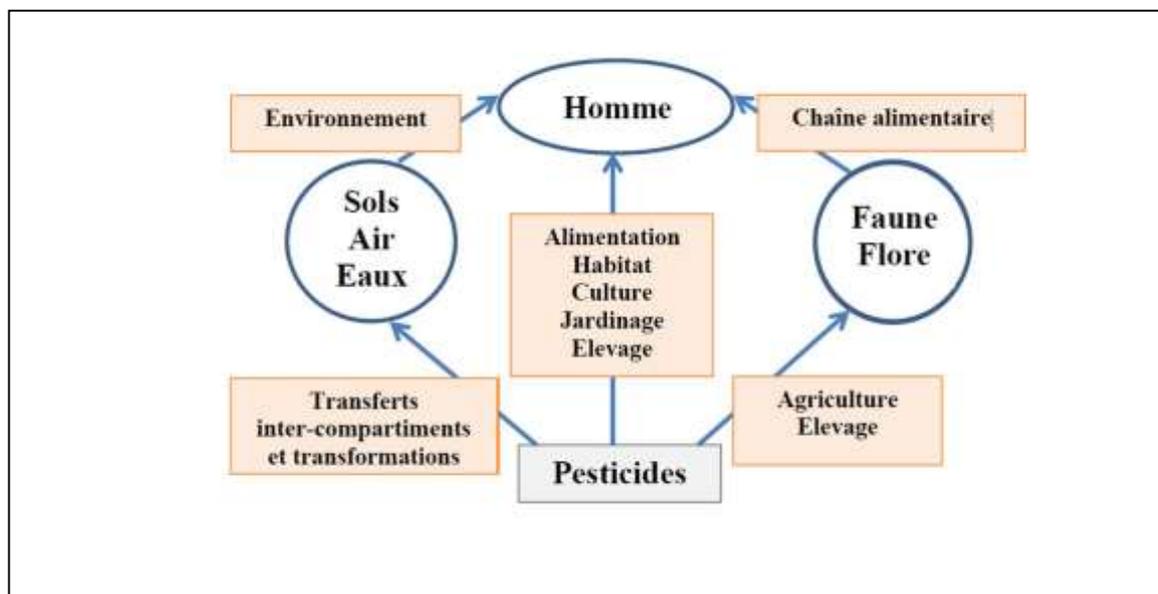


Figure 1 : Voies d'exposition de l'homme aux pesticides (Comité de la prévention et de la protection, 2002)

1.4. Impact des pesticides sur la santé humaine

Les pesticides sont des xénobiotiques dangereux susceptibles de provoquer des effets délétères. En effet, il existe de plus en plus de preuves scientifiques établissant un lien causal entre l'exposition aux pesticides et le développement de plusieurs pathologies humaines, y compris le cancer, le diabète, les troubles respiratoires, les troubles neurologiques, les syndromes reproductifs et les maladies cardiovasculaires (Rani *et al.*, 2021).

La toxicité des pesticides dépend de la dose, le temps d'exposition aux pesticides, le degré d'absorption, la nature des effets de la matière active et de ses métabolites ainsi que l'accumulation et la persistance du produit dans l'organisme. De plus, certaines personnes comme les enfants, les femmes enceintes ou les personnes âgées peuvent être plus sensibles aux effets des pesticides que d'autres (Kim *et al.*, 2017).

A cet effet, l'exposition aux produits phytosanitaires peut occasionner deux types de toxicité sur la santé humaine : la toxicité aiguë et chronique.

1.4.1. Toxicité aiguë

Les conséquences liées à cette toxicité sont le plus souvent immédiates (quelques minutes, heures ou jours), elle est induite suite à une exposition ponctuelle à une dose importante de pesticide comme pour le cas de la manipulation des produits non dilués (Damalas et Koutroubas, 2016).

La toxicité aiguë des pesticides résulte d'une mauvaise utilisation, d'un usage accidentel des pesticides (accidents domestiques) ou d'une intoxication volontaire souvent gravissime. L'exposition se fait essentiellement par voie cutanéomuqueuse et respiratoire (inhalation), la voie d'exposition orale concernerait davantage la population générale par ingestion accidentelle ou intentionnelle de pesticides. En outre, les principaux effets aigus des pesticides sont représentés par: les brûlures chimiques oculaires ; les lésions cutanées ; les effets neurologiques ; les troubles hépatiques et les difficultés respiratoires (Cherin *et al.*, 2012).

1.4.2. Toxicité chronique

La toxicité chronique est la capacité d'un pesticide à provoquer des effets néfastes sur la santé pendant une période prolongée, généralement après une exposition répétée ou continue, qui peut durer toute la vie de l'organisme exposé. Un pesticide qui a une toxicité aiguë élevée n'a pas toujours une toxicité chronique élevée alors qu'un pesticide à faible toxicité aiguë n'aura pas nécessairement une faible toxicité chronique (Damalas et Koutroubas, 2016).

Les pesticides possèdent des effets génotoxiques (Kapeleka *et al.*, 2019). En dehors des effets cancérogènes, trois types d'effets font l'objet d'une attention particulière : les troubles neurologiques causant des troubles psychologiques, en particulier des syndromes dépressifs ; les troubles de la reproduction et du développement et les perturbations endocriniennes (Kori *et al.*, 2018).

De nombreuses études ont démontré l'augmentation du risque de cancer de la prostate, du sein, de la vessie, des poumons, du côlon, de la leucémie et du myélome multiple suite à l'exposition continue à certains pesticides (Alavanja *et al.*, 2004 ; Mathur *et al.*, 2008 ; van Bommel *et al.*, 2008 ; Alavanja et Bonner, 2012 ; Lerro *et al.*, 2015 ; Huang *et al.*, 2019).

Les résultats d'études expérimentales, en l'occurrence sur l'homme, ont confirmé la corrélation entre l'exposition aux pesticides et le développement du diabète (Saldana *et al.*, 2007 ; Everett *et al.*, 2017 ; Juntarawijit et Juntarawijit, 2018 ; Lind et Lind, 2018 ; Joshi et Sukumaran, 2019).

L'exposition aux pesticides joue un rôle contributif dans le développement des troubles neurologiques (Rani *et al.*, 2021). Des études antérieures avaient révélé une association entre le contact avec les pesticides et la survenue de la maladie neuro-dégénératives comme la maladie de Parkinson et d'Alzheimer (Kamel et Hoppin, 2004 ; Thany *et al.*, 2013 ; Yan *et al.*, 2016 ; Ahmed *et al.*, 2017) .

La relation entre l'exposition aux pesticides et les troubles de la reproduction a été largement analysée et plusieurs enquêtes ont confirmé que l'exposition aux pesticides pouvait entraîner des troubles de la fertilité chez les femmes comme chez les hommes (Hanke et Jurewicz, 2004). Les perturbateurs endocriniens ont la capacité d'influencer la signalisation hormonale, y compris les œstrogènes, la thyroïde et les androgènes, qui sont indispensables au développement et à la croissance du fœtus. L'exposition des hommes aux pesticides peut influencer les hormones sexuelles, le sperme (morphologie, concentration et motilité), la qualité du sperme ou la structure de la gonade. Une réduction du nombre de spermatozoïdes a été observée chez les hommes travaillant dans la terre pendant plus de dix ans (Bretveld *et al.*, 2007 ; Roeleveld et Bretveld, 2008 ; Saadi et Abdollahi, 2012).

2. Voliam Targo® (Abamectine + Chlorantraniliprole)

Le «Voliam Targo® 063SCe» (VT) est un insecticide-acaricide à large spectre contenant deux principes actifs (abamectine 1.8% + chlorantraniliprole 4.5%) ayant différents modes d'action sur les ravageurs. Ce produit phytosanitaire a été introduit et homologué en Algérie sous le numéro d'homologation 11-51-032 (ACTA, 2015).

Les propriétés physico-chimiques d'un produit déterminent en grande partie son devenir dans l'environnement (Bloom et Matheson, 1993). Le tableau I représente les principales propriétés physico-chimiques de Voliam Targo®.

Tableau I : Propriétés physico-chimiques principales du Voliam Targo® (Syngenta, 2009)

Propriétés physiques et chimiques du Voliam Targo®	
Forme	Liquide
Couleur	Blanc
Odeur	Comme du savon, faible
pH	6.6 à 1% p/v (25°C)
Point d'inflammabilité	> 102 °C
Température d'auto-inflammation	535 °C
Propriétés comburantes	Non-oxydant
Propriétés explosives	Non-explosif
Densité	1.05 g/ml

2.1. Abamectine

L'abamectine (ABA) est une lactone macrocyclique de la famille des avermectines, mondialement, utilisée ; comme insecticide et comme anthelminthique pour les arbres fruitiers, les légumes et les plantes ornementales, ainsi que pour les animaux de ferme et les animaux domestiques. L'abamectine est un produit naturel de la fermentation des actinomycètes du sol (*Streptomyces avermitilis*). Chez l'homme, ABA est utilisée pour traiter *Onchocerca volvulus* (Aminiahidashti *et al.*, 2014). C'est également le précurseur de la synthèse de l'ivermectine, un anthelminthique largement utilisée dans le traitement des parasites humains et animaux.

L'abamectine, également appelé Avermectin B1, a été largement utilisée dans le monde entier et est toujours le plus couramment utilisé en Algérie (Khaldoun Oularbi *et al.*, 2015).

2.1.1. Structure chimique

L'abamectine est un mélange de deux homologues et contient au moins 80% d'ivermectine B1a (C₄₈ H₇₂ O₁₄) et pas plus de 20% d'ivermectine B1b (C₄₇ H₇₂ O₁₄). Les deux composants ont les mêmes propriétés biologiques et toxicologiques (Shoop et Soll, 2002) (Figure 2).

L'abamectine, comme les autres ivermectines, possède un seul groupement pharmacophore responsable de son activité thérapeutique. Il s'agit d'une chaîne macrocyclique principale de 16 atomes à laquelle une fonction benzofurane et une fonction spiroketale sont liées. Il possède également une fraction de sucre connue sous le nom de bisoleandrosyloxy dans le carbone C-13.

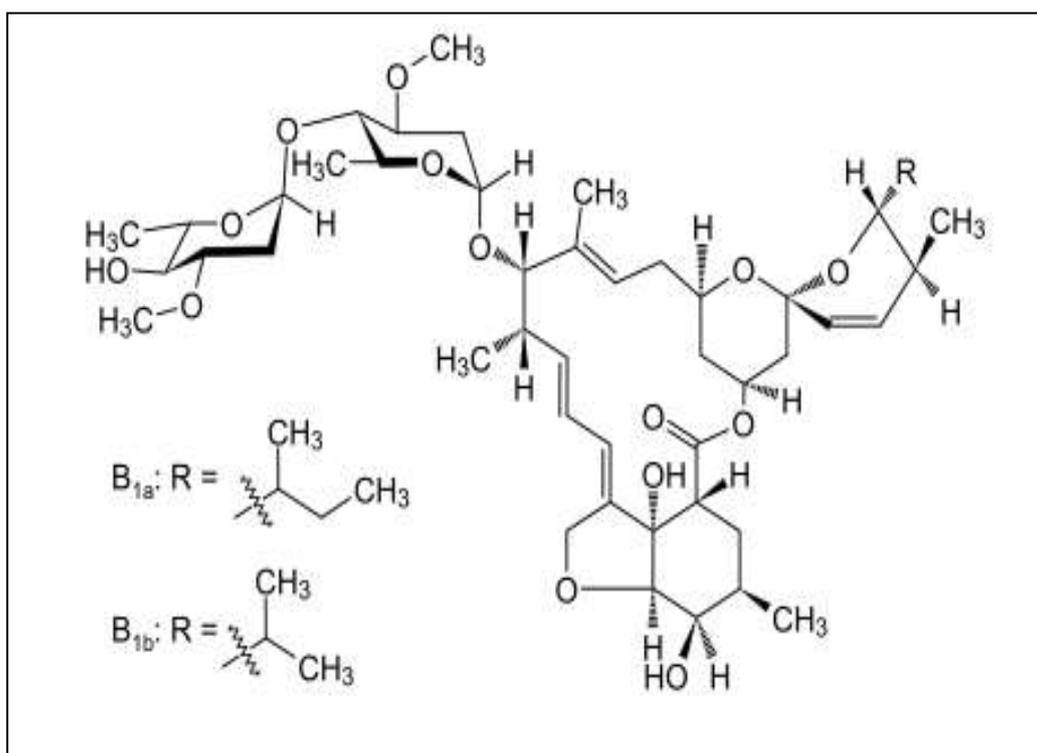


Figure 2 : Structure chimique de l'Abamectine (Pitterna *et al.*, 2009)

2.1.2. Propriétés physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques de l'abamectine se résument dans le tableau suivant :

Tableau II : Propriétés physico-chimiques principales de l'abamectine (Bloom et Matheson, 1993)

Propriétés physiques et chimiques de l'abamectine	
Forme	Liquide
Couleur	Jaune pâle
Odeur	Aromatique
pH	3,2 à 1,0% w/v à 25°C
Propriétés comburantes	Non-oxydant
Propriétés explosives	Non-explosif
Densité	0.9764 g/cm ³ à 20°C
Solubilité dans l'eau	7.8 µg/l
Demi-vie dans le sol	14 à 56 jours

2.1.3. Toxicocinétique de l'abamectine

La toxicocinétique des avermectines dépend de leurs caractères physico-chimiques tels que la polarité et la lipophilie. Ils sont pratiquement insolubles dans l'eau, et cette propriété leur confère une bonne absorption, une forte distribution et une longue rémanence dans l'organisme (Sebbag, 2011).

L'absorption, l'excrétion, la distribution et le métabolisme des avermectines ont été étudiés chez les animaux d'élevage et le rat (Chiu *et al.*, 1990).

➤ Absorption

L'ivermectine B1a, par administration orale dans de l'huile de sésame ou dans du polyéthylène glycol chez le rat, est rapidement (T_{max} entre 4 et 8 h) et presque totalement absorbée. Sa biodisponibilité après administration orale correspond à 86 % de celle observée par voie intraveineuse (Acta, 2008).

Dans le cas des formulations pour le traitement par voie transcutanée, la majeure partie de la dose totale est excrétée deux jours après son administration, alors que dans le cas de l'injection sous-cutanée, l'excrétion la plus importante se produit le troisième jour et atteint un pourcentage beaucoup plus faible de la dose totale initiale (Herd *et al.*, 1996).

➤ Distribution

L'ivermectine B1a par voie orale est légèrement distribuée dans tout l'organisme avec une teneur en résidus plus élevée dans le tissu adipeux. Après toxicité de 14 jours, l'ivermectine B1a est éliminée 7 jours après la dernière administration. Dans le compartiment sanguin, les ivermectines se fixent largement à l'albumine plasmatique et aux lipoprotéines (Sebbag, 2011).

Les composés des ivermectines sont largement distribués dans les tissus, notamment dans le foie et le tissu adipeux, ce qui participe à leur rémanence dans l'organisme, et ceci est dû à leurs propriétés lipophiles.

➤ Métabolisme

Les ivermectines sont faiblement métabolisées par l'organisme cible et la majeure partie du produit est excrétée sous forme inchangée dans les excréments, excrétion fécale (~90%), et très peu urinaire (<2%) (Sebbag, 2011).

La façon dont l'ivermectine est métabolisée par les vertébrés diffère selon le mode d'administration (Hennessy et Alvinerie, 2002). Le métabolisme de l'ivermectine B1a chez le rat est complexe. Les principales voies de biotransformation mises en oeuvre sont des réactions de déméthylation, hydroxylation, de clivage et d'oxydation. Mais l'ivermectine B1a est le composé majoritairement retrouvé dans les fèces (Jargot *et al.*, 2013).

➤ Elimination

Après administration par voie orale chez le rat, l'ivermectine B1a est presque exclusivement excrétée avec une vitesse initiale d'excrétion plus lente chez les femelles. Halley *et al.* (1989) ont mesuré la proportion d'ivermectines dans les déjections d'animaux traités et ont trouvé que celle d'ivermectine pouvait atteindre de 23 % jusqu'à 43 % chez les porcs, de 39 % jusqu'à 45 % chez les vaches et de 61 % jusqu'à 69 % chez les moutons (Ali et Hennessy, 1996 ; Atta et Abou Shihada, 2000 ; Alvinerie *et al.*, 2008).

D'autres chercheurs ont mesuré des concentrations dans des excréments de 80 % à 98 % de la dose initialement administrée (Jackson, 1989 ; Herd *et al.*, 1996). Le profil d'excrétion est également influencé par la formulation d'ivermectines administrées (injection sous-cutanée, traitement par voie transcutanée, bolus à action lente) (Herd *et al.*, 1996). Le mécanisme moléculaire de l'excrétion fait intervenir le transporteur transmembranaire la P-glycoprotéine (P-gp) qui est principalement exprimé dans l'intestin, le foie, la barrière hémato-encéphalique, le placenta, les reins et le cerveau (Lankas *et al.*, 1996).

La combinaison des propriétés physiques et chimiques des avermectines (non volatiles, faible solubilité dans l'eau, forte affinité pour les lipides et la matière organique) et de la grande proportion du composé d'origine excrétée par les animaux traités a soulevé des préoccupations à l'effet que des avermectines pénétraient et persistaient à des concentrations toxiques dans divers compartiments environnementaux (Sebbag, 2011).

➤ **Stockage**

Des recherches ont montré que sans égard à la voie d'administration, l'ivermectine s'accumule plus dans les tissus hépatiques et adipeux et moins dans le cerveau. Le composé d'origine est le composant majeur trouvé dans les tissus hépatique et adipeux, mais d'autres métabolites polaires sont également présents dans ces tissus (Chiu *et al.*, 1990).

2.1.4. Mode d'action

Les avermectines agissent principalement sur les canaux chlorures glutamate dépendant (GluCl_s), présents dans les cellules nerveuses et musculaires des invertébrés, et s'y fixent de façon irréversible. Cela conduit à l'ouverture permanente du canal et à une entrée d'ions chlorures dans la cellule. L'hyperpolarisation membranaire induite par cet influx d'ion est un message inhibiteur conduisant à une paralysie flasque du parasite ou à l'impossibilité de se nourrir (Camargo, 2005) (Figure 3).

Dans une moindre mesure et à des concentrations plus élevées, les avermectines agissent également sur les canaux chlorure-acide gamma amino butyrique (GABA) dépendants des invertébrés. L'acide gamma-aminobutyrique est un neuromédiateur présent dans tout l'organisme des invertébrés, mais aussi dans le système nerveux central des vertèbres. Chez les vertébrés, le GABA ainsi que la glycine sont connus pour bloquer l'activité électrique des cellules nerveuses et musculaires en augmentant la conductance des ions chlorure (Arena *et al.*, 1995). L'interférence entre les avermectines et ces canaux contribue donc à la paralysie du parasite mais elle est également à l'origine des effets secondaires et de la toxicité chez l'hôte, par interférence sur la transmission nerveuse (Omura, 2008).

Chez les mammifères, des systèmes enzymatiques puissants, capables d'effectuer un large spectre de réactions chimiques, se sont développés au cours de l'évolution afin de réaliser la détoxification d'une partie de composés toxiques auxquels ils sont exposés.

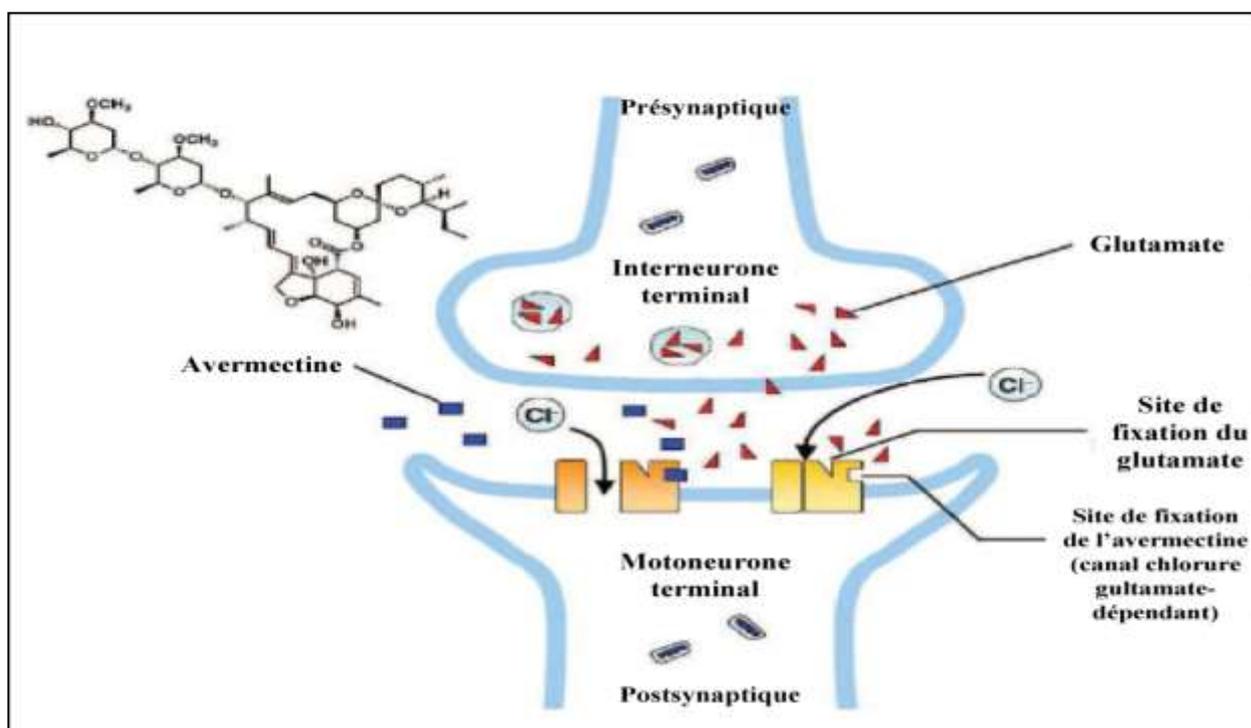


Figure 3: Mécanisme d'action des avermectines chez les invertébrés (El-Saber Batiha *et al.*, 2020)

2.1.5. Toxicité de l'abamectine

Divers impacts létaux et sublétaux ont été observés sur des organismes non visés exposés aux avermectines. Le risque principal est celui de la neurotoxicité, qui chez la plupart des espèces de mammifères peut se manifester par une dépression du système nerveux central (SNC), avec pour conséquence une ataxie (Rajasekharan *et al.*, 2019).

L'abamectine est un produit hautement toxique pour les insectes et peut aussi être toxique pour les mammifères (Bai et Ogbourne, 2016 ; Disner *et al.*, 2021). La dose létale 50 (DL50) d'ABA est de 10 mg/Kg chez le rat par ingestion alors que la dose journalière admissible (DJA) est de 0.002mg/Kg/jour (FAO, 1992). Il est dangereux pour les poissons, les abeilles et autres insectes pollinisateurs (ACTA, 2008).

Les préparations concentrées émulsifiables peuvent causer une irritation légère à modérée des yeux et une légère irritation de la peau. Les symptômes d'intoxication observés chez les animaux de laboratoire comprennent la dilatation des pupilles, les vomissements, les convulsions et / ou les tremblements et le coma. L'ABA agit sur les insectes en interférant avec la transmission neuronale et neuromusculaire. Chez les mammifères, l'ABA agit sur un type spécifique de synapse situé uniquement dans le cerveau et est protégé par la barrière hémato-

encéphalique. Cependant, à des doses très élevées, la barrière hémato-encéphalique mammalienne peut être pénétrée, entraînant des symptômes de dépression du SNC (Pulce *et al.*, 2012).

L'intoxication par l'abamectine peut altérer la fonction hépatique (Hsu *et al.*, 2001 ; El-Shenawy, 2010 ; Eissa et Zidan, 2010 ; Khaldoun Oularbi *et al.*, 2013), la fonction rénale (Abd-Elhady et Abou-Elghar, 2013 ; Khaldoun Oularbi *et al.*, 2015 ; Fahim *et al.*, 2016 ; Nasr *et al.*, 2016) et peut être neurotoxique (Sun *et al.*, 2010 ; Nasr *et al.*, 2016).

Chez les mammifères, deux mécanismes concourent à la faible toxicité des avermectines. Tout d'abord, les cibles de ces molécules chez les mammifères sont les canaux chlores GABA-dependants, canaux moins sensibles aux avermectines que les canaux chlore-dependant du glutamate (Wolstenholme et Rogers, 2005).

De plus, les récepteurs au GABA ne sont localisés que dans le SNC des mammifères, qui lui-même est protégé par la glycoprotéine P (P-gp) située sur la barrière hémato-encéphalique. Les glycoprotéines P-gp ont pour rôle l'excrétion active de leur substrat à l'extérieur de la cellule, ce qui réduit l'exposition aux xénobiotiques. De nombreuses molécules sont des substrats des glycoprotéines P : avermectines, loperamide, vincristine, morphine, digoxine, verapamil etc (Van Tellingen, 2001).

2.2. Chlorantraniliprole

Le chlorantraniliprole est un nouvel insecticide d'origine synthétique, appartenant à la classe chimique des diamides anthraniliques (Brugger *et al.*, 2010). Cet insecticide est à la fois ovicide et larvicide et il affecte les insectes nuisibles appartenant aux lépidoptères, diptères, coléoptères, blattidés (termitidés), et hémiptères (Hanning *et al.*, 2009). Quant aux effets du chlorantraniliprole sur les ennemis naturels, la plupart des études montrent que cet insecticide a un faible impact sur la faune auxiliaire.

Le chlorantraniliprole possède un nouveau mode d'action, une activité biologique élevée, une très faible toxicité pour les mammifères et une sélectivité pour les arthropodes non ciblés (Bassi *et al.*, 2009).

2.2.1. Structure chimique

Le chlorantraniliprole, 3-bromo-4'-chloro-1-(3-chloro-2-pyridyl)-2'-méthyle-6'-(methylcarbamoyl) pyrazole-5-carboxanilide (Figure 4), est un carboxamide résultant de la condensation formelle du groupe acide carboxylique de l'acide 3-bromo-1-(3-chloropyridin-2-yl)-1H-pyrazole-5-carboxylique avec le groupe amino primaire du 2-amino-5-chloro-N,3-diméthylbenzamide. C'est la première molécule de la famille chimique des diamides anthraniliques mise sur le marché qui présente un puissant effet insecticide et acaricide.

Le chlorantraniliprole est un composé organobromine, un insecticide pyrazole et un carboxamide secondaire (Figure 4) (Jeanguenat, 2013).

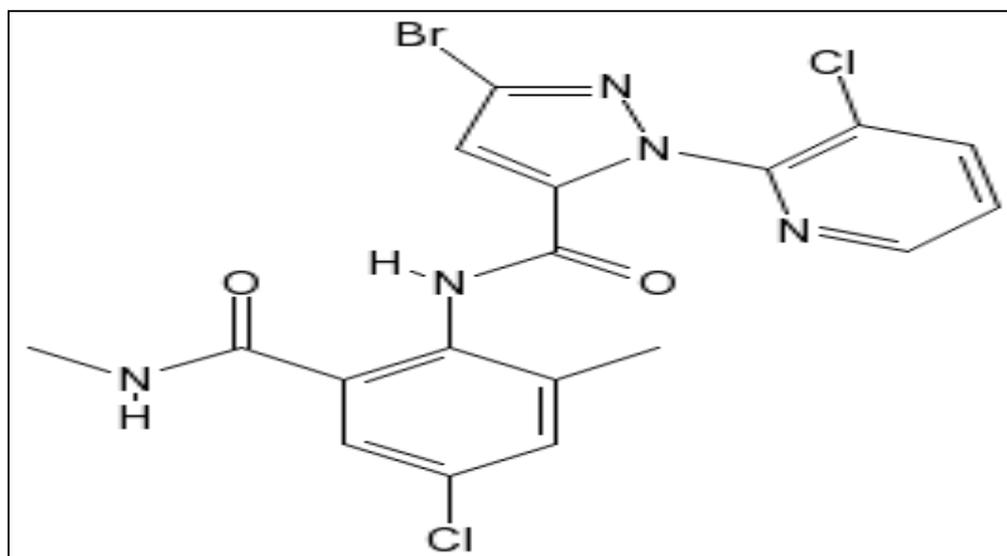


Figure 4 : Structure chimique du chlorantraniliprole (Jeanguenat, 2013)

2.2.2. Toxicocinétique du Chlorantraniliprole

➤ Absorption et Distribution

L'absorption du Chlorantraniliprole est rapide et importante (85%) avec des concentrations plasmatiques maximales survenant 5 à 12 heures après l'exposition orale. La demi-vie d'élimination est de 38-43h chez les rats males et de 78-82h chez les rats femelles. La distribution tissulaire de la dose absorbée était importante et les ratios tissu: plasma étaient sensiblement inférieurs à 1, indiquant un faible potentiel d'accumulation (Bentley *et al.*, 2010).

➤ Métabolisme et Elimination

Le métabolisme de la dose absorbée est important et impliquerait des différences sexuelles principalement dans l'hydroxylation initiale du méthylphényl et du N-méthyl-carbone. Un métabolisme supplémentaire des métabolites hydroxylés inclus N-déméthylation, cyclisation azote-carbone avec perte d'une molécule d'eau, oxydation des alcools en acides carboxyliques, clivage du pont amide, hydrolyse des amines et O-glucuronidation (Figure 5).

L'excrétion était pratiquement complète 48 à 72 heures après l'administration. L'excrétion fécale était la principale voie d'élimination (62 à 64%) suivie de l'urine (24 à 29% pour une faible dose), alors que l'excrétion du Chlorantraniliprole dans l'air expiré était négligeable (Bentley *et al.*, 2010).

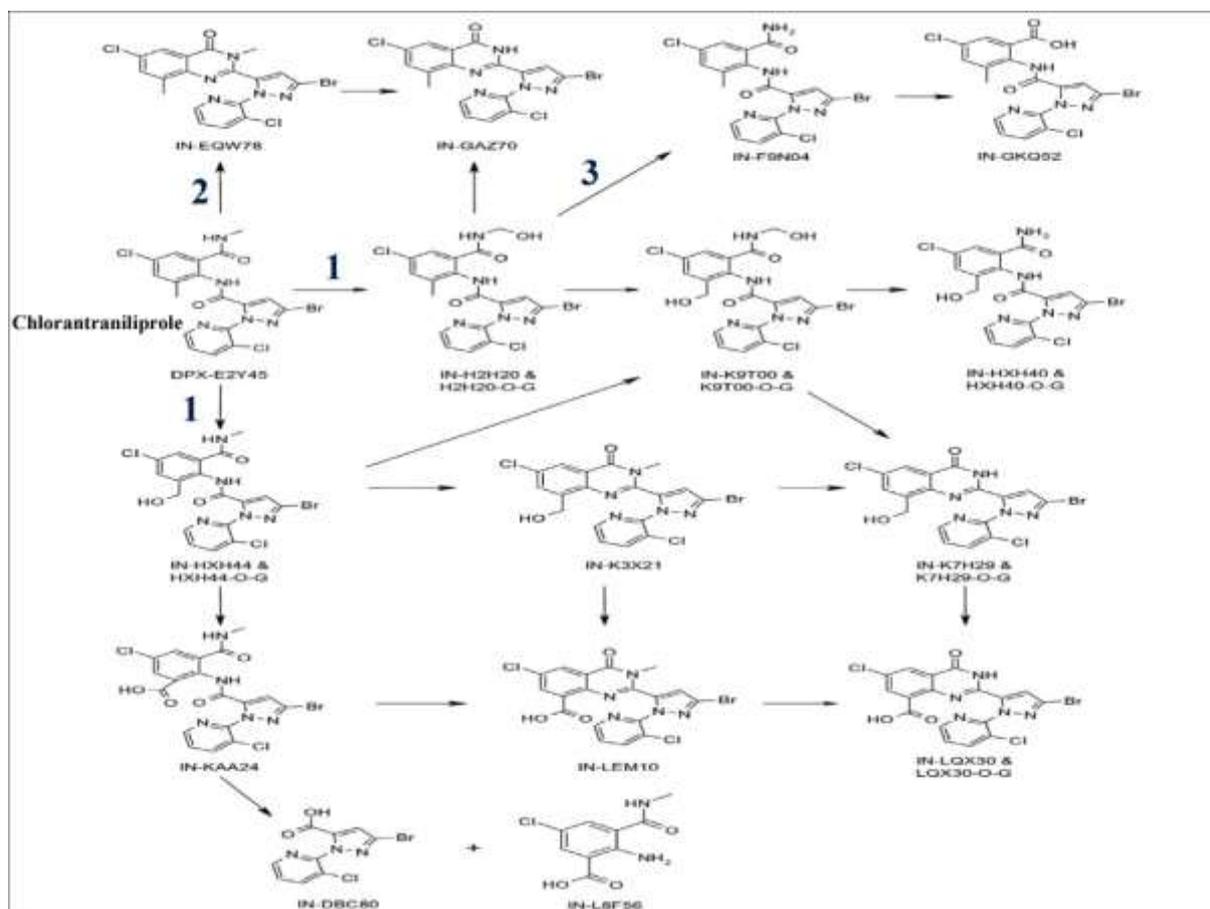


Figure 5 : Voie métabolique proposée du chlorantraniliprole (DPX-E2Y45) chez le rat (Bentley *et al.*, 2010).

(1) hydroxylation du groupe N-méthyle (en IN-H2H20) ou hydroxylation du groupe tolylméthyle (en IN-HXH44) ; (2) cyclisation avec perte de l'eau en un dérivé de quinazolinone (IN-EQW78) ; et (3) N-déméthylation via INH2H20 en IN-F9N04. Notez que l'identification des conjugués d'acide O-glucuronique est indiquée par l'ajout de "-O-G" aux noms de code IN des métabolites.

2.2.3. Mode d'action

Le chlorantraniliprole est un insecticide anthranilamide substitué qui possède un nouveau mode d'action par rapport aux insecticides synthétiques. Il cible les récepteurs de la ryanodine (RyR), qui régulent le flux de calcium pour contrôler la contraction musculaire. Les diamides anthraniliques se lient aux RyR, ce qui les maintient ouverts, et stimule la libération de calcium à partir des réserves internes de muscle lisse et strié, causant une altération de la régulation des muscles, de la paralysie et finalement de la mort des insectes (Bentley *et al.*, 2010) (Figure 6).

Le chlorantraniliprole présente une excellente sélectivité différentielle vis-à-vis des récepteurs de la ryanodine des insectes par rapport aux récepteurs mammaliens. Cette sélectivité est probablement un facteur majeur contribuant à la sécurité des mammifères observée avec le chlorantraniliprole (Bentley *et al.*, 2010).

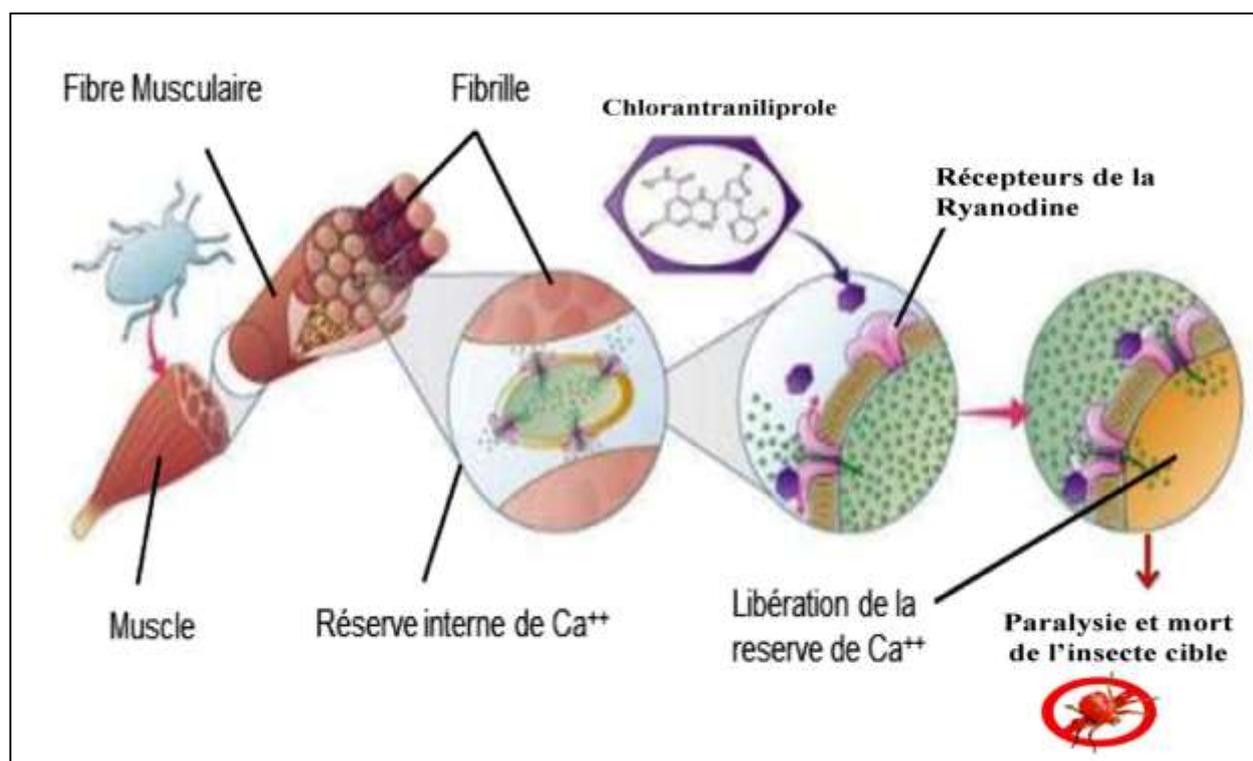


Figure 6 : Mode d'action de Chlorantraniliprole (Bentley *et al.*, 2010)

2.2.4. Toxicité du Chlorantraniliprole

Le chlorantraniliprole possède une faible toxicité aiguë quelle que soit la voie d'exposition. Il n'est pas irritant pour la peau et les yeux et il n'est pas un sensibilisant cutané. Ainsi, aucune classification du chlorantraniliprole pour la toxicité aiguë n'est requise selon les dispositions de la directive UE 67/548 / CEE (Bentley *et al.*, 2010).

Aucun symptôme humain spécifique de toxicité du chlorantraniliprole n'est connu. D'après les résultats des tests sur les animaux, le chlorantraniliprole n'est pas susceptible d'être dangereux par les voies orale, cutanée ou par inhalation.

Aucun symptôme indésirable spécifique n'a été noté dans les études à court et à long terme chez les animaux de laboratoire. Compte tenu de sa faible toxicité, aucune maladie grave ni mortalité n'est attendue en cas de surexposition accidentelle ou prolongée au chlorantraniliprole (Bentley *et al.*, 2010 ; Lavtizar *et al.*, 2016 ; Nawaz *et al.*, 2017).

1. Monographie de la plante étudiée: Le Thym commun (*Thymus vulgaris* L.)

1.1. Historique

Depuis la très haute Antiquité, le thym fait partie de la vie quotidienne des humains, tant pour ses usages culinaires et cosmétiques que pour ses bienfaits médicaux. Le nom « thym » provient du mot Grec « thymos » qui veut dire odeur, et à ce titre le thym est très largement utilisé en qualité de plante aromatique, en particulier dans la cuisine méditerranéenne en tant que condiment. Les premières déclarations enregistrées peuvent être mentionnées dans les travaux de Dioscorides (premier siècle après JC) sur les plantes médicinales et les poisons, qui mentionnent «Thymos», « Serpol » et « Zygis » et aussi dans « Plin's Natural History » (Morales, 2002 ; Stahl-Biskup et Venskutonis, 2012). Les Romains l'appelaient sepyllum. Ils en diffusèrent l'usage en Europe, via la fabrication de nombreux cosmétiques (eau de toilette, baume censé retarder le vieillissement) et ils s'en servaient aussi pour purifier leurs pièces d'habitation et pour "donner du parfum aux fromages et liqueurs". Les Égyptiens de la haute Antiquité utilisaient le thym pour l'embaumement des morts. Les Grecs le brûlaient comme offrande aux dieux dans les temples ou sur places publiques. On pensait à cette époque que cette plante était source de courage. Ils en parfumaient leurs plats et l'utilisaient dans leur bain pour ses propriétés stimulantes (Zeghib, 2013).

C'est surtout à partir du Moyen Âge que ses vertus médicales commencent à être reconnues, notamment pour lutter contre les épidémies, principalement de lèpre ou de peste. Le thym est déjà cité comme médicament par d'éminents savants de l'époque (Galien, Aetius, Dioscoride et Plin). A partir du XVI^{ème} siècle, il est signalé dans les traités de médecine pour traiter une large variété d'affections. Il faudra attendre le XIX^{ème} siècle toutefois pour que ses composants actifs soient répertoriés, le thym servant aux siècles précédents surtout à des fins aromatiques (Stahl-Biskup et Sáez, 2002 ; Singletary, 2016).

De nos jours, l'huile essentielle (HE) de thym et le thymol, un de ses composants, sont couramment utilisés pour la confection de savons et de cosmétiques divers. En Amérique du Nord, l'une des marques les plus populaires de rince-bouche (Listerine®) contient du thymol comme ingrédient principal. Il entre aussi dans la composition de quelques dentifrices. En Europe, le thym compte encore parmi les plantes les plus fréquemment recommandées contre la toux et l'inflammation des voies respiratoires (Basch *et al.*, 2004 ; Fabio *et al.*, 2007 ; Hosseinzadeh *et al.*, 2015 ; Vlachojannis *et al.*, 2015). Le thym est encore largement utilisé en médecine traditionnelle et en cuisine aujourd'hui.

1.2. Description botanique

Le thym est un sous-arbrisseau vivace de 10-30 cm de hauteur, d'une couleur vert blanchâtre ou grisâtre, très aromatique, avec des tiges ligneuses, dressées ou ascendantes, non radicantes, tortueuses, ce qui forment un petit buisson très serré, et des feuilles petites (Figure 7). Ces dernières sont de forme ovales à rectangulaires et certains composants aériens charnus sont utilisés pour la production de l'huile volatile (Prasanth Reddy *et al.*, 2014 ; Dauqan et Abdullah, 2017). De plus, ses feuilles persistantes sont de couleur gris-vert, opposées, oblongues-lancéolées à linéaires, de 5–10 mm de long et de 0,8–2,5 mm de large et en pointillés. Les fleurs sont de couleur violet clair ou blanche, de 5 mm de long, à deux lèvres avec un calice glandulaire poilu, portées soit par des bractées foliaires sur les rameaux soit elles sont trouvées en têtes terminales ovales ou arrondies (Goetz et Ghedira, 2012 ; Stahl-Biskup et Venskutonis, 2012 ; Hosseinzadeh *et al.*, 2015).

Cependant, les caractères morphologiques peuvent varier selon les conditions environnementales. *T. vulgaris* se multiplie au printemps par semis, par bouturage ou par division des touffes. Il s'accommode de tous les terrains, même humides. L'exposition au soleil est recommandé, car il a besoin de lumière et de chaleur (Patil *et al.*, 2021).



Figure 7 : Illustration de l'aspect morphologique de *Thymus vulgaris* (images.google.fr)

1 : Plante entière, 2 : Fleur, 3 : Étamine, 4 : corolle, 5 : Feuille, 6 : Racines pivotantes, 7 : Fruit, 8 : Calice, 9 : Style bifide.

1.3. Dénominations internationales

Le thym commun est connu sous différentes dénominations selon les pays ; en Arabe : ziiitra, en Amazigh : tazaetart, tamezirt, en Français : thym vulgaire, thym des jardins, farigoule, barigoule, thym commun, en Anglais : common thyme, garden thyme, culinary thyme, en Espagnol: farigola, tem, timó, tomillo común, en Portugais: timo, tomilho, tomilho-vulgar (Goetz et Ghedira, 2012 ; Braun et Cohen, 2015).

1.4. Position systématique

Le thym appartient à la famille des Lamiacées ; c'est l'une des familles botaniques les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antioxydant et antibactérien. Elle regroupe 250 genres et plus de 7000 espèces (Stankovic, 2020). Le genre *Thymus* est l'un des huit genres le plus importants en ce qui concerne le nombre d'espèces chez la famille Lamiacées ; il comporte environ 350 espèces (Patil *et al.*, 2021).

La systématique de *Thymus vulgaris* (Tableau III) est précisée dans la base de données Américaine NCBI-Taxonomy.

Tableau III : Classification botanique du *Thymus vulgaris*

Règne	Plantes
Sous règne	Plantes vasculaires
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Dialypétales
Ordre	Labiales
Famille	Lamiacées
Genre	<i>Thymus</i>
Espèce	<i>Thymus vulgaris</i> L

1.5. Habitat et répartition géographique

Le thym est originaire des pays méditerranéens, des pays balkaniques et du Caucase ; il est cultivé maintenant dans de nombreuses régions subtropicales. Cette plante est largement répandue dans le nord-ouest africain (Maroc, Algérie, Tunisie et Libye), il pousse également sur les montagnes d’Ethiopie et d’Arabie du sud-ouest. On peut le trouver également en Sibérie et même en Himalaya (Hosseinzadeh *et al.*, 2015 ; Patil *et al.*, 2021). Le genre *Thymus* inclut environ 350 espèces à travers le monde dont 11 localisées en Algérie et 9 d’entre elle sont endémiques. Ces espèces sont réparties du Nord algérois à l’Atlas saharien, et du Constantinois à l’Oranais (Quezel et Santa, 1963).

La plante pousse bien dans un climat aride et dans des zones non ombragées dans un sol grossier, rugueux et bien drainé qui ne convient généralement pas à de nombreuses plantes (Hosseinzadeh *et al.*, 2015).

1.6. Bienfaits et vertus thérapeutiques de la plante

Thymus vulgaris est utilisé depuis l’Antiquité pour le traitement de différents problèmes de santé. La plante possède une variété de propriétés biologiques et pharmacologiques (Patil *et al.*, 2021).

1.6.1. Utilisation interne

Le thym soulage un large panel de maladies respiratoires : calme les quintes de toux, notamment dans les affections de type coqueluche, bronchite, pharyngite, pleurésie, ainsi que d’autres de la sphère pulmonaire (emphysème) par son effet spasmolytique. La plante est aussi utilisée pour l’asthme ou le rhume des foins car il permet de dégager plus facilement les voies respiratoires. C’est d’ailleurs un bon stimulant pour les bronches (Pinn, 2001 ; Basch *et al.*, 2004 ; Patil *et al.*, 2021 ; Rizwan *et al.*, 2021).

Connu pour ses propriétés antiseptique et antifongique, le thym commun soulage les inflammations de la sphère bucco-pharyngée, caries, soins dentaires divers, sous forme de bains de bouche. Son efficacité antibactérienne a été prouvée dans la lutte contre une bactérie souvent liée aux ulcères de l’estomac *Helicobacter pylori* (Esmaeili *et al.*, 2012). Le thym a longtemps été prescrit aux enfants comme puissant vermifuge afin d’éliminer les parasites (Rizwan *et al.*, 2021).

De plus, le thym permet de soulager les dérèglements intestinaux tels que diarrhée, ballonnements, flatulences, colopathies diverses. L’Organisation Mondiale de la Santé (OMS)

reconnait l'usage du thym "contre les dyspepsies (digestion difficile) et autres désordres gastro-intestinaux". Le thym est aussi utilisé pour traiter les gastro-entérites sous forme d'infusions (Direkvand-Moghadam et Khosravi, 2012 ; Husseinzadeh *et al.*, 2015 ; Rizwan *et al.*, 2021).

1.6.2. Utilisation externe

Sur de nombreuses pathologies dermatologiques, ses vertus antivirales, antimicrobiennes et antiseptiques sont mises à profit dans le traitement des mycoses, des plaies, de la gale, de l'herpès et, globalement, d'un large panel d'affections cutanées allant jusqu'au zona (Dursun *et al.*, 2003). L'OMS reconnaît ses vertus antiseptiques et cicatrisantes sur les plaies superficielles de la peau et contre les irritations de la bouche (inflammation des amygdales, laryngite) (Rhind et Pirie, 2012 ; Rizwan *et al.*, 2021). Certaines variétés de thym, dont le thym à p-cymène, sont utilisées afin de soulager les affections ostéo-articulaires telles que les rhumatismes ou l'arthrose (Stahl-Biskup et Sáez, 2002 ; Rizwan *et al.*, 2021).

1.7. Précautions d'emploi et effets secondaires

Les effets indésirables du thym commun sont très rares: allergie de la peau, réaction d'hypersensibilité, nausées ou douleurs abdominales. A titre de précaution, l'usage du thym est déconseillé chez les femmes enceintes, celles qui allaitent et les enfants de moins de quatre ans. Les personnes sous traitement anticoagulant devront veiller à avoir une consommation relativement faible de thym, afin de limiter les apports de la vitamine K présente dans cette plante et qui participe au processus de coagulation du sang (Martínez-González *et al.*, 2007).

1.8. Toxicité

T. vulgaris est considéré comme une herbe culinaire et a été largement utilisé depuis des temps immémoriaux en Europe et en Méditerranée. Dans tous les registres de propriétés ethnométricinales, il n'y a aucune mention d'effets toxiques de cette plante. De plus, le thym a été décrit comme l'herbe la plus utilisée par le médecin Dioscoride au II^e siècle (Patil *et al.*, 2021). D'après l'agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA), *Thymus vulgaris* est généralement considéré comme étant non toxique et sans danger pour la consommation humaine (Rizwan *et al.*, 2021).

Par ailleurs, les études récentes ne rapportent aucune activité cytotoxique des extraits ou de l'huile essentielle de *T. vulgaris*. Une évaluation de la toxicité orale aiguë (dose unique 2 000 mg/kg) et subaiguë (doses répétées de 100, 250 et 500 mg/kg/jour pendant 28 jours) de l'huile essentielle de *T. vulgaris* chez le rat n'a détecté aucun signe de toxicité ; à l'exception des

altérations histologiques sévères au niveau pulmonaire qui ont été remarquées chez les rats traités par HET à une dose de 500 mg/kg/jour. Il a été suggéré ainsi que la dose sans effet nocif observé (NOAEL) de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* est supérieure à 250 mg/kg/jour chez le rat (Rojas-Armas *et al.*, 2019). Plusieurs études menées sur des lignées cellulaires cancéreuses ont rapporté l'effet cytotoxique de HET sur les cellules tumorales. Cependant, l'huile de thym n'a montré aucun effet sur les cellules PLP hépatiques non tumorales, même à une concentration élevée de 400 µg/ml (Patil *et al.*, 2021).

2. Huile essentielle de *Thymus vulgaris*

2.1. Production et composition

L'obtention de l'HE de thym vulgaire se fait à partir de la distillation de ses sommités fleuries et de ses tiges fleuries. L'essence aromatique est habituellement incolore à brun clair. Son odeur est assez chaude et puissante, mêlant des fragrances épicées et herbacées (Badi *et al.*, 2004). La teneur en HE de la plante varie de 5 à 25 ml/Kg et sa composition fluctue selon le chémotype considéré. Les feuilles de thym contiennent 0,2 à 2,5 % d'HE dont la composition varie beaucoup selon la zone de culture, la variété (cultivar) et surtout les conditions climatiques (chaud, froid, sec ou humide). Ce sont les variétés chémotypes. On distingue 7 races chimiques ou chémotypes de thym: thymol, carvacrol, linalool, thuyanol, α -terpinéol, géraniol et p-cymène (Keefover- Ring *et al.*, 2009).

En pharmacopée, il s'agit exclusivement de l'utilisation des parties aériennes du thym et, surtout, de la feuille et de la fleur, qui sont alors séchées. Les composants du thym sont assez nombreux (Figure 8), en particulier dans ses HE : thymol, un anti-infectieux puissant ; géraniol, antifongique et antiviral (pour la peau) ; linalool, antifongique (pour les affections de type candidose) et vermifuge. Les HE contiennent différents composants, et en particulier le p-cymène (antalgique) (Bonjardim *et al.*, 2012). Le thym contient encore des flavonoïdes (apigénol et lutéolol). Ces derniers ont aussi des propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes (Funakoshi-Tago *et al.*, 2011). Le thym frais est aussi une source importante de vitamine C, et le thym séché de calcium, de manganèse et de vitamine K (Dauqan et Abdullah, 2017).

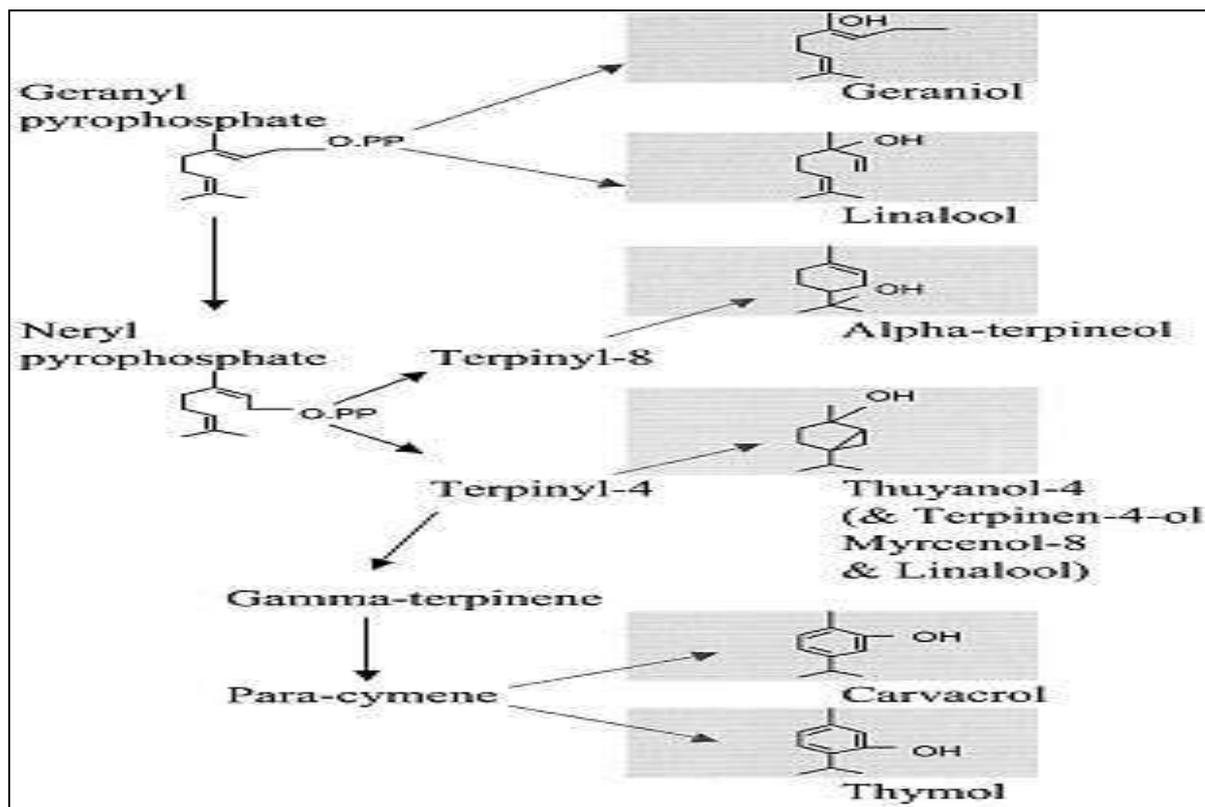


Figure 8 : La chaîne biosynthétique prévue pour la production de monoterpènes dans *Thymus vulgaris* (Thompson *et al.*, 2003)

2.2. Notion de chémotype

Différents facteurs tels que l'ensoleillement, l'altitude, la nature et la composition du sol, peuvent influencer sur la biosynthèse végétale. Ainsi, les composés aromatiques ne sont pas immuables pour une même plante. Afin de différencier dans une même espèce cette variation chimique, on utilise le terme de chémotype ou race chimique. Cette notion de chémotype est devenue essentielle et fondamentale en aromathérapie car les indications thérapeutiques qui découlent de ces divers éléments chimiques peuvent être très différentes (Pibiri, 2006).

Parmi les HE distillée du thym vulgaire, on distingue :

- **L'HE à thymol** : réputée pour ses propriétés antibactérienne et antifongique. Elle est très souvent citée pour le traitement des mycoses et des parasites cutanés. Dermocaustique, cette huile doit être impérativement diluée avant d'être appliquée sur la peau.
- **L'HE à thuyanol** : naturellement riche en thuyanol (20 à 45 % selon les provenances), est réputée être bactéricide, virucide puissante, immunostimulante, stimulante hépatocytaire, neurotonique, hormon-like et aide à réguler le taux de sucre dans le sang. Elle est particulièrement indiquée pour le traitement des problèmes de foie, d'intoxication

alimentaire ainsi que des problèmes de la sphère bucco-dentaire et de la sphère ORL. Contrairement à l'huile à thymol, cette essence est non agressive et peut être utilisée pure voie externe. Elle est la plus chère aussi.

- **L'HE à linalool** : a des propriétés proches de celle à thymol. Elle est en effet un antiseptique général puissant. Son intérêt réside dans le fait qu'elle possède des propriétés supplémentaires : elle est reconnue être vermifuge, neurotonique et utérotonique. Son parfum est plus doux et plus fleuri que les deux autres HE.
- **L'HE à géraniol** : (11-26% de géraniol et 14-40% d'acétate de géranyle) a des propriétés proches du géranium (*Pelargonium asperum*) ou de citronnelle (*Cymbopogon martinii*). Outre ses propriétés antimicrobienne et antivirale, cette essence est fluidifiante et expectorante. C'est aussi un utérotonique, neurotonique et cardiotonique (Pothier *et al.*, 2001 ; Baudoux et Zhiri, 2009; Satyal *et al.*, 2016).
- **L'HE à carvacrol** : Les recherches actuelles considèrent le carvacrol comme un puissant composé avec diverses activités pharmacologiques, telles que l'activité antioxydante, antifongique, antimicrobienne, anti-inflammatoire, anticancéreuse, hépatoprotectrice, antispasmodique, antiparasitaire et insecticide (Mondal *et al.*, 2021).

2.3. Bienfaits thérapeutiques de l'huile essentielle

L'HE du thym vulgaire a des propriétés antispasmodiques, vasodilatatrices (en application externe), anti-infectieuses, antimicrobiennes, antivirales, fongicides, parasitocides, antiseptiques, fortifiantes, analgiques, et régulatrices de l'appétit (Rota *et al.*, 2008 ; Nikolić *et al.*, 2014). Elle est aussi expectorante, astringente, antitussive, vermifuge, tonique (et neurotonique psychique), immuno-stimulante et ré-équilibrante (Vigo *et al.*, 2004; Hosseinzadeh *et al.*, 2015).

Plus généralement, l'huile est bénéfique lors de coup de froid et d'infections respiratoires (bronchite, otite, rhinite, grippe, sinusite, rhume), mais aussi lors de faiblesse des poumons ou de l'estomac, d'asthme, de tuberculose, d'infection urinaire, de candidose, de fatigue nerveuse, d'obésité, de déprime et de dépression, de vers intestinaux et d'anémie. Véritable battante contre les champignons et les infections, l'HE de thym à thymol lutte de manière efficace contre les maladies infectieuses comme l'herpès ou les aphtes (Stahl-Biskup et Sáez, 2002 ; Basch *et al.*, 2004 ; Goetz et Ghedira, 2012 ; Braun et Cohen, 2015).

Récemment, l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*, en particulier ses constituants phytoactifs carvacrol et thymol, se sont avérés avoir un potentiel thérapeutique et préventif

contre l'infection par le coronavirus COVID-19 (Hamada, 2020 ; Seadawy *et al.*, 2020 ; Mobaiend *et al.*, 2021).

2.4. Contre-indications de l'huile essentielle

La puissance des huiles essentielles est à l'origine de leur action très efficace sur l'organisme. Cependant, certaines molécules peuvent présenter des risques de toxicité qu'il est important de connaître. L'origine naturelle et végétale des huiles essentielles les font souvent considérer, à tort, comme inoffensives. Les huiles essentielles sont des préparations très concentrées et peuvent provoquer des symptômes d'intoxication en cas de surdosage. Elles sont résorbées par inhalation, ingestion ou contact cutané.

L'utilisation de l'essence aromatique du thym commun est déconseillée pendant toute la période de la grossesse et durant l'allaitement. Elle est aussi proscrite chez les personnes épileptiques. En outre, elle peut provoquer des irritations cutanées ou des allergies ; il est donc nécessaire de vérifier la tolérance à cette huile en l'appliquant en faible dose (Goetz and Ghedira, 2012).

Les huiles essentielles riches en phénols (carvacrol, thymol) et en aldéhydes aromatiques, telles que les espèces du genre *Thymus*, peuvent entraîner des irritations, voir des brûlures sur la peau et plus encore sur les muqueuses.

La présence de cétones monoterpéniques (comme la menthone, la carvone, la verbénone, le camphre) et de certains oxydes terpéniques (1,8 cinéole, alpha-pinène, bêta-pinène, alphaterpinène) dans les huiles du thym peuvent entraîner une altération du système nerveux. Le risque augmente principalement lors d'une utilisation prolongée ou à forte dose de ces huiles essentielles. Le risque varie également selon la voie d'administration employée (la voie interne présentant plus de risque).

Les huiles essentielles du thym présentent des molécules potentiellement allergisantes (dépendamment de la sensibilité de chaque personne). Certaines molécules sont notamment connues pour être à l'origine de réactions allergiques comme le limonène, le linalool, le géraniol, les citrales ou encore les lactones sesquiterpéniques qui peuvent entraîner des dermites bulleuses après application sur la peau. Notons qu'un usage prolongé d'une même huile peut également favoriser l'apparition de l'allergie chez un sujet non allergique auparavant (Poirot, 2016).

Certaines molécules aromatiques agissent sur le système cardiovasculaire. Ainsi, le thymol et le carvacrol, composés majoritaires de l'essence du thym, exercent un blocage au niveau des canaux calciques de cellules cardiaques humaines (Magyar *et al.*, 2004). Selon la même étude, la quantité de ces composés que l'on peut retrouver dans un unique flacon de divers bains de bouche, serait capable de provoquer une arythmie voire même un arrêt cardiaque. De plus, le thymol et le carvacrol ont montré une action hypotensive chez des rats normotendus (Aydin *et al.*, 2007).

1. Foie

1.1. Rappels anatomiques

Le foie est l'un des plus grands organes des mammifères et le site principal pour le métabolisme intense et l'excrétion. C'est une glande abdominale unique et asymétrique appartenant au système digestif. Il est de couleur rouge brune, de consistance molle et très vasculaire. Il se situe sous le diaphragme, dans la partie supérieure droite de la cavité abdominale et est presque entièrement protégé par la cage thoracique (Ovalle et Nahirney, 2020).

Chez les lapins, le foie est plurilobé, constitué de 5 lobes (Figure 9). Le lobe droit est unique et de forme ovale. Le lobe gauche est subdivisé en lobe latéral gauche et lobe médial gauche. Le lobe caudé est bien développé et divisé en deux parties : le processus caudé dépasse le lobe hépatique droit et présente une empreinte rénale évidente et le processus papillaire qui arrondi. Le lobe carré est petit, moins visualisé, étant attaché à la fosse de la vésicule biliaire (Stan, 2018).

Le foie est fortement vascularisé. La vascularisation est assurée par deux vaisseaux majeurs : l'artère hépatique, qui fournit au foie un sang riche en oxygène provenant du cœur et la veine porte, qui draine le sang provenant de l'œsophage, de l'estomac et des intestins, il s'agit d'un sang pauvre en oxygène mais riche en nutriments (Ovalle et Nahirney, 2020).

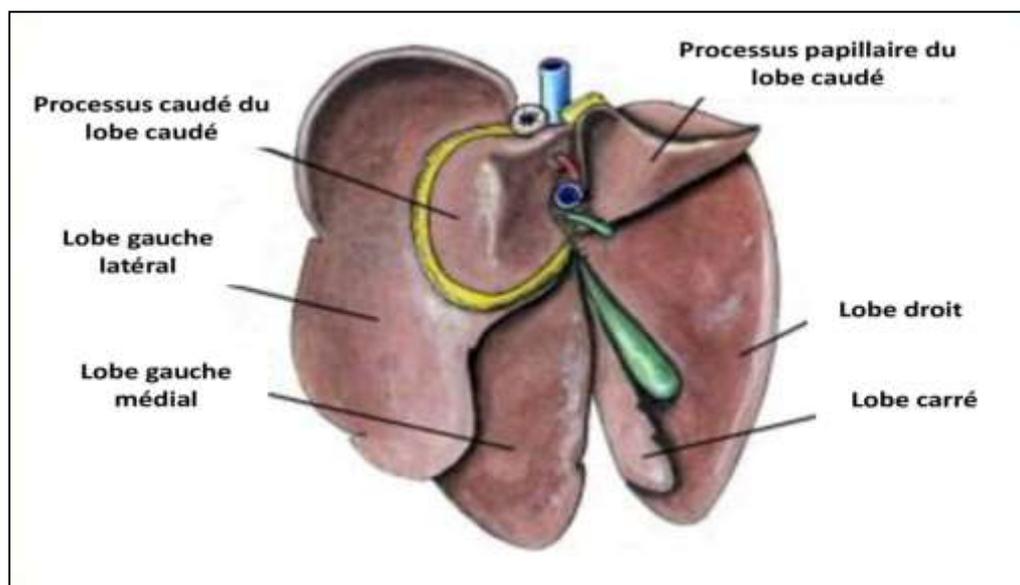


Figure 9 : Représentation des différents lobes hépatiques chez le lapin (Pignon *et al.*, 2013).

1.2. Rappels histologiques

L'unité structurale classique du foie est le lobule de Kiernan hépatique, qui possède une forme grossièrement hexagonale (Kiernan, 1833) et est centré par une veinule hépatique terminale (veine centrolobulaire VCL) dont la périphérie est délimitée par des espaces portes (EP), chacun est formé par une triade portale. Celle-ci est composée de l'artère hépatique, d'une voie biliaire et de la veine porte (Figures 10 et 11).

Le parenchyme hépatique est composé principalement d'hépatocytes, qui s'organisent sous forme des travées hépatocytaires, séparées par des capillaires sinusoidaux qui s'organisent sous forme de réseaux anastomosés, où le sang circule lentement vers la VCL. Les VCL se rejoignent pour former la veine sus-hépatique qui se jette dans la veine cave inférieure (Young *et al.*, 2015).

Le foie est composé de plusieurs types cellulaires, chacune ayant un rôle bien particulier, compris :

Les hépatocytes: responsables de nombreuses fonctions métaboliques et synthétiques du foie. Sont de grandes cellules épithéliales avec un noyau arrondi et central, dont la taille est variable en fonction de l'état de la cellule et un cytoplasme très abondant et granulaire, sa richesse en organites cytoplasmiques témoigne d'une grande activité métabolique (Young *et al.*, 2015).

Les cellules bordant les sinusoides: Ces cellules appartiennent à au moins trois types cellulaires celle qui tapissent les parois des sinusoides hépatiques, sont des cellules endothéliales plates, se distinguent facilement des hépatocytes par leurs noyaux aplatis, condensés, et leur cytoplasme de taille réduite, peu coloré. Parmi ces cellules, se trouvent de grosses cellules renflées, phagocytaires, avec des noyaux ovalaires, les cellules de Kupffer, appartiennent au système de défense monocyte- macrophage. Le troisième type cellulaires correspond à des cellules difficilement identifiables au microscope optique, appelées cellules étoilées (cellules de Ito, Stellate). Elles possèdent deux fonctions, le stockage de la vitamine A et la production de la matrice extracellulaire et de collagène, qui en cas de lésion hépatique, produisent de très importantes quantités de collagène responsable de la fibrose, caractéristique de la cirrhose hépatique (Grisham, 2009 ; Young *et al.*, 2015). On trouve aussi les lymphocytes (Pit cells) et les cellules dendritiques (Racanelli et Rehmann, 2006).

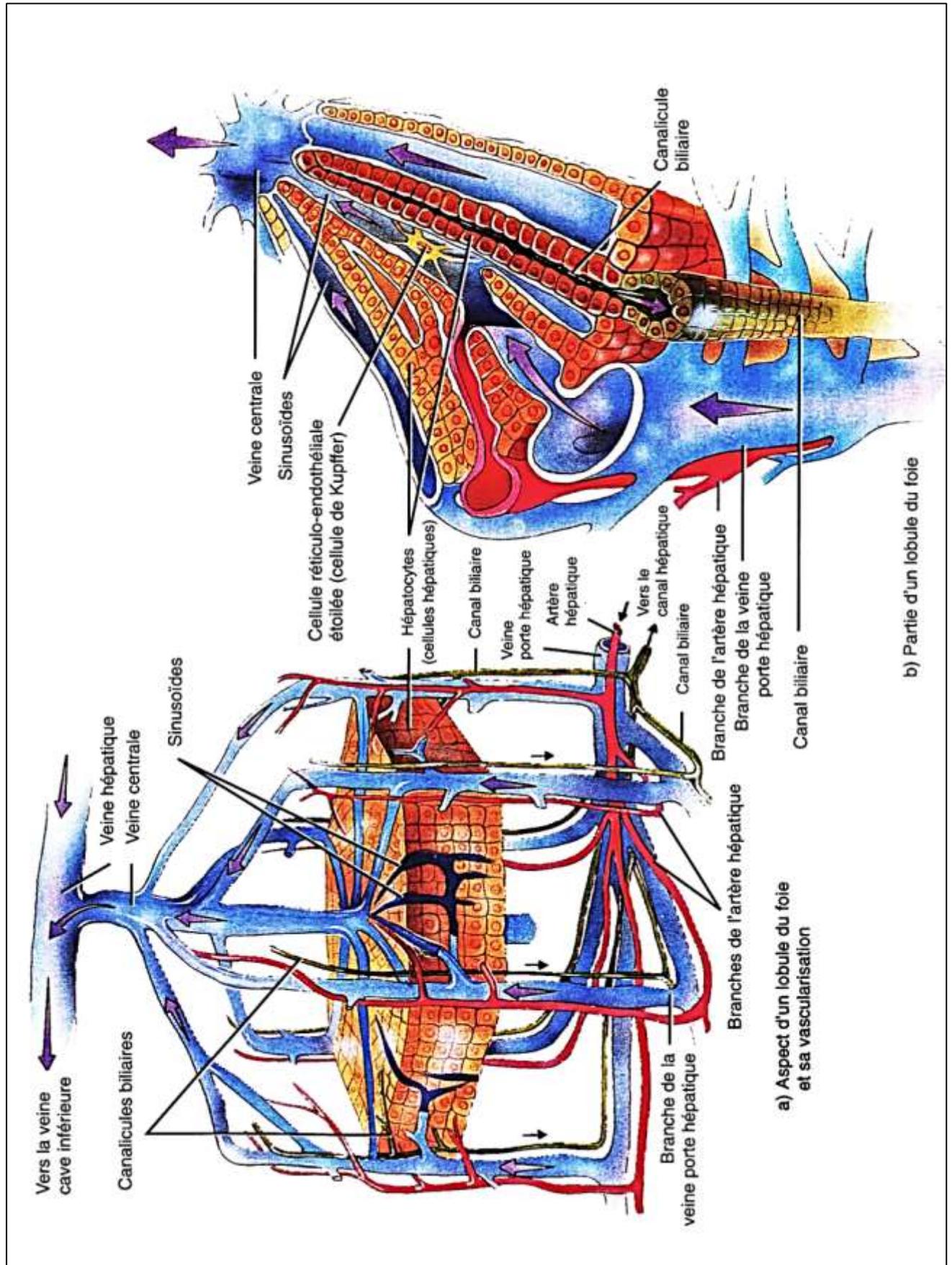


Figure 10 : Organisation du lobule hépatique et de sa vascularisation (Tortora, 2015)

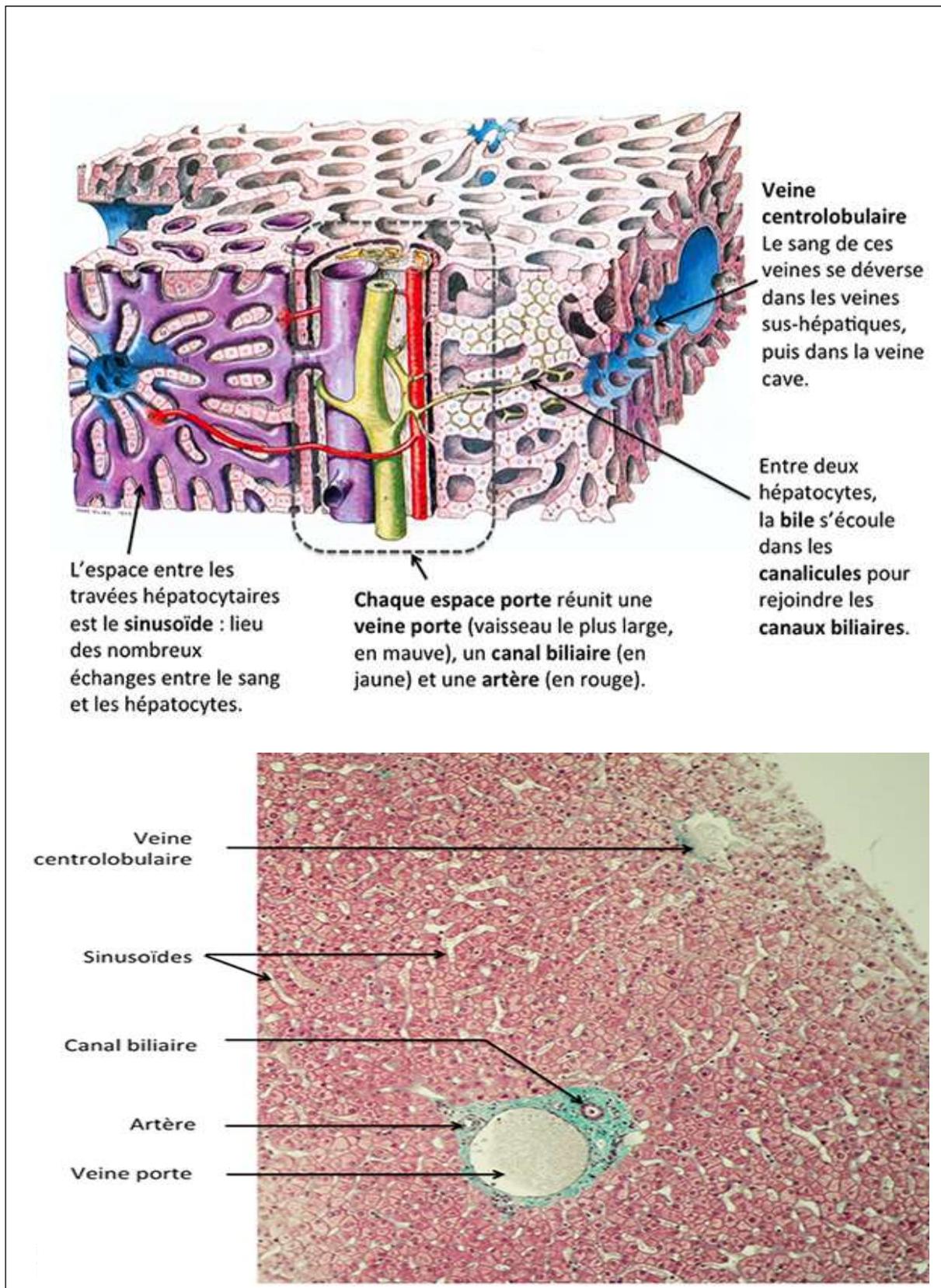


Figure 11 : Structure et aspect histologique du tissu hépatique (Jodi, 2008)

2. Rein

2.1.Rappels anatomiques

Les reins du lapin, au nombre de deux, sont des organes pleins et encapsulés, situés en position dorso-lombaire. Un rein adulte est long de 3 cm en moyenne, large de 1,5 à 2 cm et pèse entre 8 à 12 g. Les deux reins représentent environ le 1/60^{ème} du poids corporel. Ils sont de coloration brunâtre et de consistance ferme sous la capsule. En forme de haricot, les reins sont lisses et unis en surface. Ils présentent un hile au niveau de leur petite courbure, par lequel passent les vaisseaux sanguins ainsi que l'uretère. Cette dernière conduit l'urine jusqu'à la vessie (Barone, 1973).

En coupe longitudinale, le rein est composé de trois régions, une région externe de couleur rougeâtre, le cortex rénal, situé en périphérie, sous la capsule et d'une région brun-rougeâtre interne la médulla, subdivisée en médulla externe (comprenant une zone externe et une zone interne) et médulla interne. L'ensemble, le cortex et la médulla forment le parenchyme rénal, qui se termine par une «papille rénale» de forme conique le bassinet celui-ci se jette dans l'uretère (Figure 12) (Perucca, 2008).

Les néphrons renferment un grand nombre de vaisseaux sanguins, les artères rénales (droite et gauche) qui transportent environ un quart du débit cardiaque total vers les reins. L'artère rénale se divise en artères interlobaires puis en artères sus pyramidales qui forment une série d'artères interlobulaires qui pénètrent dans le cortex et se divisent en artérioles afférentes.

Chaque capsule de Bowman possède une artériole afférente qui forme un réseau enchevêtré de capillaires, appelé glomérule. Les capillaires glomérulaires fusionnent ensuite pour former une artériole efférente, de diamètre inférieur à l'artériole afférente. Cette différence de diamètre des artérioles permet d'augmenter la pression glomérulaire (Gilles *et al.*, 2006).

Chaque artériole efférente se divise pour former un réseau de capillaires péritubulaires, autour des tubes contournés. Ces capillaires se réunissent ensuite pour former les veines interlobulaires, puis veines interlobaires qui quitte le rein par la veine rénale.

Ainsi, les néphrons sont vascularisés par un double système de capillaires, l'un glomérulaire et l'autre tubulaire. L'irrigation glomérulaire est toujours artérielle ne comportant pas de sang veineux, les capillaires a ce niveau sont fenestrés permettant une filtration importante (Gilles *et al.*, 2006).

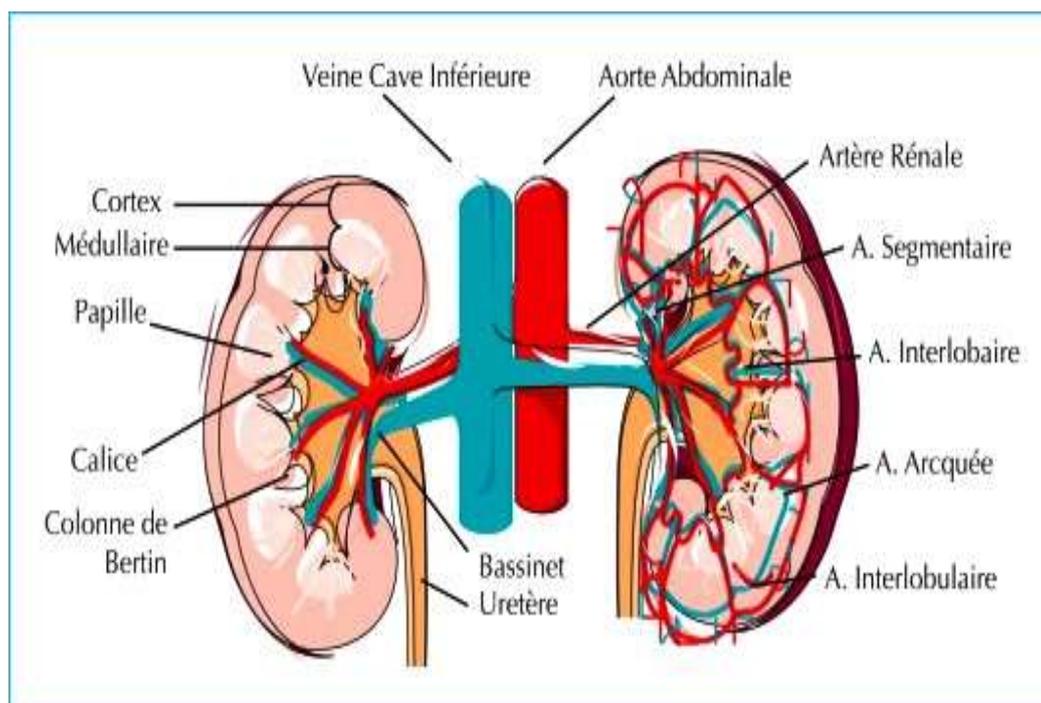


Figure 12 : Anatomie et vascularisation rénale (Gueutin *et al.*, 2012)

2.2. Rappels histologiques : néphron, unité structurale et fonctionnelle

Le néphron est considéré comme étant l'unité fonctionnelle et structurale du rein. Il se compose de deux parties principales: le corpuscule rénal et le tubule rénal (Moinuddin et Dhanda, 2015).

- **Corpuscule rénal**

Le corpuscule rénal est constituée d'une capsule de Bowman et d'un bouquet de capillaires artériels appelé glomérule.

Le glomérule est une touffe de capillaires provenant de l'artériole afférente et se terminant en artériole efférente. Il est situé au niveau du Cortex et délimité par la capsule de Bowman. Leur fonction principale est l'ultrafiltration plasmatique qu'est assurée par la membrane de filtration constituée d'une couche de cellules endothéliales fenêtrées sur la surface intérieure, une membrane basale glomérulaire sur la surface externe (Moinuddin et Dhanda, 2015).

La capsule de Bowman est formée de deux feuillets séparés par une cavité -la chambre glomérulaire- et se prolonge par le tubule rénal. Le feuillet pariétal externe de la capsule glomérulaire rénale est composé d'un épithélium simple squameux, son rôle est strictement structural et ne contribue pas à la formation du filtrat. Le feuillet viscéral, qui s'attache aux capillaires du glomérule, est composé de cellules épithéliales modifiées et ramifiées appelées

podocytes ; ces cellules constituent une partie de la membrane de filtration. Les prolongements cytoplasmiques des podocytes se terminent en pédicelles ; formations enchevêtrées qui s'attachent à la lame basale des capillaires glomérulaires.

Dans les espaces -appelés fente de filtration- délimités par les pédicelles, s'étend le diaphragme de la fente de filtration qui permet au filtrat de passer dans la chambre glomérulaire (Figure 13) (Marieb *et al.*, 2005).

- **Tubulaire rénal**

Le tubule rénal se compose de trois parties distinctes (Christier, 2003) :

- **Tubule contourné proximal (TCP)**

Localisé dans le cortex rénal, le TCP a un aspect sinueux et se trouve en continuité avec la capsule de Bowman. Sa paroi est pourvue d'une couche unique de cellules épithéliales spécifiques caractérisées par la présence d'expansions digitiformes appelées microvillosités et de nombreuses mitochondries.

- **Anse de Henlé**

Faisant suite au segment précédant, l'anse de Henlé décrit une boucle en épingle à cheveux s'enfonçant plus ou moins profondément dans la médulla rénale (néphrons courts et longs). L'anse de Henlé présente une branche descendante dont la paroi est formée d'une simple couche de cellules épithéliales aplaties et une branche ascendante dont la paroi est formée de monocouche de cellules épithéliales cubiques.

- **Tubule contourné distal (TCD)**

Localisé dans le cortex rénal, le TCD a un aspect sinueux et fait suite à la branche ascendante de l'anse de Henlé. Sa paroi est formée d'une couche unique de cellules épithéliales. En raison de son agencement, une petite région du tubule contourné distal vient s'accoler à la paroi de l'artériole glomérulaire afférente constituant l'appareil juxtaglomérulaire où :

- Les cellules de TCD deviennent cylindriques et sont appelées macula densa.
- Les cellules musculaires lisses de l'artériole glomérulaire afférente deviennent des myoépithéliocytes.

- **Tubule collecteur de Bellini**

Recueillant les urines définitives élaborées par plusieurs néphrons, chaque tubule collecteur de Bellini parcourt la médulla rénale. A l'approche de la papille rénale, il s'élargit et

devient le conduit papillaire, qui déverse les urines dans les voies urinaires hautes (les petits calices). Sa paroi est constituée d'une couche unique de cellules épithéliales de forme cubique (Christier, 2003).

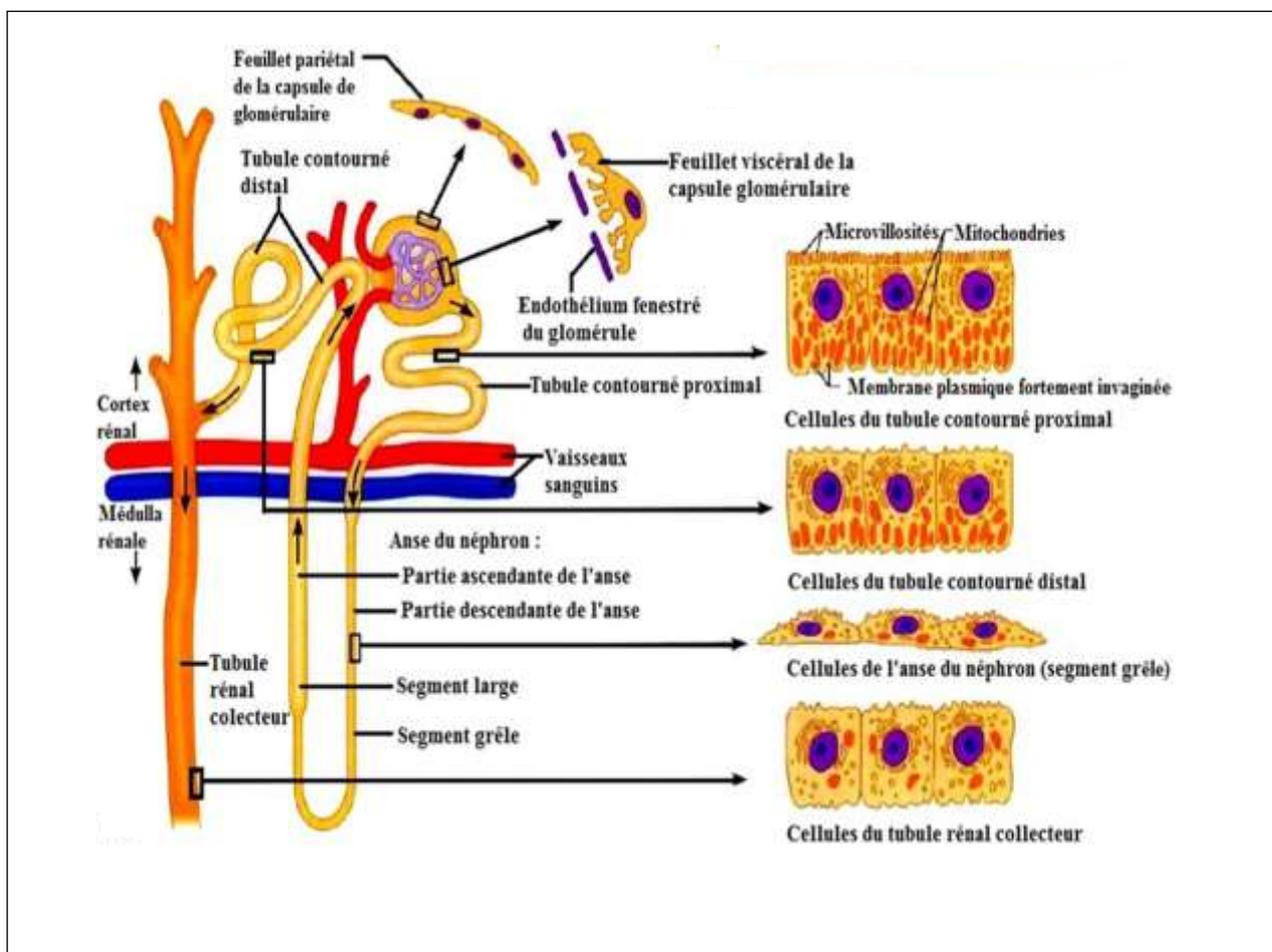


Figure 13 : Schéma représentatif montrant l'histologie du néphron (Marieb *et al.*, 2005)

3. Système Nerveux Central

3.1. Rappels anatomiques

Le système nerveux central (SNC) ou névraxe est la partie du système nerveux située dans la boîte crânienne et la colonne vertébrale. Le SNC comprend l'encéphale et la moelle épinière. Il se compose de tissu nerveux (neurones), glial et vasculaire. Il est entouré par les méninges.

L'encéphale est responsable de la conscience, de la pensée, de la mémoire et du contrôle de toutes les fonctions de l'organisme et comprend le cerveau, le cervelet et le tronc cérébral. Le cerveau et la moelle épinière baignent dans le liquide cérébro-spinal (Vogel, 2009).

➤ Cerveau

Le cerveau d'un lapin domestique mesure environ quatre centimètres de long et deux centimètres de large. Il est organisé anatomiquement comme chez les autres mammifères. Il est constitué de deux hémisphères cérébraux sur lesquels on observe des gyrus et des sulcus. Le cerveau se prolonge caudalement par le cervelet, le pont de Varole, la moelle allongée puis la moelle épinière (Barone *et al.*, 1973).

Le cerveau du lapin est divisé en trois régions: le cerveau antérieur (prosencephale), le mésencéphale et le cerveau postérieur (rhombencéphale).

Le prosencephale se compose d'une paire de lobes olfactifs, d'une paire d'hémisphères cérébraux et d'un diencéphale non apparié. Les hémisphères cérébraux ou télencéphale sont bien développés et forment environ 2/3 du cerveau entier. Les hémisphères cérébraux sont divisés longitudinalement par la scissure interhémisphérique ; le bord ventral de la scissure est formé par le corpus callosum, qui est un tractus de substance blanche reliant les deux hémisphères (Barone *et al.*, 1973) (Figure 14).

Le diencéphale, situé sur la partie ventrale du télencéphale, se compose du métathalamus, du thalamus, de l'hypothalamus, de la glande pinéale (épithalamus) et de l'hypophyse (Wingerd et Stein, 1985).

Le mésencéphale est situé caudal au diencéphale et se compose du tectum (dorsal) et du tegmentum (ventral). Le tectum comprend les colliculi rostral et caudal, impliqués dans les réflexes visuels et auditifs respectivement (Wingerd et Stein, 1985).

Le cerveau postérieur ou rhombencéphale se compose du cervelet, du pont et de la moelle; le cervelet et le pont forment le métencéphale, tandis que la moelle épinière forme la partie la plus caudale du cerveau, le myélencéphale. Le thalamus, l'hypothalamus, le mésencéphale, le pont de Varole et la moelle forment ensemble le tronc cérébral (Wingerd et Stein, 1985).

La surface des hémisphères est recouverte de cortex cérébral, c'est la substance grise qui contient les corps cellulaires des neurones. Le cortex est parcouru de circonvolutions, qui représentent des replis du tissu cérébral (Peterson *et al.*, 2015). Depuis la découverte du cerveau des mammifères, il a été montré que la neurogénèse est principalement confinée dans deux structures du cerveau : le bulbe olfactif, premier relais central de l'information olfactive, et l'hippocampe, structure essentielle dans la mémoire.

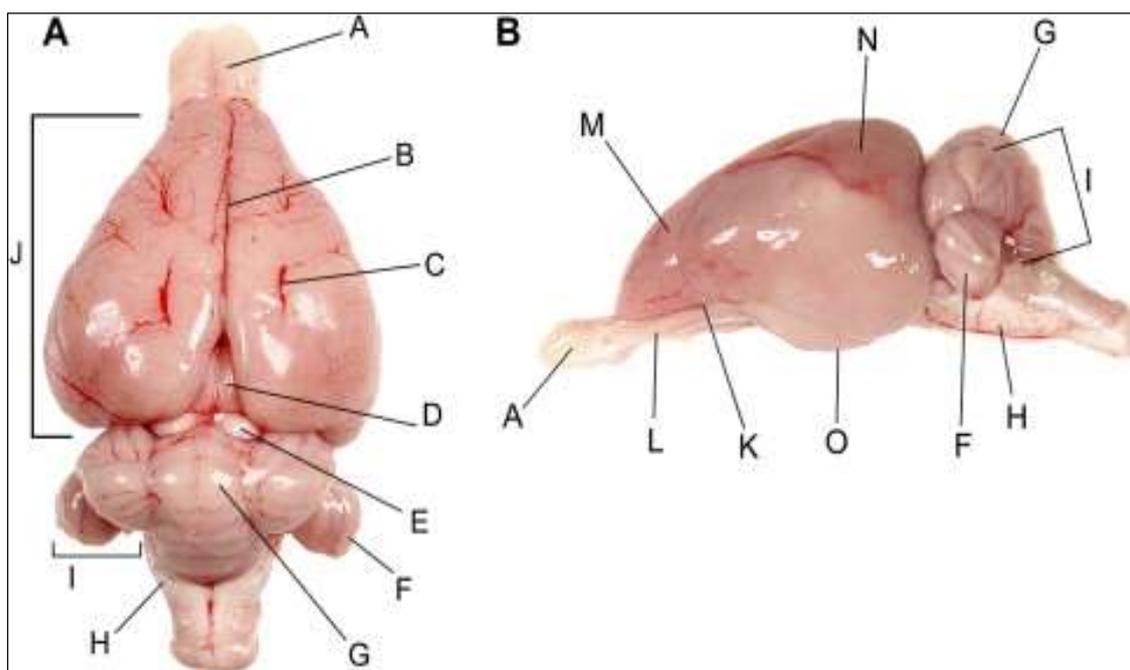


Figure 14 : Vues dorsale (A) et latérale (B) du cerveau non conservé du lapin domestique néo-zélandais (*Oryctolagus cuniculus*) (Osofsky *et al.*, 2007)

A - Bulbe olfactif. B - Fissure longitudinale. C - Sillon marginal. D - Colliculus rostral. E - Colliculus caudal. F - Paraflocculus cérébelleux. G - Vermis cérébelleux. H - Médulla. I - Hémisphère cérébelleux. J - Cortex cérébral. K- Sillon rhinal latéral. L - Pédoncule olfactif. M - Lobe frontal du cerveau. N - Lobe occipital du cerveau. O - Lobe piriforme du cerveau.

➤ Cervelet

Le cervelet est un organe impair et médian, situé en arrière des hémisphères cérébraux au-dessus du bulbe. Bien que le volume cérébelleux total ne dépasse pas les 10% du volume du SNC, le cervelet contient plus de neurones que l'ensemble des autres structures du SNC. Il est composé d'environ 3 ou 4 fois plus de neurones que le néocortex dans la plupart des espèces de mammifères (Osofsky *et al.*, 2007).

Le cervelet du lapin est bien développé et se compose d'un grand lobe médian appelé vermis, de deux lobes latéraux situés sur les côtés du vermis et de deux lobes flocaires situés sur les côtés ventro-latéraux des lobes latéraux (paraflocculi) (Wingerd et Stein, 1985). Le cervelet est constitué d'une couche de matière grise fortement repliée sur elle-même, le cortex cérébelleux. Dans le plan sagittal médian, le cervelet a une forme triangulaire, plutôt que la forme plus ronde observée chez d'autres animaux domestiques (Osofsky *et al.*, 2007).

3.2. Rappels histologiques

➤ Cortex cérébral

Le cortex cérébral est une structure agencée en six couches horizontales (I-VI), contenant des types cellulaires spécifiques, et cette organisation est hautement préservée chez les mammifères. Au cours de la formation du cerveau, les neurones au sein de chacune de ces couches acquièrent une identité précise et forment des connexions locales et distales appropriées, jouant un rôle fondamental dans le développement et la maturation des capacités cognitives et motrices (Eroschenko, 2008). Dans sa globalité, l'ensemble des cellules corticales est agencé selon le schéma décrit ci-dessous.

La couche I, la plus externe, est appelée couche moléculaire ; elle est essentiellement composée d'arborisations dendritiques terminales issues des couches plus profondes et de cellules horizontales de Cajal, qui sont présentes surtout au cours du développement et très peu chez l'adulte. La couche II, ou granulaire externe, inclut des cellules étoilées (en grain) et des petites cellules pyramidales. En dessous, la couche III ou couche pyramidale externe contient des neurones pyramidaux de taille moyenne et des interneurons. La couche IV, très riche en cellules de forme étoilée, est appelée couche granulaire interne. La couche V, ou pyramidale interne, contient des neurones pyramidaux de grande taille ; elle est divisée en deux sous-couches : une supérieure (externe) ou Va et une inférieure (interne) ou Vb. Enfin la couche VI, la plus interne du cortex, est nommée couche polymorphe car elle renferme de multiples types neuronaux (Laurence JG, 2006) (Figure 15). D'une manière très générale, les couches I, II et IV sont plutôt réceptrices et les couches III, V et VI sont plutôt émettrices.

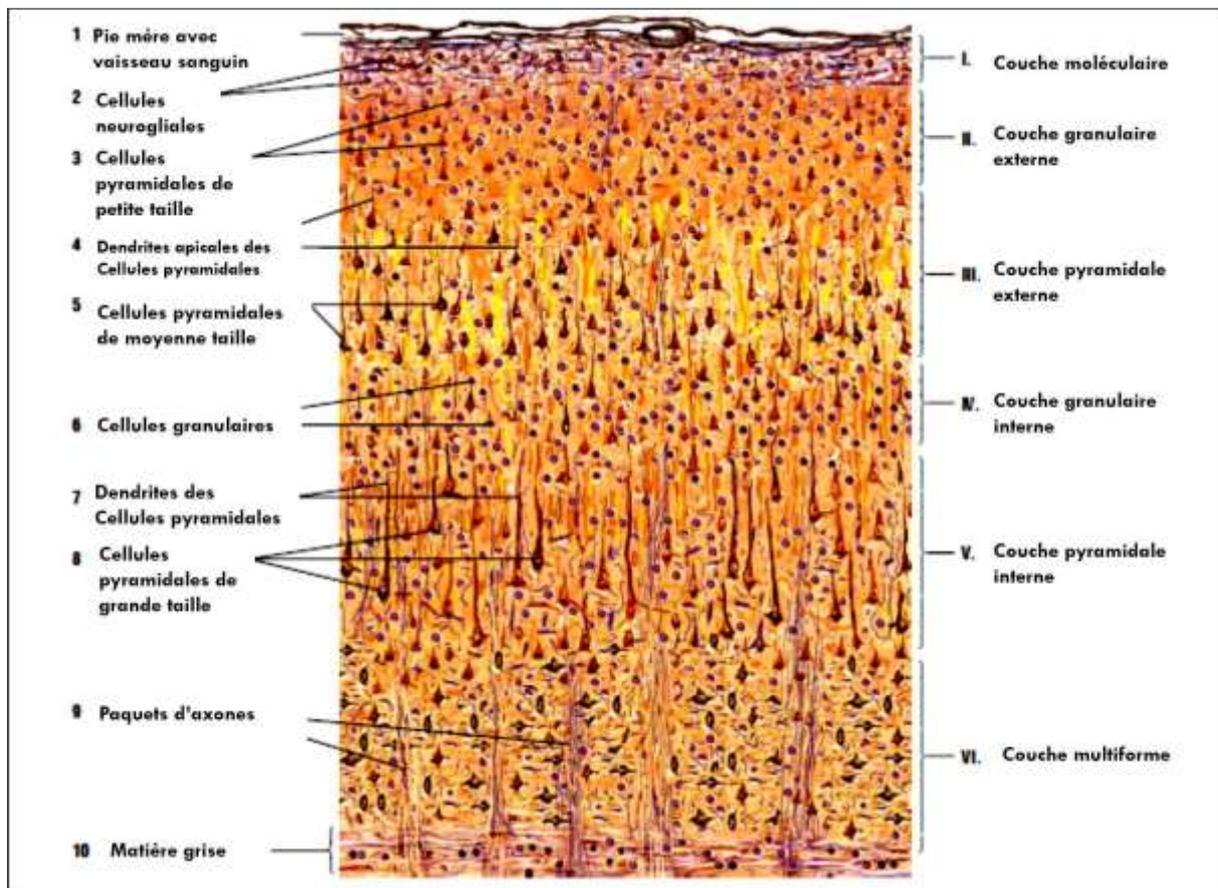


Figure 15 : Coupe histologique du cortex cérébral (substance grise) après imprégnation argentique (Eroschenko, 2008).

➤ Hippocampe

Chez les mammifères supérieurs, l'hippocampe est une petite formation allongé, bilatérale, systémique, sous-corticale, enroulé sur elle-même et occupant la partie interne de la face médiane du lobe temporal. Il constitue avec l'amygdale, le septum et le thalamus, l'un des éléments principaux du système limbiques. Ce dernier joue un rôle important dans les processus émotionnels, d'apprentissage et de mémorisation (Pernot, 2009).

L'hippocampe est formé de deux couches neurales interconnectées en forme de U inversé, le gyrus denté (GD) et la corne d'Ammon (CA), subdivisé-elle même en quatre régions (CA1, CA2, CA3 et CA4) (Pernot, 2009) (Figure 16).

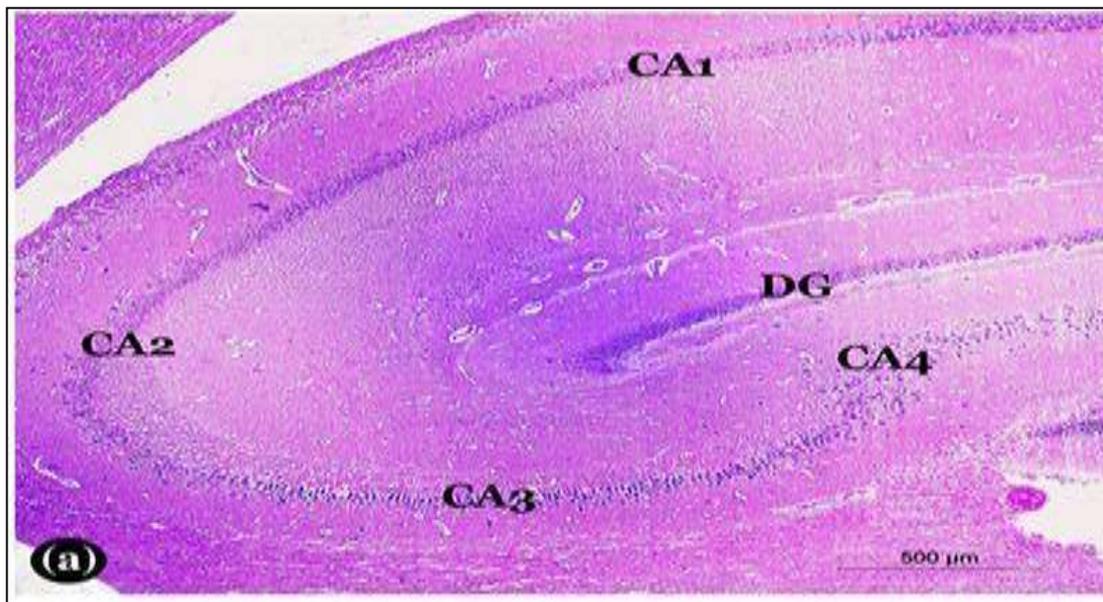


Figure 16 : Coupe horizontale de l'hippocampe chez le lapin mâle Néo-Zélandais. H&E, x40 (Mazher et Hassan, 2021)
CA1, CA2, CA3 et CA4 : les quatre régions de corne d'Ammon, DG : gyrus denté.

- **Gyrus dentelé (GD)**

Le gyrus dentelé se compose de trois couches cellulaires : la couche moléculaire (ou dendritique), la couche granulaire (ou principale) et la couche polymorphique (ou la région du hile). Les principaux neurones du GD sont les cellules granulaires, qui sont relativement petites (8-12 µm de diamètre) et possèdent deux dendrites principales se ramifiant en de nombreuses branches fines et couvertes d'épines dans la couche moléculaire sus-jacente, qui est principalement acellulaire (Pernot, 2009).

- **Corne d'Ammon (CA)**

Au niveau histologique, la corne d'Ammon peut être divisée en trois parties, en fonction notamment de la taille des cellules, de la densité cellulaire, ainsi que des connections synaptiques : CA1, CA2, CA3. Les cellules composant majoritairement la CA sont les neurones pyramidaux, correspondant à des excitateurs glutaminergiques. Les régions CA2 et CA3 sont formées de neurones plus larges, mais moins condensés que la région CA1. Le GD est composé majoritairement de neurones granulaires projetant des axones appelés fibres mousses vers la région CA3 (Pernot, 2009).

❖ Cortex cérébelleux

Le cortex cérébelleux possède une organisation en trois couches, homogène sur toute sa longueur. La couche moléculaire (superficielle) et la couche des grains (profonde) sont séparées par un alignement de volumineux corps cellulaires de neurones de type pyramidal, spécifiques au cervelet : les neurones piriformes ou cellules de Purkinje (Figure 17).

La couche moléculaire est constituée de neurones étoilés et de cellules à corbeilles, présents en petit nombre et noyés dans un réseau formé de leurs fibres et de celles des deux autres couches. Les axones des cellules à corbeilles émettent des collatérales qui pénètrent dans la couche des cellules de Purkinje pour former autour d'elles des lacis complexes et denses appelés corbeilles.

L'élément principal du cortex cérébelleux est la cellule de Purkinje. De forme ovoïde, elle possède un ou deux dendrites qui se dirigent vers la surface en se ramifiant abondamment dans un seul plan, perpendiculaire au grand axe du lobule. L'ensemble constitue l'arbre dendritique de la cellule de Purkinje. Les cellules de Purkinje sont disposées en une seule rangée parallèle à la surface du cortex.

La couche des grains se caractérise par sa très grande densité cellulaire, où dominent largement de très petites cellules, les grains ou neurones granuleux, auxquels s'ajoutent une faible proportion de grands neurones étoilés ou « cellules de Golgi ». L'aspect granuleux de cette couche est dû à cette densité de petites cellules serrées les unes contre les autres, et dont on ne voit que les noyaux sur les préparations de routine (Barone et Bortolami, 2004).

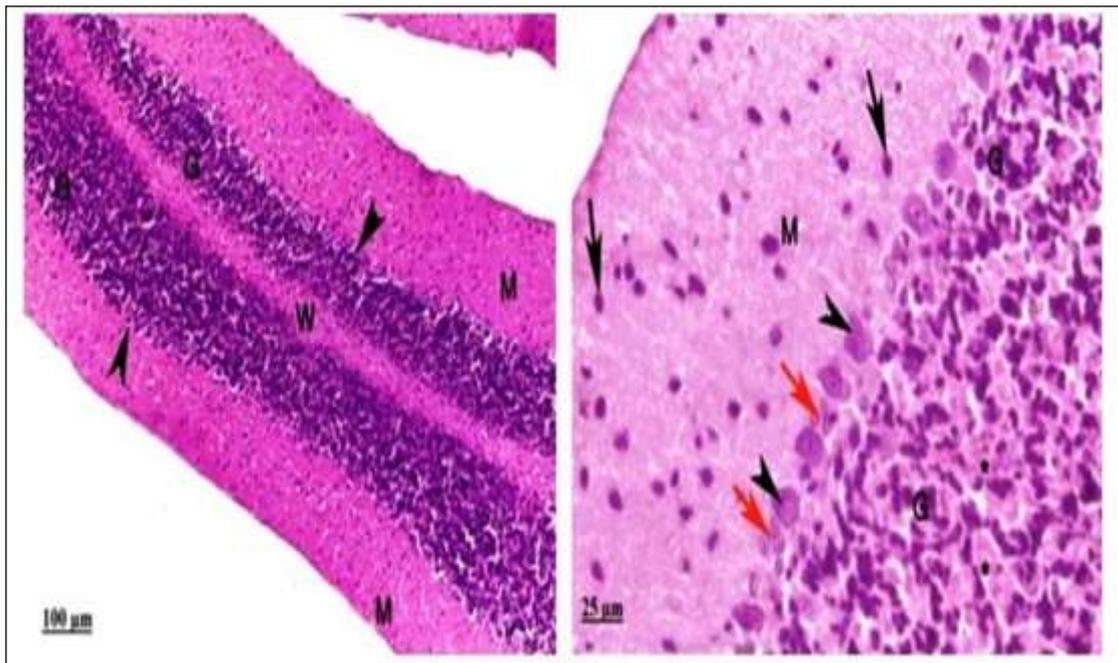


Figure 17 : Histologie de cortex cérébelleux (H&E, x100, x400) (El-Azab *et al.*, 2018)
 M : couche moléculaire, G : couche granuleuse, têtes de flèches (▲) : cellules de Purkinje, Flèche noire (↑) : cellules gliales, Flèche rouge : Astrocytes.

4. Cœur

4.1.Rappels anatomiques

Le cœur est un organe contractile assurant la circulation sanguine. Le cœur du lapin est relativement petit, comme dans toutes les espèces à faible activité physique et pèse 8 à 14 g soit environ 1/300 du poids du corps. Il est relativement plus étroit que celui des carnivores. Il est placé haut dans le thorax entre les poumons et près du sternum, protégé le péricarde (Barone, 1973).

L'architecture anatomique du cœur de lapin est comparable à celle de l'homme. C'est un muscle strié creux, séparé en deux moitiés indépendantes (droite et gauche). Sa partie droite contient du sang pauvre en oxygène et assure la circulation pulmonaire ; sa partie gauche renferme du sang riche en oxygène et le propulse dans tous les tissus. Chacune des moitiés comporte une oreillette et un ventricule qui communiquent par des valves d'admission qui, à l'état normal, laissent passer le sang uniquement de l'oreillette vers le ventricule. Il existe aussi des valves d'échappement qui assurent la communication entre le ventricule droit et l'artère pulmonaire (valve pulmonaire), ainsi qu'entre le ventricule gauche et l'artère aorte (valve aortique). Ces deux valves se trouvent à l'entrée de l'aorte et de l'artère pulmonaire respectivement. On peut observer, la base du cœur, le sillon coronarien qui sépare les deux

atriums au-dessus et les deux ventricules en dessous, et les deux sillons interventriculaires antérieurs et postérieurs qui séparent les deux ventricules (Barone, 1973) (Figure 18).

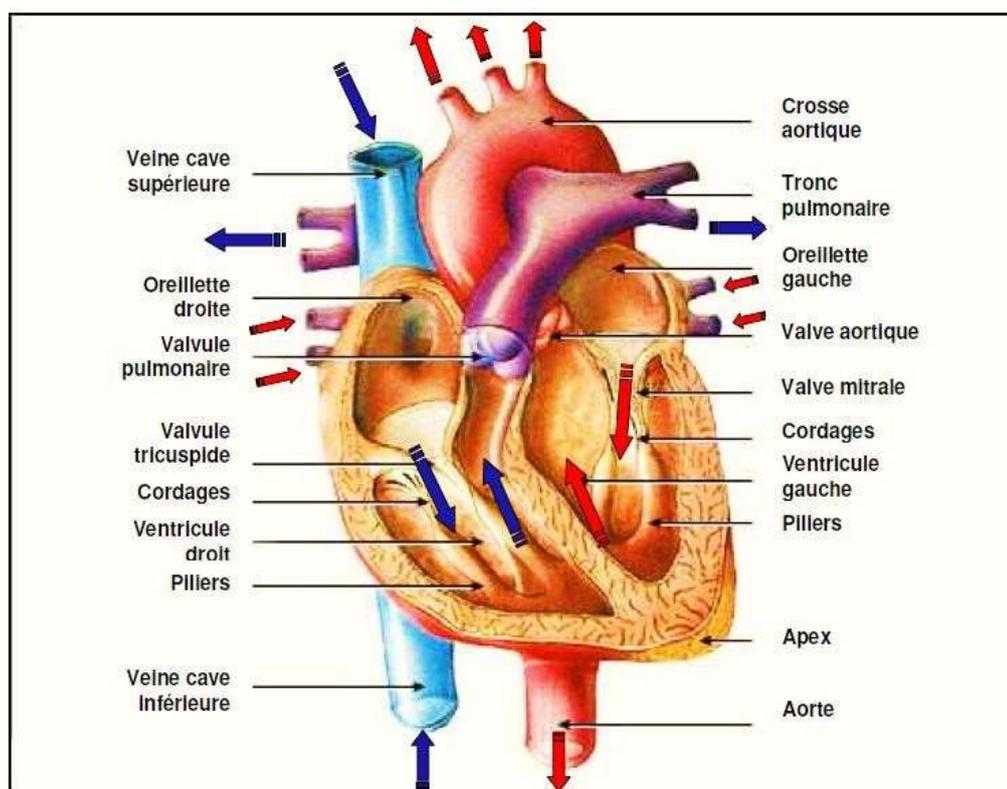


Figure 18 : Anatomie du cœur et des vaisseaux associés (Cabasson, 2008)

4.2. Rappels histologiques

Le cœur est un organe musculaire extrêmement épais composé de trois tuniques : le péricarde, le myocarde et l'endocarde (Figure 19).

✓ Le péricarde

Est divisé en deux feuillets ; un feuillet viscéral (épicaarde) et un feuillet pariétal. Ces feuillets sont caractérisés par la présence de tissu adipeux. Mince et transparent, il est composé de mésothélium et d'un délicat tissu conjonctif qui rend la texture de la face externe du cœur lisse et glissante.

✓ Le myocarde

Constitue le substratum fondamental de la paroi cardiaque. Il est formé d'un réseau des cellules musculaires involontaire, striés et ramifiés avec un ou deux noyaux centraux entourés d'une zone de cytoplasme périnucléaire. Les extrémités des myocytes adjacents sont unies par des digitations traverses irrégulières appelées disques intercalaires. Ils contiennent également des

jonctions communicantes qui permettent aux potentiels d'action de se propager d'un myocyte cardiaque à l'autre.

✓ **L'endocarde**

L'endocarde tapisse les cavités cardiaques et il formé de trois couches ; un endothélium continu (épithélium pavimenteux simple) qui repose sur une couche sous-endothéliale conjonctive, et une couche sous-endocardique dans laquelle circule les vaisseaux sanguins (Tortora et Derrickson, 2014).

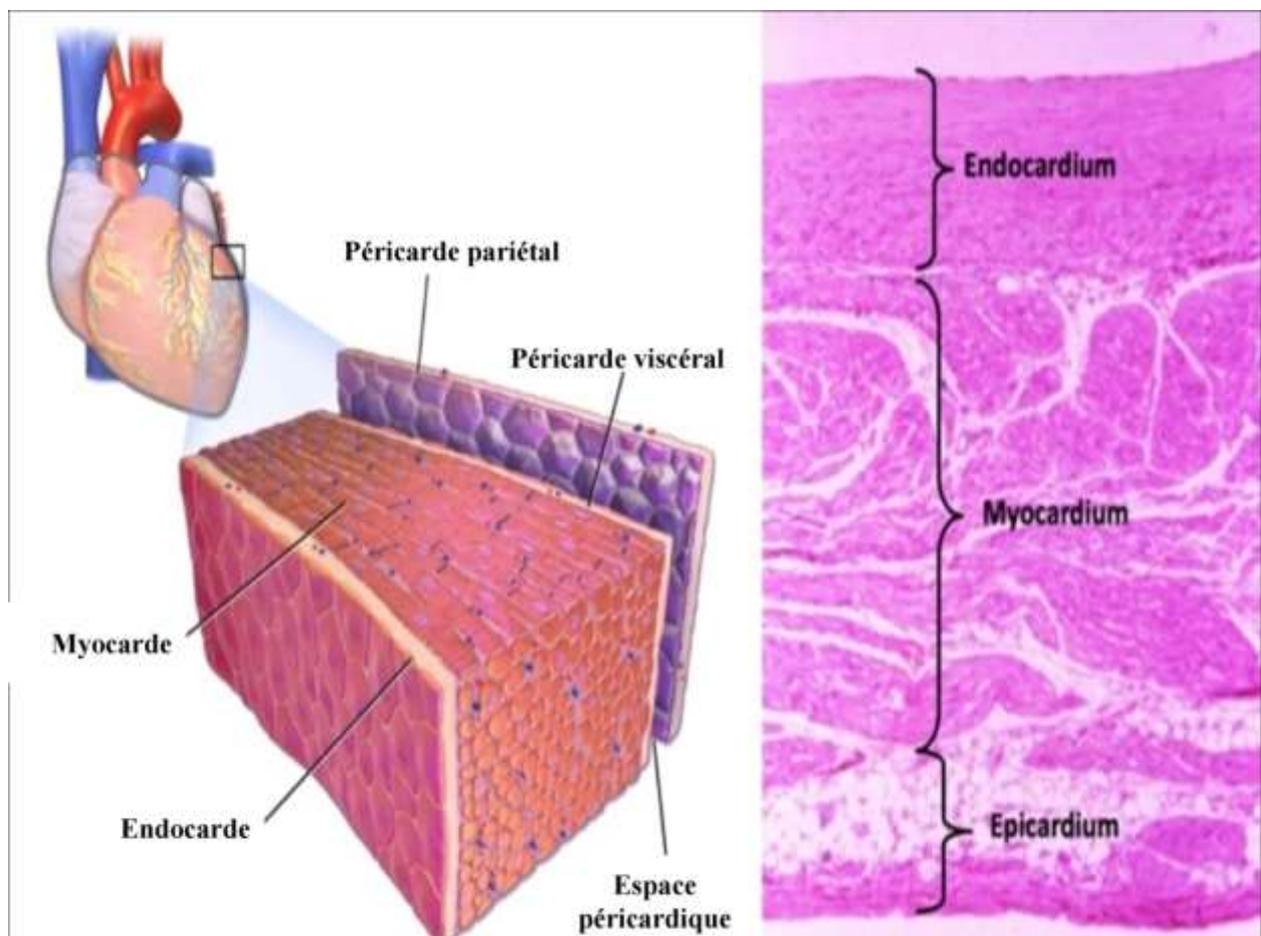


Figure 19 : Structure histologique du tissu cardiaque (Tortora et Derrickson, 2014)

1. Protéine B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) : Une protéine anti-apoptotique

1.1. Apoptose

L'apoptose constitue le principal type de mort cellulaire programmée. Elle peut se produire chez des cellules saines au cours de l'embryogenèse ou pour le maintien de l'homéostasie tissulaire, chez des cellules malades ou endommagées, ou encore pour éliminer les cellules immunitaires en surnombre après l'élimination d'un pathogène (Chaabane *et al.*, 2013 ; Negroni *et al.*, 2015). Elle peut être activée par des signaux aussi variés que des dommages de l'ADN, un manque de facteurs de croissance ou de nutriments ou encore des stress variés (thermique, oxydatif. ..) (Jin et El-Deiry, 2005 ; Negroni *et al.*, 2015). Sa régulation est cruciale : une apoptose excessive des neurones est associée à la maladie de Parkinson et à celle d'Alzheimer, tandis qu'un défaut d'apoptose contribue à l'inflammation chronique et au développement de tumeurs (Pallepati et Averill-Bates, 2012).

Il existe principalement deux voies d'activation de l'apoptose : une voie extrinsèque via les récepteurs de mort situés dans la membrane plasmique et appartenant à la famille des récepteurs du facteur de nécrose tumorale (TNF), et la voie intrinsèque, dite mitochondriale, régulée par les protéines de la famille Bcl-2, qui contrôlent la perméabilité de la membrane mitochondriale (Chaabane *et al.*, 2013). Les caractéristiques physiques de l'apoptose, communes à ces deux voies, incluent la condensation de la chromatine, la perte d'adhésion, le rétrécissement de la cellule et le bourgeonnement de la membrane. Ce bourgeonnement est un précurseur à la formation de corps apoptotiques, c'est-à-dire de «morceaux» de cellule entourés de membrane plasmique. Ces membranes ont la particularité d'exposer des phosphatidylsérines à leur surface, des phospholipides qui sont habituellement exprimés sur la face interne de la membrane plasmique. Ces phosphatidylsérines vont permettre d'attirer les macrophages pour que la cellule soit éliminée par phagocytose. De cette façon, le contenu cellulaire n'étant jamais libéré dans le milieu, l'apoptose ne provoque pas de réaction inflammatoire (Chaabane *et al.*, 2013).

La voie intrinsèque de l'apoptose implique un dysfonctionnement mitochondrial, la libération du cytochrome c et l'activation subséquente de la caspase-9 au niveau de l'apoptosome. La protéine anti-apoptotique Bcl-2 inhibe la libération du cytochrome c par la mitochondrie. La voie extrinsèque est initiée par la liaison de ligands de mort au récepteur de mort et le recrutement ultérieur de la protéine adaptatrice FADD et de la caspase-8 dans le complexe de signalisation induisant la mort (Figure 20).

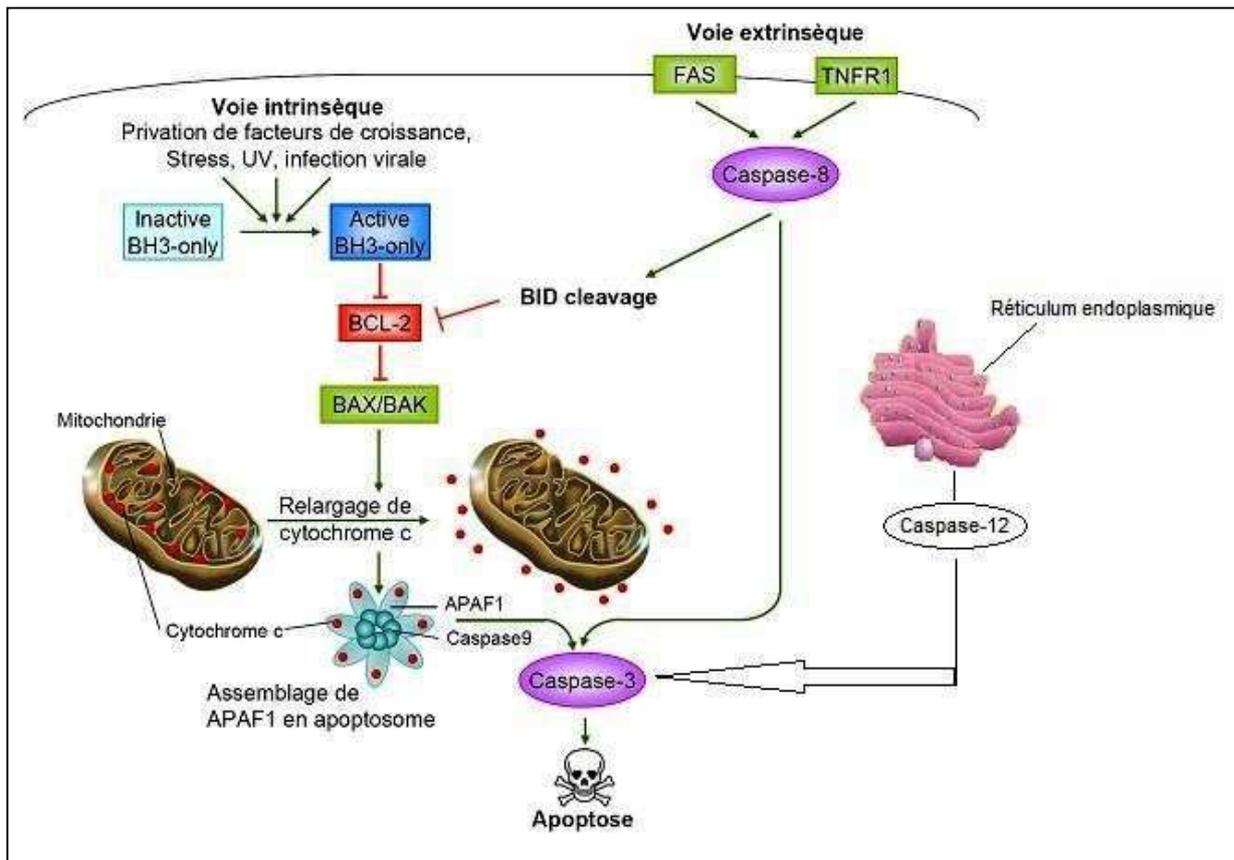


Figure 20 : Deux principales voie d'apoptose (Braun *et al.*, 2010)

1.2. Structure de la protéine Bcl-2

Il existe deux types de protéines régulant l'apoptose : les anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w...) et les proapoptotiques (BAX, BAK, BIM, BID..). La Bcl-2 est une protéine anti-apoptotique qui permet la survie cellulaire. Elle est associée aux membranes et se localise de façon prédominante au niveau des mitochondries (Siddiqui *et al.*, 2015).

Le gène BCL-2 est composé de trois exons ; les deux premiers exons codent pour les quatre domaines d'homologie avec Bcl-2 (ou domaines BH), tandis que l'exon 3 code pour le domaine transmembranaire qui ancre la protéine aux membranes intracellulaires (Seto *et al.*, 1988) (Figure 21).

La protéine Bcl-2 (239 résidus d'acides aminés, 26 266 Da) est composée de sept hélices alpha, où les deux hélices hydrophobes centrales (α_1 et α_2) sont entourées de cinq hélices amphipathiques (α_3 , α_4 , α_5 , α_6 et α_7). Les domaines BH1, BH2 et BH3 se trouvent à proximité immédiate et forment une fente hydrophobe pour lier d'autres membres de la famille. Le domaine transmembranaire C-terminal s'étend à partir de l'hélice 7. L'hélice N-terminale (α_1) est essentielle pour le maintien de la stabilisation de la structure car elle forme des interactions

étendues avec les autres hélices. Le domaine BH3 est contenu dans l'hélice α_2 , le domaine BH1 entre α_4 et 5 et BH2 entre α_6 et α_7 (Warren *et al.*, 2019).

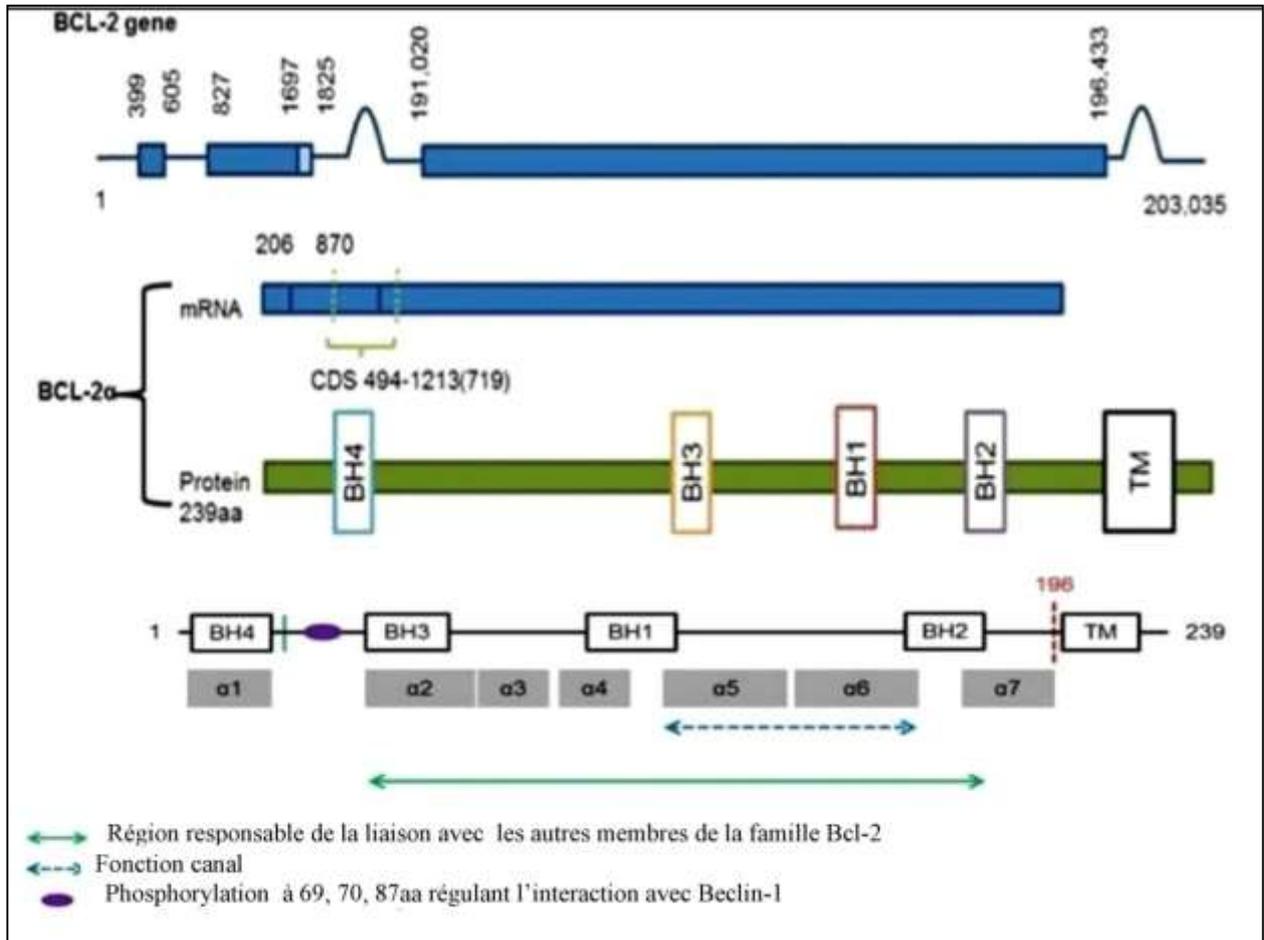


Figure 21 : Structure protéique de Bcl-2 (Warren *et al.*, 2019)

1.3. Fonctions de Bcl-2

Bcl-2 est une protéine qui joue un rôle important dans la voie de signalisation intrinsèque de l'apoptose. Cette molécule anti-apoptotique intervient dans la survie cellulaire en empêchant l'apoptose, mais contribue également à de nombreuses autres fonctions cellulaires. En effet, Bcl-2 s'oppose à l'apoptose induite par de nombreux agents cytotoxiques, radiations ionisantes, glucocorticoïdes, privation en facteurs de croissance et hypoxie (Shimizu *et al.*, 1995 ; Decaudin *et al.*, 1997). En particulier, Bcl-2 régule l'apoptose en maintenant le potentiel membranaire de la mitochondrie et en contrôlant la libération de différents facteurs apoptogènes dans le cytoplasme de la cellule. Elle empêche l'oligomérisation Bax/Bak et l'insertion de ces dimères dans la membrane mitochondriale externe (Ku *et al.*, 2011).

De plus, Bcl-2 est impliquée dans l'autophagie via l'interaction avec Beclin 1, ainsi que la signalisation calcique, et joue d'autres rôles en dehors de la régulation de l'apoptose (Liu *et al.*, 1997 ; Braun *et al.*, 2013). Il a également été impliqué dans la réparation de l'ADN, y compris la réparation par excision de nucléotides, la réparation par excision de bases, la réparation des mésappariements et la réparation des cassures double brin (Liu *et al.*, 1997 ; Hou *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2008). En outre, BCL-2 peut réguler un certain nombre de facteurs de transcription majeurs, notamment p53 (Beham *et al.*, 1997), NF- κ B, AP1, CRE et NFAT (Massaad *et al.*, 2004). Les différents rôles de Bcl-2 sont résumés dans le Tableau IV.

Tableau IV : Rôles alternatifs pour Bcl-2, autres que l'apoptose

Processus cellulaire	Rôle du Bcl-2	Références
Autophagie	Bcl-2 est capable d'inhiber l'autophagie via son interaction avec Beclin-1.	(Braun <i>et al.</i> , 2013)
Apoptose via p53	Bcl-2 peut empêcher p53 de réguler positivement les gènes pro-apoptotiques.	(Beham <i>et al.</i> , 1997)
Contrôle du facteur de transcription	Bcl-2 peut réguler les facteurs de transcription NF- κ B, AP1, CRE et NFAT en les empêchant d'entrer dans le noyau	(Massaad <i>et al.</i> , 2004)
Réparation par excision de nucléotides	La surexpression de BCL-2 atténue l'élimination du dimère de cyclobutane pyrimidine et le blocage de la réplication de l'ADN après une exposition à la lumière UV	(Liu <i>et al.</i> , 1997)
Réparation par excision de bases (BER)	La surexpression de Bcl-2 régule négativement le BER via le blocage d'APE1	(Kuo <i>et al.</i> , 1999)
Réparation des mésappariements (MMR)	BCL-2 peut inhiber le MMR via son interaction directe avec MSH2	(Hou <i>et al.</i> , 2007)

2. Alpha-FoetoProtéine (AFP) : un marqueur de régénération hépatique

L'alpha-foetoprotéine (AFP) est une protéine de la famille de l'albumine dont l'expression est retrouvée principalement dans le foie fœtal au cours de développement embryonnaire. Le gène *AFP* est réprimé lors de la différenciation terminale des hépatocytes pour être toutefois réactivé chez l'adulte conséquemment au divers trouble et dysfonctionnements hépatiques tels que la cirrhose, la dégénérescence, les infections virales et certains cancers (Sell, 1980).

L'utilisation d'AFP comme marqueur de régénération hépatique et aussi des hépatocarcinomes est très répandue.

2.1. Structure de la protéine AFP

AFP est une protéine constituée d'une seule chaîne polypeptidique ayant une masse moléculaire d'environ 69 kDa et formée de 590 résidus d'acides aminés (Morinaga *et al.*, 1983). Les poids moléculaires et les compositions d'acides aminés de l'AFP chez l'homme, le chien, le lapin et le rat sont similaires (Nishi *et al.*, 1975).

Cette protéine comprend 3 domaines d'albumine de 180 à 200 acides aminés, constituant chacun 10 hélices alpha avec une configuration de boucles intramoléculaires dictée par des ponts de pontage disulfure conduisant à une structure tertiaire conformationnelle en forme de V. Une poche hydrophobe se forme entre le domaine-1 et le domaine-3 (Figure 22) (Mizejewski, 2001 ; Mizejewski, 2016).

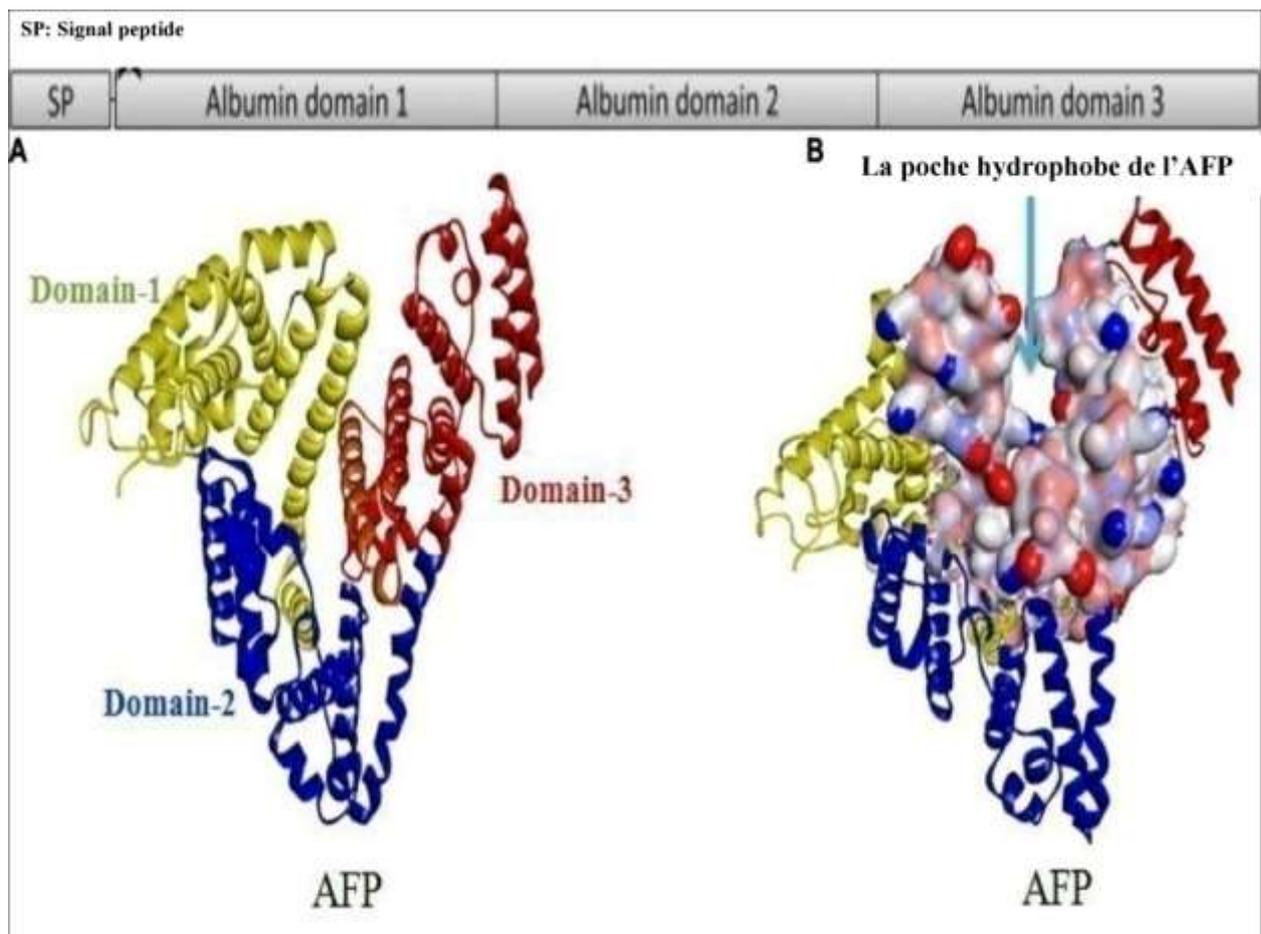


Figure 22 : Structure protéique de l'AFP (Mizejewski, 2016)

2.2. Fonctions de l'alpha-foetoprotéine

L'AFP exerce différentes activités physiologiques, comme un transporteur intravasculaire des protéines et des hormones stéroïdiennes ; elle maintient la pression oncotique et pourrait moduler la prolifération cellulaire agissant ainsi de concours avec les facteurs de croissance cellulaire. Elle joue un rôle important pendant la vie embryonnaire comme transporteur d'ions, de la bilirubine, et des acides gras polyinsaturés. Elle pourrait aussi avoir un rôle immunosuppresseur en protégeant les antigènes paternels du fœtus des anticorps circulants maternels et elle jouerait un rôle dans la différenciation sexuelle du cerveau (De Mees *et al.*, 2006).

Le gène de l'AFP est exprimé chez le fœtus en développement et dans des conditions de régénération hépatique et de tumorigenèse chez l'adulte (Jin *et al.*, 1998). Une augmentation de l'expression de l'AFP après une nécrose hépatique est considérée comme indicative d'une régénération ou d'une prolifération hépatique (Schmidt et Dalhoff, 2005 ; Mizejewski, 2015 ; Marzinke et Dufour, 2020). Plusieurs études ont démontré que l'AFP est anti-apoptotique (Zhang *et al.*, 2007 ; Ho *et al.*, 2009) et joue un rôle clé dans la promotion de la prolifération cellulaire (Li *et al.*, 2002).

L'AFP joue un rôle important dans l'induction de la transformation maligne des cellules cancéreuses, la régulation de la prolifération cellulaire, de la migration, de l'apoptose et de l'échappement immunitaire, et est utilisée comme biomarqueur clinique pour diagnostiquer le carcinome hépatocellulaire (Lin *et al.*, 2021). Le comportement malin de l'AFP est principalement médié par ses récepteurs (AFPR), qui sont présents à la surface cellulaire et leur expression dans les cellules est associée à la présence d'AFP (Pak, 2018). L'AFP se lie aux AFPR et subit une endocytose médiée par des récepteurs. Ensuite, les AFPR et l'AFP intracellulaire activent les voies de transduction du signal et interviennent dans la prolifération, l'invasion, la métastase, la reprogrammation et les réponses anti-apoptotiques des cellules cancéreuses du foie. L'AFP endocytée peut interagir avec PTEN et activer la voie PI3K/AKT/mTOR, qui favorise le comportement malin des cellules de carcinome hépatocellulaire (CHC) en régulant positivement l'expression de la protéine mTOR (Figure 23) (Lin *et al.*, 2021).

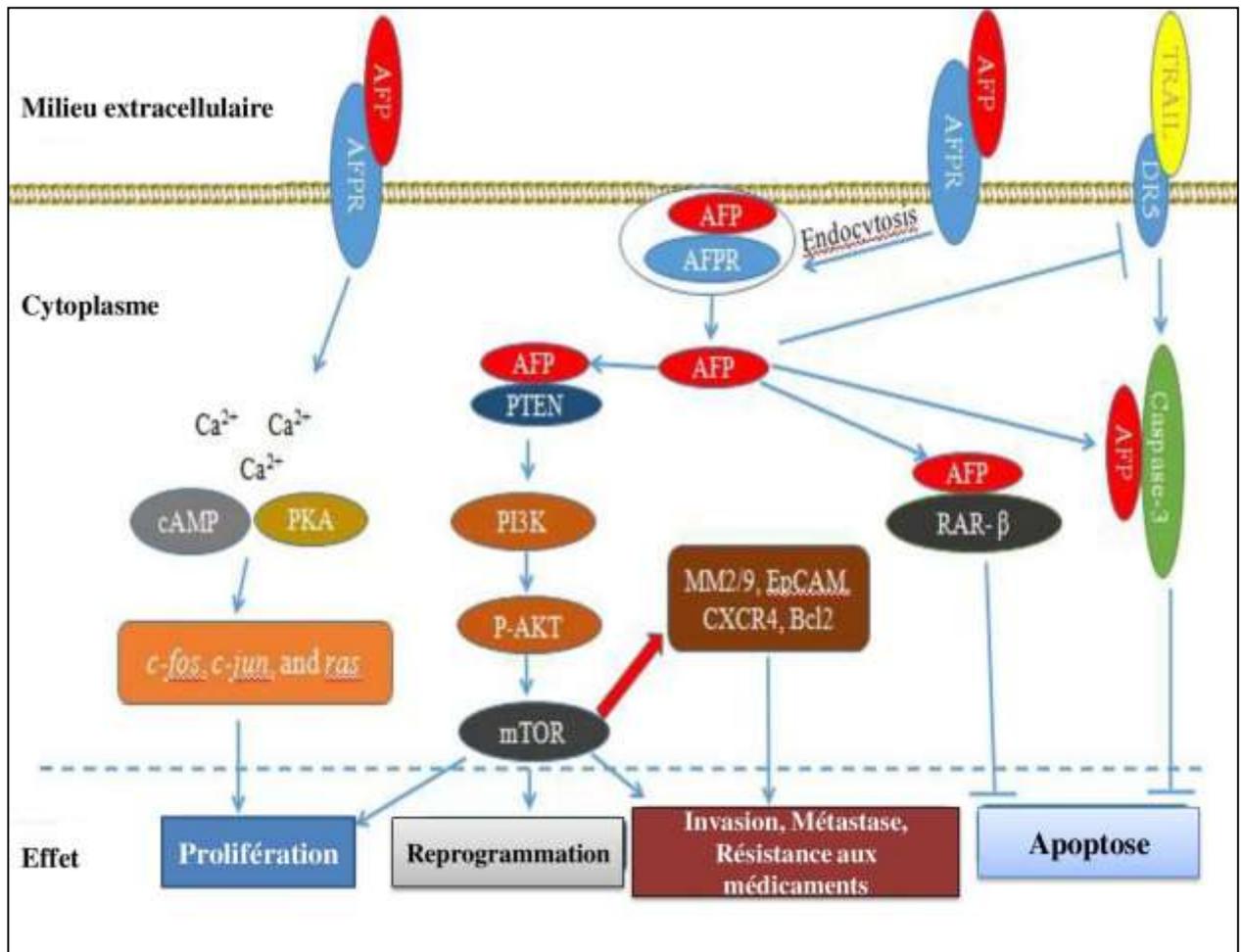


Figure 23 : Role de l'AFP dans la transformation maligne des cellules cancéreuses du foie (Lin *et al.*, 2021).

1. Objectifs de l'étude

L'objectif principal de ce projet de thèse est d'évaluer les effets toxiques d'une administration répétée d'un insecticide homologué et commercialisé en Algérie depuis 2011, le « Voliam Targo® », et d'examiner l'activité protectrice possible de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* vis-à-vis la toxicité induite par ce pesticide, chez le lapin male de souche synthétique (*Oryctolagus cuniculus*).

Pour ce faire, nous avons entrepris une investigation *in vivo* par un test toxicologique. Notre travail s'articule autour de deux volets : le premier volet porte sur l'étude de l'effet toxique de l'insecticide VoliamTargo® et de l'activité protectrice de l'huile essentielle de *T. vulgaris*, sur le comportement, l'évolution pondérale, la consommation d'aliment et de boisson, la variation du poids des organes étudiés, les paramètres biochimiques de la fonction rénale, hépatique et le bilan lipidique, ainsi que les effets histopathologiques sur le rein, le système nerveux central (cortex cérébral, hippocampe et cervelet), le cœur et le foie. Dans cette étude, l'accent est mis également sur l'expression de deux marqueurs de prolifération cellulaire, à savoir la Bcl-2 et l'alpha fœtoprotéine, au niveau de l'organe de détoxification « le foie ». Le second volet vise à valoriser l'huile essentielle de l'espèce choisie, *T. vulgaris* par extraction, étude de sa composition chimique et de son activité antioxydante.

2. Matériel

2.1. Matériel biologique

2.1.1. Matériel animal (modèle animal)

Le lapin possède des caractéristiques qui font de lui un modèle intéressant dans de nombreuses études toxicologiques : il est facile à loger et à manipuler ; s'habitue au manipulateur et tolère le gavage ; son poids permet de nombreuses investigations ; sa grande disponibilité favorise la constitution de lots de taille compatible aux évolutions statistiques des données expérimentales.

❖ Systématique**Règne :** Animal**Embranchement :** Vertébrés**Classe :** Mammifère**Super ordre :** Glires**Ordre :** Lagomorphe**Famille :** Léporides (lièvre et lapin)**Sous-famille :** Leporinae**Genre :** *Oryctolagus***Espèce :** *Oryctolagus cuniculus*

Dans notre étude, on a utilisé 20 lapins males sains, âgés de 3 à 4 mois, ayant un poids corporel moyen qui varie entre 2.5 kg et 2.6 kg.

Le modèle animal utilisé dans notre expérimentation est le lapin de souche synthétique (*Oryctolagus cuniculus*), nommée ITELV2006, issu de l'animalerie de l'Institut Technique des Elevages (ITELV) de Baba Ali, Alger. Cette souche est un génotype obtenu par le croisement des lapins males de souche (INRA TOULOUS 2666) avec des lapines femelles de population décrite par Zerrouki et al (2007), élevée en confinement et en milieu contrôlé à l'ITELV d'Alger. Les géniteurs de cette dernière provenaient de 9 wilayas d'Algérie ; cette population présente un niveau de performances constant mais très hétérogène (Bolet *et al.*, 2012).

La robe de la souche synthétique ITELV2006 est caractérisé par plusieurs phénotypes : le blanc, le marron, le noir, le gris et parfois mélangé (Figure 24) ; les yeux avec plusieurs couleurs (noir, marron, bleu et rouges) (Saadi *et al.*, 2014). Cette souche cunicole présente une bonne adaptation aux climats méditerranéens avec des étés chauds et hivers froids.



Figure 24: Différents phenotypes des lapins utilisés (*Oryctolagus cuniculus*)

Les lapins de notre expérimentation sont élevés dans l'animalerie du centre de recherche et de développement (CRD)-Saidal, Alger. Les animaux sont hébergés dans des cages métalliques individuelles dans des conditions de température ambiante allant de 22 à 28°C avec une hygrométrie stable (50-55 %) et un éclairage naturel maintenu 12 heures sur 24 heures.

Les animaux étaient nourris et abreuvés *ad-libitum*. Ils reçoivent un régime alimentaire standard et équilibré sous forme de granulés commercial, destiné à l'élevage cunicôle, provenant de l'unité de fabrication d'aliment de bétail de Bouzaréah (Alger).

L'aliment de bétail de Bouzaréah (CEREGRAIN®) est distribué à toutes les catégories des lapins (reproducteur et lapins destinés à l'engraissement), dont la composition centésimale est de 36% de luzerne déshydratée, 26% de son de blé, 25% de maïs, 12% de tourteaux de soja et 1% de complément minéral vitaminique. L'eau de boisson (eau de robinet) est servie dans des biberons *ad libitum*.

2.1.2. Matériel végétal

La plante qui a fait l'objet de notre étude est *Thymus vulgaris* connue sous le nom Zaitara, dont on a utilisé les parties aériennes (feuilles et sommités fleuries). La récolte de nos échantillons a été effectuée en juillet pendant la période de floraison, au niveau de la région de Hammam Melouane (Blida, Algérie).

Le matériel végétal collecté a été identifié au niveau du laboratoire de botanique de l'Ecole National Supérieure Agronomique d'Alger comme étant le *Thymus vulgaris* L.

Après la récolte et le nettoyage des échantillons, ils ont été laissés sécher à l'ombre dans un endroit sec et aéré (Figure 25).

La situation géographique ainsi que l'étage bioclimatique de la région de récolte sont présentées dans le tableau V et la figure 26.



Figure 25 : *Thymus vulgaris* (A) ; parties de la plante utilisées pour l'extraction de l'huile essentielle (B)

Tableau V : Coordonnées géographiques et caractéristiques bioclimatiques de la région de récolte

Région	Altitude	Latitude	Longitude	Etage bioclimatique
Hamмам Melouane	200 m	36°29' N	2°50' E	Un climat humide se distingue par un été chaud et tempéré et un hiver froid et humide; la pluviométrie atteint une moyenne de 700 mm/an.

(Meddour, 2002)

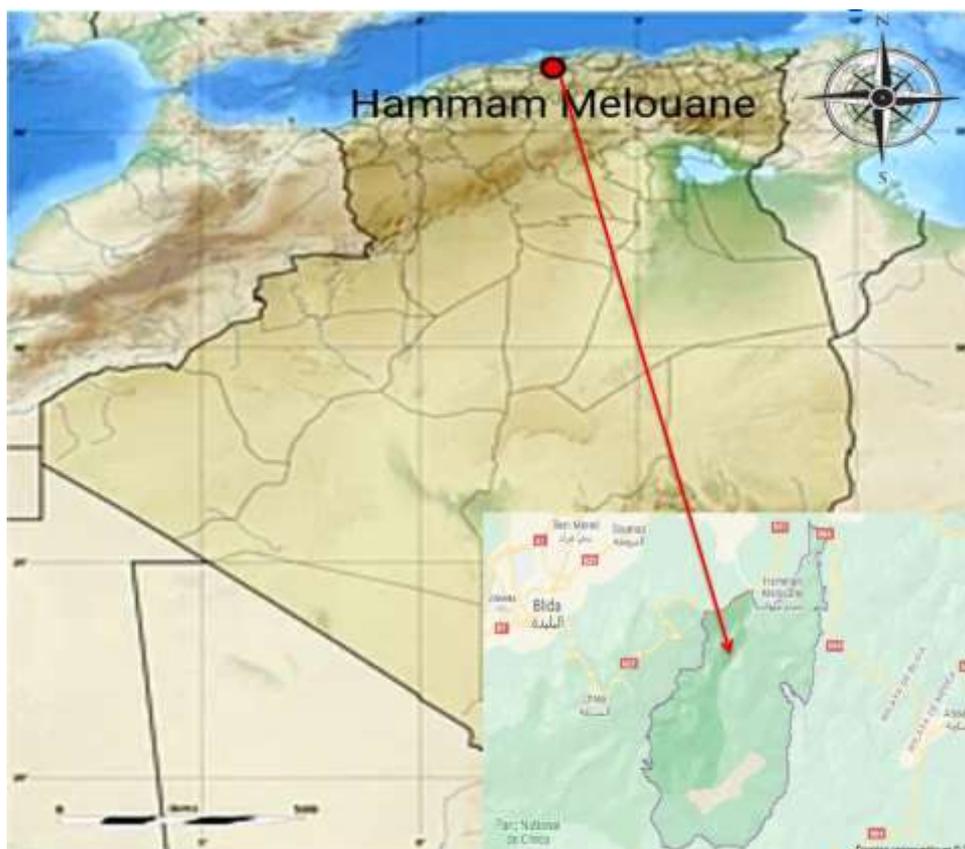


Figure 26 : Situation géographique de la région de récolte de l'espèce étudiée

2.2. Matériel non biologique

Le produit testé dans le cadre de cette thèse est une formulation commerciale d'un insecticide : le Voliam Targo[®] composé de deux matières actives appartenant à deux familles chimiques différentes: le chlorantraniliprole (45g/l, Anthranilamide) et l'abamectine (18g/l, Avermectine). Ce pesticide est communément utilisé en agriculture pour le traitement phytosanitaire des fruits et légumes (tomate, pommier, fraisier...ect). Le Voliam Targo[®] est importé et commercialisé en Algérie par la firme productrice SYNGENTA (annexe de Kouba, Alger).

Les réactifs (Annexe 2) et les kits de dosage biochimiques proviennent de sources commerciales ; Biosolve Chimie (Valkenswaard, Pays-Bas) et BIOLABO SAS (France).

3. Méthodes

3.1. Etude toxicologique

3.1.1. Protocol expérimental

Notre expérimentation animale a été réalisée dans le respect des principes éthiques et conformément aux directives de l'OCDE (2008), et aux principes des lignes directrices relatives à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales (National Research Council, 2010).

Vingt lapins mâles sont répartis en quatre lots de cinq lapins chacun. Avant toute expérimentation, les animaux sont soumis à une période d'acclimatation (21 jours) afin de s'adapter aux conditions du laboratoire et aux manipulateurs, et pour éviter que ces derniers ne soient pas des facteurs de variation durant notre étude toxicologique.

Les lapins ont été identifiés par un marquage spécifique (numérotation individuelle) au niveau de l'oreille de chaque lapin. Chaque animal est mis dans une cage métallique avec une étiquette sur laquelle sont mentionnées le lot, le numéro de lapin et le type de traitement.

Les lapins de chaque lot ont été pesés quotidiennement le matin durant la période d'acclimatation et la période du traitement. La quantité d'aliment et d'eau consommée par chaque lapin quotidiennement a été aussi déterminée.

▪ Protocol expérimental

Après 3 semaines d'acclimatation, les lapins ont été traités pendant 21 jours comme suit :

Groupe 1 (Témoin): Lapins mâles témoins, recevant en alternance jour par jour :

1^{er} jour : 1ml de l'eau distillée par gavage ;

2^{ème} jour : 1 ml de l'huile d'olive par gavage.

Groupe 2 (VT): Lapins mâles traités par l'insecticide VT recevant en alternance jour par jour :

1^{er} jour : une dose de Voliam Targo® contenant 4 mg/kg d'abamectin et 11 mg/kg de chlorantraniliprole par voie orale à l'aide d'une sonde de gavage. Avant chaque

administration de l'insecticide, les lapins sont pesés afin de déterminer la dose correspondante du produit calculée en mg/Kg/ poids corporel de l'animal.

2^{ème} jour : 1ml de l'eau distillée par gavage.

Groupe 3 (HET): Lapins mâles traités par HET recevant en alternance jour par jour :

1^{er} jour : 1 ml de l'huile d'olive par gavage ;

2^{ème} jour : une dose de 0.5 mg/Kg de l'huile essentielle de thym par gavage. La dose de HET administrée est calculée par rapport au poids corporel moyen de groupe.

NB : Le VT a été dilué dans de l'eau distillée avant l'administration ;

L'huile essentielle de thym a été diluée dans de l'huile d'olive.

Groupe 4 (VT+HET) : Lapins mâles traités par VT+HET recevant en alternance jour par jour :

1^{er} jour : une dose de Voliam Targo[®] contenant 4 mg/kg d'abamectin et 11 mg/kg de chlorantraniliprole par gavage ;

2^{ème} jour : une dose de 0.5 mg/Kg de l'huile essentielle de thym par gavage.

L'observation clinique des lapins est effectuée durant la période post-administration où les effets sont les plus marqués. Des pesées quotidiennes des animaux, de l'eau et de la nourriture sont effectuées pour le suivi de l'évolution pondérale et la consommation d'aliment et de boisson pendant la période expérimentale.

3.1.2. Sacrifice des animaux et prélèvements des échantillons

3.1.2.1. Prélèvement sanguin

A la fin de l'expérimentation, le prélèvement sanguin a eu lieu le matin, à jeun, par ponction de la veine marginale et centrale de l'oreille du lapin. Un volume d'environ 3 à 5 ml de sang est recueilli dans des tubes héparinés étiquetés, en vue de l'étude des paramètres biochimiques.

Les prélèvements sanguins sont immédiatement centrifugés à 3000 tours / min pendant 15 min, le plasma obtenu est récupéré dans des tubes éppendorfs et les échantillons ainsi récupérés sont maintenus à -20°C jusqu'au moment du dosage biochimique.

3.1.2.2. Prélèvement des organes

Au terme de l'expérimentation, les animaux sont sacrifiés par saignée. Après dissection, le foie, les reins, le cerveau et le cœur ont été prélevés et débarrassés de leurs tissus adipeux puis pesés ; Les tissus destinés à l'étude histologique et immunohistochimique ont été conservés dans une solution de formol tamponné à 10%.

3.1.3. Etude biochimique

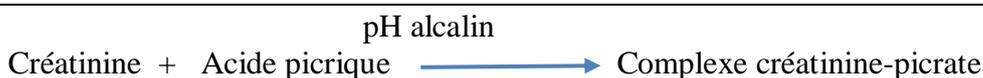
Le plasma obtenu est destiné au dosage des paramètres biochimiques de la fonction rénale : la créatinine et l'acide urique ; la fonction hépatique : la glycémie, l'aspartate aminotransferases (ASAT), l'alanine aminotransferases (ALAT) et le γ -Glutamyl Transférase (γ -GT), ainsi que des paramètres du bilan lipidique : le cholestérol total (CT) ; les triglycérides (TG), les lipoprotéines à haute densité (HDL-C) et les lipoprotéines à basse densité (LDL-C).

Le dosage des paramètres biochimiques a été réalisé à l'aide des kits enzymatiques spectrophotométriques disponible dans Biolabo (France) en utilisant l'analyseur automatique Hitachi 912 (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne).

3.1.3.1. Dosage de la créatinine

- **Principe**

La créatinine est une substance endogène produite par le métabolisme de la créatine dans les muscles surtout squelettiques. Le dosage de la créatinine plasmatique (créatinémie) a été réalisé selon une méthode colorimétrique (réaction de Jaffé). Au cours de la réaction, la créatinine se combine avec l'acide picrique en une solution alcaline pour former un complexe coloré rouge-orange. Le schéma réactionnel du dosage de la créatinine se résume comme suit (Fabiny et Ertingshausen, 1971) :



L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration en créatinine dans l'échantillon. Elle est déterminée par l'augmentation de l'absorbance à 490 nm (490 – 510 nm).

- **Calcul des concentrations**

Le résultat est déterminé d'après la formule suivante :

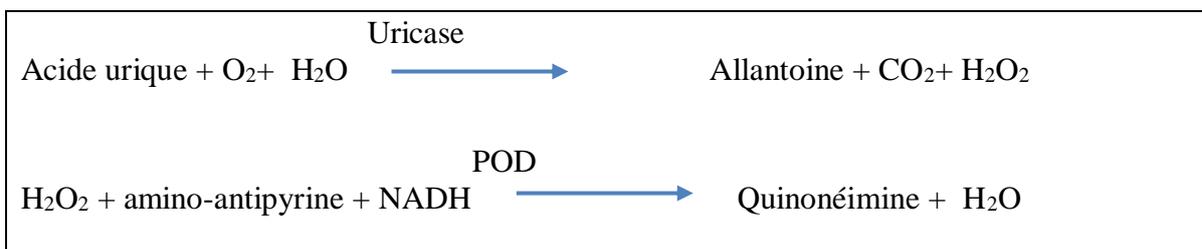
$$\text{Créatinine (mg/dl)} = \frac{\text{Abs échantillon}}{\text{Abs étalon}} \times \text{concentration de l'étalon (100 mg/dl)}$$

NB : la procédure de lecture et de calcul se fait par l'analyseur automatique.

3.1.3.2. Dosage de l'acide urique

- **Principe**

L'uricase agit sur l'acide urique pour produire de l'allantoïne, du dioxyde de carbone et du peroxyde d'hydrogène. En présence de peroxydase (POD), le peroxyde d'hydrogène réagit avec un chromogène (dichloro-hydroxybenzène sulfonates et aminoantipyrine) pour former une quinonéimine, complexe de couleur rouge. Le schéma réactionnel du dosage de l'acide urique se résume comme suivant (Fossati *et al.*, 1980):



L'absorbance mesurée à 505 nm, est proportionnelle à la concentration en acide urique dans l'échantillon.

- **Calcul des concentrations**

Le résultat est déterminé d'après la formule suivante :

$$\text{Acide urique (mg/dl)} = \frac{\text{Abs échantillon}}{\text{Abs étalon}} \times \text{concentration de l'étalon (100 mg/dl)}$$

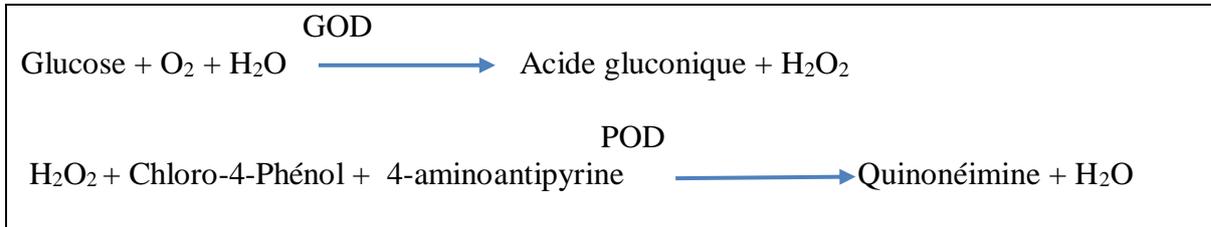
NB : la procédure de lecture et de calcul se fait par l'analyseur automatique.

3.1.3.3. Dosage de la glycémie

- **Principe**

La glycémie est dosée par la méthode enzymatique colorimétrique selon Trinder (1969). Le glucose est oxydé par le glucose oxydase (GOD) en acide gluconique et

peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ce dernier, en présence de peroxydase (POD), réagit avec le chloro-4-phenol et le chromogène incolore 4-amino antipyrine pour former une quinonéimine (composé coloré en rouge). Le schéma réactionnel du dosage du glucose se résume comme suivant :



L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration du glucose dans l'échantillon. La lecture est effectuée à une longueur d'onde de 500 nm.

▪ **Calcul des concentrations**

Le calcul de la concentration du glucose dans les échantillons est réalisé selon la formule suivante :

$\text{Glucose (mg/dl)} = \frac{\text{Abs échantillon}}{\text{Abs étalon}} \times \text{concentration de l'étalon (100 mg/dl)}$

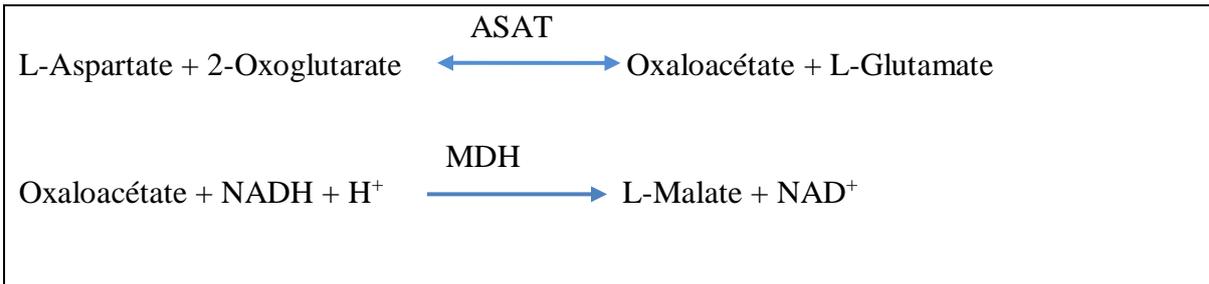
NB : la procédure de lecture et calcul se font par l'analyseur automatique.

3.1.3.4. Dosage des transaminases plasmatiques

❖ **Aspartate Amino-Transférase (ASAT)**

▪ **Principe**

L'aspartate amino-transférase (ASAT), appelée aussi oxaloacétate de glutamate transaminase (TGO), catalyse la transamination réversible de la L-aspartate et de la 2-oxoglutarate en oxaloacétate et en L-glutamate. L'oxaloacétate est alors réduit en malate en présence de la malate deshydrogénase (MDH) avec l'oxydation concomitante de la β-nicotinamide-adénine-dinucléotide (forme réduite) (NADH) en β-nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) (Henry *et al.*, 1960). Le schéma réactionnel se résume comme suivant:



La diminution de l'absorbance due à la conversion du NADH en NAD⁺, mesurée à 340 nm pendant un temps donné, est proportionnelle à l'activité de l'ASAT dans l'échantillon.

▪ **Calcul des concentrations**

Le résultat est déterminé d'après la formule suivante :

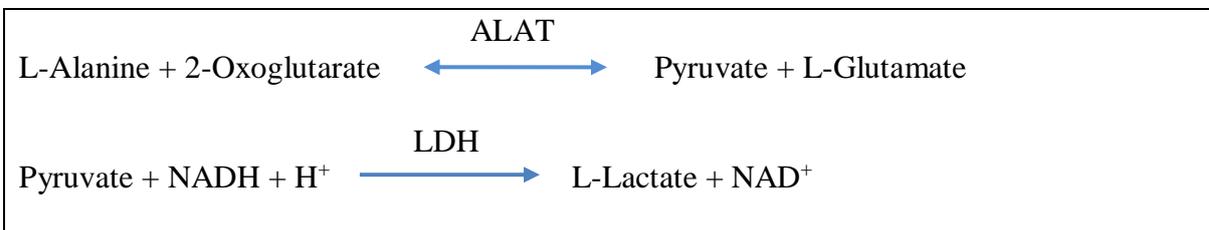
$$\text{ASAT (UI/L)} = \Delta\text{DO}/\text{min} \times 1746$$

NB : la procédure de lecture et de calcul se fait par un analyseur automatique.

❖ **Dosage de l'Alanine Amino-Transférase (ALAT)**

▪ **Principe**

L'alanine amino-transférase, appelée aussi pyruvate de glutamate transaminase (TGP), catalyse la transamination réversible de la L-alanine et de la 2-oxoglutarate en pyruvate et en L-glutamate. Le pyruvate est alors réduit en lactate en présence de la lactate déshydrogénase (LDH) avec l'oxydation concomitante de la NADH en NAD (Henry *et al.*, 1960). Le schéma réactionnel se résume comme suivant:



La diminution de l'absorbance due à la conversion du NADH en NAD⁺, mesurée à 340 nm pendant un intervalle de temps fixe, est proportionnelle à l'activité ALAT dans l'échantillon.

- **Calcul des concentrations**

Le résultat est déterminé d'après la formule suivante :

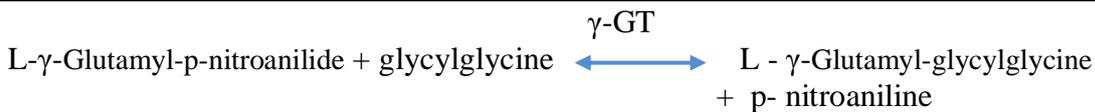
$$\text{ALAT (UI/L)} = \Delta\text{DO}/\text{min} \times 1746$$

NB : la procédure de lecture et calcul se font par l'analyseur automatique.

- ❖ **Dosage de γ -Glutamyl Transférase (γ -GT)**

- **Principe**

La γ -GT présente dans l'échantillon catalyse le transfert du groupe glutamyl du substrat vers la glycylglycine pour former la L- γ -glutamyl-glycylglycine et le p-nitroaniline. L'activité de la γ -Glutamyl Transférase est déterminée selon le schéma réactionnel suivant (Szasz, 1960) :



La vitesse de formation du p-nitroaniline, est directement proportionnelle à l'activité de la γ -GT présente dans l'échantillon et elle est mesurée à 405 nm.

- **Calcul des concentrations**

Le résultat est déterminé d'après la formule suivante :

$$\gamma\text{-GT (UI/L)} = \Delta\text{A}/\text{min} \times 2121$$

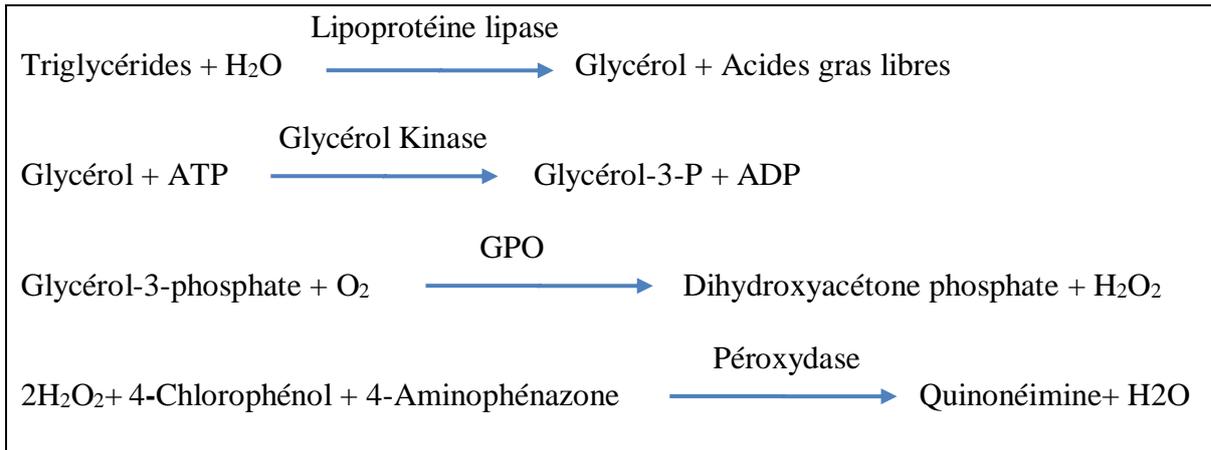
NB : la procédure de lecture et de calcul se fait par l'analyseur automatique.

3.1.3.5. Dosage des paramètres lipidiques

- ❖ **Dosage des triglycérides**

- **Principe**

Le dosage des triglycérides a été réalisé selon une méthode enzymatique colorimétrique décrite par Fossati et Prencipe (1982), selon le schéma réactionnel suivant:



L'intensité de la coloration rouge développée est directement proportionnelle à la concentration en triglycérides mesurée par photométrie à 500 nm.

▪ **Calcul des concentrations**

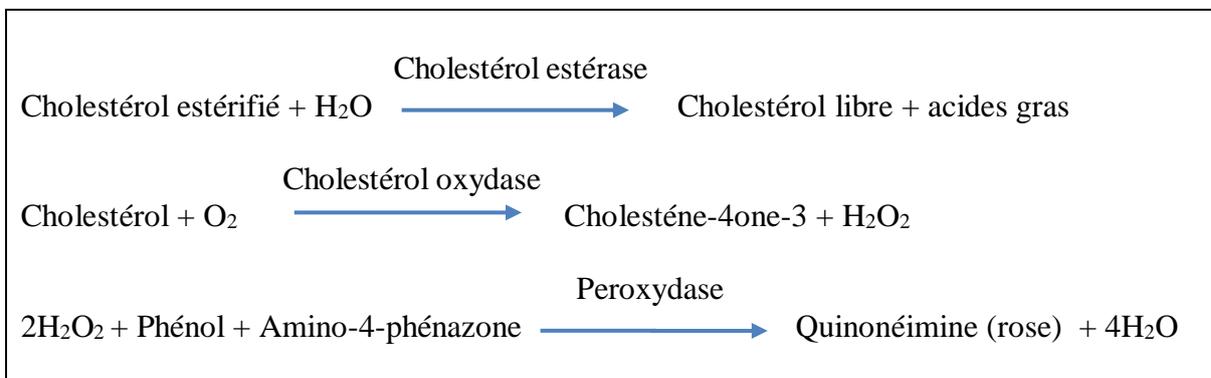
$$\text{Triglycérides (mg/dl)} = \frac{\text{Abs échantillon}}{\text{Abs étalon}} \times \text{Concentration de l'étalon (200 mg/dl)}$$

NB : la procédure de lecture et de calcul se fait par l'analyseur automatique.

❖ **Dosage du cholestérol total (CT)**

▪ **Principe**

Le dosage du cholestérol total plasmatique (CT) a été réalisé selon une méthode enzymatique colorimétrique décrite par Allain et al. (1974), selon le schéma réactionnel suivant :



L'intensité de la coloration développée est directement proportionnelle à la concentration en cholestérol dans l'échantillon. La lecture est effectuée à une longueur d'onde de 505 nm.

- **Calcul des concentrations**

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

NB : la procédure de lecture et de calcul se fait par l'analyseur automatique.

- ❖ **Dosage du HDL-cholestérol**

- **Principe**

Le dosage du cholestérol HDL (HDL-C) plasmatique a été réalisé selon une méthode enzymatique colorimétrique. Les LDL-C, les VLDL-C et les chylomicrons contenus dans l'échantillon sont précipités par addition d'acide phosphotungstique en présence d'ions magnésium. Le surnageant, après centrifugation, contient les HDL-C. Sous l'action de la cholestérol-estérase, les esters du cholestérol sont scindés en cholestérol libre et en acides gras. L'intensité de la coloration développée est directement proportionnelle à la concentration en cholestérol HDL. Elle est déterminée par l'augmentation de l'absorbance à 600 nm.

- ❖ **Dosage du LDL-cholestérol**

Le dosage de LDL-C se fait par la méthode directe avec l'utilisation des détergents sélectifs, sans prétraitement de l'échantillon.

Au cours de la première phase, seules les lipoprotéines non-LDL sont solubilisées par le détergent 1. Le cholestérol ainsi généré, soumis à l'action du cholestérol Oxydase (CO) et du cholestérol Estérase (CE), produit un composé incolore. Au cours de la seconde phase, le détergent 2 solubilise le cholestérol-LDL. Le couple chromogénique développe une réaction colorée proportionnelle à la concentration en cholestérol-LDL. La lecture s'effectue à 546 nm (520-580).

❖ Calcul de taux du VLDL-cholestérol

Le taux de VLDL-C a été déterminé à partir de la formule suivante (Króliczewska *et al.*, 2018) :

$$\text{VLDL-C} = \text{CT} - (\text{HDL-C} + \text{LDL-C})$$

De plus, pour une meilleure expression du rapport entre les TG et le HDL-C, le facteur d'indice athérogène du plasma (IAP) basé sur le rapport des taux plasmatiques des triglycérides aux taux de HDL-C a été calculé selon la formule suivante (Króliczewska *et al.*, 2018):

$$\text{IAP} = \text{Log} [\text{TG}] / [\text{HDL-C}]$$

D'autres facteurs athérogènes (FA) ont été aussi calculés à savoir, le rapport entre cholestérol total et HDL-C et le rapport entre LDL-C et HDL-C (Millán *et al.*, 2009).

3.1.4. Etude histologique

La confection des coupes histologiques permet l'observation des tissus au microscope photonique après une coloration spécifique. Elle comporte plusieurs étapes rapportées essentiellement par Martoja et Martoja (1967) et Gabe (1968).

➤ Fixation

La fixation permet d'immobiliser et de conserver les structures cellulaires et tissulaires dans un état aussi proche que possible de celui de l'organisme vivant. Les organes, fraîchement récoltés, sont plongés dans une solution de formol à 10%. C'est une étape importante dans la réalisation des techniques de préparation des échantillons histologiques et immunohistochimique ; la fixation se pratique par immersion des organes dans des flacons hermétiquement fermés et soigneusement étiquetés (numéro d'identification de l'animal, lot expérimental, nom de l'organe fixé et date de fixation).

➤ Circulation

La circulation comprend trois étapes : la déshydratation, l'éclaircissement et l'imprégnation. Elle permet d'éliminer graduellement l'eau contenue dans les tissus afin de le remplacer par un solvant de paraffine.

❖ **Déshydratation** : l'inclusion dans la paraffine nécessite au préalable la déshydratation des pièces histologiques. Les organes contenus dans les cassettes passent par des bains d'alcool à concentration croissante 70°, 90°, 95° et 100° respectivement pour réaliser une déshydratation en douceur.

❖ **Eclaircissement** : il s'effectue dans deux bains de xylène ; il permet d'éliminer toute trace d'alcool et préparé les tissus à la pénétration de la paraffine.

❖ **Imprégnation** : elle constitue l'étape finale de la circulation. Les cassettes sont imprégnées dans deux bains successifs de paraffine pure fondue pendant deux heures chacun, pour l'élimination du xylène.

➤ **Inclusion**

L'inclusion à la paraffine consiste à faire pénétrer le tissu par la paraffine qui donne la résistance mécanique lors de la réalisation des coupes au microtome. Dans cette étape, des moules métallique et des cassettes en plastiques sur lesquelles sont portées les indications de la pièce traitée ont été utilisés ; la paraffine fondue est versée dans les moules légèrement préchauffés (45°C). La pièce à inclure est orientée et disposée dans la paraffine ; on dépose la cassette correspondante sur le moule. Le bloc n'est démoulé qu'après refroidissement total sur une plaque refroidie au congélateur.

➤ **Confection des coupes**

Après fixation de bloc sur un microtome de type Leica, le rabotage est effectué en ajustant l'échelle à 20 µm ; lorsque la pièce apparaît dans le plan de coupes, l'échelle est ramenée à 2 µm afin d'obtenir des coupes sériées fines sous forme de rubans.

➤ **Etallement des coupes**

Les rubans obtenus sont déposés avec précaution sur 1 ml d'eau distillée étalée sur les lames, et disposés sur une plaque chauffante réglée à 40 C° ; la paraffine ramollit brusquement. L'excédent d'eau est retiré à l'aide de papier absorbant puis les lames sont séchées à l'étuve à 40 C° pendant 1h. L'identification de l'organe est préalablement gravée sur la lame correspondante à l'aide d'un diamant (lames ordinaires).

3.1.4.1. Coloration à l'hématoxyline-eosine

La coloration à l'hématoxyline-éosine (H&E) est la méthode de coloration la plus courante pour matériel histologique. Dans un premier temps, le colorant du noyau chargé positivement (hématoxyline) se fixe sur les groupes phosphates chargés négativement des

acides nucléiques du noyau cellulaire. Les noyaux prennent alors une couleur variant entre le bleu foncé et le violet foncé. La seconde étape réside dans la contre-coloration à un colorant xanthène anionique (éosine) chargé négativement ; le colorant se fixe aux protéines plasmatiques chargées positivement. Le cytoplasme et les éléments cellulaires basiques se colorent en rose à rouge.

Les coupes de tissus ont été déparaffinées dans deux bains de xylène pendant 10 min, puis réhydratées dans trois bains d'éthanol de degrés décroissants (100°, 90° et 70°) pendant 5 min chacun. Après rinçage à l'eau courante, les sections ont été colorées à l'hématoxyline de Harris pendant 6 min. Après un lavage à l'eau courante, une coloration à l'éosine pendant 1 min a été effectuée, suivi d'un autre lavage. Par la suite, les sections ont été déshydratées dans un bain d'éthanol (90°), éclaircies dans le xylène, puis monté à l'aide d'une résine synthétique (l'eukitt). Les lames ont été observées sous microscope photonique (Olympus, Zeiss AxioStar plus, Allemagne), après leur séchage.

3.1.4.2. Coloration au trichrome de Masson

C'est une coloration histologique, topographique, trichromique, associant à une coloration nucléaire (hématoxyline), une coloration cytoplasmique par un mélange de colorants acides (Fuchsine Ponceau) et une coloration élective du collagène (vert lumière). Elle est utilisée pour différencier les fibres de collagène et musculaires sur des coupes tissulaires.

Les coupes de tissus ont été déparaffinés dans deux bains de xylène pendant 10 min, puis réhydratées dans trois bains d'éthanol de degrés décroissants (100°, 90° et 70°) pendant 5 min chacun. Après rinçage à l'eau courante, les sections ont été colorées à l'hématoxyline de Groat pendant 2 min. Après lavage à l'eau courante, une coloration à la fuchsine Ponceau a été effectuée pendant 5 min, suivie d'un lavage puis une coloration à l'orange G phosphomolybdique pendant 5 min. Après rinçage, une coloration au vert lumière a été réalisée durant 5 min. Les sections ont par la suite été déshydratées dans un bain d'éthanol (100°), éclaircies dans du xylène, puis montées à l'aide d'une résine synthétique. Après séchage, les lames ont été observées sous microscope photonique.

3.1.5. Etude immunohistochimique

L'immunohistochimie (IHC) est la combinaison de l'immunologie et de l'histochimie. C'est une technique très importante et délicate, consiste à mettre en évidence

la localisation de protéines tissulaires, cytoplasmiques, membranaires ou nucléaires, spécifiques pour un type ou une fonction tissulaire in situ et l'évaluation de leur expression. Elle est basée sur une réaction spécifique immunologique de type Ag-Ac permettant la détection des protéines (antigène) cellulaires au moyen d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux.

Le couple anticorps-antigène (anticorps primaire) peut être visualisé par un anticorps secondaire conjugué à une enzyme (peroxydase) qui peut catalyser une réaction de production de couleur visualisable en lumière blanche du microscope optique (**Pluot et al., 2006**).

Plusieurs systèmes de révélation/ amplification sont utilisés en IHC. Le système avec polymère est celui utilisé dans notre étude. Il s'agit d'une technique en deux étapes, incubation de l'anticorps primaire dirigé contre l'antigène d'intérêt, puis incubation de l'anticorps secondaire directement couplé au polymère de type micro polymère sur lequel les marqueurs sont fixés.

❖ Réalisation des coupes

Les coupes doivent être épaisses de 5 μm afin de bien visualiser le marquage. L'étalement des coupes se fait sur des lames silanisées électro-statiquement équilibrées pour assurer l'adhésion des tissus et réduire le risque de décollement des coupes en température élevée. Le numéro du bloc et l'anticorps utilisé sont mentionnés sur la lame à l'aide d'un crayon. Ensuite, les lames sont séchées dans une étuve à 40°C pendant toute une nuit.

❖ Démasquage antigénique

Le démasquage permet de rendre accessibles les épitopes masqués naturellement ou suite à la fixation afin d'assurer la liaison anticorps-antigène (**Shi et al., 2001**). Il permet aux antigènes de retrouver leur conformation protéique initiale et les rend accessibles aux anticorps.

A la suite des étapes de déparaffinage et de réhydratation des sections tissulaires, un démasquage des sites antigéniques a été effectué par traitement à la chaleur dans une solution de tampon citrate (0.01M, pH=6). Après refroidissement, un rinçage au tampon

TBS (Tris-Buffered Saline) pendant 1 à 5 min a été réalisé ; les fragments ont été ensuite encerclés à l'aide d'un Dako pen pour éviter le déversement de marqueur.

❖ Blocage des peroxydases endogènes

Afin de bloquer les peroxydases endogènes, on verse quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 3%, sur les lames et on laisse réagir pendant 10 min. L'addition de H_2O_2 permet le blocage des peroxydases endogènes qui ont les mêmes récepteurs que le DAB (3.3' Diaminobenzidine). Les lames sont ensuite rincées dans deux bacs de TBS dilué au 1/20^{ème}, pendant 5 min chacun ; ce lavage permet d'enlever tout l'excès de produit précédent. Les lames seront égouttées pour ne pas diluer les anticorps.

❖ Application de l'AC primaire spécifique

Quelques gouttes de l'Ac d'intérêt sont déposées sur la partie encerclée du tissu sur la lame (Bcl-2 ou AFP). Les lames seront recouvertes et laissées incubées pendant 30 min. Puis, un lavage dans 2 bacs de tampon TBS (5 minutes chacun) sera réalisé. Les anticorps primaires utilisés sont les suivants :

- l'anticorps monoclonal de la souris qui reconnaît l'oncoprotéine Bcl-2 (clone Bcl-2/100/D5 ; code NCL-L-bcl-2, Novocastra).
- l'anticorps monoclonal de la souris qui reconnaît l'alpha foetoprotéine (clone AFP/C3 ; code NCL-L-AFP, Novocastra).

❖ Application de l'AC secondaire non spécifique

Quelques gouttes de l'AC secondaire conjugué à l'enzyme HRP (Horse Radish peroxydase), dilué à 1/100, sont déposées sur la lame, suivie d'une incubation de 30 min (code RE7260-K, Novocastra™, Leica BioSystem, Peroxidase/ DAB, Lapin/souris) ; c'est une étape d'amplification du signal. La réaction de DAB a ensuite été arrêtée par rinçage dans deux bacs de la solution TBS pendant 5 min chacun.

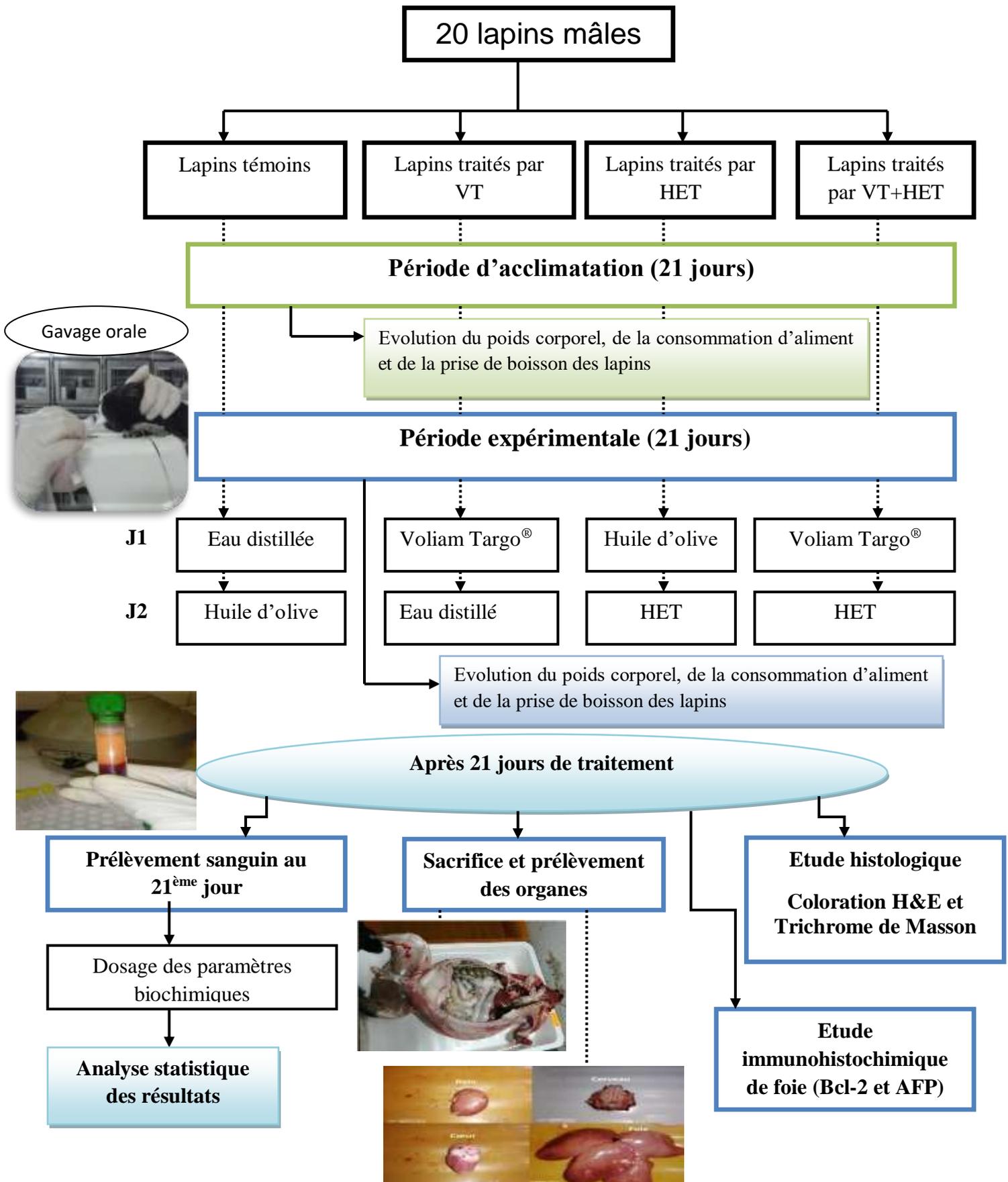
❖ Révélation

Quelques gouttes d'un révélateur, le chromogène DAB (3-3 diaminobenzidine), sont appliquées sur les coupes pendant 5 min, suivi d'un rinçage dans deux bacs de la solution TBS pendant 5 min chacun. L'enzyme HRP dégrade le substrat chromogène DAB, le produit qui en résulte donne une coloration marron détectable par microscopie optique.

❖ Contre coloration

Dans le but de colorer le noyau en bleu violet, les lames sont émergées dans l'hématoxyline de Mayer pendant 5 minutes puis rincées à l'eau courante pour enlever l'excès d'hématoxyline. Par la suite, un passage des lames dans un bain de l'eau ammoniacale a été effectué pour éliminer l'excès du colorant (Bleuitement), suivi par un rinçage à l'eau courante.

Enfin, les sections ont été déshydratées, éclaircies, montées puis observées sous microscope photonique, et des photomicrographies ont été prises aux grossissements x100 et x400 à l'aide d'un appareil photo (Leica wild MP 48) raccordé au microscope.



Organigramme de l'étude toxicologique

3.2. Extraction de l'huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle de thym a été effectuée par hydrodistillation (HD) au moyen d'un dispositif d'extraction type Clevenger. Cette technique se base sur le pouvoir que possède la vapeur d'eau à transporter les huiles essentielles.

L'opération consiste à introduire 200 g de masse végétale dans un ballon de 2 litres rempli d'eau distillée jusqu'aux 2/3 de sa capacité, pour éviter les débordements de l'ébullition. Le mélange est porté à ébullition pendant 3h à l'aide d'un chauffe ballon. Les vapeurs chargées d'huile essentielle, traversent le réfrigérant et se condensent ainsi avant de chuter dans une ampoule de décantation, l'huile se sépare par la suite de l'eau par différence de densité.

L'huile essentielle ainsi séparé de la phase aqueuse, contient des traces d'eau, afin de les éliminer, l'huile essentielle sera séchée avec du sulfate de sodium anhydre. L'huile séchée est séparée du sulfate de sodium par filtration sur de laine de verre. L'huile ainsi obtenue est récupérée et conservée dans des flacons opaques bien scellés à température basse (4°C).

3.2.1. Rendement de l'extraction de l'huile essentielle

Selon la norme AFNOR (1986), le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile essentielle extraite et le poids de la matière végétale utilisée. Il est exprimé en pourcentage et calculé par la formule ci-dessous:

$$R = (P_B / P_A) \times 100$$

R : Rendement en huile essentielle en % ;

P_B : Poids de l'huile essentielle en gramme ;

P_A : Poids de la matière végétale en gramme.

3.3. Étude analytique de l'huile essentielle

L'étude analytique d'une huile essentielle consiste à vérifier ses caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur), à déterminer ses indices physiques (densité et indice de réfraction) et à obtenir son profil chromatographique identifiant les différents constituants de l'huile essentielle.

3.3.1. Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle

Les différentes caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur) de l'essence du *Thymus vulgaris* ont été notées.

3.3.2. Mesure des constantes physiques

Les méthodes utilisées pour déterminer les indices physiques sont celles indiquées par le recueil de normes de l'Association Française de Normalisation (AFNOR).

❖ Détermination de la densité relative à 20°C (d^{20}) : (Norme NF T 75-111, AFNOR 2000)

C'est le rapport de la masse d'un certain volume d'une huile essentielle à 20°C, à la masse d'un volume égal d'eau à 20°C. Elle constitue un point de repère important.

➤ Mode opératoire et calcul

Les méthodes homologuées prévoient l'utilisation d'un pycnomètre ou d'un densimètre automatique pour la mesure de cette constante. Or dans notre pratique courante et par manque d'une quantité suffisante d'HE, nous étions dans l'obligation de procéder par une méthode de routine qui consistait à prélever par une micropipette un volume de 1 ml et de le peser avec une balance analytique de précision en prenant en considération le coefficient de correction de température :

$$d^{20} = (m \text{ HE} / m \text{ H}_2\text{O}) + (0,00073 * (T^\circ \text{ échant} - 20))$$

Où m : la masse en gramme.

❖ Détermination de l'indice de réfraction : (Norme NF ISO 280 75-112, AFNOR 1999)

C'est le rapport entre le sinus des angles d'incidence et de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'HE maintenue à une température constante.

➤ Mode opératoire et calcul

Régler le réfractomètre en mesurant l'indice de réfraction de l'eau distillée qui doit

être de 1,333 à 20°C. Après ouverture du prisme secondaire nous déposons 2 gouttes d'HE sur la partie centrale du prisme principal et nous fermons ensuite doucement le prisme secondaire ce qui permettra à l'HE de s'étaler entre les prismes principal et secondaire en un film mince.

La lecture de la mesure s'effectue à une température stable et cette valeur sera modifiée suivant le changement de température.

L'indice de réfraction n_t , à la température de référence t , est donné par l'équation suivante:

$$n_t = n_{t'} + 0,0004 (t - t')$$

Où $n_{t'}$: valeur de lecture, obtenue à la température t' , à laquelle a été effectuée la détermination.

3.3.3. Analyse chromatographique de l'huile essentielle de thym

❖ Principe de la CG-SM

Le spectromètre de masse couplé à un chromatographe en phase gazeuse (CG-SM) permet d'identifier et de quantifier les constituants d'un mélange de molécules volatiles.

En soumettant une HE à la CG-SM, nous déclenchons un processus à plusieurs étapes :

- ionisation des molécules qui se volatilisent sous l'effet de la haute température.
- accélération des ions formés qui se dirigent vers le dispositif de séparation.
- séparation des ions et leur distribution suivant leur rapport masse /charge et leur détection.
- traitement du signal : le signal de sortie de l'appareil conduit au spectre de masse qui constitue la représentation conventionnelle de l'abondance des ions en fonction de leurs rapports m/z .

La comparaison informatique du spectre d'un pic inconnu avec une ou plusieurs « bibliothèques » de référence permet son identification. Ce couplage augmente considérablement la quantité et la qualité des informations obtenues.

➤ **Conditions opératoires de la CG-SM**

L'analyse chromatographique d'HE a été effectuée sur un chromatographe en phase gazeuse type Hewlett-Packard (HP6890) couplé avec un spectromètre de masse (5973).

La fragmentation est effectuée par impact électronique à 70eV. La colonne utilisée est une colonne capillaire HP-5MS (30m x 0,25mm), l'épaisseur du film est de 0,25µm. La température de la colonne est programmée de 60 à 250°C à raison de 2°C/min. Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est fixé à 0.3 ml/min. Le mode d'injection est du mode split (rapport de fuite : 1/70). L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse NIST 98 et piloté par un logiciel « *HP ChemStation* » permettant de suivre l'évolution des analyses chromatographiques.

➤ **Identification des constituants**

L'identification des constituants a été faite sur la base de la comparaison de leurs indices de rétention avec ceux des composés de référence de la littérature. Une confirmation est apportée à l'aide des spectres de masse en comparaison avec ceux des composés standard de la banque de données informatisée (NIST 98).

La préparation de la table des n-alcanes pour la mesure des indices de Kovats des composés identifiés dans l'huile essentielle a été faite comme suit : Solution des n-alcanes de C₈ à C₂₆ (origine: Aldrich et FlukaChemicals) à 5% dans le pentane. Soit 0,1 g de chaque alcane dans 20 ml de pentane, conservé au réfrigérateur.

L'identification des composés a été effectuée par comparaison de leurs indices de rétention (indices de Kovats) et des spectres de masse ions-fragments caractéristiques obtenus expérimentalement à ceux cités dans la littérature et/ ou inventoriés dans les banques de bibliothèques spectrales (Wiley7, Nist 2002).

Les indices de Kovats (IK) sont calculés selon la formule suivante :

$$IK = 100 n + 100 * (TR_c - TR_n / TR_{n+1} - TR_n)$$

n: Nombre d'atomes de carbone de l'alcane élué avant le composé;

TR_c : Temps de rétention du composé ;

TR_n : Temps de rétention de l'alcane à n atomes de carbone élué avant le composé ;

TR_{n+1} : Temps de rétention de l'alcane à $n+1$ atomes de carbone élué après le composé.

3.4. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante *in vitro* a été évaluée par le test du piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle). Le pouvoir antioxydant de l'huile essentielle de thym a été estimé par comparaison avec un antioxydant de synthèse le Butyl Hydroxy Toluène (BHT).

▪ Principe du test du DPPH

Le DPPH est un radical stable à température ambiante et de couleur violette caractéristique. Il possède dans sa structure un électron non apparié sur un atome du pont azote-azote. Sa particularité provient de la modification de ses propriétés d'absorption UV/Visible selon son état : la forme oxydée (DPPH) absorbe à 517 nm alors que sa forme réduite (DPPH-H) ne présente pas de pic d'absorption.

En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH de couleur violette se réduit en un composé jaune (DPPH-H) dont l'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la capacité de l'antioxydant présent dans le milieu (Molyneux, 2004) (Figure 27).

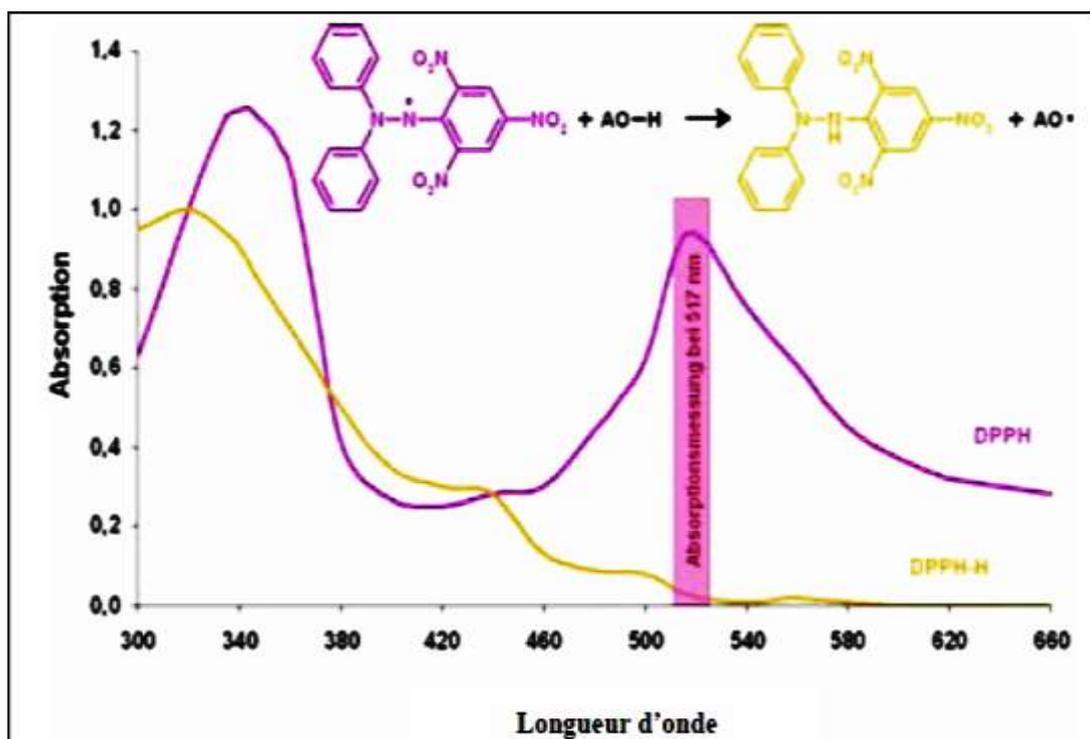


Figure 27 : Réaction de réduction du radical DPPH par un antioxydant (Matkowski *et al.*, 2008)

▪ Mode opératoire

La capacité de l'huile essentielle de thym à piéger le radical libre DPPH a été évaluée selon la méthode décrite par Sanchez-Moreno *et al.* (1998), suivi du calcul de la CI50 et de l'indice de l'activité antioxydante (IAA) (Scherer *et Godoy*, 2009).

- Une solution de 0,025 g/L de DPPH est préparée dans de l'éthanol absolu, le mélange de couleur violette est conservé à l'abri de la lumière pour éviter son oxydation.
- Un volume de 50 μ L de chacune des solutions éthanoliques d'huile essentielle préparées à différentes concentrations est mélangé avec 1950 μ L de la solution de DPPH. Le mélange est incubé pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'absorbance est mesurée à 517 nm par un spectrophotomètre.

Nous procédons de la même manière pour le BHT, un antioxydant de synthèse pris comme référence ou contrôle positif.

Un blanc composé de 50 μ L d'éthanol et 1950 μ L de la solution de DPPH est également préparé. Chaque essai est répété trois fois.

▪ Expression des résultats

L'activité antioxydante liée à l'effet de piégeage du radical DPPH est exprimé en pourcentage d'inhibition (PI) calculé selon la formule suivante :

$$\text{PI (\%)} = [(\text{Abs blanc} - \text{Abs échantillon}) / \text{Abs blanc}] \times 100$$

Abs blanc : Absorbance du blanc (DPPH dans l'éthanol) ;

Abs échantillon : Absorbance du composé d'essai.

Le graphique de la variation du pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration de l'extrait testé nous a permis de déterminer la CI50. La concentration inhibitrice (CI50) est définie comme étant la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% des radicaux libres dans le milieu réactionnel. Elle est inversement proportionnelle au pouvoir antioxydant d'un composé. En effet, plus la valeur de CI50 est faible, plus l'activité antioxydante est forte (Dung *et al.*, 2008). L'activité antioxydante est exprimée sous la forme de valeurs d'IC50 et d'IAA.

L'indice de l'activité antioxydante (IAA) est calculé selon l'équation suivante:

$$\text{IAA} = \text{concentration finale de DPPH (mg/ml)} / \text{IC50 (mg/ml)}$$

Les résultats d'IAA sont exprimés comme suit: IAA < 0.5 → faible activité antioxydante; 1 > IAA > 0.5 → activité antioxydante modérée; 2 > IAA > 1 → forte activité antioxydante; IAA > 2 → très forte activité antioxydante.

3.5. Analyse Statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± standard de déviation (SD). Les différences dans les moyennes des variables quantitatives entre les différents groupes ont été analysées en utilisant le test ANOVA à un seul facteur (One-way) suivi par le test post-hoc de Duncan.

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel STATISTICA version 10.0 (StatSoft Inc). Les variables ont été considérées comme indiquant une différence statistiquement significative pour une valeur p inférieur à 0.05.

La différence entre les moyennes est significative si :

$P < 0.001$*** hautement significatif

$P < 0.01$** très significatif

$P < 0.05$* significatif

$P \geq 0.05$ non significatif

1. Résultats de l'étude toxicologique

Aucune mortalité n'a été constatée chez les animaux lors de l'expérimentation. Durant la période de traitement, des signes cliniques de toxicité ont été observés chez les lapins traités par le VT à savoir une baisse d'activité, des tremblements, agitation et des rougeurs au niveau des yeux.

1.1. Effet du traitement sur l'évolution pondérale des lapins

Le poids des lapins a été noté quotidiennement le matin, pendant l'acclimatation, et la période de l'expérimentation. Le tableau VI résume l'évolution du poids corporel des lapins témoins et traités par semaine de traitement.

Les résultats des variations du poids corporel des lapins des différents lots montrent :

- Au cours de l'acclimatation, une prise de poids homogène dans chaque lot avec une légère variation non significative entre les quatre lots.
- Pendant l'expérimentation, on remarque une prise de poids homogène chez les lapins témoins, traités par HET et traités par VT + HET. Cependant, une diminution très significative ($p < 0,01$) du poids corporel moyen des lapins traités par VT en comparaison avec les lapins des autres groupes est observée.

Tableau VI : Variation du poids corporel moyens des lapins pendant la période d'acclimatation (21 jours) et la période expérimentale (21 jours)

	Période	Témoin	HET	VT	VT + HET	
Poids corporel (kg)	Acclimatation	S 1	2.49 ± 0.02	2.50 ± 0.03	2.60 ± 0.04	2.57 ± 0.03
		S 2	2.53 ± 0.03	2.67 ± 0.03	2.66 ± 0.05	2.62 ± 0.05
		S 3	2.71 ± 0.03	2.84 ± 0.07	2.81 ± 0.06	2.76 ± 0.09
	Expérimentation	S 1	2.88 ± 0.02	2.93 ± 0.03	2.84 ± 0.07	2.91 ± 0.09
		S 2	2.93 ± 0.03	3.05 ± 0.04	2.82 ± 0.08^{b**,c**}	3.08 ± 0.06
		S 3	3.12 ± 0.01	3.11 ± 0.03	2.85 ± 0.11^{a**,b**,c**}	3.12 ± 0.08

Résultats exprimés en moyenne ± SD (N=5). S : semaine. a**, b**et c** : $p < 0,01$ (a : différence très significative par rapport au groupe témoin, b : différence très significative par rapport groupe HET, c : différence très significative par rapport au groupe VT + HET).

1.2. Effet du traitement sur la prise de l'aliment

La quantité moyenne d'aliment consommé en (g) durant la période d'acclimatation et la période d'expérimentation par semaine est représentée dans le tableau VII.

D'après les résultats obtenus, on remarque une perturbation de prise d'aliment pendant la 1^{ère} et la 2^{ème} semaine d'acclimatation. Cependant, la consommation d'aliment devient homogène entre les quatre lots durant la 3^{ème} semaine d'acclimatation.

Durant la période expérimentale, une diminution significative de la consommation d'aliment chez l'ensemble des lapins traités par le VT par rapport aux autres lots a été notée pendant la 2^{ème} et la 3^{ème} semaine de l'expérimentation. Cependant, la co-administration de HET avec le VT a permis d'améliorer la quantité moyenne d'aliments prise par les lapins mais qui reste significativement inférieur à celle des lapins témoins.

Tableau VII : Variation de la consommation moyenne d'aliments chez les lapins pendant la période d'acclimatation (21 jours) et la période expérimentale (21 jours)

	Période	Témoin	HET	VT	VT + HET	
Prise d'Aliments (g/lapin)	Acclimatation	S 1	91.91 ± 5.62	120.11 ± 12.46^{a*}	84.88 ± 9.72^{b**}	107.94 ± 9.37
		S 2	130.51 ± 1.11	171.34 ± 6.50^{a***}	156.56 ± 10.55^{a*}	145.43 ± 6.51^{b*}
		S 3	159.56 ± 5.28	183.33 ± 6.88	177.90 ± 9.17	176.46 ± 6.23
	Expérimentation	S 1	138.60 ± 4.69	141.70 ± 4.17	127.75 ± 6.71	135.05 ± 4.66
		S 2	163.00 ± 5.93	155.10 ± 3.04	113.73 ± 6.97^{a***,b*}	136.63 ± 4.76^{a**}
		S 3	188.80 ± 5.02	163.00 ± 2.10	86.55 ± 9.21^{a***,b***,c**}	143.75 ± 3.19^{a***}

Les résultats sont donnés en moyenne ± SD (n=5). S : semaine. a* et b* : p < 0,05 ; a**, b**et c** : p < 0,01 ; a*** et b*** : p < 0,001 (a : différence par rapport au groupe témoin, b : différence par rapport groupe HET, c : différence par rapport au groupe VT + HET).

1.3. Effet du traitement sur la prise d'eau

La prise d'eau moyenne en ml durant la période d'acclimatation et la période d'expérimentation par semaine est représentée dans le tableau VIII.

On note une perturbation de la prise d'eau pendant la 1^{ère} semaine d'acclimatation entre les différents lots. Alors que durant la 2^{ème} et 3^{ème} semaine, une homogénéisation de la quantité moyenne de l'eau prise par les lapins des quatres lots a été observée.

Contrairement, au cours de l'expérimentation une diminution significative de la consommation d'eau est observée uniquement chez le lot traité par le VT pendant la 3^{ème} semaine de l'expérimentation. Alors que chez le lot traité par VT+HET, la consommation journalière de l'eau était comparable à celle chez le lot témoin et le lot traité par HET durant toute la période expérimentale.

Tableau VIII : Variation de la consommation moyenne de l'eau chez les lapins pendant la période d'acclimatation (21 jours) et la période expérimentale (21 jours)

	Période	Témoin	HET	VT	VT + HET	
Prise de boisson (ml / lapin)	Acclimatation	S 1	32.06 ± 0.55	73.28 ± 5.45^{a**}	47.74 ± 3.74	36.68 ± 1.25^{b**}
		S 2	75.18 ± 14.13	101.77 ± 6.05	102.77 ± 7.58	97.17 ± 7.69
		S 3	129.50 ± 4.09	141.20 ± 5.80	118.56 ± 5.98	128.33 ± 9.55
	Expérimentation	S 1	138.05 ± 7.57	148.30 ± 19.72	147.75 ± 17.85	135.10 ± 14.70
		S 2	133.10 ± 04.28	141.83 ± 12.24	117.77 ± 8.80	143.67 ± 13.59
		S 3	135.60 ± 2.75	139.55 ± 12.37	107.46 ± 7.98^{a*,b*,c*}	127.50 ± 15.64

Les résultats sont donnés en moyenne ± SD (n=5). S : semaine. a*, c* et b* : p < 0,05 ; a**et b** : p < 0,01 (a : différence par rapport au groupe témoin, b : différence par rapport groupe HET, c : différence par rapport au groupe VT + HET).

1.4. Variations du poids absolu et relatif des organes

Les valeurs absolues et relatives du poids moyen des organes enregistrées à la fin de l'expérience pour les 04 lots de lapins sont reportées dans le tableau IX, sur lequel on note les observations suivantes :

-Le poids absolu du rein droit et gauche du lot traité par le VT est significativement plus élevé au poids absolu des reins du lot témoin. Le poids relatif du rein droit et gauche est significativement supérieur chez le groupe traité par l'insecticide en comparaison au groupe

témoin. Tandis que chez le lot traité par l’insecticide plus l’huile essentielle de thym, on note que le poids moyen absolu et relatif des reins droit et gauche est très proche de celui de lot témoin.

- Par ailleurs, le VT a entraîné une diminution significative des poids moyens absolu et relatif de cœur chez les lapins traités comparativement aux témoins. Cependant, le poids moyen de cœur chez le lot traité par VT+HET était similaire à celui chez le lot témoin.

- Les poids absolus et relatifs du foie n’étaient pas influencés par l’exposition subaigüe à l’insecticide VT.

Tableau IX : Effet du traitement sur le poids absolu (g) et relatif des organes des lapins expérimentaux

Organes/ Poids (g)	Témoin	HET	VT	VT+HET
Rein Droit				
Poids absolu	7.01 ± 0.18	7.15 ± 0.52	7.78 ± 0.18^{a*}	6.95 ± 0.18
Poids relatif	0.23 ± 0.005	0.24 ± 0.004	0.25 ± 0.002^{a*}	0.24 ± 0.007
Rein Gauche				
Poids absolu	6.65 ± 0.34	7.41 ± 0.40	7.86 ± 0.18^{a*}	7.06 ± 0.08
Poids relatif	0.22 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.26 ± 0.002^{a**}	0.23 ± 0.01
Cœur				
Poids absolu	7.67 ± 0.02	6.95 ± 0.32	6.84 ± 0.22^{a*}	7.39 ± 0.27
Poids relatif	0.25 ± 0.002	0.24 ± 0.03	0.22 ± 0.003^{a*}	0.25 ± 0.01
Foie				
Poids absolu	75.01 ± 2.5	73.20 ± 3.45	72.14 ± 5.9	68.38 ± 0.32
Poids relatif	2.61 ± 0.03	2.42 ± 0.09	2.47 ± 0.08	2.38 ± 0.11

Les résultats sont donnés en moyenne ± SD pour cinq lapins dans chaque groupe. a* indique une différence significative par rapport au groupe témoin (p < 0,05), a** indique une différence très significative par rapport au groupe témoin (p < 0,01).

1.5. Paramètres biochimiques

1.5.1. Paramètres biochimiques de la fonction rénale

L'effet de l'exposition subaigüe au VT et/ou HET sur les paramètres biochimiques de la fonction rénale chez le lapin est représenté dans la planche 1.

L'administration du Voliam targo® a induit une augmentation significative (p < 0.05) du taux plasmatique de l'acide urique et de la créatinine par rapport au lot témoin (2.70 ± 0.62 mg/dl

vs 1.73 ± 0.35 mg/dl ; 3.58 ± 0.82 mg/dl vs 1.14 ± 0.07 mg/dl, respectivement). Néanmoins, la co-administration d'huile essentielle de thym a permis de restaurer le taux élevé des biomarqueurs de la fonction rénale vers les normes.

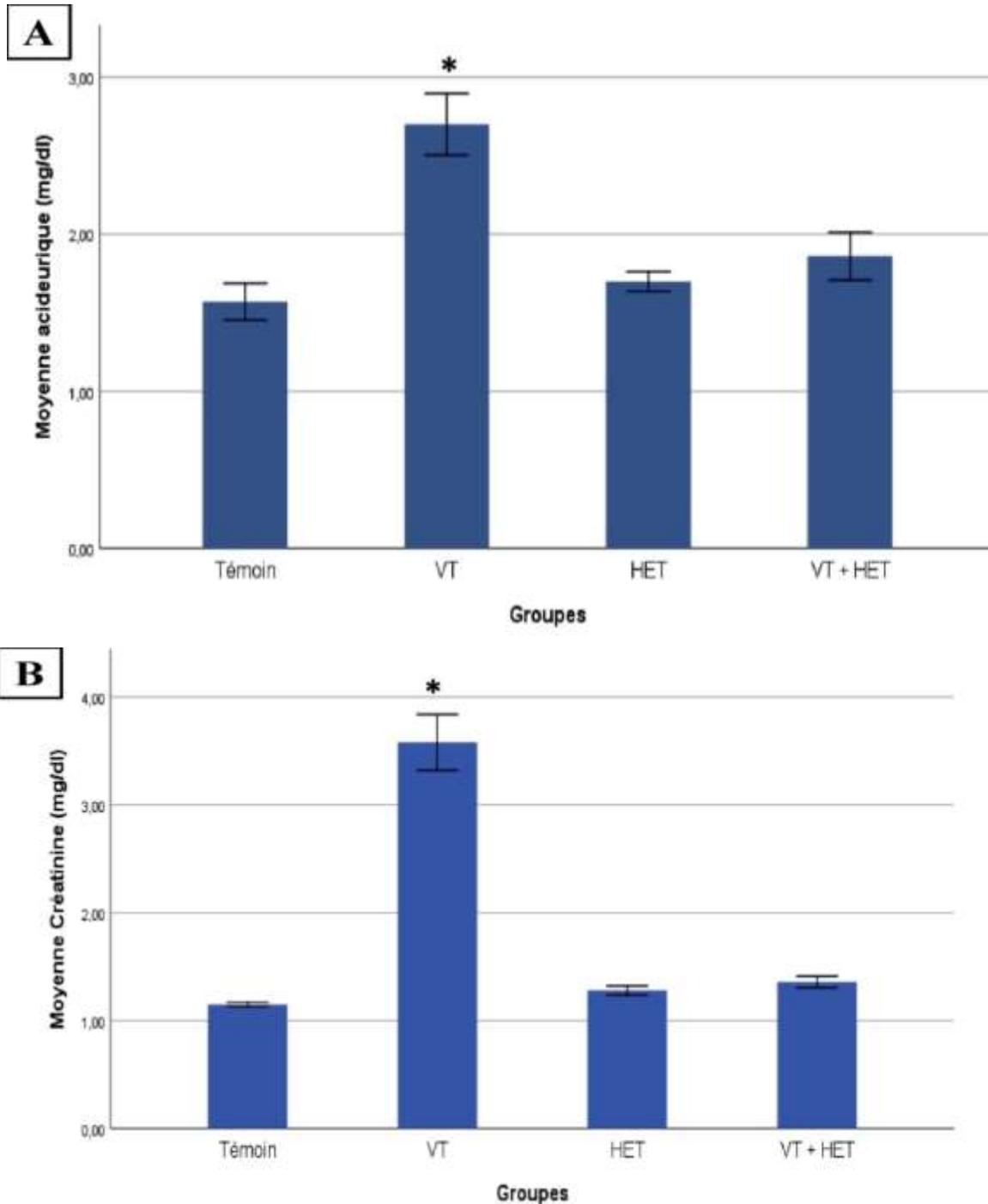


Planche 1: Effet du traitement sur les paramètres biochimiques de la fonction rénale (acide urique et créatinine) chez les lapins expérimentaux. * Significativement différent ($p < 0.05$) par rapport aux autres groupes.

1.5.2. Paramètres biochimiques de la fonction hépatique

L'administration orale de VT pendant 21 jours a entraîné une augmentation significative des taux sériques d'ASAT, d'ALAT et de γ -GT en comparaison au groupe témoin. En revanche, la co-administration de l'HE de *T. vulgaris* a permis de corriger les variations causées par le VT (Planche 2).

De plus, le taux plasmatique en glucose augmente significativement chez les lapins traités par le VT par rapport au lot témoin (145.00 ± 7.78 mg/dl vs 106.4 ± 8.06 mg/dl, $p < 0.05$). Cependant, nous avons noté une diminution de la glycémie chez le lot traité par VT+HET en comparaison avec le lot traité par le VT (127.60 ± 9.68 mg/dl vs 145.00 ± 7.78 mg/dl, $p < 0.05$, respectivement).

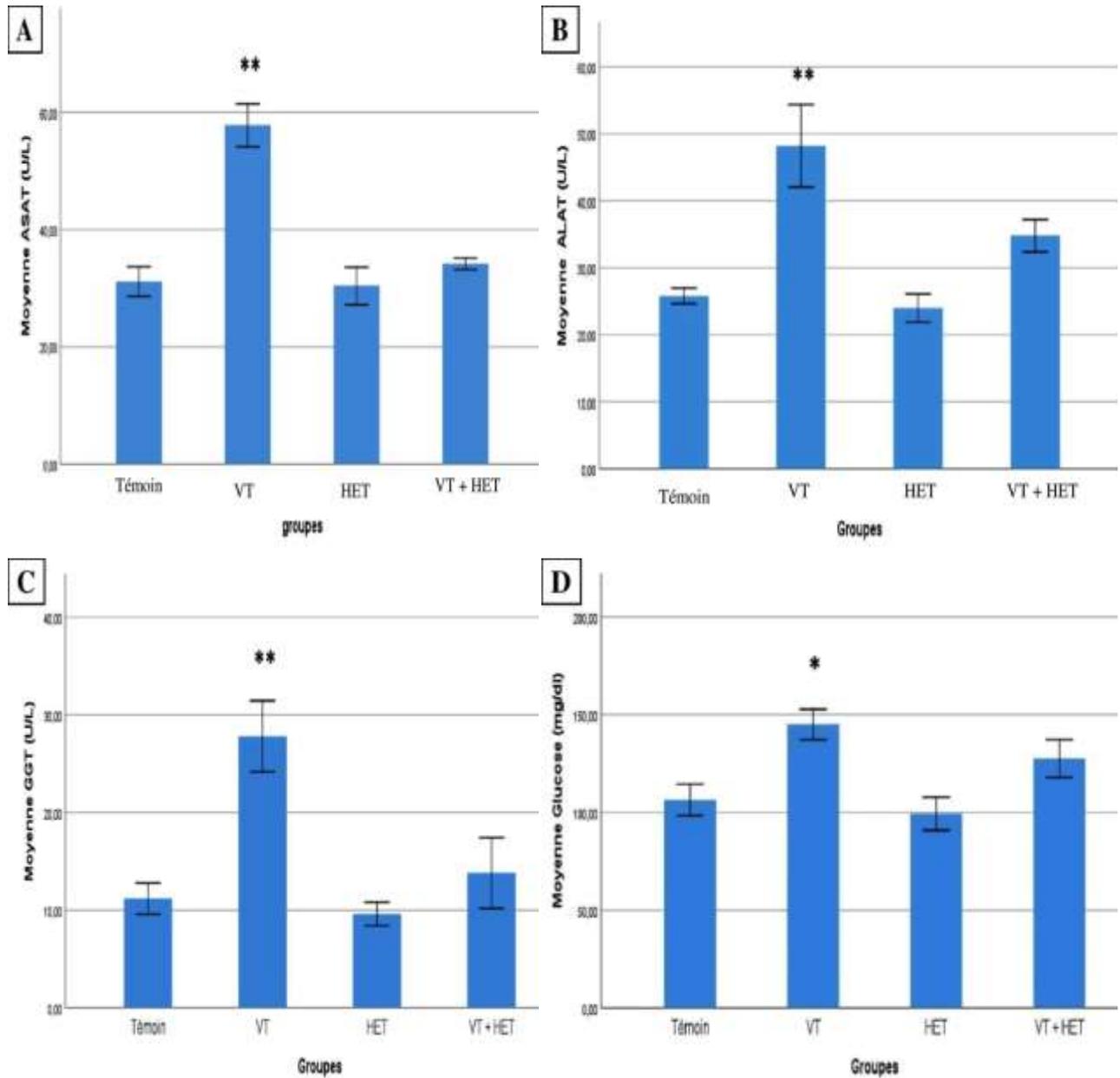


Planche 2 : Effet du traitement sur les paramètres biochimiques de la fonction hépatique (ASAT, ALAT, γ -GT et glucose) chez les lapins expérimentaux. * Significativement différent ($p < 0.05$) par rapport au groupe témoin et au groupe HET ; ** Très significativement différent ($p < 0.01$) par rapport aux autres groupes.

1.5.3. Paramètres biochimiques du bilan lipidique

L'exposition subaiguë au VT a provoqué une perturbation de certains paramètres lipidiques à savoir une diminution significative du taux de cholestérol total, LDL-c et du facteur athérogène LDL-c /HDL-c. Par contre, aucune différence significative des différents paramètres biochimiques du bilan lipidique entre le lot traité par VT+HET et le lot témoin n'a été observée. Par ailleurs, une diminution significative du rapport LDL-c /HDL-c et du l'IAP a été observée chez les lapins traités par HET en comparaison avec les lapins témoins (Planche 3).

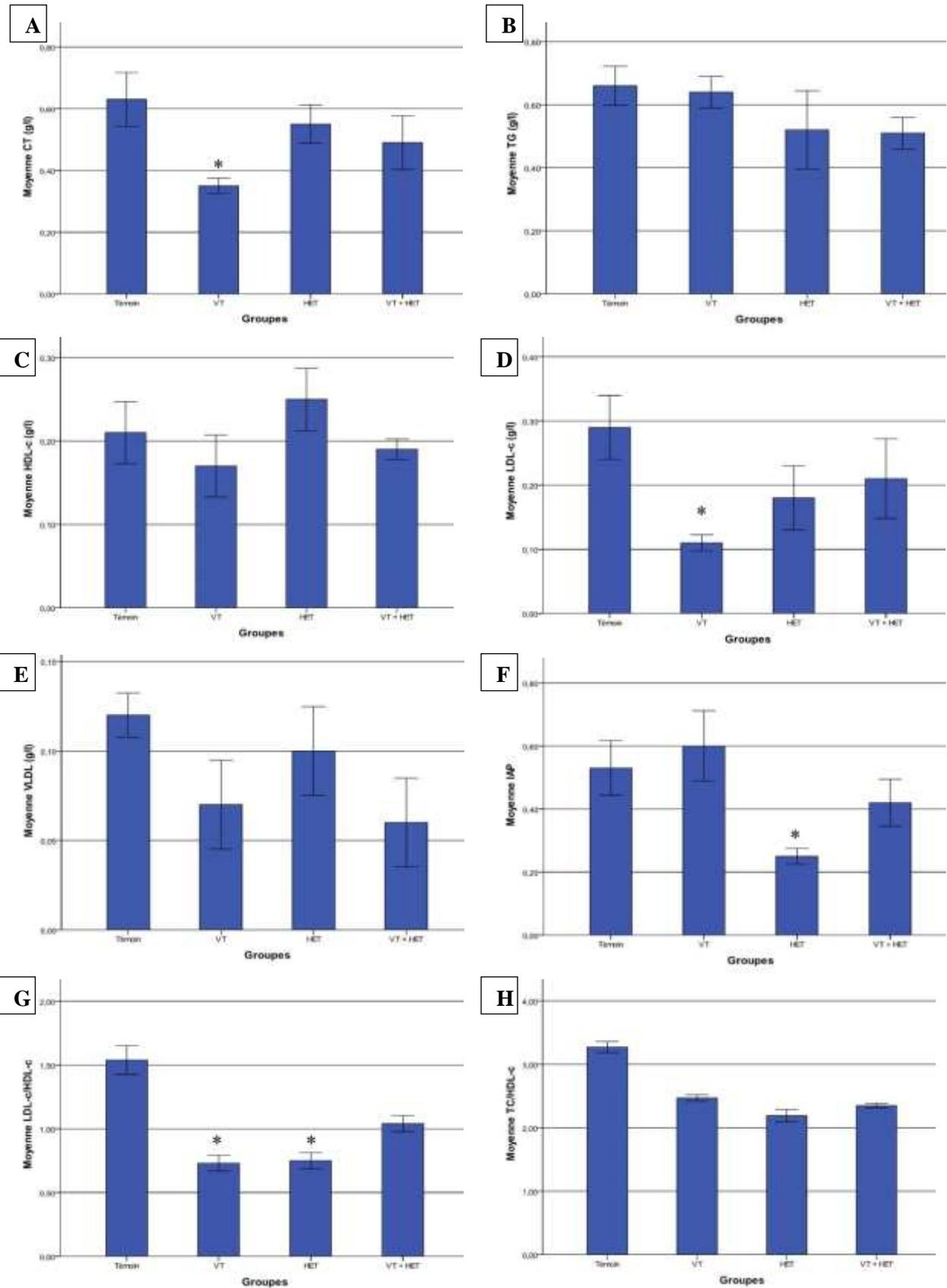


Planche 3 : Effet du traitement sur les paramètres biochimiques du bilan lipidique (CT, TG, HDL-c, LDL-c, VLDL-c, IAP, LDL-c/HDL-c et TC/HDL-c) chez les lapins expérimentaux. * Significativement différent ($p < 0.05$) par rapport aux autres groupes.

1.6. Aspects histologiques

Nous avons réalisé deux types de colorations topographiques, l'hématoxyline-éosine (H&E) et le Trichrome de Masson, afin de mettre en évidence les lésions histologiques causées par le pesticide VT et rechercher l'effet protecteur de l'huile essentielle de thym supplémenté par gavage.

1.6.1. Histopathologie du rein

L'observation microscopique des coupes histologiques du rein aux différents grossissements nous a permis de saisir l'architecture rénale ainsi de comparer l'aspect histologique des quatre lots étudiés.

Le parenchyme rénal est entouré d'une capsule conjonctive du tissu fibreux qui le protège ; il est constitué de deux zones concentriques de teintes et de textures différentes : une zone externe périphérique, la corticale, qui comporte les glomérules, les tubes contournés proximaux et distaux et les tubes collecteurs ; et une partie centrale, la médullaire.

Histologie du parenchyme rénal des lapins témoins

L'analyse microscopique des coupes histologiques du parenchyme rénal chez les lapins témoins à différents grossissements révèle une organisation normale du rein, avec une architecture classique.

L'architecture du cortex rénale du lapin témoin, montre au faible grossissement (Planches 4A et 5A) des corpuscules rénaux qui tendent à se disposer en rangées parallèles perpendiculairement à la capsule dans le cortex labyrinthe. La majeure partie du tissu qui entoure les glomérules dans le cortex est constituées de tubes contournés proximaux (TP) et distaux (TD).

Le fort grossissement (Planches 4B et 5B) permet de bien visualiser les constituants du cortex rénal, et qui sont :

- **Les corpuscules rénaux, ou corpuscules de Malpighi** : chaque glomérule apparaît comme une structure dense plus ou moins arrondie, et entourée par une zone claire, c'est la chambre glomérulaire ou l'espace de Bowman.
- **Le tube contourné proximal** : caractérisé par une lumière étroite et un épithélium cubique simple ; ses cellules sont munies d'une bordure en brosse apicale, indicatrice d'une fonction d'absorption.

- **Le tube contourné distal** : présente un épithélium cylindrique, une lumière nette et plus importante, avec l'absence de bordure en brosse.

Histologie du parenchyme rénal des lapins traités par HET

A partir des planches 4 et 5, on remarque que les lapins traités par l'huile essentielle de thym présentent un parenchyme rénal comparable à celui du groupe témoin, sans lésions histopathologiques visibles.

Histologie du parenchyme rénal des lapins traités par l'insecticide VT

Contrairement aux témoins, l'examen microscopique par un faible puis un fort grossissement des coupes histologiques du tissu rénal des lapins exposés à un traitement subaiguë de Voliam Targo® pendant 21 jours révèle la présence d'une architecture désorganisée du parenchyme rénal ainsi de nombreuses altérations structurales et cellulaires, représentées dans la planche 4E et F et la planche 5E et F, qui se manifestent par :

- Congestion vasculaire ;
- Dilatation des vaisseaux sanguins ;
- Des foyers de nécrose tubulaire avec dilatation de quelques tubules contournés proximaux et distaux ;
- Dilatation de la chambre glomérulaire et une destruction de certains glomérules ;
- Infiltration des cellules inflammatoires en région corticale.

Ces modifications affectent la filtration glomérulaire et la réabsorption tubulaire.

Histologie du parenchyme rénal des lapins traités par VT+HET

L'observation microscopique du cortex rénal des lapins traités par l'insecticide et co-administrés par l'huile essentielle de thym montrent une architecture semblable à celle des témoins et moins désorganisée comparativement à celle observée chez le lot traité par le VT uniquement (Planche 4G et H, Planche 5G et H). Les changements positifs causés par l'huile essentielle de thym apparaissent à travers l'observation d'une dilatation moins importante des tubules et des congestions locales très faibles.

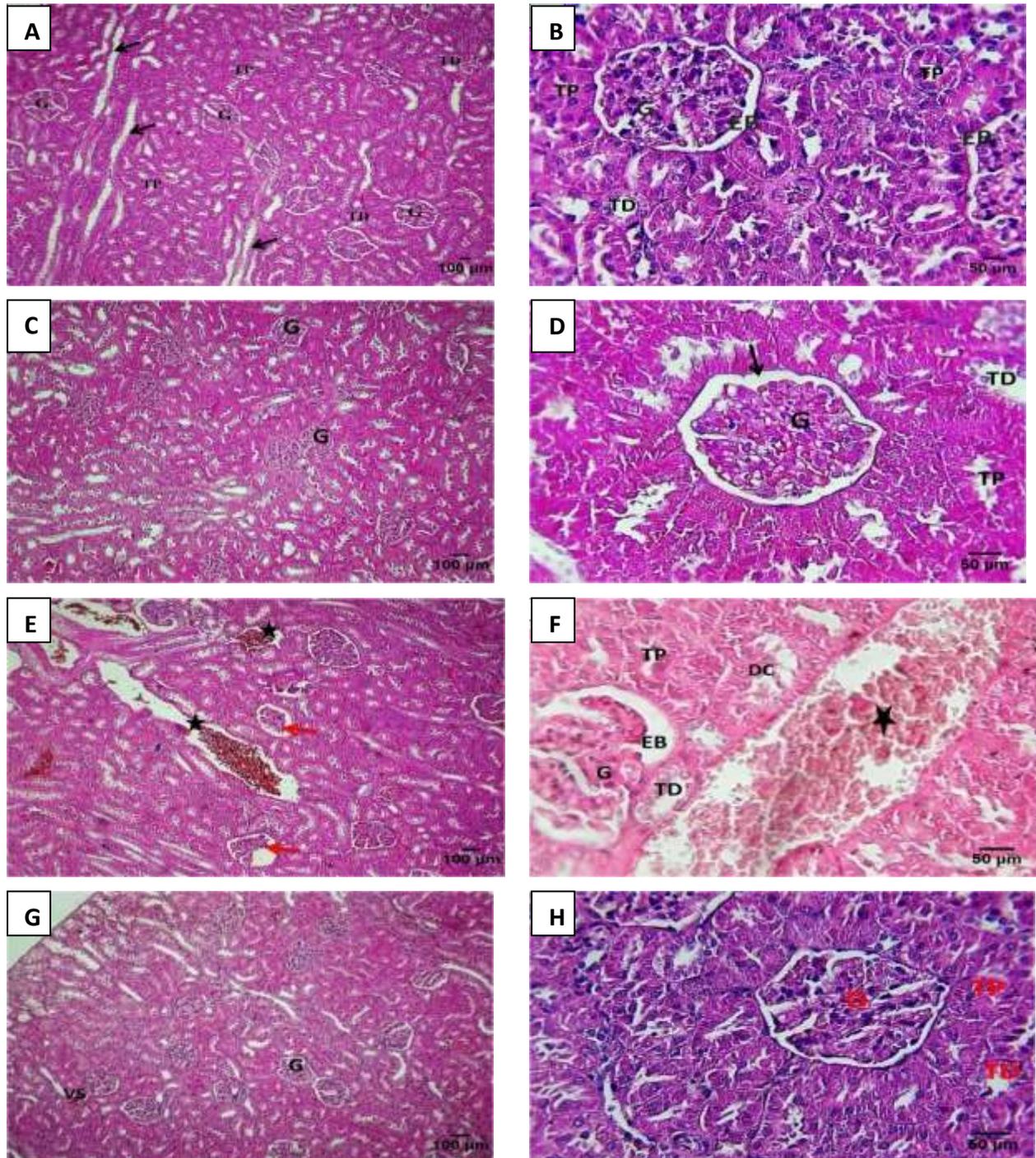


Planche 4 : Aspect histologique du cortex rénal des lapins expérimentaux (A, C, E, G): X 100, (B, D, F, H) : X 400 coloration H&E.

Légende: Les sections des lapins témoins (A et B) et des lapins traités par HET (C et D) montrent un aspect histologique normal du parenchyme rénal avec une architecture typique des glomérules (G), des tubules contournés proximaux (TP) et distaux (TD). Les sections des lapins traités par VT (E et F) montrent une architecture désorganisée du parenchyme rénal avec de nombreuses altérations cellulaires à savoir une congestion et une dilatation des vaisseaux sanguins (Asthérisque), des foyers de nécrose tubulaire (DC) avec dilatation de quelques tubules contournés proximaux (TP) et distaux (TD) et une dilatation de la chambre glomérulaire (Flèche rouge). Les sections des lapins traités par VT + HET (G et H) montrent une structure classique du cortex rénal sans lésion visible. EB : espace de Bowman, VS : vaisseau sanguin, Flèche noir : pyramide de Ferrari.

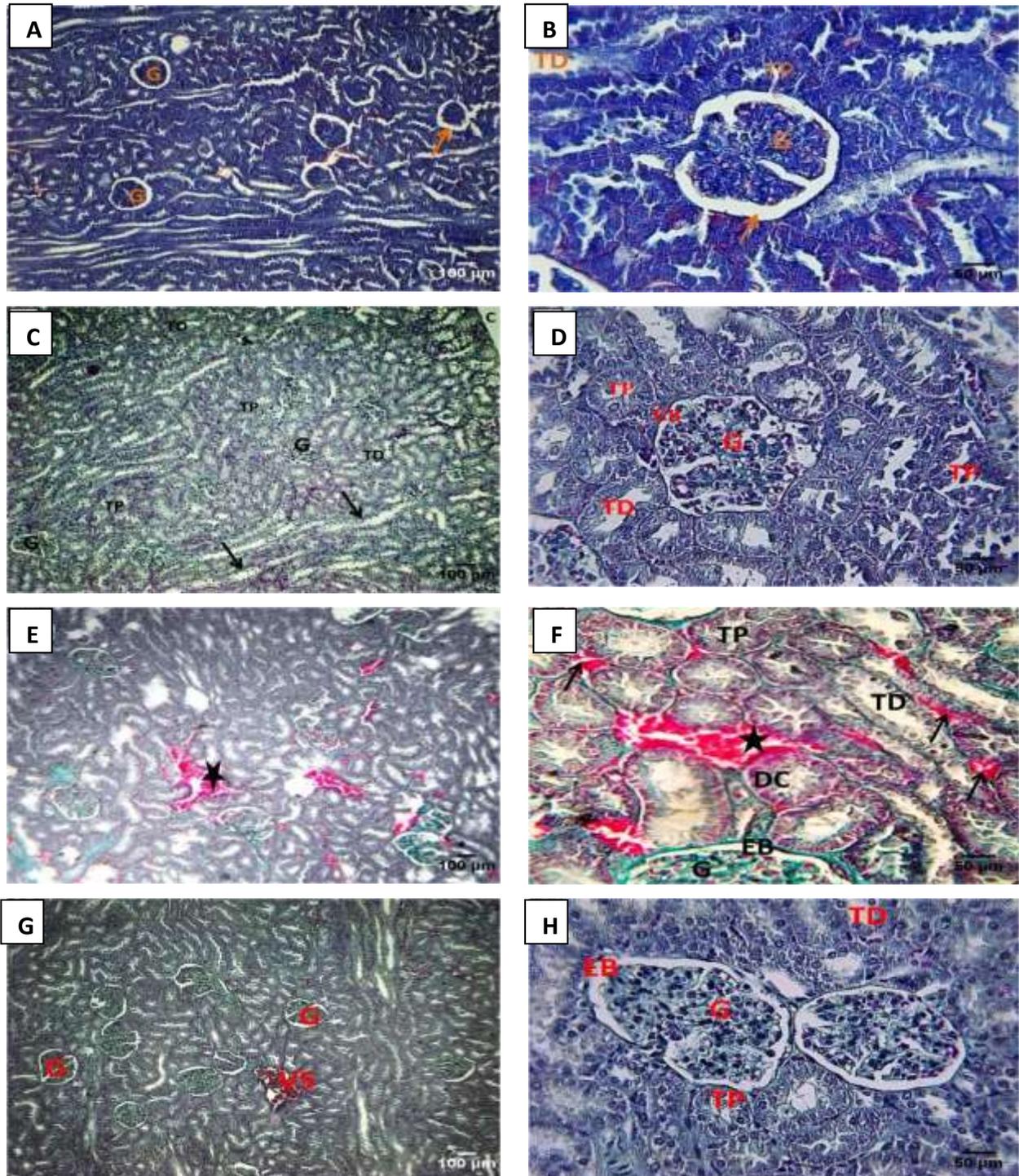


Planche 5 : Histologie du cortex rénal des lapins expérimentaux (A, C, E, G): X 100, (B, D, F, H) : X 400 coloration Trichrome de Masson.

Légende: Les sections des lapins témoins (A et B) et des lapins traités par HET (C et D) montrent une structure typique des glomérules (G), des tubules contournés proximaux (TP) et distaux (TD). Un cortex rénal présentant des altérations cellulaires chez les lapins traités par VT (E et F) avec une désorganisation cellulaire (DC) du TP et une dilatation et congestion des vaisseaux sanguins (Asterisque). Les sections des lapins traités par VT + HET (G et H) montrent un aspect histologique normal du cortex rénal avec une légère congestion des vaisseaux sanguins (VS). EB : espace de Bowman, Flèche noire : pyramide de Ferrain.

1.6.2. Histopathologie du tissu nerveux

Nous avons procédé à une étude histologique de différentes structures cérébrales, à savoir : le cortex cérébral, l'hippocampe et le cervelet.

A. Histopathologie du cerveau

❖ Histopathologie de cortex cérébral

L'observation des coupes histologiques du cortex cérébral des lapins témoins et ceux traités par HET a révélé une architecture cellulaire normale ; le tissu nerveux est constitué de neurones, de cellules gliales et de capillaires sanguins.

L'étude histologique des coupes du cortex cérébral des lapins traités par le VT montre l'effet neurotoxique due à l'exposition subaiguë à ce xénobiotique. Cette toxicité se traduit au niveau tissulaire par une nécrose cellulaire marquée par la présence des vacuoles entourant les cellules nerveuses et un neuropile vacuolisé avec une perte d'architecture tissulaire. Tandis que l'observation microscopique des coupes histologiques du cortex cérébral des lapins traités par VT+HET révèle une architecture plus au moins normale du tissu cérébral (Planche 6).

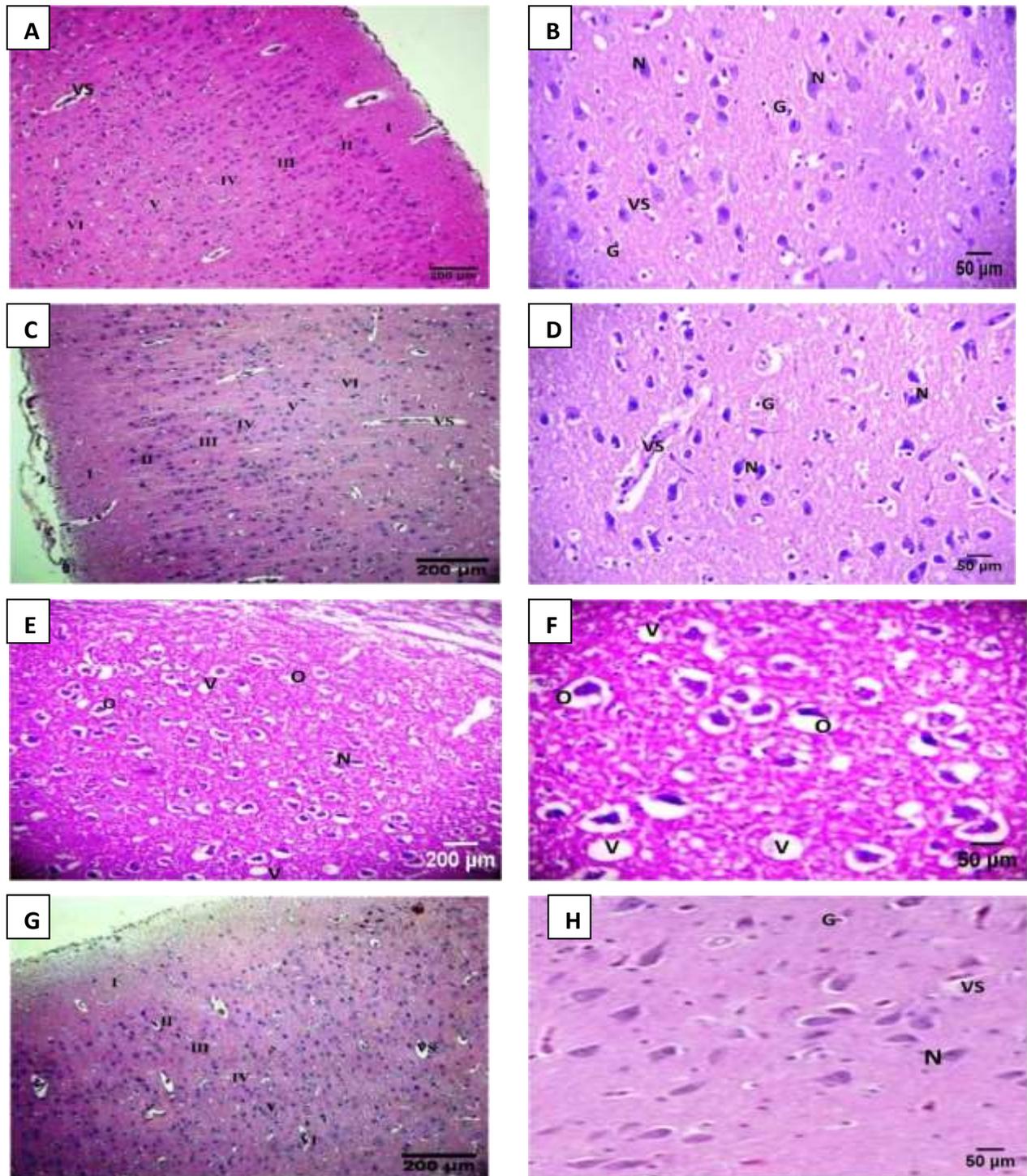


Planche 6 : Aspect histologique du cortex cérébral des lapins expérimentaux (A, C, E, G): X 40, (B, D, F, H) : X 100 coloration H&E.

Légende: Les sections des lapins témoins (A et B) et des lapins traités par HET (C et D) montrent une structure normale des cellules nerveuses constituant les différentes couches du cortex cérébral (I: couche moléculaire; II: couche granulaire externe; III: couche pyramidale externe; IV: couche granulaire interne; V: couche pyramidale interne; VI: couche polymorphe). Les sections des lapins traités par VT (E et F) montrent un neuropile vacuolisé (V) au niveau des différentes couches du cortex cérébral, des cellules gliales (G) de structure désorganisée et une nécrose (O) des cellules nerveuses (N). Les sections des lapins traités par VT + HET (G et H) montrent une architecture plus au moins normale du cortex cérébral avec une amélioration de la structure des cellules nerveuses constituant les différentes couches du cortex cérébral. VS : vaisseau sanguin.

❖ Histopathologie de l'hippocampe

✚ Chez les lapins témoins

L'analyse microscopique des coupes histologiques de l'hippocampe des lapins témoins montre une architecture normale classique du tissu de l'hippocampe sans lésion visible. Il y'a une répartition cellulaire homogène. Les cellules nerveuses de l'hippocampe sont normales et intactes en termes de morphologie, d'arrangement et de distribution cellulaires (Planche 7A et B).

✚ Chez les lapins traités par HET

L'examen microscopique des sections de l'hippocampe des lapins traités par HET révèle une architecture similaire à celle des animaux du groupe témoin et montre une structure normale de l'hippocampe sans lésions visibles (Planche 7C et D).

✚ Chez les lapins traités par le VT

Les coupes histologiques de l'hippocampe après 21 j d'exposition au VT ont présentés des altérations structurales accentuées. Le tissu hippocampique était le siège d'un œdème important et d'une désorganisation de l'architecture des cellules nerveuses ; ces dernières apparaissent rétractées et présentent des halots clairs péricellulaires (Planche 7E et F).

✚ Chez les lapins traités par le VT+HET

L'observation microscopique de l'hippocampe des lapins traités par le VT+HET révèle une architecture hippocampique conservée proche à celle de groupe témoin avec une congestion vasculaire discrète (Planche 7G et H).

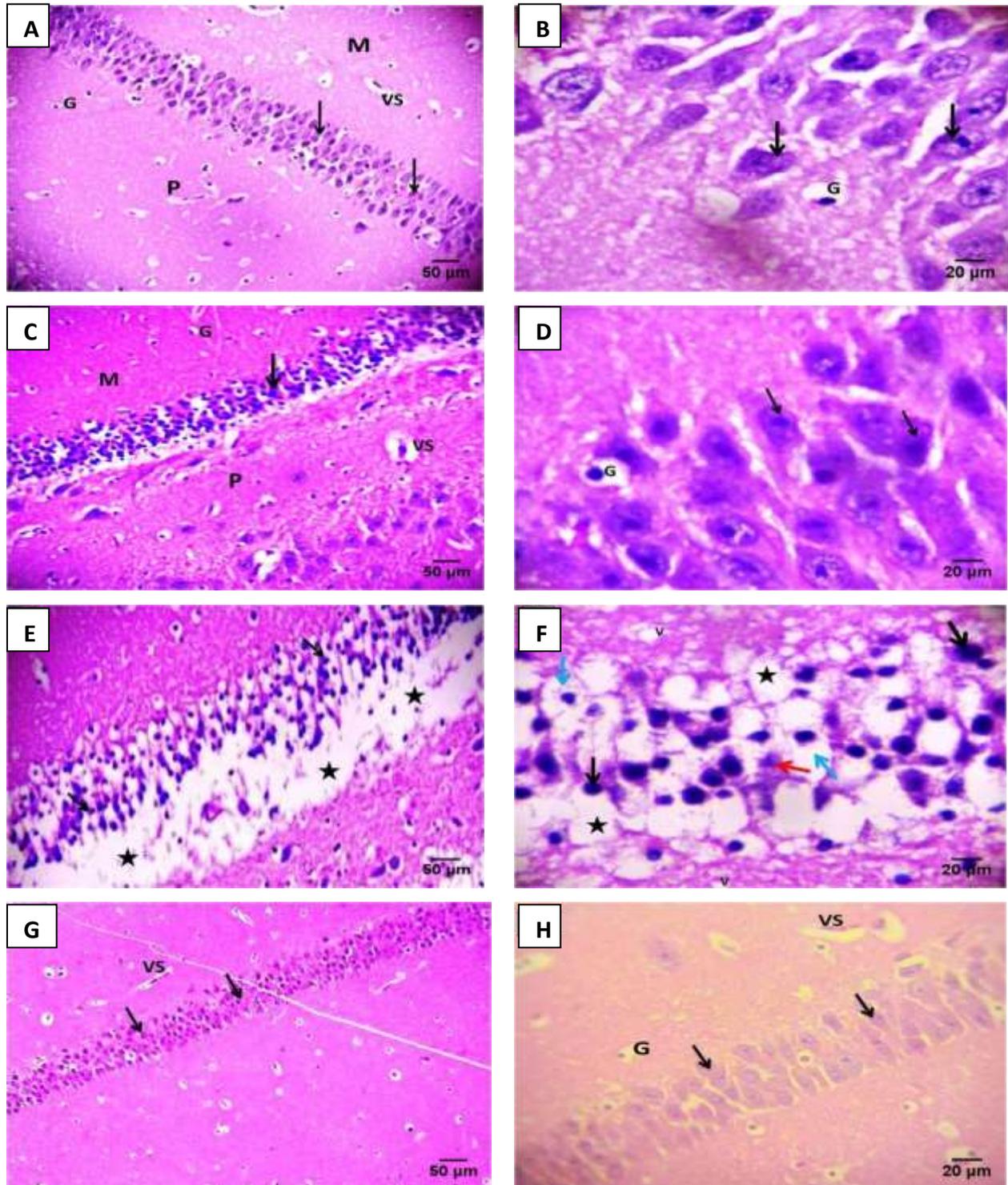


Planche 7 : Aspect histologique de l'hippocampe des lapins expérimentaux (A, C, E, G): X 100, (B, D, F, H) : X 400 coloration H&E.

Légende: Les sections des lapins témoins (A et B) et des lapins traités par HET (C et D) montrent une structure histologique classique du tissu hippocampique avec trois couches, une couche moléculaire (M), une couche des neurones pyramidaux (Flèche noir) et une couche polymorphe (P). Les sections des lapins traités par VT (E et F) montrent un œdème important (Astérisque) et une désorganisation de l'architecture des cellules nerveuses qui apparaissent rétractées (flèche rouge) et présentent des halots clairs péricellulaires (flèches bleues) et des noyaux picnotiques (flèches noires). Les sections des lapins traités par VT + HET (G et H) montrent une architecture hippocampique conservée proche à celle de groupe témoin. VS : vaisseau sanguin, G : cellules gliales.

B. Histopathologie de cervelet

✚ Chez les lapins témoins

L'étude histologique du cervelet chez les lapins témoins montre une architecture histologique normale de cervelet ; une couche de Purkinje intacte, une couche moléculaire et une couche granulaire avec une répartition cellulaire homogène (Planche 8A et B).

✚ Chez les lapins traités par HET

L'étude histologique de cervelet chez les lapins traités par HET montre une structure normale des trois couches corticales cérébelleuses: couche moléculaire (CM), granulaire (CG) avec alignement des cellules nerveuses de Purkinje qui sont bien individualisées (Planche 8C et D).

✚ Chez les lapins traités par le VT

L'observation microscopique de cervelet des lapins traités par le VT révèle la présence d'œdème interstitiel au niveau de cervelet, une dégénérescence et rétraction des cellules nerveuses. Les cellules de Purkinje apparaissent espacées et rétractées. De plus, des fontes nucléaires des cellules de Purkinje ont été remarquées (Planche 8E et F).

✚ Chez les lapins traités par le VT+HET

La structure histologique du cervelet chez les lapins traités par le VT+HET montre une architecture normale avec une distribution des cellules régulières dont les cellules ganglionnaires et les cellules de Purkinje sont conservées avec absence d'anomalies ou des lésions tissulaires (Planche 8G et H).

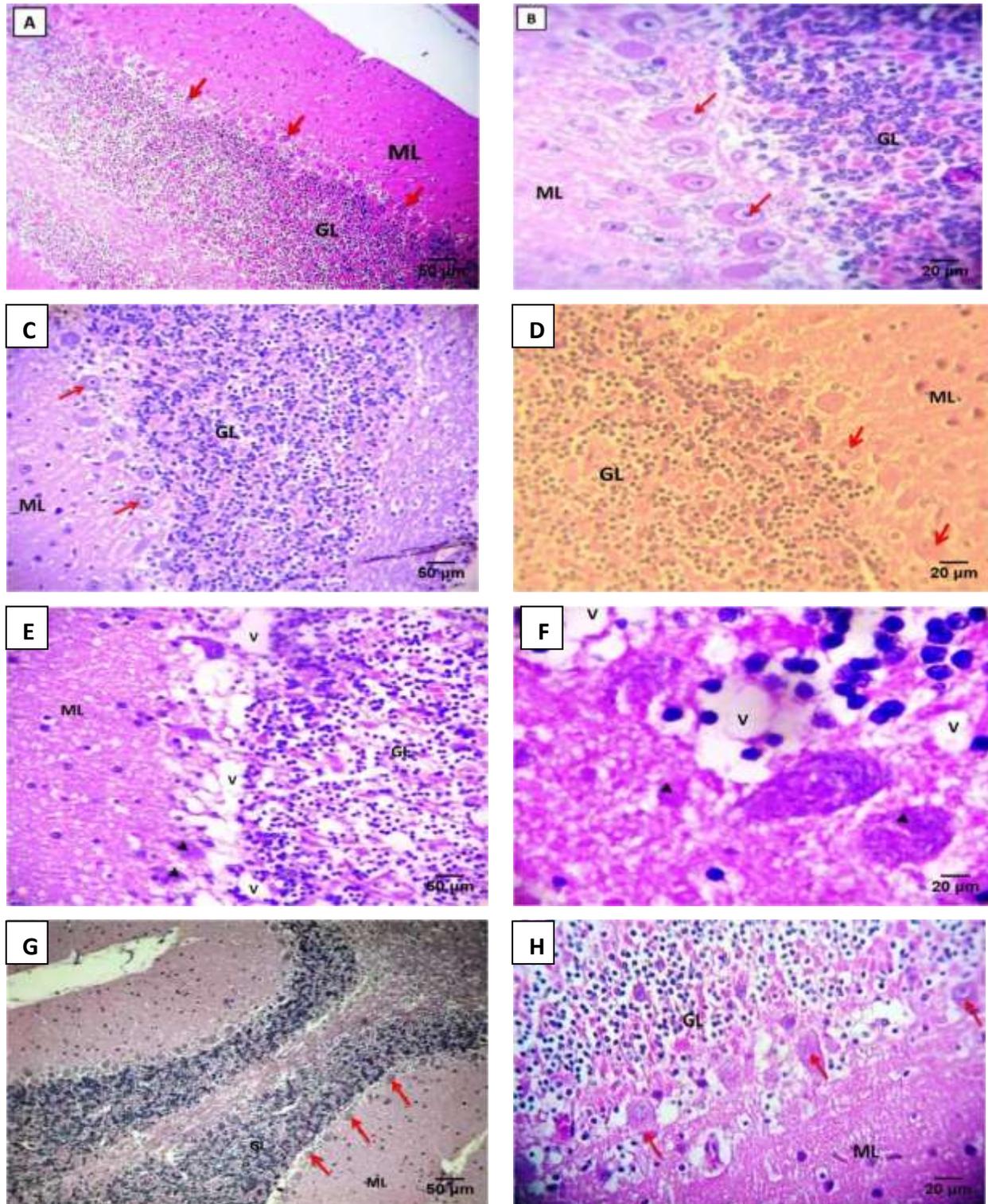


Planche 8 : Aspect histologique du cervelet des lapins expérimentaux (A, C, E, G): X 100, (B, D, F, H) : X 400 coloration H&E.

Légende: Les sections des lapins témoins (A et B) et des lapins traités par HET (C et D) montrent une structure histologique normale de cervelet ; une couche de Purkinje (Flèche rouge) intacte, une couche moléculaire (ML) et une couche granulaire (GL) avec une répartition cellulaire homogène. Les sections des lapins traités par VT (E et F) montrent un neuropile vacuolisé (V) au niveau des trois couches du cortex cérébelleux avec une neurodégénérescence des cellules de Purkinje (Pointe de flèche). Les sections des lapins traités par VT + HET (G et H) montrent une structure normale des trois couches du cortex cérébelleux.

1.6.3. Histopathologie du cœur

Lot témoin

L'étude microscopique de cœur des lapins du groupe témoin révèle une structure histologique normale du tissu cardiaque sans altération (Planches 9A et 10A).

Au plus fort grossissement, on observe l'endocarde qui est une couche unique des cellules endothéliales aplaties en continuité avec l'endothélium des vaisseaux qui arrivent et partent du cœur ; le myocarde est plus épais au niveau des parois ventriculaires constitué du muscle cardiaque (cardiomyocytes) dont la structure s'accorde avec les particularités fonctionnelles du cœur et contient des vaisseaux sanguins et des nerfs ; l'épicarde est constitué par une couche des cellules mésothéliales aplaties (Planches 9B et 10B).

Lot traité par HET

Selon la planche 9C et D, on remarque que la structure du parenchyme cardiaque des lapins traités par HET ressemble à celle du groupe témoin mettant en évidence une architecture normale du tissu cardiaque, qui est formé de fibres musculaires cardiaques typiques fait des cellules myocardiques contenant un ou deux noyaux et un cytoplasme ramifié étendu donnant l'apparence d'un réseau tridimensionnel continu. Les noyaux allongés sont situés au centre de la cellule myocardique.

Lot traité par le VT

L'observation microscopique des coupes histologiques du tissu cardiaque (Planche 9E et F, Planche 10E et F) des lapins traités pendant 21 jours par le VT comparativement avec le témoin révèle une architecture plus au moins désorganisée. Les principales lésions histologiques du parenchyme cardiaque observées sont :

- Des capillaires sanguins congestionnés.
- Infiltration des cellules inflammatoires.
- Œdèmes.
- une augmentation des masses de fibres de collagène parmi les fibres musculaires cardiaques et autour des vaisseaux sanguins congestionnés (Fibrine).

Lot VT+HET

L'examen du parenchyme cardiaque des lapins traités par VT+HET montre une architecture moins désorganisée. Nous avons remarqué une légère congestion vasculaire avec absence d'inflammation, d'œdème et de fibrine (Planche 9G et H, Planche 10G et H).

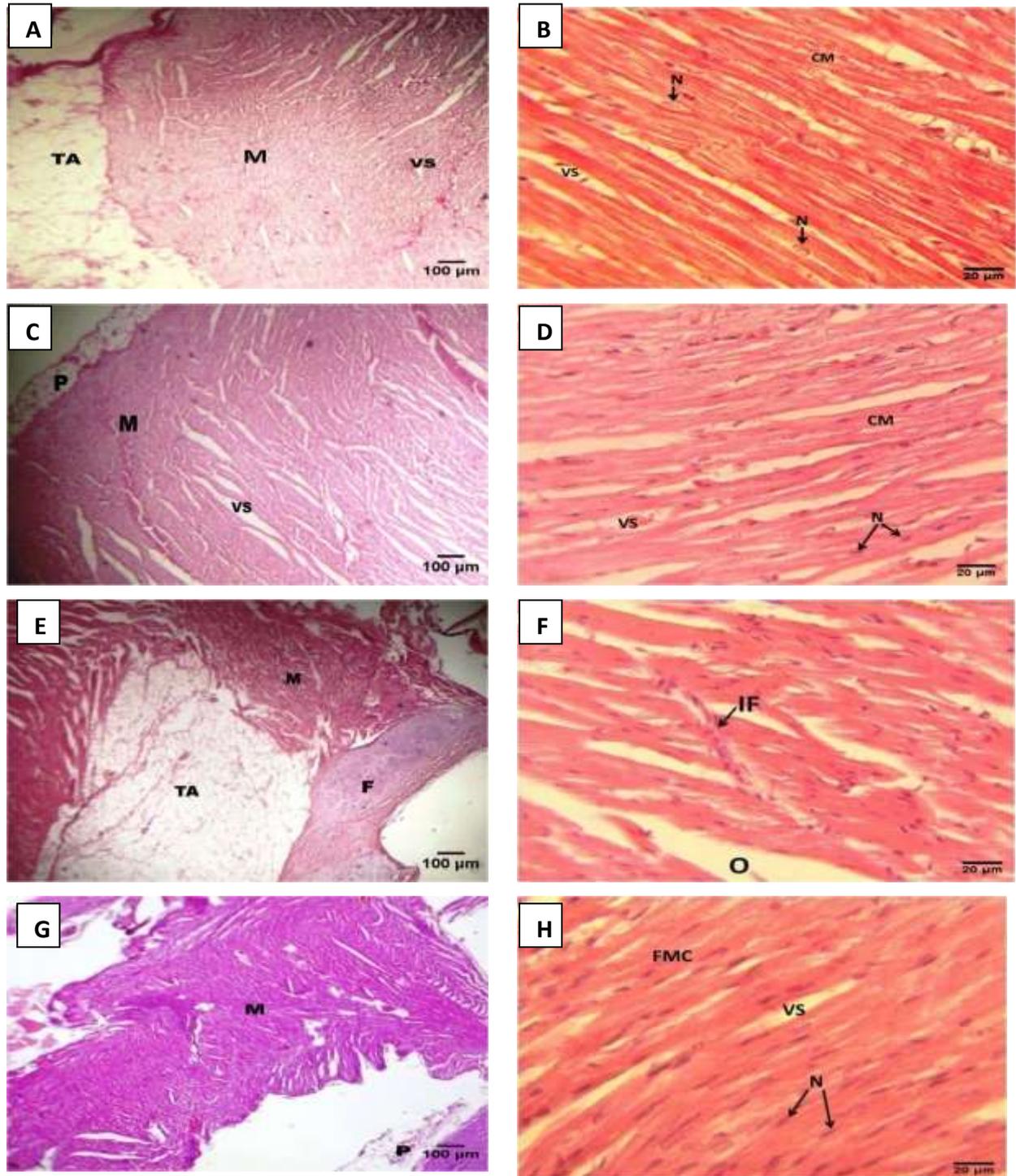


Planche 9 : Aspect histologique du parenchyme cardiaque des lapins expérimentaux (A, C, E, G): X 100, (B, D, F, H) : X 400 coloration H&E.

Légende: Les sections des lapins témoins (A et B) et des lapins traités par HET (C et D) montrent une structure histologique normale du tissu cardiaque sans altération avec des fibres musculaires cardiaques (FMC) intactes faites de cellules myocardiques (CM) contenant un ou deux noyaux (N) et un cytoplasme ramifié étendu donnant l'apparence d'un réseau tridimensionnel continu. Les sections des lapins traités par VT (E et F) montrent une architecture plus au moins désorganisés du parenchyme cardiaque avec quelques lésions histologiques, à savoir : une infiltration des cellules inflammatoires (IF), oedème (O) et de fibrine (F). Les sections des lapins traités par VT + HET (G et H) montrent une amélioration de la structure de tissu cardiaque. M : myocarde, P : péricarde, TA : tissu Adipeux, VS : vaisseau Sanguin.

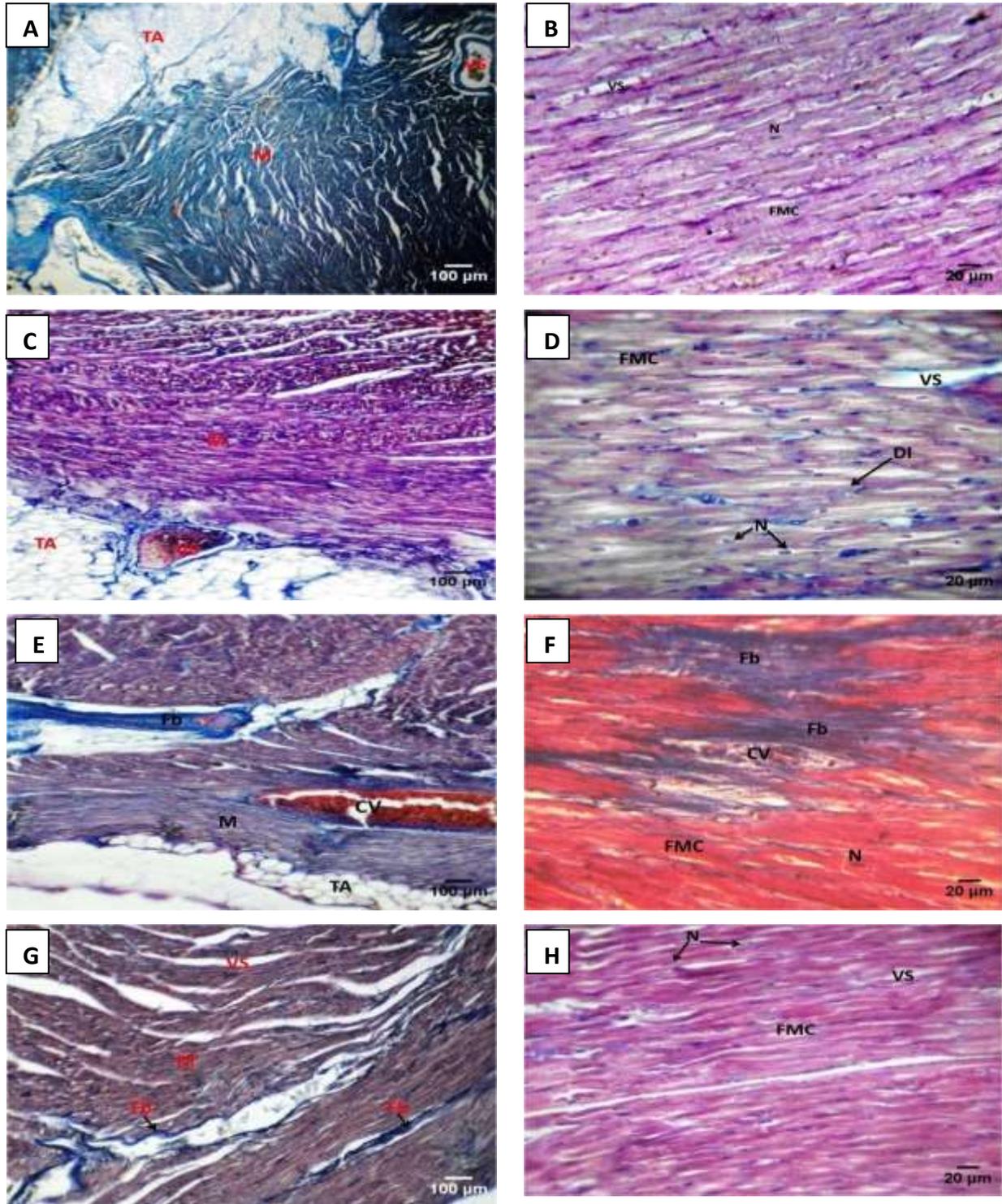


Planche 10 : Histologie du parenchyme cardiaque des lapins expérimentaux (A, C, E, G): X 100, (B, D, F, H) : X 400 coloration Trichrome de Masson.

Légende: Les sections des lapins témoins (A et B) et des lapins traités par HET (C et D) montrent une structure histologique classique de la paroi cardiaque avec un tissu adipeux (TA) et un tissu myocardique (M) contenant des fibres musculaires cardiaques (FMC) intactes séparés par des disques intercalaires (DI). Les sections des lapins traités par VT (E et F) montrent une augmentation de masse des fibres de collagène (Fb) parmi les fibres musculaires cardiaques (FMC) et autour des vaisseaux sanguins congestionnés (CV). Les sections des lapins traités par VT+HET (G et H) montrent une architecture moins désorganisée du parenchyme cardiaque avec une nette diminution des fibres de collagène (Fb). N : noyau, VS : vaisseau sanguin.

1.6.4. Histopathologie du foie

Histologie du foie du lot témoin

L'observation des coupes histologiques du parenchyme hépatique des lapins témoins révèle une organisation histologique normale du foie, avec une architecture lobulaire conservée, centrée par une veine centro-lobulaire et limitée en périphérie par plusieurs espaces portes (EP) d'aspect régulier.

Chaque lobule, possédant une forme hexagonale, est formé des travées hépatocytaires, disposées radialement autour d'une veine centro-lobulaire. Ces travées sont séparées par des capillaires sinusoides sous forme d'espace peu coloré.

Dans les lobules, Les hépatocytes sont d'aspects réguliers polygonaux à cytoplasme éosinophile dense avec un noyau rond régulier central. Elles sont étroitement serrées les uns contre les autres, autour d'une veine centro-lobulaire et entre eux des sinusoides et des espaces portes (Planche 11A et B).

La coloration au Trichrome de Masson est un marqueur important de la fibrose hépatique et est utilisée pour mettre en évidence les fibres de collagène. Le tissu conjonctif a été démontré comme une fine couche de fibres de collagène dans la paroi de la veine centrale et les espaces portes dans le lot témoin (Planche 12A et B).

Histologie du foie du lot traité par HET

L'observation des coupes histologiques du parenchyme hépatique des lapins traités par HET, révèle une organisation histologique d'un foie normal, des lobules hépatiques possédant une forme hexagonale et qui sont centrées par une veine centro-lobulaire, la présence des travées hépatocytaires avec un cytoplasme des hépatocytes dense et des noyaux arrondis, autour d'une veine centro lobulaire et entre eux des sinusoides et des espaces portes (Planches 11C et D).

La coloration au Trichrome de Masson a révélé une fine couche de collagène autour des espaces portes semblable à celle observée chez le lot témoin (Planche 12C et D).

Histologie du foie du lot traité par le VT

L'examen du parenchyme hépatique des lapines traités par le VT, révèle une architecture plus ou moins désorganisée des lobules hépatiques. Cette désorganisation est marquée par la présence des lésions hépatiques qui peuvent se résumer comme suit :

- Dilatation et congestion des veines centrolobulaires ;
- Infiltration des cellules inflammatoires ;
- Des micro-vacuoles existent dans plusieurs hépatocytes et indiquent une souffrance

cellulaire ou stéatose ;

- Dilatation des espaces portes et des sinusoides (Planche 11E et F).

L'observation des coupes des sections de foie colorés au Trichrome Masson a permis de mettre en évidence une accumulation des fibres de collagène denses au niveau de la zone porte (Planche 12E et F).

Histologie du foie du lot traité par VT + HET

La structure du parenchyme hépatique chez les lapins traités par VT+HET montre une réorganisation de l'architecture du lobule hépatique comparable à celle des lapins témoins, avec cependant quelques lésions à savoir une discrète congestion sanguine dans la veine centrolobulaire et un infiltrat minime au niveau des espaces portes (Planche 11G et H).

La coloration Trichrome Masson a montré un dépôt nettement réduit de tissu fibreux dans le foie des lapins traités par VT+HET (Planche 12G et H).

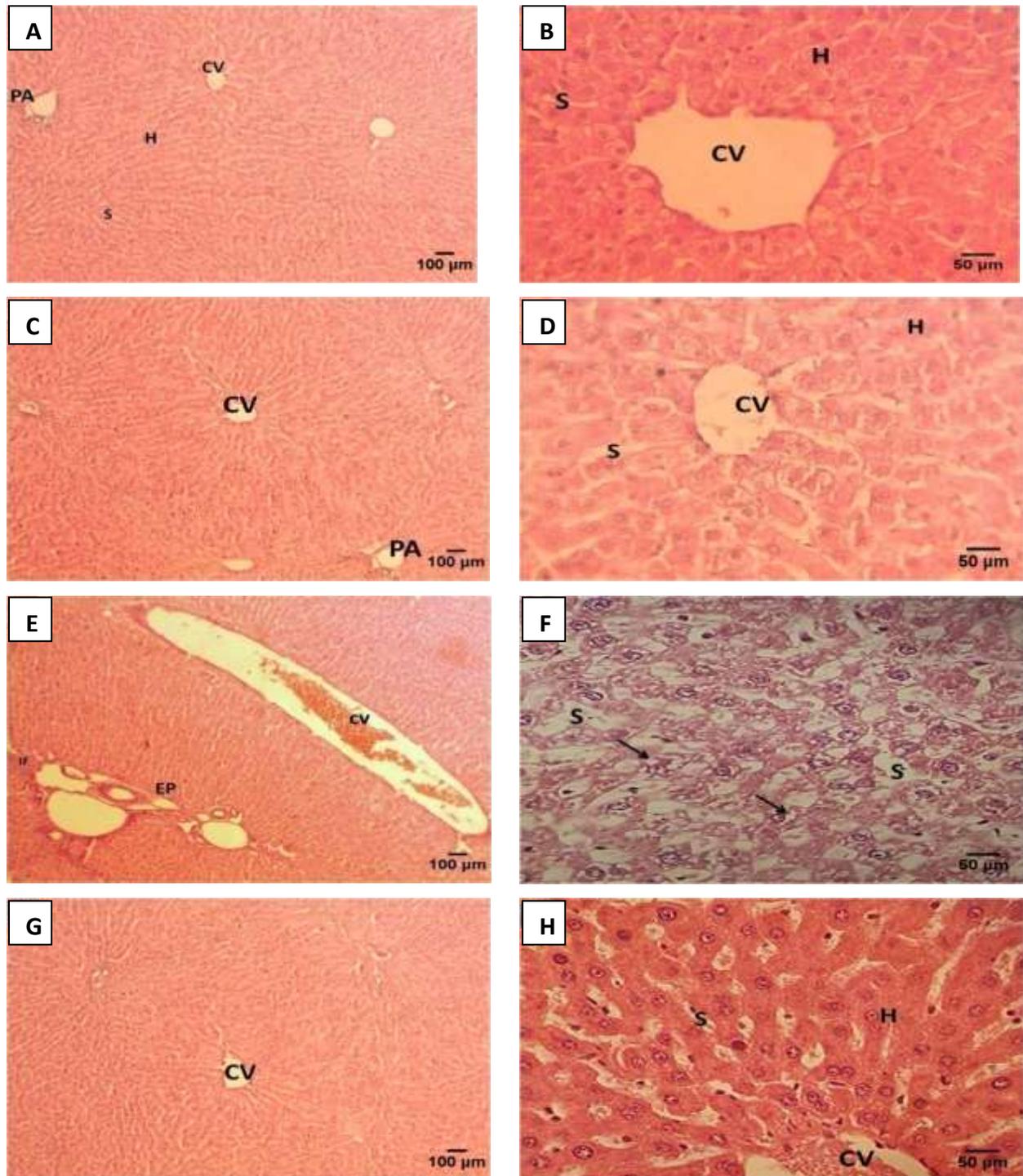


Planche 11 : Aspect histologique du parenchyme hépatique des lapins expérimentaux (A, C, E, G): X 100, (B, D, F, H) : X 400 coloration H&E.

Légende: Les sections des lapins témoins (A et B) et des lapins traités par HET (C et D) montrent une organisation histologique normale du tissu hépatique, avec une architecture lobulaire conservée, centrée par une veine centro-lobulaire (CV) et limitée en périphérie par plusieurs espaces portes (PA). Les sections des lapins traités par VT (E et F) montrent une architecture plus ou moins désorganisée des lobules hépatiques, marquée par la présence des lésions hépatiques à savoir : une dilatation et congestion des veines centro-lobulaires (CV), une infiltration des cellules inflammatoires (IF), microvacuolisation du cytoplasme des hépatocytes (Flèche noire) et une dilatation des espaces portes (EP) et des sinusoides (S). Les sections des lapins traités par VT+HET (G et H) montrent une réorganisation de la structure du lobule hépatique comparable à celle des lapins témoins. H : Hépatocyte.

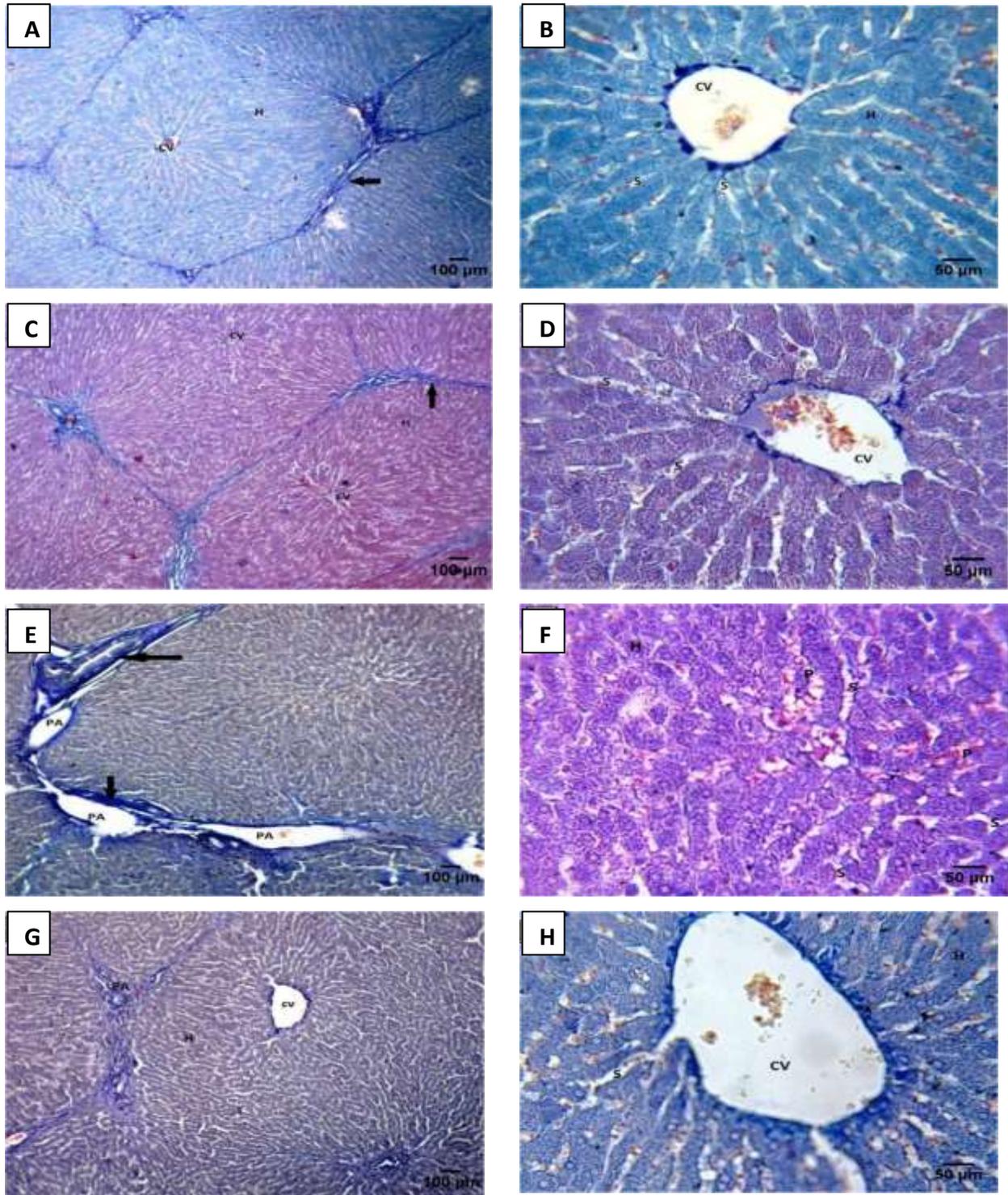


Planche 12 : Histologie du parenchyme hépatique des lapins expérimentaux (A, C, E, G) : X 100, (B, D, F, H) : X 400 coloration Trichrome de Masson.

Légende: Les sections des lapins témoins (A et B) et des lapins traités par HET (C et D) montrent une architecture lobulaire normale avec un minimum de fibres de collagène (Flèche noir). Les sections des lapins traités par VT (E et F) montrent une dilatation des espaces portes (PA) et une accumulation des fibres de collagène denses (Flèche noir) au niveau de la zone porte avec dilatation des sinusoïde (S). Les sections des lapins traités par VT+HET (G et H) montrent une réorganisation de la structure du lobule hépatique comparable à celle des lapins témoins avec un dépôt nettement réduit de tissu fibreux au niveau de la zone porte (PA) et autour les veines centro-lobulaires (CV). H : Hépatocyte, PV : veine porte.

1.7. Résultats de l'étude immunohistochimique

Dans notre étude, nous avons évalué l'expression immuno-histochimique de deux biomarqueurs : l'alpha-foetoprotéine (AFP) et la Bcl-2 au niveau des cellules hépatiques des lapins témoins et ceux traités.

1.7.1. Etude IHC de l'expression de Bcl-2 dans le foie

Expression de Bcl-2 dans le foie des lapins témoins

L'observation au faible grossissement montre une expression positive de la Bcl-2 au niveau des hépatocytes, les espaces sinusoidales et la veine Centro-lobulaire. Au fort grossissement, un marquage positif a été observé au niveau cytoplasmique des hépatocytes chez les lapins témoins (Planche 13A et B).

Expression de Bcl-2 dans le foie des lapins traités par HET

L'observation au faible grossissement montre une expression positive de la Bcl-2 au niveau des hépatocytes ainsi qu'au niveau des espaces portes chez le lapin traité par HET. Au fort grossissement, on observe un marquage cytoplasmique des hépatocytes et des espaces sinusoidales (Planche 13C et D).

Expression de Bcl-2 dans le foie des lapins traités par le VT

L'observation microscopique montre une expression négative de Bcl-2 au niveau du parenchyme hépatique des lapins traités par le VT (Planche 13E et F).

Expression de Bcl-2 dans le foie des lapins traités par VT +HET

L'observation microscopique montre un marquage doublement positif au niveau des espaces sinusoidales, la veine centro-lobulaire, les espaces portes et aussi au niveau cytoplasmique des hépatocytes (Planche 13G et H).

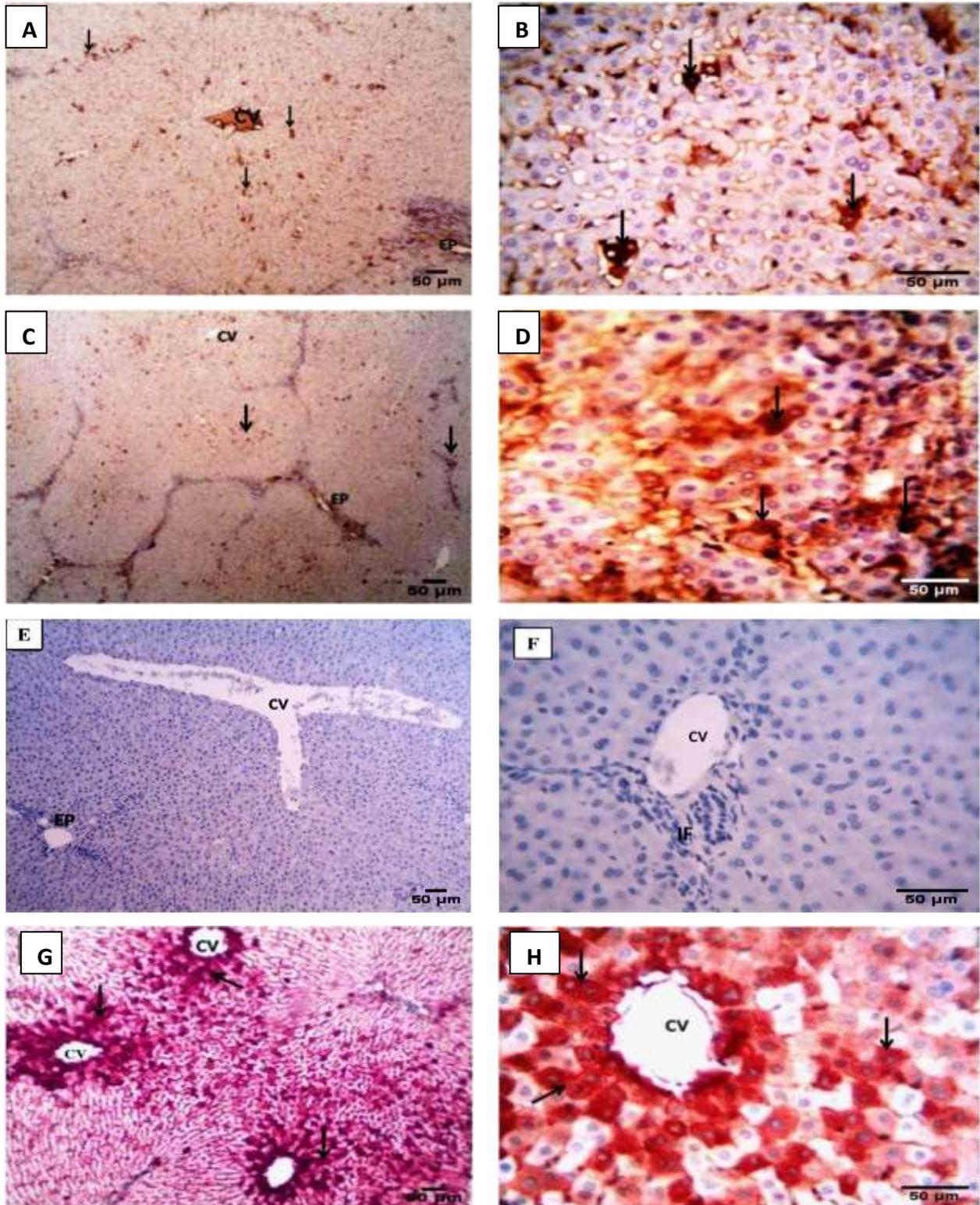


Planche 13 : Expression immunohistochimique de la protéine Bcl-2 dans le parenchyme hépatique chez les lapins expérimentaux (A, C E et G): X 100, (B, D, F et H) : X 400.

Légende: une expression cytoplasmique positive de la protéine Bcl-2 chez le lot témoin (A et B) et le lot HET (C et D), une forte immuno-expression de Bcl-2 dans le groupe VT + HET (G et H) et une immunoexpression négative de la Bcl-2 dans le groupe VT (E et F). Flèche noir : expression cytoplasmique de Bcl-2 ; CV : veine centro-lobulaire ; EP : espace porte, IF : infiltrat inflammatoire.

1.7.2. Etude IHC de l'expression de l'AFP dans le foie

Expression de l'AFP dans le foie des lapins témoins

L'observation microscopique montre une expression très faible à négative de l'AFP au niveau du tissu hépatique des lapins témoins (Planche 14A et B).

Expression de l'AFP dans le foie des lapins traités par HET

L'observation au faible grossissement montre un signal immunohistochimique positive de l'AFP au niveau de la veine centro-lobulaire et des hépatocytes. Au fort grossissement, on observe un immunomarquage positif au niveau membranaire et cytoplasmique des hépatocytes (Planche 14C et D).

Expression de l'AFP dans le foie des lapins traités par le VT

Une expression négative de l'AFP a été notée au niveau de tissu hépatique des lapins traités par l'insecticide seul (Planche 14E et F).

Expression de l'AFP dans le foie des lapins traités par VT + HET

L'observation à faible grossissement montre une expression doublement positive de l'AFP au niveau de la veine centro-lobulaire, la triade portale et des hépatocytes. Au fort grossissement, un marquage positif au niveau membranaire des hépatocytes a été observée (Planche 14G et H).

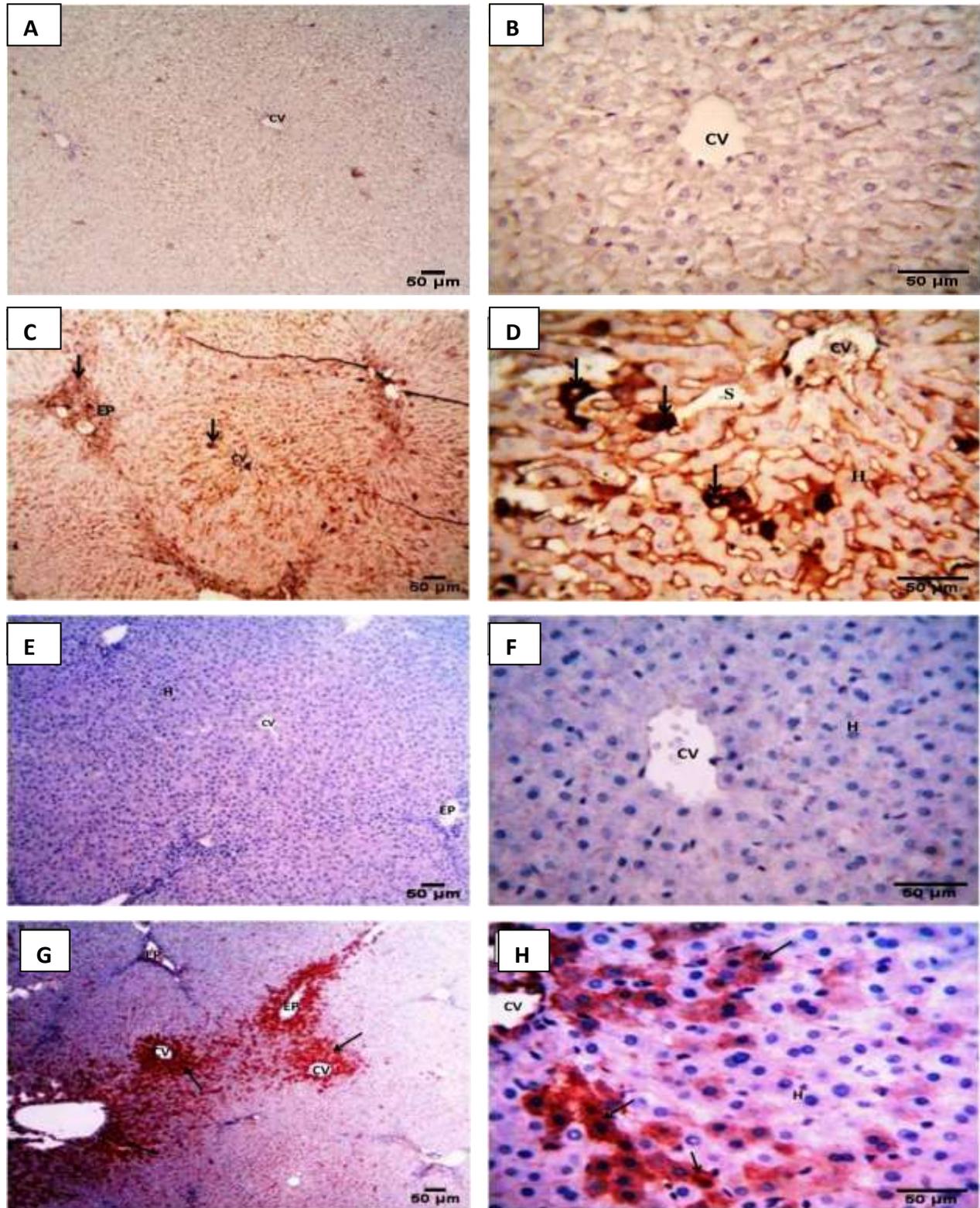


Planche 14 : Expression immunohistochimique de l'AFP dans le parenchyme hépatique chez les lapins expérimentaux (A, C E et G): X 100, (B, D, F et H) : X 400.

Légende: un marquage négatif de l'AFP chez le lot témoin (A et B) et le lot VT (E et F), et une expression cytoplasmique positive de l'AFP dans le tissu hépatique chez le lot HET (C et D) et le lot VT+HET (G et H). Flèche noir : expression cytoplasmique de AFP ; CV : veine centro-lobulaire ; EP : espace porte ; H : hépatocyte ; S : sinusoïde.

2. Résultats de l'extraction de l'huile essentielle de thym

2.1. Rendement en huile essentielle

L'hydrodistillation de la partie aérienne sèche de la plante, menée dans un appareil Clevenger, nous a permis d'obtenir un rendement de 0.30% de l'huile essentielle. Les rendements en HE en fonction du temps sont représentés dans le tableau X.

Tableau X : Rendements de l'huile essentielle de thym en continu durant la même extraction par hydrodistillation

Durée d'extraction (min)	60	85	88	91	94	120
Rendement (%)	0.00	0.04	0.09	0.13	0.18	0.30

2.2. Résultats de l'étude analytique de l'huile essentielle

2.2.1. Propriétés physiques et organoleptiques de l'huile essentielle de thym

Les propriétés physiques et organoleptiques sont considérées comme étant des critères de vérification et de contrôle de la qualité de l'HE. Le Tableau XI regroupe les valeurs des constantes physiques ainsi que les caractéristiques organoleptiques de HET.

Tableau XI : Propriétés physiques et organoleptiques de l'huile essentielle du Thym

Type d'extraction		Hydrodistillation
Constantes physiques	Densité à 20°C	0,92
	Indice de réfraction à 20°C	1,49
Caractéristiques organoleptiques	Aspect	Liquide mobile
	Couleur	Brun clair
	Odeur	Caractéristique, aromatique, légèrement épicé.

2.2.2. Composition chimique de l'huile essentielle de thym

La composition qualitative et quantitative de l'huile essentielle de thym est consignée dans le tableau XII, par ordre d'élution et selon les familles chimiques. Le chromatogramme obtenu par l'analyse CG/SM de HET est représenté par la figure 28.

L'analyse de HET par CG/SM nous a permis d'identifier 13 composés volatiles qui représentent environ 99.73% de la composition chimique totale de HET ; dont le composé majoritaire est le carvacrol (86,25%). D'autre part, la teneur des autres composés varie entre (0,03 - 1,70%) sauf pour : le linalool à (3,00%), et l'alpha-Humelène à (3,90%).

La composition chimique par famille de l'huile essentielle du thym nous révèle que :

- les monoterpènes hydrocarbonés sont présents en très faibles teneurs (1.48%) ;
- l'HET est caractérisé par de très fortes teneurs en monoterpènes oxygénés (89.84%);
- l'HET présente de faibles teneurs en sesquiterpènes (6.78%) et une absence de sesquiterpènes oxygénés.

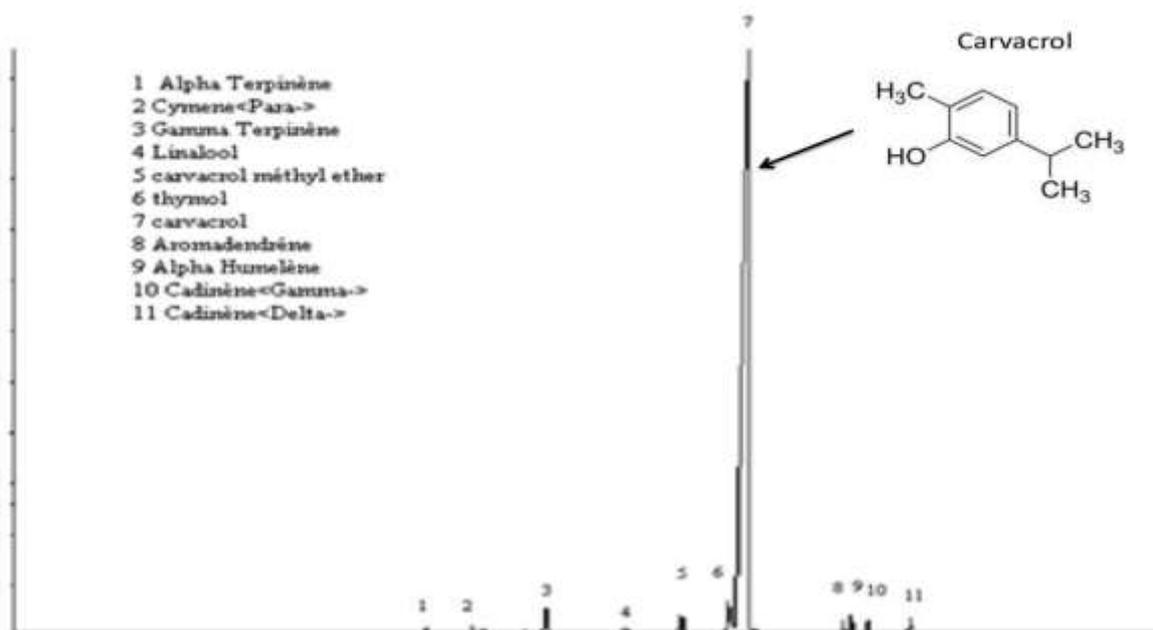


Figure 28 : Chromatogramme CG-SM de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*

Tableau XII: Composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* identifiée par CG-SM

N°	Composants	Pourcentage (%)	IR apolaire HP5MS
	Monoterpènes hydrocarbonés	1.48	
1	Alpha Terpinène	0,28	1019
2	<i>para</i> -Cymène	0,67	1028
3	<i>trans</i> -Ocimène	0,40	1052
4	<i>gamma</i> -Terpinène	0,13	1065
	Monoterpènes Oxygénés	89.84	
5	Linalool	3,00	1123
6	Terpin-4-ol	0,05	1179
7	Thymol	0,54	1302
8	Carvacrol	86,25	1318
	Sesquiterpènes	6.78	
9	Aromadendrène	1,15	1439
10	<i>alpha</i> -Humulène	3,90	1454
11	<i>gamma</i> -Cadinène	1,70	1513
12	<i>delta</i> -Cadinène	0,03	1542
	Autres composés oxygénés	1.63	
13	Carvacrol méthyle éther	1,63	1282
	Composés Oxygénés totaux	91.47	
	Composés non Oxygénés totaux	8.26	

IR : Indice de rétention

2.3. Activité antioxydante de l'huile essentielle de thym

L'évaluation de la capacité de l'huile essentielle de *T. vulgaris* à piéger le radical libre DPPH, a été réalisée par la mesure de son absorbance en présence de ce dernier, et ce, à différentes concentrations. Les résultats obtenus ont permis de tracer les courbes de la Figure 43, qui représentent la variation du pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration de l'huile essentielle et du BHT.

La Figure 29 indique une augmentation des pourcentages d'inhibition (PI) du radical DPPH en fonction des concentrations de l'extrait de thym. A la plus faible concentration (1 mg/ml), l'huile du thym a présenté un PI de 36.64% tandis qu'à la plus grande concentration (100 mg/ml), le PI a atteint 85.34%. Ceci montre que l'huile essentielle de thym piègent le radical superoxyde d'une manière dose dépendante.

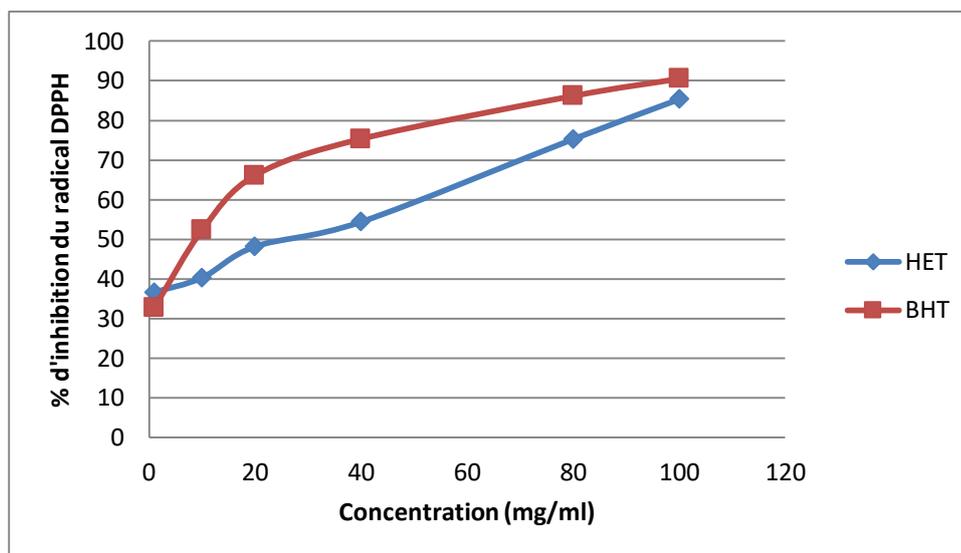


Figure 29 : Pourcentage de piégeage du radical libre en fonction de la concentration de l'huile essentielle de *T. vulgaris* et du BHT

Afin d'évaluer et de comparer l'efficacité de HET par rapport à l'antioxydant de synthèse (BHT), la CI50 et IAA ont été déterminés. D'après les résultats du tableau XIII, HET a révélé une très forte activité antioxydante avec une CI50 de l'ordre de 28.15 ± 0.04 mg/ml et un indice de l'activité antioxydante (IAA) de 3.03. Cependant, la capacité antioxydante de l'huile essentielle de thym reste moindre par rapport à l'antioxydant synthétique de référence, la BHT (CI50 = 6.09 mg/ml et IAA = 14.86).

Tableau XIII: Activité antioxydante de l'huile essentielle de *T. vulgaris* et de BHT obtenues par le test de DPPH

Pouvoir antioxydant	HET	BHT
CI50 (mg/ml)	28.15 ± 0.04	6.09 ± 0.03
AAI	3.03	14.86

CHAPITRE 3 : DISCUSSION GÉNÉRALE

Le traitement par les produits phytosanitaires est jusqu'à présent le moyen prépondérant pour la protection de l'homme et de son environnement des différents ravageurs. L'agriculture moderne est devenue cependant une véritable source de pollution ; l'usage systématique des pesticides à de forte teneur engendre souvent des conséquences multiples sur la santé humaine et sur l'environnement (Eddaya *et al.*, 2015).

L'utilisation intensive des pesticides, entraîne leur accumulation dans les écosystèmes provoquant ainsi l'apparition de diverses pathologies humaines, parmi lesquels le cancer, les troubles endocriniens, les maladies cardio-vasculaires et neuro-dégénératives (Pereira *et al.*, 2015). Les pesticides peuvent affecter les systèmes respiratoire, reproducteur, rénal, hépatique et circulatoire (Ansari *et al.*, 2021 ; Rani *et al.*, 2021). Notamment, des études récentes ont rapporté la détection des résidus des pesticides dans les légumes, les fruits, l'air, l'eau des rivières et les eaux souterraines (Mebdoua, 2019 ; Olisah *et al.*, 2020 ; Sousa *et al.*, 2021). Il est donc indispensable de rechercher de nouvelles stratégies pour réduire voire prévenir l'impact de ces xénobiotiques.

Parmi ces molécules, figure la famille des avermectines qui sont employés comme médicaments vétérinaires destinés aux animaux producteurs de denrées alimentaires, et comme agents de protection des végétaux insecticides et acaricides dans le secteur agricole (Bai et Ogbourne, 2016). Les avermectines sont parmi les pesticides les plus couramment utilisés dans le monde ainsi qu'en Algérie (Khaldoun Oularbi *et al.*, 2013 ; Fent, 2014).

Actuellement, de nombreuses études ont révélés l'intérêt de la phytothérapie dans le traitement des diverses maladies. Les extraits ou les huiles essentielles des plantes médicinales contiennent des molécules antioxydants naturels très efficaces, tels que les dérivés de l'isoprène, le carotène, les terpènes et divers polyphénols qui pourraient servir d'agents protecteurs.

Ce travail de thèse a été mené dans l'objectif, d'une part, d'examiner l'impact toxicologique de l'insecticide Voliam Targo® ; et d'autre part, d'évaluer l'effet protecteur possible d'une supplémentation de l'huile essentielle de thym *Thymus vulgaris* sur les paramètres biochimiques, histologiques et immunohistochimiques chez le lapin male de souche synthétique (*Oryctolagus cuniculus*).

Le choix de produit biocide à tester, dans ce travail de thèse, a été fait suite aux résultats obtenus sur la toxicité des avermectines commercialisés en Algérie (abamectine, emamectine

benzoate) (Khaldoun Oularbi *et al.*, 2013 ; Khaldoun Oularbi *et al.*, 2015 ; Khaldoun Oularbi *et al.*, 2017) ; nous avons ciblé ainsi une formulation insecticide à base d'abamectine à savoir, le Voliam Targo®. Cette formulation est une association de deux molécules, dont l'une est toxique qui est l'abamectine et la deuxième est non toxique (chlorantraniliprole) ; ce produit phytosanitaire (VT) a été introduit et homologué en Algérie depuis 2011 (ACTA, 2015).

Le choix ciblé de la plante a été basé sur la large distribution et répartition de cette espèce en Algérie, sa disponibilité et son emploi large en culinaire, en cosmétique et en médecine traditionnel par les populations locales.

✓ **Effet du traitement sur le comportement des lapins**

L'administration par voie orale de l'insecticide Voliam Targo® a entraîné des troubles du comportement des lapins traités. Les principales manifestations de toxicité observées sont des troubles du système nerveux central (tremblement, agitation et baisse d'activité des animaux). Nos résultats, sont en accord avec ceux observés par Khaldoun Oularbi *et al.* (2013) suite à un traitement par un pesticide de la famille des avermectines dont la matière active est l'abamectine, chez le rat. Ces troubles pourraient s'expliquer par l'interférence entre l'abamectine, une des matières actives de VT, et les canaux chlorures glutamate-dépendants (GABA) présents dans le système nerveux central des mammifères reflétant ainsi la neurotoxicité de pesticide testé.

Durant la période de traitement, aucun trouble du comportement n'a été noté chez les lapins traités par HET et ceux traités par VT+HET. Ce résultat est en accord avec celui de Fachini-Queiroz *et al.* (2012) indiquant qu'aucune perturbation comportementale apparente n'a été observée chez les animaux exposés à l'huile essentielle de thym à des doses de 250, 500 et 750 mg/kg. Les valeurs élevées de DL50 (4000 mg/kg) signalées chez le rat suggèrent également que l'huile essentielle de thym est relativement sans danger et non toxique.

✓ **Évolution du poids corporel**

La variation du poids corporel est un indicateur de la détérioration de l'état de santé général de l'animal. Nos résultats montrent que l'exposition au Voliam Targo® provoque une diminution significative du poids corporel moyen des lapins traités en comparaison avec les lapins témoins et ceux traités par HET.

Des résultats similaires sont rapportés chez les rats traités avec 5 mg/kg/jour et 10 mg/kg/jour d'émamectine benzoate (Khaldoun Oularbi *et al.*, 2015) et par une dose de 2 mg/kg/j d'abamectine (Khaldoun Oularbi *et al.*, 2017). Également, Meligi et Hassan, (2017) ont

démontré que le traitement par l'abamectine chez le rat pendant 28 jours est à l'origine d'une baisse de prise de poids (Meligi et Hassan, 2017).

Cette diminution de poids corporel est associée à une baisse de la prise de la nourriture et de l'eau chez les lapins traités par le VT. Nos résultats confirment l'hypothèse, d'autres travaux, sur la relation entre le poids corporel et la prise de nourriture et boisson suite au traitement par les pesticides (Tripathi et Srivastav, 2010). Cela pourrait être expliqué par l'effet délétère de VT induisant une diminution de la prise alimentaire, une mauvaise appétence des aliments ou une altération de l'absorption intestinale des nutriments (Ball et Chhabra 1981 ; El-Sheikh et Galal, 2015).

Cependant, contrairement au traitement par le VT, la co-administration de l'HE de *T. vulgaris* aux lapins traités par le VT a permis le maintien d'un poids corporel moyen proche de celui de témoin ; Ce qui montre l'effet amélioratif de l'huile essentielle de thym co-administré avec le VT.

Nos résultats sont en ligne avec ceux de Benourad et al. (2018) qui ont démontré une augmentation du poids corporel moyen des rats traités par le Dicofol, un pesticide de la famille des organochlorés et supplémentés par l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* en comparaison avec celui des rats traités uniquement par le Dicofol. Des résultats similaires sont rapportés chez les rats intoxiqués par le chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) et co-traités avec l'extrait de thym montrant une amélioration significative du poids corporel de ces derniers par rapport aux rats traités uniquement par $AlCl_3$ (Mokrane *et al.*, 2020).

✓ Évolution du poids absolu et relatif des organes

Généralement, les altérations de la masse relative des organes reflètent la toxicité après l'exposition à une substance toxique ; le cœur, le foie et les reins sont les premiers organes affectés par la réaction métabolique provoquée par le toxique (Jothy *et al.*, 2011).

Nos données révèlent que le traitement par le VT provoque une augmentation significative ($p < 0,05$) du poids absolu et relatif des reins, et une diminution significative du poids absolu et relatif de cœur, alors que le poids moyen de foie ne semble pas être affecté par ce traitement.

L'augmentation du poids relatif des reins chez les lapins exposés au VT peut être attribuée à l'effet toxique de l'insecticide ou à la réduction du poids corporel des animaux traités. Simons et al. (1995) ont signalé que l'augmentation du poids absolus ou relatifs des organes des animaux représente un indicateur de la cytotoxicité induite par les insecticides.

Tandis que la diminution du poids absolu et relative de cœur peut être due aux effets toxiques de l'insecticide (Voliam Targo®) qui provoque des altérations au niveau du parenchyme cardiaque.

Par contre, le traitement par le VT supplémenté par HET, a permis de normaliser les poids relatifs et absolus des organes ; il semble que la co-administration de HET a entraîné une amélioration du poids des reins et de cœur en atténuant la toxicité de l'insecticide (Voliam Targo®).

✓ Impact néphrotoxique du VT et effet amélioratif de l'huile essentielle de thym

Le rein est un organe cible pour les composés xénobiotiques notamment les polluants environnementaux suite au volume sanguin supplémenté élevé et son rôle en concentrant les solutés. Cette susceptibilité du rein à la toxicité produit une variété d'effets toxiques rénaux impliquant les cellules tubulaires et glomérulaires (Mohamed *et al.*, 2003).

La présente étude a démontré que l'administration du VT augmente significativement les taux plasmatiques d'acide urique et de créatinine chez les lapins. Cette augmentation des biomarqueurs rénaux indique la capacité diminuée des reins de filtrer les déchets du sang et de les excréter dans l'urine reflétant ainsi une altération de la fonction rénale. Ces résultats ont été confirmés par l'examen histologique des reins qui a montré des altérations histopathologiques marquées dans le tissu rénal chez le lot traité par le VT, comprenant une dilatation des tubules proximaux et distaux, une congestion des vaisseaux sanguins et une infiltration de lymphocytes dans l'interstitium cortical rénal.

Nos résultats concordent avec des études antérieures qui ont documenté des résultats similaires chez des rats albinos mâles exposés à des insecticides à base d'ivermectine (Eissa et Zidan, 2010 ; Khaldoun Oularbi *et al.*, 2015 ; Magdy *et al.*, 2016 ; Nasr *et al.*, 2016).

De plus, le traitement combiné de VT+HET dans la présente étude a mis en évidence une amélioration significative des biomarqueurs de la fonction rénale et des altérations histologiques du rein. Ainsi, l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* peut avoir un effet protecteur contre la néphrotoxicité induite suite à l'administration du VT.

Cette action néphro-protectrice de notre huile essentielle de chémotype carvacrol est due probablement à ses capacités antioxydantes et antiradicalaires. L'activité antioxydante de l'huile de thym a été documentée par des travaux antérieurs appliquant différentes méthodes. Les

propriétés antioxydantes des extraits de thym sont principalement dues à la présence de constituants phénoliques, notamment le thymol et le carvacrol (Lee et Shibamoto, 2002 ; Miura *et al.*, 2002). En outre, Ündeğer *et al.* (2009) ont prouvé que le carvacrol a révélé une activité antioxydante puissante par rapport à celle de l'antioxydant standard Trolox®.

✓ Impact neurotoxique du VT et effet amélioratif de l'huile essentielle de thym

Nos résultats démontrent la neurotoxicité du VT qui se manifeste par les altérations histologiques des tissus du cortex cérébral, l'hippocampe et le cervelet des lapins traités. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Radi *et al.* (2020) qui ont révélé que l'administration de l'abamectine à une dose de 2 mg/kg chez le rat pendant 5 jours a provoqué des lésions histologiques marquées au niveau du cortex cérébral (vacuolisation de neuropile, des hémorragies et des neurones avec des noyaux picnotiques) et de l'hippocampe (des changements dégénératifs des neurones pyramidaux).

Le stress oxydatif est considéré comme un mécanisme principal des dommages aux cellules neuronales impliqués dans la neurotoxicité induite par les pesticides (Qiao *et al.*, 2005). Les insecticides agissent comme des pro-oxydants et déclenchent des dommages oxydatifs dans le tissu cérébral (Limón-Pacheco et Gonsebatt, 2009). De plus, des études antérieures ont montré que l'ivermectine induit une neurotoxicité via des dommages oxydatifs, l'apoptose (Li *et al.*, 2013) ou une régulation négative de la P-gp (Sun *et al.*, 2010).

Les avermectines sont parmi les composés les plus largement utilisés pour la lutte contre les insectes aujourd'hui. En raison de leurs propriétés physico-chimiques, de lipophilie et d'insolubilité dans l'eau, les avermectines peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique et provoquer des effets nocifs sur les tissus cérébraux (Tišler et Eržen, 2006). De plus, le tissu cérébral est particulièrement vulnérable aux dommages oxydatifs dus à sa forte teneur en acides gras polyinsaturés et sa forte consommation d'oxygène (Dringen, 2000 ; Lukaszewicz-Hussain, 2010).

Étant donné que les avermectines agissent comme des agonistes des récepteurs GABA-A chez les vertébrés, leur sécurité chez les animaux nécessite une barrière hémato-encéphalique intacte avec une P-gp intégré. La P-gp, codée par le gène *mdr-1*, est un transporteur d'efflux de la superfamille des transporteurs ATP Binding Cassette (ABC) (Jones et George, 2004), exprimé dans les cellules endothéliales capillaires du cerveau, du placenta et de l'intestin (Ballent *et al.*, 2006). La P-gp protège les animaux contre la diffusion des avermectines dans le cerveau et de la neurotoxicité qui en résulte (Macdonald et Gledhill, 2007).

En outre, il a été démontré que l'effet neurotoxique de l'ABA est due à son effet inhibiteur efficace du transport facilité de la p-gp (Lankas *et al.*, 1998). L'ABA inhibe la fonction de transport d'efflux de la P-gp, augmentant ainsi sa pénétration dans le SNC et facilitant l'interaction avec les récepteurs GABA (Radi *et al.*, 2020).

Par ailleurs, il a été prouvé que l'ABA pourrait augmenter de manière significative l'expression du récepteur GABA-A dans le tissu cérébral des rats intoxiqués par l'ABM. Le mécanisme d'action de la neurotoxicité induite par les lactones macrocycliques (y compris l'ABA) chez les ravageurs repose sur leur grande affinité pour les canaux chlorures glutamate-dépendants dans les cellules neuronales et musculaires. Chez les mammifères, ils se lient au récepteur du neurotransmetteur inhibiteur (GABA) et ouvrent les canaux Cl ionotropes dépendants du récepteur GABA-A qui sont limités au SNC (McCavera *et al.*, 2007). Les ions chlorure affluent alors en excès dans le neurone postsynaptique, provoquant une hyperpolarisation du potentiel membranaire et perturbant la transmission du signal nerveux (Novelli *et al.*, 2012).

Dans le présent travail, tous les lapins traités par VT + HET ont présenté une architecture améliorée à la fois du cortex cérébral, cervelet et l'hippocampe. Ce ci confirme l'activité neuroprotectrice de HET contre la neurotoxicité de VT, qui pourrait être attribué à son pouvoir antioxydant puissant.

✓ **Impact cardiotoxique du VT et effet amélioratif de l'huile essentielle de thym**

Les maladies cardiovasculaires (MCV) constituent l'une des principales causes de mortalité et morbidité dans le monde (Mensah *et al.*, 2019). En fait, il ya de plus en plus des évidences scientifiques établissant un lien causal entre l'exposition aux pesticides et la survenue des maladies cardiovasculaires (Sekhatha *et al.*, 2016). Les radicaux libres et le stress oxydatif jouent un rôle crucial dans la physiopathologie de plusieurs MCV, notamment : l'insuffisance cardiaque congestive, la cardiomyopathie, l'athérosclérose et cardiopathie ischémique (Bagchi *et al.*, 2003). Ainsi, les antioxydants naturels peuvent offrir un moyen efficace de lutter et de renforcer les défenses de l'organisme contre les radicaux libres et les MCV (Halliwell *et al.*, 1992).

Le profil lipidique constitue un facteur clé de prédiction du risque cardio-vasculaire. LDL-C est considérée comme la principale lipoprotéine athérogène. Des données épidémiologiques récentes démontrent qu'un taux élevé en LDL-C et/ou un faible taux de HDL-C ont été corrélé avec un risque élevé de développement des MCV. De plus, les rapports CT/HDL-C et LDL-C/HDL-C sont également utilisés pour évaluer le risque cardiovasculaire ; ils semblent être plus

prédictifs de risque cardiovasculaire que la concentration individuelle des lipoprotéine (Orozco-Beltran *et al.*, 2017).

Un autre indice critique d'estimation du risque cardiaque est l'indice athérogène du plasma (IAP) qu'est défini comme le logarithme [log] du rapport entre la concentration plasmatique de TG et le HDL-C et est fortement corrélé avec le risque d'athérosclérose et des maladies coronariennes. L'IAP est le meilleur déterminant pour le taux d'estérification fractionné du HDL-C et reflète la relation entre les lipoprotéines protectrices et athérogènes (Dobiášová *et al.*, 2011).

Nos résultats montrent que l'administration de VT provoquait une diminution significative des taux plasmatiques du cholestérol total et du LDL-C par rapport au témoin. Nos données sont en accord avec celles obtenues par Meligi et Hassen (2017) qui ont démontré une réduction significative du taux sérique de LDL-C chez les rats albinos mâles traités par l'abamectine en comparaison aux rats témoins ($36,17 \pm 0,93$ mg/dl vs $42,67 \pm 2,58$ mg/dl, $P < 0,05$). De plus, la diminution du taux de cholestérol total dans notre étude chez les lapins traité par le VT est en adéquation avec celle rapportée par Magdy *et al.* (2016) qui ont rapporté que le traitement par l'abamectine a entraîné une réduction significative de la concentration de cholestérol total.

En fait, les avermectines sont des molécules très hydrophobes ; leur transport sanguin se fait via les particules de lipoprotéines plasmatiques LDL-C, HDL-C et VLDL. Ainsi, la pharmacocinétique des avermectines est influencée par les taux plasmatiques de lipoprotéines (Bassissi *et al.*, 2004). Selon Miyajima *et al.* (2015), l'augmentation du taux de cholestérol pourrait modifier le profil de distribution de l'ivermectine dans le plasma du lapin et, par conséquent, sa concentration pourrait être augmentée.

La diminution du taux du cholestérol total et du LDL-C chez le lapin intoxiqué par le VT pourrait être due à l'action de l'abamectine, une des matières actives du VT, sur le récepteur farnésoïde X (FXR) qui maintient l'homéostasie du cholestérol et peut être la cause de l'hypocholestérolémie chez le lapin en régulant l'expression des gènes (Jin *et al.*, 2013).

En effet, Jin *et al.* (2013) ont démontré que l'ivermectine, un médicament antelmenthique de la famille des avermectines possédant le même mécanisme d'action que celui de l'abamectine, est considéré comme un ligand du FXR qui maintient l'homéostasie des acides biliaires et du cholestérol et peut améliorer efficacement l'hyperlipidémie chez la souris diabétique en régulant l'expression des gènes. Ils suggèrent que l'ivermectine régule le métabolisme de cholestérol en se liant au récepteur nucléaire FXR avec une sélectivité élevée.

Considérant que l'abamectine possède une structure chimique et un poids moléculaire (873.1 Da) très proches de ceux de l'ivermectine (875.1 Da), la diminution du taux du cholestérol total après l'administration de VT pourrait être due à l'effet possible de la molécule d'abamectine, une des matières actives de VT, sur le récepteur nucléaire FXR.

Nos données indiquent que le taux du CT, du LDL-C et le rapport LDL-C/HDL-C ont été significativement diminués dans le groupe traité par le VT par rapport aux autres groupes, reflétant ainsi un effet anti-athérogénique de ce pesticide. Ainsi, la présente étude suggère l'effet possible de VT sur le mécanisme hypolipidémique. Toutefois, aucun effet sur les taux de triglycérides, de HDL-C et de VLDL-C n'a été observé d'où la nécessité d'effectuer d'autres études détaillées pour une meilleure interprétation.

Contrairement à l'effet bénéfique de VT sur le taux des indices athérogènes, nos résultats histologiques montrent que le traitement par le VT a entraîné des altérations histopathologiques du tissu cardiaque, à savoir une congestion des vaisseaux sanguins, œdème, fibrine et une infiltration des cellules inflammatoires.

Nos résultats sont en corrélation avec ceux obtenus par Ahmed et al. (2016) indiquant que l'administration de 0.8 mg/kg d'abamectine pendant 28 jours chez le rat a provoqué des lésions histologiques au niveau de myocarde des rats traités, à savoir une congestion des vaisseaux sanguins et une nécrose des myocytes cardiaques associée à une infiltration de cellules inflammatoires. De nombreuses études ont révélé les effets néfastes des pesticides sur le tissu cardiaque (Thomaz *et al.*, 2009; Hatice et Kalender, 2011).

Nos résultats montrent que la co-administration de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* a permis de minimiser les effets néfastes du VT. L'effet cardio-protecteur de notre huile essentielle est très probablement attribué à l'effet antioxydant puissant de son composé terpénique majoritaire « le carvacrol ». Ces résultats sont en accord avec une étude antérieure d'El-Sayed et al. (2016) qui ont démontré l'effet cardioprotecteur du carvacrol contre la cardiotoxicité induite par la doxorubicine (un médicament anticancéreux). Récemment, des résultats semblables ont été rapportés par Guesmi et al. (2020) confirmant l'action cardioprotectrice de l'huile essentielle de *Thymus algeriensis* sur la cardio-toxicité induite par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) chez le rat.

✓ Impact hépatotoxique du VT et effet amélioratif de l'huile essentielle de thym

Le foie est le principal organe de multiples voies métaboliques. Il est considéré comme le

premier site de la détoxification des substances toxiques et des polluants environnementaux (Karami-Mohajeri et Abdollahi, 2011). Par conséquent, il est potentiellement vulnérable aux lésions induites par les xénobiotiques.

L'exploration de la fonction hépatique suppose l'évaluation des paramètres suivants : l'aspartate aminotransférase (ASAT), l'alanine amino Transférase (ALAT), le gamma glutamyl transférase (γ -GT) et la glycémie.

Le traitement par le VT a induit une augmentation significative de l'activité enzymatique des transaminases (ALAT, ASAT) et de γ -GT chez le lot traité par le VT par rapport au lot témoin. Des observations similaires ont été rapportées par d'autres études suite à l'exposition des animaux aux insecticides à base d'abamectine (Eissa et Zidan, 2010 ; Khaldoun Oularbi *et al.*, 2013 ; Meligi et Hassan, 2017 ; Abdel-Daim et Abdellatif, 2018). Les transaminases sont des biomarqueurs de la fonction hépatique et leur augmentation plasmatique est probablement liée à l'effet hépatotoxique de l'insecticide testé « Voliam Targo[®] ».

L'augmentation de la concentration des transaminases plasmatiques ASAT et ALAT chez les lapins traités par le VT indique l'atteinte tissulaire hépatique. En effet, l'augmentation de l'activité ASAT reflète une lésion cellulaire ; en particulier au niveau hépatique, cardiaque, rénal ou musculaire. Tandis que l'activité de l'enzyme ALAT, qui est plus spécifique du foie que ASAT, reflète particulièrement une lésion cellulaire hépatique. Selon Gulati *et al.* (2018), l'activité de la γ -GT d'origine membranaire augmente dans la plupart des troubles hépatiques.

L'augmentation marquée de l'activité hépatiques des transaminases et de l'enzyme γ -GT laisse donc suggérer des lésions du tissu hépatique; parce que ces enzymes sont libérées dans la circulation sanguine suite aux dommages hépatocellulaires (Gulati *et al.*, 2018). De plus, les activités élevées des enzymes hépatiques dans le sérum reflétaient une perméabilité accrue de la membrane hépatocellulaire, résultant des lésions des hépatocytes, et étaient associées à une nécrose hépatique, qui pourrait être le résultat d'une génération accrue d'espèces réactives de l'oxygène induite par l'administration répétée du toxique (Contreras Zentella *et al.*, 2016).

En outre, une hyperglycémie a été observée chez les lapins traités avec le VT et qui est probablement due à un dysfonctionnement du métabolisme glucidique sous l'effet de la matière active l'abamectin. Des résultats similaires des études antérieures ont montré que l'exposition aux insecticides à base d'ivermectine (abamectine ou benzoate d'émamectine) augmentait

significativement le taux de glucose sérique chez le rat (Khaldoun Oularbi *et al.*, 2013 ; Magdy *et al.*, 2016 ; Khaldoun Oularbi *et al.*, 2017) .

Zanoli *et al.* (2012), ont rapporté que l'abamectine perturbe le métabolisme bioénergétique chez le rat. Ainsi, en cas d'agressions, le métabolisme hépatique des protéines est forcément modifié vers la production des systèmes de défense et la néoglucogenèse.

D'autre part, Il a été postulé que l'élévation de la glycémie pourrait refléter une altération du métabolisme des glucides en raison d'une glycogénolyse élevée dans les hépatocytes, probablement médiée par une augmentation des hormones adrénocorticotrophiques et glyco-gènes et/ou une diminution de l'activité de l'insuline (Raja *et al.*, 1992). De plus, Magdy *et al.* (2016) ont rapporté que l'hyperglycémie signalée chez les animaux intoxiqués par l'abamectine pourrait être attribuée à la diminution de l'activité des cellules β pancréatiques et à l'altération de la production d'insuline.

Dans cette étude, la supplémentation en huile essentielle de *Thymus vulgaris* à une dose de 0,5 mg/kg de poids corporel a atténué l'effet hépatotoxique du VT en améliorant les taux des biomarqueurs hépatiques (ALAT, ASAT et γ -GT) et la concentration de glucose. Ces résultats prouvent que l'huile essentielle de *T. vulgaris* maintient l'intégrité structurale de la membrane hépatocellulaire et protège la structure des cellules hépatiques contre les dommages induits par le VT.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Khalifa et Alkhalaf (2020) montrant que la co-administration de feuilles de thym en poudre a nettement atténué les niveaux élevés de transaminases induits par le malathion, un insecticide organophosphoré, vers les normes. De même, l'extrait de *Thymus vulgaris* a présenté un effet hépatoprotecteur contre les taux élevés des transaminases hépatiques induites par l'administration du plomb (El-Boshy *et al.*, 2019) et de l'alcool (El-Newary *et al.*, 2017).

Les perturbations biochimiques des biomarqueurs de la fonction hépatiques dans cette étude sont en totale adéquation avec les changements histopathologiques du foie chez les lapins exposés au VT.

L'examen histologique du parenchyme hépatique chez le lapin traité par le VT pendant 21 jours a révélé une architecture plus ou moins désorganisée des lobules hépatiques, avec présence d'infiltrat inflammatoire au niveau des espaces portes, une dilatation et congestion vasculaire, une stéatose ainsi qu'une accumulation des fibres de collagène autour des espaces portes.

Plusieurs auteurs ont montrés des altérations histologiques similaires du foie chez le rat intoxiqué par l'abamectine (Khaldoun Oularbi *et al.*, 2013 ; Magdy *et al.*, 2016 ; Abdel-Daim et Abdellatif, 2018 ; Radi *et al.*, 2020). D'autres résultats similaires ont été rapporté dans le foie du poisson intoxiqué par l'abamectine (Kushwaha *et al.*, 2020).

La stéatose hépatique observée dans les coupes du tissu hépatique des lapins traités par le VT est probablement due à une altération du métabolisme lipidique et la diminution de l'oxydation hépatique des acides gras, provoquant ainsi leur accumulation. La stéatose hépatique non alcoolique est une cause fréquente de l'augmentation modérée des transaminases, et peut s'accompagner d'une augmentation des γ -GT (Ontko, 1973).

L'intoxication par le VT peut être une source des radicaux libres et peut causer des dommages oxydatifs. Kushwaha *et al.* (2020) ont montré chez des organismes aquatiques, que le traitement par ABA provoque une génération des radicaux libres qui entravent le mécanisme de défense des hépatocytes entraînant ainsi une nécrose cellulaire. Selon Astiz *et al.* (2012), les pesticides génèrent des espèces réactives oxygénées (ROS) qui affecte le niveau d'antioxydants dans les cellules et provoque un épuisement des antioxydants avec une surproduction de ROS; cette condition peut conduire à une inflammation des organes cibles.

Chez les lapins traités par l'insecticide et supplémenté par l'huile essentielle de thym, l'examen des coupes histologiques révèle une réorganisation architecturale des lobules hépatiques. Ces résultats corroborent avec ceux de Grespan *et al.* (2014) montrant un effet hépato-protecteur de la co-administration de l'huile essentielle de *T. vulgaris* suite à une hépato-toxicité induite par le paracétamol chez la souris. De plus, nos résultats sont en accord avec ceux d'El-Newary *et al.* (2017) lors d'une hépato-toxicité induite par l'alcool chez le rat et aussi avec ceux d'El-Boshy *et al.* (2019) qui ont montré l'effet réparateur de l'extrait de thym contre le stress oxydatif induit par la toxicité du plomb dans le foie des rats.

Le mécanisme de défense de base et le plus important de l'organisme sont les agents antioxydants (Abdollahi *et al.*, 2004). Le terme antioxydant désigne toute substance qui retarde, prévient ou supprime les dommages oxydatifs d'une molécule cible (Halliwell, 2007). Les composés phénoliques sont considérés comme favorisant une santé optimale grâce à leurs propriétés antioxydantes et anti-radicalaires. L'huile essentielle de thym est riche en composés phénoliques et possède une forte activité de piégeage des radicaux libres.

Les phénols sont des composés antioxydants bien connus et capables de réduire le stress oxydatif (El-Boshy *et al.*, 2019). En fait, les activités anti-tumorales, immuno-modulatrices, anti-inflammatoires et antioxydantes de genre de *Thymus* sont principalement attribuées à leurs composés phénoliques, y compris le carvacrol (El-Nekeety *et al.*, 2011 ; Kozics *et al.*, 2013 ; Nikolić *et al.*, 2014 ; Habashy *et al.*, 2018). Les phénols exercent leur action antioxydante en chélatant les ions métalliques redox et/ou en chélatant les radicaux libre provoquant ainsi l'arrêt de la réaction en chaîne des radicaux libres (Habashy *et al.*, 2018). Par conséquent, on suggère que l'activité protectrice de l'huile essentielle *Thymus vulgaris* contre la toxicité de VT est attribué à sa richesse en composé phénolique le carvacrol.

✓ **Expression hépatique de la Bcl2 et l'AFP chez les lapins traités par VT et/ou HET**

Afin de mieux comprendre le mécanisme moléculaire de la toxicité du VT ainsi que le mécanisme probable de l'effet hépato-protecteur de l'huile essentielle de thym, une étude immunohistochimique a été réalisé pour évaluer l'expression des deux biomarqueurs, à savoir alpha-foetoprotéine (AFP) et Bcl-2 au niveau hépatique.

L'étude IHC de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 a montré une expression positive chez le lot témoin et celui traité par HET, une forte immuno-expression de Bcl-2 dans le groupe VT + HET et une immunoexpression négative de la Bcl-2 dans le groupe VT.

Il a été précédemment indiqué que la pathogenèse de la toxicité de l'abamectine est médié par le stress oxydatif et l'apoptose (Li *et al.*, 2013). La Bcl2 favorise la survie cellulaire en supprimant l'apoptose. Durant un stress oxydatif, l'apoptose est induite suite à l'activation de la voie mitochondriale (Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016). Une surexpression de la Bcl-2 suite à un stress oxydatif peut inhiber la perméabilité des membranes de la mitochondrie et supprime l'activité des caspases en empêchant l'efflux du cytochrome C des mitochondries et/ou en se liant au facteur d'activation de l'apoptose (APAF-1) (Haraguchi *et al.*, 2000).

Dans la présente étude, l'expression de la protéine Bcl-2 était significativement régulée à la baisse chez les lapins exposés au VT, ainsi, le mécanisme de toxicité de ce pesticide peut être attribué à l'accumulation intracellulaire excessive de ROS conduisant à des dommages oxydatifs de l'ADN, qui aboutissent finalement à l'apoptose cellulaire.

Toutefois, la co-administration de HET aux lapins traités par VT a considérablement augmenté l'expression de Bcl-2 dans le tissu hépatique, ce qui suggère que l' HET peut protéger

la fonction cellulaire normale via son effet anti-apoptotique. De plus, l'HET contient des substances bioactives possédant un pouvoir antioxydant très fort qui jouent un rôle dans l'élimination des dommages oxydatifs. Nos résultats reflètent l'effet anti-apoptotique de l'HET qui stimule la régénération cellulaire après les lésions hépatiques induites par l'insecticide VT ; ce qui explique l'effet protecteur et amélioratif de cette huile sur le plan biochimique et histologique.

L'AFP est la protéine plasmatique la plus abondante pendant la période fœtale. Elle est exprimé à un taux élevé dans le sac vitellin, le foie et dans une moindre mesure dans l'intestin au cours du développement fœtal. Cependant, la synthèse de l'AFP est nettement diminuée après la naissance et seule une petite quantité d'AFP continue d'être produite chez l'adulte. L'expression de l'AFP peut être reprise dans certaines conditions physiopathologiques, telles que la régénération du foie après une exposition à un xénobiotique (Tomasi, 1977 ; Roncero *et al.*, 1998 ; Kuhlmann et Peschke, 2006).

L'augmentation de l'expression de l'AFP après une nécrose hépatique est considérée comme révélatrice d'une régénération ou d'une prolifération hépatique (Schmidt et Dalhoff, 2005 ; Mizejewski, 2015 ; Marzinke et Dufour, 2020). Plusieurs études ont démontré que l'AFP est anti-apoptotique (Zhang *et al.*, 2007 ; Ho *et al.*, 2009) et joue un rôle clé dans la promotion de la prolifération cellulaire (Li *et al.*, 2002).

Dans notre étude, nous avons trouvé un marquage négatif de l'AFP dans le groupe traité par le VT. Tandis qu'une forte expression de l'AFP dans les tissus hépatiques des lapins traités avec VT+HET a été noté. Cette augmentation de l'expression du gène AFP pourrait être due à l'effet anti-apoptotique du HET qui stimule la régénération des cellules hépatiques suite aux dommages tissulaires causés par l'insecticide. L'huile essentielle de thym via son pouvoir antioxydant puissant pourrait réduire le stress oxydatif induit par le VT, donc elle stimule le foie à se régénérer et aux hépatocytes de se proliférer.

Il est à noter que les lapins traités avec une dose de 0,5 mg/kg p.c. de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* n'ont révélé aucun changement significatif du poids corporel, du poids relatif des organes, des paramètres biochimiques de la fonction rénale et hépatique, ou de la structure histologique des tissus cibles en comparaison avec les lapins témoins. En fait, Domaracky *et al.* (2007) ont rapporté que l'huile essentielle de thym n'affectait pas le développement de l'embryon de souris lorsqu'elle était ajoutée à un régime commercial à une concentration de 0.25%, ce qui suggérait l'innocuité de cette huile.

En outre, une étude récente, ciblant la toxicité de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* administrée par gavage orale à des doses répétées chez le rat pendant 28 jours, n'a montré aucun changement significatif du poids corporel moyen et des poids relatifs des organes cibles chez les rats traités par l'HET avec des doses de 100, 250 et 500 mg/kg/jour par rapport aux rats témoins. De plus, les paramètres biochimiques de la fonction rénale et hépatique ainsi que ceux du bilan lipidique des rats femelles et mâles traités n'ont montré aucun changement significatif par rapport au groupe témoin. Par ailleurs, l'étude histopathologique des organes des rats sacrifiés après la période de traitement de 28 jours n'a révélé aucune altération et ce pour les trois doses testées de l'HET en comparaison avec le lot témoin ; à l'exception des poumons, où des altérations histologiques sévères au niveau pulmonaire ont été remarquées chez les rats traités par HET à une dose de 500 mg/kg/jour. Il a été suggéré ainsi que la dose sans effet nocif observé (NOAEL) de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* est supérieure à 250 mg/kg/jour chez le rat (Rojas-Armas *et al.*, 2019).

Dans l'ensemble, les désordres observés après administration de l'insecticide testé (Voliam Targo®) aux animaux témoignent sur ses effets toxiques, particulièrement aux niveaux rénal, nerveux, cardiaque et hépatique. Cette toxicité du VT pourrait être due à l'induction du stress oxydatif et le déclenchement de l'apoptose ce qui induit à un dysfonctionnement et une perte cellulaire.

L'association de l'huile essentielle de thym avec le VT a diminué de façon impressionnante le niveau de la toxicité de cette dernière, en modulant les niveaux des marqueurs biochimiques, ainsi que sur le plan histologique ou une protection parfaite des tissus a été assurée par HET au niveau des organes (reins, SNC, cœur, foie) touchés par la toxicité induite par le VT. Cet effet protecteur de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* pourrait être du au pouvoir antioxydant et anti-apoptotique de son composé majoritaire le carvacrol.

✓ Rendement de l'huile essentielle de thym

L'huile essentielle a été extraite par hydrodistillation de type cleverger à partir de la matière végétale sèche de la partie aérienne de la plante *T. vulgaris*. Le rendement était estimé de 0.30%. Nos résultats concordent avec ceux rapportés par Atti-Santos *et al.* (2004) dont le rendement est estimé à 0.25% pour *T. vulgaris* de la région de Caxias do Sul au Sud de Brésil ; Abbassy *et Marei*, (2013) dont la teneur en huile essentielle est estimé à 0.3% pour *T. vulgaris* de la région du Sinaï en Egypte et Alsaraf *et al.*, (2020) qui ont obtenu un rendement de 0.44% pour la même plante poussant en Muscat, Sultanat d'Oman.

Cependant, ce taux est nettement inférieur à celui obtenu par Bouguerra et al. (2017) indiquant que les parties aériennes de *Thymus vulgaris* récolté en période de Janvier-Mars dans la région de Blida, ont un rendement en huile essentielle de 1.58%. Il est aussi relativement inférieur à celui rapporté par Imelouane et al. (2009) au Maroc avec un rendement en huile essentielle de 1% de la même espèce récoltée dans la région de Taforalt.

D'après la littérature, cette variabilité de rendement en huile essentielle de *Thymus vulgaris* peut être due à divers facteurs environnementaux, prenant en compte que l'huile essentielle est un produit métabolique de cellules végétales et sa composition quantitative et qualitative peut être influencée par les conditions climatiques (notamment le type de climat, l'altitude, la température), l'origine géographique, le type de sol, le stade de croissance de la plante en question, la période de récolte, les pratiques culturales et la technique d'extraction (Hudaib et Aburjai, 2007).

✓ **Propriétés physiques et organoleptiques de l'huile essentielle de thym**

Nos résultats montrent que les paramètres physiques et organoleptiques de notre huile essentielle sont conformes aux normes AFNOR et ceux déterminées par la pharmacopée européenne 2005. La densité à 20°C de l'HE du Thym (0.92) est inférieure à celle de l'eau, ce qui explique sa non miscibilité aux solutions hydrauliques.

L'indice de réfraction d'une huile essentielle dépend de sa composition chimique et plus spécifiquement de sa teneur en composants à chaîne longue, tels que les monoterpènes et les dérivés oxygénés (Koba, 2004). Plus que l'HE est riche en monoterpènes, plus que l'indice de réfraction sera élevé ; ce qui est le cas de l'HET de notre étude.

✓ **Composition chimique de l'huile essentielle de thym**

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes constitués de plusieurs dizaines, voire plusieurs centaines de composés, principalement terpéniques (Paolini, 2005). Elles sont constituées également de monoterpènes et des sesquiterpènes (possédant respectivement 10 et 15 atomes de carbone) et plus rarement des diterpènes (20 atomes de carbone) ainsi que des composés linéaires non terpéniques et des phénylpropanoïdes (Chiasson et Beloin, 2007).

La composition chimique de l'huile essentielle peut être différente au sein d'une même espèce, on parle alors de races chimiques ou de chémotypes. Il s'agit d'un polymorphisme chimique où une espèce peut être homogène au niveau de son caryotype et produire des huiles essentielles de compositions différentes. La teneur élevée en un composé définit le chémotype

de l'espèce (Lukas *et al.*, 2015). Dans le cas de *Thymus vulgaris*, sept (7) chémotypes ont été individualisés, deux sont phénoliques dont le composé majeur est le thymol ou le carvacrol et cinq chémotypes non phénoliques représentés par la prédominance de géraniol, α -terpinéol, thujène-4-ol, linalool et 1,8-cinéole (Kulevanova *et al.*, 1996 ; Guillén et Manzanos, 1998 ; Thompson *et al.*, 2003 ; Torras *et al.*, 2007).

L'analyse chromatographique de l'huile essentielle de *T. vulgaris* par CG-SM a permis d'identifier 13 composés dont un majeur le carvacrol (86.25%) qui est un monoterpène oxygéné. Ces résultats concordent relativement avec ceux rapportés par plusieurs auteurs. La composition chimique de l'huile de *T. vulgaris* collecté au Brésil a révélé une prédominance du carvacrol (45,5%), de l' α -terpinéol (22,9%) et de l'endo-Bornéol (14,3%) (Fachini-Queiroz *et al.*, 2012). Les résultats obtenus par Zantar *et al.* (2014) montrent que l'huile essentielle de *T. vulgaris* cultivé dans la région de Beni Idder dans le nord-est du Maroc, est constitué majoritairement de carvacrol (81.2%), alors que la teneur des autres constituants était relativement faibles : p-cymène (3,8 %), γ -terpinène (2,7 %), α -humulène (2,0 %) et α -terpinène (0,7%). Ainsi, les travaux d'Abedini *et al.* (2014) ont révélé la présence de carvacrol (57.3%), suivi de linalool (11.8%) et de thymol (10.67%) au niveau de l'huile essentielle de *T. vulgaris* cultivé dans la province du Khorasan, au nord-est de l'Iran.

Par ailleurs, la composition chimique de l'huile essentielle étudiée diffère totalement de celles précédemment publiées par d'autres études et affiche un profil chimique de l'huile essentielle très fluctuant (Mohammed *et al.*, 2016 ; Bouguerra *et al.*, 2017 ; Giatropoulos *et al.*, 2018).

La composition chimique des huiles essentielles varie en fonction de différents facteurs externes et internes à la plante, incluant le stade de développement des plantes, la période et la zone géographique de récolte (Delaquis *et al.*, 2002 ; Burt, 2004), le mode d'extraction, la variation saisonnière, l'organe végétal et l'âge du cycle végétatif (Abu Lafi *et al.*, 2008 ; Zein *et al.*, 2011) et les particularités génétiques (Masotti *et al.*, 2003; Mileski *et al.*, 2014). La nature du sol et les rayons solaires exercent une influence directe sur l'activation ou l'inactivation de certains groupes enzymatiques, conduisant à la prédominance d'une voie particulière de la biosynthèse (Belaiche, 1979).

De plus, la qualité de l'HE varie selon le régime des vents, notamment chez les espèces qui possèdent des structures histologiques de stockage superficielle (ex : poils sécréteurs des Lamiaceae) (Bruneton, 1999).

✓ **Activité antioxydante de l'huile essentielle de thym**

L'activité antioxydante de l'huile essentielle de thym a été évaluée au moyen du test DPPH, nos résultats montrent que l'HE de *T. vulgaris* possède un très fort pouvoir antioxydant (CI50= 28.15±0.04 mg/ml ; AAI=3.03) mais qui reste, cependant, nettement inférieur à celui de BHT. Nos résultats sont proches de ceux obtenus par Abdelli et al. (2017) rapportant une CI50 de 24.89 ±0.02 mg/ml et de 34.13 ± 0.03 mg/ml obtenus par le test DPPH, des deux huiles essentielles de *T. vulgaris* collecté de la région de Tlemcen et Mostaganem, respectivement. Par contre, la CI50 retrouvée dans notre étude est plus élevée que celle obtenue par l'étude de Fazel et al. (2007) (CI50 déterminée à 8.9 mg/ml par le test de DPPH) ou encore, par l'étude de Nikolić et al. (2014) et de Keramat et Golmakani (2016) (CI50 notées 4.80 µg/ml et 0.50 mg/ml, respectivement suite au test de DPPH).

L'activité antioxydante des huiles essentielles extraites de plantes appartenant au genre *Thymus*, a largement été démontrée (Sarikurkcü *et al.*, 2010 ; Viuda-Martos *et al.*, 2010 ; Zouari *et al.*, 2011), ce qui confirme les résultats obtenus dans notre étude. L'activité a été rapportée comme étant principalement liée aux composés phénoliques.

En effet, une étude faite par Ruberto et Baratta (2000) consistant à tester l'activité antioxydante de 98 composants purs d'huiles essentielles, a souligné que les composés phénoliques notamment, le thymol et le carvacrol présentait l'activité la plus élevée. Cela pourrait donc justifier la grande activité exhibée par notre huile essentielle de thym, d'autant plus que ce dernier, est de chémotype carvacrol. D'autres constituants présents à des teneurs appréciables tels que l'alpha-Humelène (3.9%) et le linalool (3%) pourraient également y avoir contribué. En effet, ces derniers possèdent une importante activité antioxydante (Ruberto et Baratta, 2000; Jia *et al.*, 2010 ; Seol *et al.*, 2016).

Le pouvoir antioxydant des huiles essentielles ne peut pas être attribué uniquement aux composants majoritaires mais aussi, aux composants minoritaires. En effet, les composés majeurs testés séparément donnent des résultats inférieurs comparés à l'activité antioxydante de la totalité d'une huile essentielle (Safaei-Ghomi *et al.*, 2009). Lu et Foo (2001) rapportent que les composés antioxydants fonctionnent synergiquement les uns avec les autres pour produire une large gamme d'activités antioxydantes qui crée un système de défense efficace contre les radicaux libres.

Il a été rapporté que les composés phénoliques de part leurs propriétés d'oxydo-réduction, pouvaient assurer leurs fonctions antioxydantes en agissant comme donneurs d'atome

d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle. Ce rôle leur permet de réagir avec des radicaux libres le plus souvent, des peroxydes et des alcoxydes interrompant de ce fait, la réaction en chaîne de propagation de la peroxydation. Ils peuvent chélater des métaux de transition tels que le fer et le cuivre de sorte, à empêcher ces derniers de générer des radicaux libres. Ils peuvent également éliminer directement certaines espèces réactives d'oxygène tels que, les radicaux hydroxyle, peroxyde et superoxyde (Kris-Etherton *et al.*, 2002; Cillard et Cillard, 2006; Halliwell, 2007).

L'activité antioxydante des huiles essentielles dépend tout d'abord, de leur composition chimique et plus précisément, de la concentration et de la structure des molécules dotées de propriétés antioxydantes (Kamal-Eldin et Appelqvist, 1996; Číž *et al.*, 2010) mais aussi, de la température, la lumière, le type de substrat, l'état physique du système et des microcomposants agissant comme pro-oxydants ou synergistes (Kamal-Eldin et Appelqvist, 1996). La méthode utilisée est également un facteur qui peut fortement influencer l'activité (Miguel *et al.*, 2007).

En effet, en raison de l'existence de nombreux tests basés sur différents mécanismes, l'interprétation des données n'est pas simple. En conséquence, les résultats d'évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles d'une même espèce végétale, peuvent varier considérablement d'une étude à une autre (Ruberto et Baratta, 2000 ; Kulisic *et al.*, 2005). C'est ce que nous avons d'ailleurs, constaté en comparant nos résultats à ceux de travaux antérieurs. Il est donc nécessaire de souligner qu'il n'existe pas de système parfait qui évalue la « vraie » activité antioxydante d'un seul composé ou d'un mélange complexe (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006).

L'huile essentielle de *T. vulgaris* demeure une réserve importante pour la recherche de substances biologiquement actives et il reste beaucoup à apprendre au sujet de ses modes d'action et ses propriétés pharmacocinétiques. Néanmoins, il y a un manque de recherche clinique sur les effets de cette substance chez l'Homme. Il n'existe présentement aucun consensus sur la normalisation des produits thérapeutiques à base des huiles essentielles.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

L'utilisation excessive des pesticides constitue une préoccupation majeure en santé humaine et environnementale, suscitant des inquiétudes croissantes dans l'opinion publique. Aujourd'hui, alors que la thérapeutique moderne se développe, il y a une tendance croissante à la phytothérapie pour traiter divers problèmes de santé. Vu sa diversité climatique ainsi que la nature de ses sols, notre pays recèle des ressources végétales inestimables ; le thym est parmi les plantes les plus répandues en Algérie et dont on peut tirer profit.

Dans ce contexte, on a tenté de valoriser l'espèce végétale choisie, *T. vulgaris* et de contribuer à mieux connaître les effets toxiques de l'administration du « Voliam Targo[®] chez le lapin mâle de souche « *Oryctolagus cuniculus* » ; et d'évaluer l'effet protecteur possible d'une co-administration de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* contre la toxicité induite par ce xénobiotique.

Afin de répondre à l'objectif principal de cette thèse et en se basant sur des tests biochimiques, histologiques et immuno-histochimiques, on a pu examiner l'impact d'une exposition subaiguë à la molécule testée le VT ainsi que l'effet protecteur d'une supplémentation de l'huile essentielle de *T. vulgaris* sur certains organes vitaux à savoir, le rein, le système nerveux central, le cœur et le foie.

Les résultats biochimiques ont clairement montré une perturbation des paramètres biochimiques de la fonction rénale et hépatique (créatinine, acide urique, ALAT, ASAT et γ GT) suite à l'exposition subaiguë au VT tandis que ce dernier a entraîné une diminution significative de certains paramètres du bilan lipidique, notamment le taux du cholestérol total, C-LDL et le rapport c-LDL /c-HDL. La supplémentation en huile essentielle de thym a permis de restaurer les taux des paramètres biochimiques perturbés vers les normes.

D'après les résultats histopathologiques, il s'avère que le VT entraîne des lésions histologiques du tissu rénal, nerveux, cardiaque et hépatique. Ces altérations histologiques provoquées par le VT ont été minimisées suite à la co-administration de l'huile essentielle de thym.

De plus, l'examen immunohistochimique réalisé apporte des éléments d'informations complémentaires sur le mécanisme probable de la toxicité hépatique du VT ainsi que le mécanisme par lequel l'huile essentielle de thym exerce son effet protecteur.

L'extraction par hydrodistillation de l'huile essentielle de *T. vulgaris* a donné un rendement de 0.3%. L'analyse de l'huile obtenue par CG-SM a permis d'identifier 13 composés volatiles dont le carvacrol était le composé majoritaire (86.25%). L'étude du pouvoir antioxydant par le test de DPPH a montré que l'HET possédait une très forte activité.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats obtenus ont permis de mettre en évidence l'action protectrice de l'huile essentielle de *T. vulgaris* et sa capacité à moduler les effets toxiques causés par le Voliam Targo® chez le lapin male « *Oryctolagus cuniculus* ». Cette action protectrice de HET pourrait être attribuée à la capacité anti-oxydante et l'effet anti-apoptotique de son composé majoritaire « le carvacrol ».

Notre travail nous permet de proposer plusieurs pistes à explorer dans l'avenir. En perspective, il serait intéressant de :

- Reprendre l'étude sur une période plus longue (toxicité chronique).
- Comparer la toxicité de Voliam Targo® avec celle de ses deux matières actives séparées (abamectine et le chlorantrailiprole) pour mettre en évidence si l'association de deux ingrédients actifs induit un effet antagoniste, synergétique ou sans impact sur le plan toxicité.
- Explorer les marqueurs de stress oxydatif tel que le super oxyde dismutase, le glutathions transférase et réductase, la catalase et la malonaladéhyde.
- D'évaluer l'expression d'autres anticorps comme la P53, KI67, Bax et les caspases.
- Réaliser une étude *in silico* (bioinformatique) pour mettre en évidence le mécanisme moléculaire de l'effet protecteur du carvacrol.
- Elargir le spectre des activités biologiques de l'huile essentielle de thym en évaluant d'autres activités tant au niveau *in vitro* qu'*in vivo* (activité antitumorale, anti-inflammatoire, antivirale, insecticide).
- Caractériser et isoler les principes actifs responsables à ces propriétés pharmacologiques de l'huile essentielle du thym.
- Tester les effets des composants actifs séparément et comparer leurs pouvoirs avec ceux de l'huile essentielle.

Pour conclure, nous réalisons qu'à ce jour, il existe un manque d'information de la population sur le danger de ces polluants et leurs effets sur leur santé. Sensibiliser les revendeurs des produits phytosanitaires ainsi que les agriculteurs du danger des pesticides contribuera certainement à la réduction des résidus dans les produits susceptibles d'être utilisés pour la

consommation humaine. Il est aussi nécessaire de perfectionner le système d'homologation des pesticides et le réseau de surveillance des dangers et des risques liés à l'utilisation de ces xénobiotiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abbassy, M. A., & Marei, G. I. (2013). Antifungal and chemical composition of essential oils of *Juniperus communis* L. and *Thymus vulgaris* L. against two phytopathogenic fungi. *Journal of Applied Sciences Research*, 9(8), 4584-4588.
2. Abd-Elhady, H. K., & Abou-Elghar, G. E. (2013). Abamectin induced biochemical and histopathological changes in the albino rat, *Rattus norvegicus*. *Journal of Plant Protection Research*, 53(3).
3. Abdel-Daim, M. M., & Abdellatief, S. A. (2018). Attenuating effects of caffeic acid phenethyl ester and betaine on abamectin-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(16), 15909-15917.
4. Abdelli, W., Bahri, F., Romane, A., Höferl, M., Wanner, J., Schmidt, E., & Jirovetz, L. (2017). Chemical composition and anti-inflammatory activity of Algerian *Thymus vulgaris* essential oil. *Natural product communications*, 12(4), 1934578X1701200435.
5. Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., & Rezaiee, A. (2004). Pesticides and oxidative stress: a review. *Medical Science Monitor*, 10(6), RA141-RA147.
6. Abedini, S., Sahebkar, A., & Hassanzadeh-Khayyat, M. (2014). Chemical composition of the essential oil of *Thymus vulgaris* L. grown in Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17(3), 538-543.
7. Abubakar, Y., Tijjani, H., Egbuna, C., Adetunji, C. O., Kala, S., Kryeziu, T. L., et al. (2020). Pesticides, history, and classification. In *Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control* (pp. 29-42). Academic Press.
8. Abu-Lafi, S., Odeh, I., Dewik, H., Qabajah, M., Hanuš, L. O., & Dembitsky, V. M. (2008). Thymol and carvacrol production from leaves of wild Palestinian *Majorana syriaca*. *Bioresource technology*, 99(9), 3914-3918.
9. ACTA (2008). Abamectin. In : Index des produits phytosanitaires ACTA 2008. Paris : ACTA.
10. ACTA (2015). Index des produits phytosanitaire à usage agricole ACTA 2015. Alger : ACTA.
11. Ahmed, O. M., Fahim, H. I., Boules, M. W., & Ahmed, H. Y. (2016). Cardiac and testicular toxicity effects of the latex and ethanolic leaf extract of *Calotropis procera* on male albino rats in comparison to abamectin. *SpringerPlus*, 5(1), 1-21.

12. Ahmed, H., Abushouk, A. I., Gabr, M., Negida, A., & Abdel-Daim, M. M. (2017). Parkinson's disease and pesticides: a meta-analysis of disease connection and genetic alterations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *90*, 638-649.
13. Aktar, M. W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary toxicology*, *2*(1), 1.
14. Alavanja, M. C., Hoppin, J. A., & Kamel, F. (2004). Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. *Annu. Rev. Public Health*, *25*, 155-197.
15. Alavanja, M. C., & Bonner, M. R. (2012). Occupational pesticide exposures and cancer risk: a review. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, *15*(4), 238-263.
16. Ali, D. N., & Hennessy, D. R. (1996). The effect of level of feed intake on the pharmacokinetic disposition and efficacy of ivermectin in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, *19*(2), 89-94.
17. Ali, M. S., Sun, T., McLeroy, G. E., & Phillippo, E. T. (2000). Confirmation of eprinomectin, moxidectin, abamectin, doramectin, and ivermectin in beef liver by liquid chromatography/positive ion atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, *83*(1), 39-52.
18. Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, C. S., Richmond, W. F. P. C., & Fu, P. C. (1974). Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clinical chemistry*, *20*(4), 470-475.
19. Alsaraf, S., Hadi, Z., Al-Lawati, W. M., Al Lawati, A. A., & Khan, S. A. (2020). Chemical composition, in vitro antibacterial and antioxidant potential of Omani Thyme essential oil along with in silico studies of its major constituent. *Journal of King Saud University-Science*, *32*(1), 1021-1028.
20. Alvinerie, M., Dupuy, J., Kiki-Mvouaka, S., Sutra, J. F., & Lespine, A. (2008). Ketoconazole increases the plasma levels of ivermectin in sheep. *Veterinary parasitology*, *157*(1-2), 117-122.
21. Aminiahidashti, H., Jamali, S. R., & Gorji, A. M. H. (2014). Conservative care in successful treatment of abamectin poisoning. *Toxicology international*, *21*(3), 322.
22. Anderson, S. E., & Meade, B. J. (2014). Potential health effects associated with dermal exposure to occupational chemicals. *Environmental health insights*, *8*, EHI-S15258.
23. Ansari, I., El-Kady, M. M., Arora, C., Sundararajan, M., Maiti, D., & Khan, A. (2021). A review on the fatal impact of pesticide toxicity on environment and human health. In *Global Climate Change* (pp. 361-391). Elsevier.

24. Arena, J. P., Liu, K. K., Paress, P. S., Frazier, E. G., Cully, D. F., Mrozik, H., & Schaeffer, J. M. (1995). The mechanism of action of avermectins in *Caenorhabditis elegans*: correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane binding, and biological activity. *The Journal of parasitology*, 286-294.
25. Asshauer, J. (1991). Pesticide residues--determination and evaluation in food and environment. in *Pesticide chemistry*, VCH, New York, 361-372.
26. Astiz, M., de Alaniz, M. J., & Marra, C. A. (2012). The oxidative damage and inflammation caused by pesticides are reverted by lipoic acid in rat brain. *Neurochemistry international*, 61(7), 1231-1241.
27. Atta, A. H., & Abo-Shihada, M. N. (2000). Comparative pharmacokinetics of doramectin and ivermectin in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 23(1), 49-52.
28. Atti-Santos, A. C., Pansera, M. R., Paroul, N., Atti-Serafini, L., & Moyna, P. (2004). Seasonal variation of essential oil yield and composition of *Thymus vulgaris* L.(Lamiaceae) from South Brazil. *Journal of Essential Oil Research*, 16(4), 294-295.
29. Aydin, Y., Kutlay, Ö., Ari, S., Duman, S., Uzuner, K., & Aydin, S. (2007). Hypotensive effects of carvacrol on the blood pressure of normotensive rats. *Planta medica*, 73(13), 1365-1371.
30. Azevedo, F. A., Carvalho, L. R., Grinberg, L. T., Farfel, J. M., Ferretti, R. E., Leite, R. E., ... & Herculano-Houzel, S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *Journal of Comparative Neurology*, 513(5), 532-541.
31. Badi, H. N., Yazdani, D., Ali, S. M., & Nazari, F. (2004). Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. *Industrial crops and products*, 19(3), 231-236.
32. Bagchi, D., Sen, C. K., Ray, S. D., Das, D. K., Bagchi, M., Preuss, H. G., & Vinson, J. A. (2003). Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 523, 87-97.
33. Bai, S. H., & Ogbourne, S. (2016). Eco-toxicological effects of the avermectin family with a focus on abamectin and ivermectin. *Chemosphere*, 154, 204-214.

34. Ball, L. M., & Chhabra, R. S. (1981). Intestinal absorption of nutrients in rats treated with 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, 8(4), 629-638.
35. Ballent, M., Lifschitz, A., Virkel, G., Sallovitz, J., & Lanusse, C. (2006). Modulation of the P-glycoprotein-mediated intestinal secretion of ivermectin: in vitro and in vivo assessments. *Drug metabolism and Disposition*, 34(3), 457-463.
36. Barone, R., Pavaux, C., Blin P.C., & Cuq P., 1973. Atlas d'anatomie du lapin, Masson éditions, Paris, 220 p.
37. Barone, R., & Bortolami, R. (2004). *Neurologie I: Système nerveux central*. Vigot.
38. Basch, E., Ulbricht, C., Hammerness, P., Bevins, A., & Sollars, D. (2004). Thyme (Thymus vulgaris L.), thymol. *Journal of herbal pharmacotherapy*, 4(1), 49-67.
39. Basch, E., Ulbricht, C., Hammerness, P., Bevins, A., & Sollars, D. (2004). Thyme (Thymus vulgaris L.), thymol. *Journal of herbal pharmacotherapy*, 4(1), 49-67.
40. Bassi, A., Rison, J. L., & Wiles, J. A. (2009). Chlorantraniliprole (DPX-E2Y45, Rynaxypyr®, Coragen®), a new diamide insecticide for control of codling moth (*Cydia pomonella*), Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) and European grapevine moth (*Lobesia botrana*). *Nova Gorica*, 4(5), 39-45.
41. Bassissi, M. F., Alvinerie, M., & Lespine, A. (2004). Macrocyclic lactones: distribution in plasma lipoproteins of several animal species including humans. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 138(4), 437-444.
42. Baudoux, D., & Zhiri, A. 2009. Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies, Edition Inspir Development.
43. Beham, A., Marin, M. C., Fernandez, A., Herrmann, J., Brisbay, S., Tari, A. M., ... & McDonnell, T. J. (1997). Bcl-2 inhibits p53 nuclear import following DNA damage. *Oncogene*, 15(23), 2767-2772.
44. Belaiche, P. (1979). *Traité de phytothérapie et d'aromathérapie: Les maladies infectieuses*. Maloine.
45. Benedetti, D., Lopes Alderete, B., de Souza, C. T., Ferraz Dias, J., Niekraszewicz, L., Cappetta, M., et al. (2018). DNA damage and epigenetic alteration in soybean farmers exposed to complex mixture of pesticides. *Mutagenesis*, 33(1), 87-95.
46. Benourad, F., Kahvecioglu, Z., Youcef-Benkada, M., & Colet, J. M. (2014). Prospective evaluation of potential toxicity of repeated doses of Thymus vulgaris L. extracts in rats by

- means of clinical chemistry, histopathology and NMR-based metabonomic approach. *Drug testing and analysis*, 6(10), 1069-1075.
47. Benourad, F., Kahvecioglu, Z. C., Youcef-Benkada, M., & Colet, J. M. (2018). Protective potential of the essential oil of *Thymus vulgaris* L. against Dicofol-induced poisoning in rats as established through clinical chemistry, histopathology and ¹H-NMR-based metabonomics. *South Asian Journal of Experimental Biology*, 8(2), 49-56.
 48. Bentley, K. S., Fletcher, J. L., & Woodward, M. D. (2010). Chlorantraniliprole: an insecticide of the anthranilic diamide class. In *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (pp. 2231-2242). Academic Press.
 49. Bloom, R. A., & Matheson III, J. C. (1993). Environmental assessment of avermectins by the US Food and Drug Administration. *Veterinary Parasitology*, 48(1-4), 281-294.
 50. Bolet, G., Zerrouki, N., Gacem, M., Brun, J. M., & Lebas, F. (2012, August). Genetic parameters and trends for litter and growth traits in a synthetic line of rabbits created in Algeria. In *Proceedings of the 10th World Rabbit Congress* (pp. 3-6).
 51. Bonjardim, L. R., Cunha, E. S., Guimarães, A. G., Santana, M. F., Oliveira, M. G., Serafini, M. R., ... & Quintans-Júnior, L. J. (2012). Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive properties of p-cymene in mice. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 67(1-2), 15-21.
 52. Bouguerra, N., Tine-Djebbar, F., & Soltani, N. (2017). Algerian *Thymus vulgaris* essential oil: Chemical composition and larvicidal activity against the mosquito *Culex pipiens*. *International Journal of Mosquito Research*, 4(1), 37-42.
 53. Bousbia, N. (2011). *Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires* (Doctoral dissertation, Université d'Avignon).
 54. Braun, S., Gaza, N., Werdehausen, R., Hermanns, H., Bauer, I., Durieux, M. E., ... & Stevens, M. F. (2010). Ketamine induces apoptosis via the mitochondrial pathway in human lymphocytes and neuronal cells. *British journal of anaesthesia*, 105(3), 347-354.
 55. Braun, F., de Carné Trécesson, S., Bertin-Ciftci, J., & Juin, P. (2013). Protect and serve: Bcl-2 proteins as guardians and rulers of cancer cell survival. *Cell Cycle*, 12(18), 2937-2947.
 56. Braun, L., & Cohen, M. (2015). *Herbs and natural supplements, volume 2: An evidence-based guide* (Vol. 2). Elsevier Health Sciences.

57. Bretveld, R., Brouwers, M., Ebisch, I., & Roeleveld, N. (2007). Influence of pesticides on male fertility. *Scandinavian journal of work, environment & health*, 13-28.
58. Brugger, K. E., Cole, P. G., Newman, I. C., Parker, N., Scholz, B., Suvagia, P., .et al. (2010). Selectivity of chlorantraniliprole to parasitoid wasps. *Pest Management Science*, 66(10), 1075-1081.
59. Bruneton, J. (1999). Huiles essentielles. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Edition Tec & Doc, Lavoisier.
60. Buchel, K. H. (1983). Chemistry of pesticides.
61. Cabasson, A. (2008). *Estimation et analyse des intervalles cardiaques* (Doctoral dissertation, Université Nice Sophia Antipolis).
62. Camargo, J.A. (2005). Systemes Injectables Biodegradables Pour La LiberationProlongee D'ivermectine. Thèse de doctorat en Biologie, Université Henri Poincare, France.
63. Carvalho, F. P. (2017). Pesticides, environment, and food safety. *Food and energy security*, 6(2), 48-60.
64. Chaabane, W., User, S. D., El-Gazzah, M., Jaksik, R., Sajjadi, E., Rzeszowska-Wolny, J., & Łos, M. J. (2013). Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 61(1), 43-58.
65. Cherin, P., Voronska, E., Fraoucene, N., & De Jaeger, C. (2012). Toxicité aiguë des pesticides chez l'homme. *Médecine & Longévité*, 4(2), 68-74.
66. Chiasson, H., & Beloin, N. (2007). Les huiles essentielles, des biopesticides «nouveau genre». *Bulletin de la Société d'Entomologie du Québec*, 14(1), 3-6.
67. Chiu, S. H. L., Green, M. L., Baylis, F. P., Eline, D., Rosegay, A., Meriwether, H., & Jacob, T. A. (1990). Absorption, tissue distribution, and excretion of tritium-labeled ivermectin in cattle, sheep, and rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(11), 2072-2078.
68. Christie, B. A. (2003). Anatomy of the urinary system. In *Textbook of Small Animal Surgery* (pp. 1558-1574). Saunders Elsevier.
69. Cillard, J., & Cillard, P. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oleagineux, corps gras, lipides*, 13(1), 24-29.
70. Číž, M., Čížová, H., Denev, P., Kratchanova, M., Slavov, A., & Lojek, A. (2010). Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables. *Food Control*, 21(4), 518-523.

71. Contreras-Zentella, M. L., & Hernández-Muñoz, R. (2016). Is liver enzyme release really associated with cell necrosis induced by oxidant stress?. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.
72. Cotonat, J. (1996). La toxicologie. *Que sais-je?*.
73. Couteux, A., & Salaün, C. (2009). ACTA Index phytosanitaire.
74. Comité de la Prévention et de la Protection (CPP), 2002. Risques sanitaires liés à l'utilisation des produits phytosanitaires. <http://www.ecologie.gouv.fr/PPP-Rapport-2002-02- Risques.html>
75. Damalas, C. A., & Koutroubas, S. D. (2016). Farmers' exposure to pesticides: toxicity types and ways of prevention.
76. Dauqan, E. M., & Abdullah, A. (2017). Medicinal and functional values of thyme (*Thymus vulgaris* L.) herb. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 5(02), 017-022.
77. Dauqan, E. M., & Abdullah, A. (2017). Medicinal and functional values of thyme (*Thymus vulgaris* L.) herb. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 5(02), 017-022.
78. De Mees, C., Bakker, J., Szpirer, J., & Szpirer, C. (2006). Alpha-fetoprotein: from a diagnostic biomarker to a key role in female fertility. *Biomarker insights*, 1, 117727190600100002.
79. Decaudin, D., Geley, S., Hirsch, T., Castedo, M., Marchetti, P., Macho, A., ... & Kroemer, G. (1997). Bcl-2 and Bcl-XL antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Research*, 57(1), 62-67.
80. Delaquis, P. J., Stanich, K., Girard, B., & Mazza, G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International journal of food microbiology*, 74(1-2), 101-109.
81. Díaz-Fleischer, F., Pérez-Staples, D., Valle-Mora, J., & Antonio García-Pérez, J. (2016). Laboratory evaluation of two commercial abamectin-based insecticides against *Anastrepha Ludens* (Diptera: Tephritidae): lethal and sublethal effects. *Journal of economic entomology*, 109(6), 2472-2478.
82. Direkvand-Moghadam, A., & Khosravi, A. (2012). The impact of a novel herbal Shirazi *Thymus Vulgaris* on primary dysmenorrhea in comparison to the classical chemical Ibuprofen. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 17(7), 668.
83. Disner, G. R., Falcao, M. A. P., Andrade-Barros, A. I., Leite dos Santos, N. V., Soares, A. B. S., Marcolino-Souza, M., ... & Lopes-Ferreira, M. (2021). The toxic effects of

- glyphosate, chlorpyrifos, abamectin, and 2, 4-D on animal models: a systematic review of Brazilian studies. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 17(3), 507-520.
84. Dobiášová, M., Frohlich, J., Šedová, M., Cheung, M. C., & Brown, B. G. (2011). Cholesterol esterification and atherogenic index of plasma correlate with lipoprotein size and findings on coronary angiography. *Journal of lipid research*, 52(3), 566-571.
85. Domaracký, M., Rehak, P., Juhás, Š., & Koppel, J. (2007). Effects of selected plant essential oils on the growth and development of mouse preimplantation embryos in vivo. *Physiological research*, 56(1).
86. Dringen, R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in neurobiology*, 62(6), 649-671.
87. Drum, C. (1980). Soil chemistry of pesticides, PPG industries. *Inc. USA*.
88. Dung, N. T., Kim, J. M., & Kang, S. C. (2008). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds. *Food and chemical Toxicology*, 46(12), 3632-3639.
89. Dursun, N., Liman, N., Özyazgan, İ., Güneş, I., & Saraymen, R. (2003). Role of thymus oil in burn wound healing. *The Journal of burn care & rehabilitation*, 24(6), 395-399.
90. Eddaya, T., Boughdad, A., Becker, L., Chaimbault, P., & Zaïd, A. (2015). Utilisation et risques des pesticides en protection sanitaire de la menthe verte dans le Centre-Sud du Maroc. *Journal of Materials and Environmental Science*, 6(3), 656-665.
91. Eissa, F., & Zidan, N. (2010). Haematological, biochemical and histopathological alterations induced by abamectin and *Bacillus thuringiensis* in male albino rats. *Acta Biologica Hungarica*, 61(1), 33-44.
92. El-Azab, N. E. E., El-Mahalaway, A. M., & Sabry, D. (2018). Effect of methyl mercury on the cerebellar cortex of rats and the possible neuroprotective role of mesenchymal stem cells conditioned medium. histological and immunohistochemical study. *Stem Cell Res Ther*, 8(430), 2.
93. El-Boshy, M. E., Refaat, B., Qasem, A. H., Khan, A., Ghaith, M., Almasmoum, H., ... & Almaimani, R. A. (2019). The remedial effect of *Thymus vulgaris* extract against lead toxicity-induced oxidative stress, hepatorenal damage, immunosuppression, and hematological disorders in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(22), 22736-22746.

94. El-Nekeety, A. A., Mohamed, S. R., Hathout, A. S., Hassan, N. S., Aly, S. E., & Abdel-Wahhab, M. A. (2011). Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induced oxidative stress in male rats. *Toxicol*, *57*(7-8), 984-991.
95. El-Newary, S. A., Shaffie, N. M., & Omer, E. A. (2017). The protection of *Thymus vulgaris* leaves alcoholic extract against hepatotoxicity of alcohol in rats. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, *10*(4), 361-371.
96. El-Saber Batiha, G., Alqahtani, A., Ilesanmi, O. B., Saati, A. A., El-Mleeh, A., Hetta, H. F., & Magdy Beshbishy, A. (2020). Avermectin derivatives, pharmacokinetics, therapeutic and toxic dosages, mechanism of action, and their biological effects. *Pharmaceuticals*, *13*(8), 196.
97. El-Sayed, E. S. M., Mansour, A. M., & Abdul-Hameed, M. S. (2016). Thymol and carvacrol prevent doxorubicin-induced cardiotoxicity by abrogation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis in rats. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, *30*(1), 37-44.
98. El-Sheikh, E. S. A., & Galal, A. A. (2015). Toxic effects of sub-chronic exposure of male albino rats to emamectin benzoate and possible ameliorative role of *Foeniculum vulgare* essential oil. *Environmental toxicology and pharmacology*, *39*(3), 1177-1188.
99. El-Shenawy, N. S. (2010). Effects of insecticides fenitrothion, endosulfan and abamectin on antioxidant parameters of isolated rat hepatocytes. *Toxicology in vitro*, *24*(4), 1148-1157.
100. Eroschenko, V. P., & Di Fiore, M. S. (2013). *DiFiore's atlas of histology with functional correlations*. Lippincott Williams & Wilkins.
101. Esmaeili, D., Mobarez, A. M., & Tohidpour, A. (2012). Anti-helicobacter pylori activities of shoya powder and essential oils of *thymus vulgaris* and *eucalyptus globulus*. *The open microbiology journal*, *6*, 65.
102. Everett, C. J., Thompson, O. M., & Dismuke, C. E. (2017). Exposure to DDT and diabetic nephropathy among Mexican Americans in the 1999–2004 National Health and Nutrition Examination Survey. *Environmental Pollution*, *222*, 132-137.
103. Ezz, A. L. (2009). Plant growth strategies of *Thymus vulgaris* L. in response to population density. *Industrial Crops and Products*, *30*(3), 389-394.
104. Fabiny, D. L., & Ertingshausen, G. (1971). Automated reaction-rate method for determination of serum creatinine with the Centrifichem. *Clinical chemistry*, *17*(8), 696-700.

105. Fabio, A., Cermelli, C., Fabio, G., Nicoletti, P., & Quaglio, P. (2007). Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on microorganisms responsible for respiratory infections. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 21(4), 374-377.
106. Fachini-Queiroz, F. C., Kummer, R., Estevao-Silva, C. F., Carvalho, M. D. D. B., Cunha, J. M., Grespan, R., ... & Cuman, R. K. N. (2012). Effects of thymol and carvacrol, constituents of *Thymus vulgaris* L. essential oil, on the inflammatory response. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
107. Fahim, H. E., Ahmed, O. M., Boules, M. W., & Ahmed, H. Y. (2016). Nephrotoxic effects of abamectin and *Calotropis procera* latex and leaf extract in male albino rats. *Am J Med Med Sci*, 6(3), 73-86.
108. FAO/WHO Commission du Codex Alimentarius. (1998). Résidus des pesticides dans les denrées alimentaires. Roma.
109. Fazel, M., Omidbeygi, M., Barzegar, M., & Naghdi Badi, H. (2007). Influence of heating on antiradical activity of essential oils of thyme, summer savory and clove by 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) method. *Journal of Medicinal Plants*, 6(22), 54-63.
110. Fenik, J., Tankiewicz, M., & Biziuk, M. (2011). Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(6), 814-826.
111. Fent, G. M. (2014): Avermectin. In: "Encyclopedia of Toxicology", Third Edition, Academic Press, Oxford, pp. 342-344.
112. Fossati, P., & Prencipe, L. (1982). Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clinical chemistry*, 28(10), 2077-2080.
113. Funakoshi-Tago, M., Nakamura, K., Tago, K., Mashino, T., & Kasahara, T. (2011). Anti-inflammatory activity of structurally related flavonoids, Apigenin, Luteolin and Fisetin. *International immunopharmacology*, 11(9), 1150-1159.
114. Gabe, M. (1968). Techniques histologiques. *Masson (Eds), Paris*, 1111p.
115. Galovičová, L., Borotová, P., Valková, V., Vukovic, N. L., Vukic, M., Štefániková, J., ... & Kačániová, M. (2021). *Thymus vulgaris* Essential Oil and Its Biological Activity. *Plants*, 10(9), 1959.
116. Gerolt, P. (1969). Mode of entry of contact insecticides. *Journal of insect physiology*, 15(4), 563-580.
117. Giatropoulos, A., Kimbaris, A., Michaelakis, A., Papachristos, D. P., Polissiou, M. G., & Emmanouel, N. (2018). Chemical composition and assessment of larvicidal and repellent

- capacity of 14 Lamiaceae essential oils against *Aedes albopictus*. *Parasitology research*, 117(6), 1953-1964.
- 118.Goetz, P., & Ghedira, K. (2012). Mécanisme d'action antibactérienne des huiles essentielles. In *Phytothérapie anti-infectieuse* (pp. 193-208). Springer, Paris.
- 119.Granger, R., & Passet, J. (1973). *Thymus vulgaris* spontane de France: Races chimiques et chemotaxonomie. *Phytochemistry*, 12(7), 1683-1691.
- 120.Grespan, R., Aguiar, R. P., Giubilei, F. N., Fuso, R. R., Damião, M. J., Silva, E. L., ... & Cuman, R. K. N. (2014). Hepatoprotective effect of pretreatment with *Thymus vulgaris* essential oil in experimental model of acetaminophen-induced injury. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014.
- 121.Grisham, J. W. (2009). Organizational principles of the liver. In *The Liver*.
- 122.Guesmi, F., Khantouche, L., Mehrez, A., Bellamine, H., & Landoulsi, A. (2020). Histopathological and biochemical effects of thyme essential oil on H₂O₂ stress in heart tissues. *Heart, Lung and Circulation*, 29(2), 308-314.
- 123.Gueutin, V., Deray, G., & Isnard-Bagnis, C. (2012). Physiologie rénale. *Bulletin du cancer*, 99(3), 237-249.
- 124.Guillen, M. D., & Manzanos, M. J. (1998). Study of the composition of the different parts of a Spanish *Thymus vulgaris* L. plant. *Food Chemistry*, 63(3), 373-383.
- 125.Gulati, K., Reshi, M. R., Rai, N., & Ray, A. (2018). Hepatotoxicity: Its mechanisms, experimental evaluation and protective strategies. *Am J Pharmacol*. 2018; 1 (1), 1004.
- 126.Habashy, N. H., Serie, M. M. A., Attia, W. E., & Abdelgaleil, S. A. (2018). Chemical characterization, antioxidant and anti-inflammatory properties of Greek *Thymus vulgaris* extracts and their possible synergism with Egyptian *Chlorella vulgaris*. *Journal of functional foods*, 40, 317-328.
- 127.Halley, B.A.; Jacob, T.A.; Lu, A.Y.H. (1989). The environmental impact of the use of ivermectin: Environmental effects and fate. *Chemosphere*, 18(7-8), 1543-1563.
- 128.Halliwell, B. A. R. R. Y., Gutteridge, J. C., & Cross, C. E. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 119(6), 598-620.
- 129.Halliwell, B. (2007). Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health?. *Cardiovascular research*, 73(2), 341-347.

130. Hamada, A. M. (2020). Vitamins, omega-3, magnesium, manganese, and thyme can boost our immunity and protect against COVID-19. *European Journal of Biological Research*, 10(4), 271-295.
131. Han, W., Zhang, S., Shen, F., Liu, M., Ren, C., & Gao, X. (2012). Residual toxicity and sublethal effects of chlorantraniliprole on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Pest management science*, 68(8), 1184-1190.
132. Hanke, W., & Jurewicz, J. (2004). The risk of adverse reproductive and developmental disorders due to occupational pesticide exposure: an overview of current epidemiological evidence. *International journal of occupational medicine and environmental health*, 17(2), 223-243.
133. Hannig, G. T., Ziegler, M., & Marçon, P. G. (2009). Feeding cessation effects of chlorantraniliprole, a new anthranilic diamide insecticide, in comparison with several insecticides in distinct chemical classes and mode-of-action groups. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 65(9), 969-974.
134. Haraguchi, M., Torii, S., Matsuzawa, S. I., Xie, Z., Kitada, S., Krajewski, S., ... & Reed, J. C. (2000). Apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1)-independent cell death suppression by Bcl-2. *Journal of Experimental Medicine*, 191(10), 1709-1720.
135. Hassaan, M. A., & El Nemr, A. (2020). Pesticides pollution: Classifications, human health impact, extraction and treatment techniques. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*.
136. Hatice, B. A. S., & Kalender, Y. (2011). Chlorpyrifos induced cardiotoxicity in rats and the protective role of quercetin and catechin. *Gazi University Journal of Science*, 24(3), 387-395.
137. He, F., Sun, S., Tan, H., Sun, X., Qin, C., Ji, S., ... & Jiang, X. (2019). Chlorantraniliprole against the black cutworm *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae): From biochemical/physiological to demographic responses. *Scientific reports*, 9(1), 1-17.
138. Hennessy, D. R., & Alvinerie, M. R. (2002). Pharmacokinetics of the macrocyclic lactones: conventional wisdom and new paradigms. *Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy*, 97, 124.
139. Henry, R. J., Chiamori, N., Golub, O. J., & Berkman, S. (1960). Revised spectrophotometric methods for the determination of glutamic-oxalacetic transaminase, glutamic-pyruvic transaminase, and lactic acid dehydrogenase. *American journal of clinical pathology*, 34(4_ts), 381-398.

- 140.Herd, R. P., Sams, R. A., & Ashcraft, S. M. (1996). Persistence of ivermectin in plasma and faeces following treatment of cows with ivermectin sustained-release, pour-on or injectable formulations. *International journal for parasitology*, 26(10), 1087-1093.
- 141.Ho, H. K., Pok, S., Streit, S., Ruhe, J. E., Hart, S., Lim, K. S., ... & Ullrich, A. (2009). Fibroblast growth factor receptor 4 regulates proliferation, anti-apoptosis and alpha-fetoprotein secretion during hepatocellular carcinoma progression and represents a potential target for therapeutic intervention. *Journal of hepatology*, 50(1), 118-127.
- 142.Hosseinzadeh, S., Jafarikukhdan, A., Hosseini, A., & Armand, R. (2015). The application of medicinal plants in traditional and modern medicine: a review of *Thymus vulgaris*. *International Journal of Clinical Medicine*, 6(09), 635.
- 143.Hosseinzadeh, S., Jafarikukhdan, A., Hosseini, A., & Armand, R. (2015). The application of medicinal plants in traditional and modern medicine: a review of *Thymus vulgaris*. *International Journal of Clinical Medicine*, 6(09), 635.
- 144.Hosseinzadeh, S., Jafarikukhdan, A., Hosseini, A., & Armand, R. (2015). The application of medicinal plants in traditional and modern medicine: a review of *Thymus vulgaris*. *International Journal of Clinical Medicine*, 6(09), 635.
- 145.Hou, Y., Gao, F., Wang, Q., Zhao, J., Flagg, T., Zhang, Y., & Deng, X. (2007). Bcl2 impedes DNA mismatch repair by directly regulating the hMSH2-hMSH6 heterodimeric complex. *Journal of Biological Chemistry*, 282(12), 9279-9287.
- 146.Hsu, D. Z., Hsu, C. H., Huang, B. M., & Liu, M. Y. (2001). Abamectin effects on aspartate aminotransferase and nitric oxide in rats. *Toxicology*, 165(2-3), 189-193.
- 147.Huang, W., He, Y., Xiao, J., Huang, Y., Li, A., He, M., & Wu, K. (2019). Risk of breast cancer and adipose tissue concentrations of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides: a hospital-based case-control study in Chinese women. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(31), 32128-32136.
- 148.Hudaib, M., & Aburjai, T. (2007). Volatile components of *Thymus vulgaris* L. from wild-growing and cultivated plants in Jordan. *Flavour and fragrance journal*, 22(4), 322-327.
- 149.Imelouane, B., Amhamdi, H., Wathelet, J. P., Ankit, M., Khedid, K., & El Bachiri, A. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. *Int. J. Agric. Biol*, 11(2), 205-208.
- 150.Jackson H.C., (1989). Ivermectin as a systemic insecticide. *Parasitol.Today*, 5: 146-156.
- 151.Jargot, D., Falcy, M., & Robert, S. (2013). Fiches toxicologiques, n° 299. INRS

152. Jeanguenat, A. (2013). The story of a new insecticidal chemistry class: the diamides. *Pest management science*, 69(1), 7-14.
153. Jenčič, V., Černe, M., Eržen, N. K., Kobal, S., & Cerkvenik-Flajs, V. (2006). Abamectin effects on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicology*, 15(3), 249-257.
154. Jia, H. L., Ji, Q. L., Xing, S. L., Zhang, P. H., Zhu, G. L., & Wang, X. H. (2010). Chemical composition and antioxidant, antimicrobial activities of the essential oils of *Thymus marschallianus* Will. and *Thymus proximus* Serg. *Journal of food science*, 75(1), E59-E65.
155. Jin, D. K., Vacher, J., & Feuerman, M. H. (1998). α -Fetoprotein gene sequences mediating Afr2 regulation during liver regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(15), 8767-8772.
156. Jin, Z., & El-Deiry, W. S. (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer biology & therapy*, 4(2), 147-171.
157. Jin, L., Feng, X., Rong, H., Pan, Z., Inaba, Y., Qiu, L., ... & Li, Y. (2013). The antiparasitic drug ivermectin is a novel FXR ligand that regulates metabolism. *Nature communications*, 4(1), 1-8.
158. Jones, P. M., & George, A. M. (2004). The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61(6), 682-699.
159. Joshi, A. K. R., & Sukumaran, B. O. (2019). Metabolic dyshomeostasis by organophosphate insecticides: insights from experimental and human studies. *EXCLI journal*, 18, 479-484.
160. Jothy, S. L., Zakaria, Z., Chen, Y., Lau, Y. L., Latha, L. Y., & Sasidharan, S. (2011). Acute oral toxicity of methanolic seed extract of *Cassia fistula* in mice. *Molecules*, 16(6), 5268-5282.
161. Juntarawijit, C., & Juntarawijit, Y. (2018). Association between diabetes and pesticides: a case-control study among Thai farmers. *Environmental health and preventive medicine*, 23(1), 1-10.
162. Kamal-Eldin, A., & Appelqvist, L. Å. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31(7), 671-701.
163. Kamel, F., & Hoppin, J. A. (2004). Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease. *Environmental health perspectives*, 112(9), 950-958.

164. Kapeleka, J. A., Sauli, E., & Ndakidemi, P. A. (2019). Pesticide exposure and genotoxic effects as measured by DNA damage and human monitoring biomarkers. *International journal of environmental health research*, 1-18.
165. Karami-Mohajeri, S., & Abdollahi, M. (2011). Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: a systematic review. *Human & experimental toxicology*, 30(9), 1119-1140.
166. Keefover-Ring, K., Thompson, J. D., & Linhart, Y. B. (2009). Beyond six scents: defining a seventh *Thymus vulgaris* chemotype new to southern France by ethanol extraction. *Flavour and fragrance journal*, 24(3), 117-122.
167. Keramat, M., & Golmakani, M. T. (2016). Effect of *Thymus vulgaris* and *Bunium persicum* essential oils on the oxidative stability of virgin olive oil. *Grasas y aceites*, 67(4), e162-e162.
168. Khaldoun-Oularbi, H., Richeval, C., Djenas, N., Lhermitte, M., Humbert, L., & Baz, A. (2013). Effect of sub-acute exposure to abamectin “insecticide” on liver rats (*Rattus norvegicus*). In *Annales de Toxicologie Analytique* (Vol. 25, No. 2, pp. 63-70). EDP Sciences.
169. Khaldoun Oularbi, H., Allorge, D., Richeval, C., Lhermitte, M., & Djenas, N. (2015). Emamectin benzoate (Proclaim®) mediates biochemical changes and histopathological damage in the kidney of male Wistar rats (*Rattus norvegicus*). *Toxicologie Analytique et Clinique*, 27(2), 72-80.
170. Khaldoun Oularbi, H., Richeval, C., Lebaili, N., Zerrouki-Daoudi, N., Baha, M., Djennas, N., & Allorge, D. (2017). Ameliorative effect of vitamin C against hepatotoxicity induced by emamectin benzoate in rats. *Human & experimental toxicology*, 36(7), 709-717.
171. Khalifa, F. K., & Alkhalaf, M. I. (2020). Effects of black seed and thyme leaves dietary supplements against malathion insecticide-induced toxicity in experimental rat model. *Journal of King Saud University-Science*, 32(1), 914-919.
172. Kiernan, F. (1833). XXIX. The anatomy and physiology of the liver. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, (123), 711-770.
173. Kim, K. H., Kabir, E., & Jahan, S. A. (2017). Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of the total environment*, 575, 525-535.
174. Kolar, L., Eržen, N. K., Hogerwerf, L., & van Gestel, C. A. (2008). Toxicity of abamectin and doramectin to soil invertebrates. *Environmental Pollution*, 151(1), 182-189.

- 175.Kori, R. K., Singh, M. K., Jain, A. K., & Yadav, R. S. (2018). Neurochemical and behavioral dysfunctions in pesticide exposed farm workers: A clinical outcome. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 33(4), 372-381.
- 176.Kozics, K., Klusová, V., Srančíková, A., Mučaji, P., Slameňová, D., Hunáková, Ľ., ... & Horváthová, E. (2013). Effects of *Salvia officinalis* and *Thymus vulgaris* on oxidant-induced DNA damage and antioxidant status in HepG2 cells. *Food chemistry*, 141(3), 2198-2206.
- 177.Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., ... & Etherton, T. D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American journal of medicine*, 113(9), 71-88.
- 178.Króliczewska, B., Mišta, D., Ziarnik, A., Žuk, M., Szopa, J., Pecka-Kiełb, E., ... & Króliczewski, J. (2018). The effects of seed from *Linum usitatissimum* cultivar with increased phenylpropanoid compounds and hydrolysable tannin in a high cholesterol-fed rabbit. *Lipids in health and disease*, 17(1), 1-14.
- 179.Ku, B., Liang, C., Jung, J. U., & Oh, B. H. (2011). Evidence that inhibition of BAX activation by BCL-2 involves its tight and preferential interaction with the BH3 domain of BAX. *Cell research*, 21(4), 627-641.
- 180.Kuhlmann, W. D., & Peschke, P. (2006). Hepatic progenitor cells, stem cells, and AFP expression in models of liver injury. *International journal of experimental pathology*, 87(5), 343-359.
- 181.Kulevanova, S., Ristić, M., Stafilov, T., Dorevski, K., & Ristov, T. (1996). Essential oil analysis of some taxa of genera *Thymus* L.–environmental influences. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia*, 15, 33–38 (1996).
- 182.Kulisic, T., Radonic, A., & Milos, M. (2005). Antioxidant properties of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) essential oils. *Italian journal of food science*, 17(3), 315.
- 183.Kuo, M. L., Shiah, S. G., Wang, C. J., & Chuang, S. E. (1999). Suppression of apoptosis by Bcl-2 to enhance benzene metabolites-induced oxidative DNA damage and mutagenesis: A possible mechanism of carcinogenesis. *Molecular pharmacology*, 55(5), 894-901.

- 184.Kurek-Górecka, A., Rzepecka-Stojko, A., Górecki, M., Stojko, J., Sosada, M., & Świerczek-Zięba, G. (2014). Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules*, *19*(1), 78-101.
- 185.Kushwaha, S., Anerao, I., Rajput, S., Bhagriya, P., & Roy, H. (2020). Evaluation of abamectin induced hepatotoxicity in *Oreochromis mossambicus*. *Cogent Biology*, *6*(1), 1761277.
- 186.Lai, T., & Su, J. (2011). Effects of chlorantraniliprole on development and reproduction of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner). *Journal of Pest Science*, *84*(3), 381-386.
- 187.Lankas, G. R., Cartwright, M., Minsker, D., & Cukierski, M. (1996). Postnatal development of P-glycoprotein, a component of the bloodbrain and intestinal barriers, in rats. *Fundam Appl Toxicol Suppl*, *30*, 263-7.
- 188.Lankas, G. R., Wise, L. D., Cartwright, M. E., Pippert, T., & Umbenhauer, D. R. (1998). Placental P-glycoprotein deficiency enhances susceptibility to chemically induced birth defects in mice. *Reproductive toxicology*, *12*(4), 457-463.
- 189.Lavtižar, V., Berggren, K., Trebše, P., Kraak, M. H., Verweij, R. A., & van Gestel, C. A. (2016). Comparative ecotoxicity of chlorantraniliprole to non-target soil invertebrates. *Chemosphere*, *159*, 473-479.
- 190.Lee, K. G., & Shibamoto, T. (2002). Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices. *Journal of agricultural and food chemistry*, *50*(17), 4947-4952.
- 191.Lerro, C. C., Koutros, S., Andreotti, G., Friesen, M. C., Alavanja, M. C., Blair, A., ... & Freeman, L. E. B. (2015). Organophosphate insecticide use and cancer incidence among spouses of pesticide applicators in the Agricultural Health Study. *Occupational and environmental medicine*, *72*(10), 736-744.
- 192.Li, M. S., Li, P. F., He, S. P., Du, G. G., & Li, G. (2002). The promoting molecular mechanism of alpha-fetoprotein on the growth of human hepatoma Bel7402 cell line. *World journal of gastroenterology*, *8*(3), 469.
- 193.Li, S., Li, M., Cui, Y., & Wang, X. (2013). Avermectin exposure induces apoptosis in King pigeon brain neurons. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *107*(2), 177-187.
- 194.Limón-Pacheco, J., & Gonsebatt, M. E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *674*(1-2), 137-147.

- 195.Lin, B., Wang, Q., Liu, K., Dong, X., Zhu, M., & Li, M. (2021). Alpha-Fetoprotein Binding Mucin and Scavenger Receptors: An Available Bio-Target for Treating Cancer. *Frontiers in Oncology*, *11*, 96.
- 196.Lind, P. M., & Lind, L. (2018). Endocrine-disrupting chemicals and risk of diabetes: an evidence-based review. *Diabetologia*, *61*(7), 1495-1502.
- 197.Liu, Y., Naumovski, L., & Hanawalt, P. (1997). Nucleotide excision repair capacity is attenuated in human promyelocytic HL60 cells that overexpress BCL2. *Cancer research*, *57*(9), 1650-1653.
- 198.Lu, Y., & Foo, L. Y. (2001). Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food chemistry*, *75*(2), 197-202.
- 199.Lukas, B., Schmiderer, C., & Novak, J. (2015). Essential oil diversity of European *Origanum vulgare* L.(Lamiaceae). *Phytochemistry*, *119*, 32-40.
- 200.Lukaszewicz-Hussain, A. (2010). Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity–Short review. *Pesticide biochemistry and physiology*, *98*(2), 145-150.
- 201.MacDonald-Wicks, L. K., Wood, L. G., & Garg, M. L. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *86*(13), 2046-2056.
- 202.Macdonald, N., & Gledhill, A. (2007). Potential impact of ABCB1 (p-glycoprotein) polymorphisms on avermectin toxicity in humans. *Archives of toxicology*, *81*(8), 553-563.
- 203.Magdy, B. W., Mohamed, F. E., Amin, A. S., & Rana, S. S. (2016). Ameliorative effect of antioxidants (vitamins C and E) against abamectin toxicity in liver, kidney and testis of male albino rats. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, *77*, 69-82.
- 204.Magyar, J., Szentandrassy, N., Bányász, T., Fülöp, L., Varró, A., & Nánási, P. P. (2004). Effects of terpenoid phenol derivatives on calcium current in canine and human ventricular cardiomyocytes. *European Journal of Pharmacology*, *487*(1-3), 29-36.
- 205.Marieb, E. N., Hoehn, K., Moussakova, L., & Lachaine, R. (2005). Anatomie et physiologie humaines (4e éd.). *Saint-Laurent: Éditions du Renouveau Pédagogique Inc.*
- 206.Martinez-González, M. C., Buján, J. J. G., Gómez, W. M., & Capdevila, E. F. (2007). Concomitant allergic contact dermatitis due to *Rosmarinus officinalis* (rosemary) and *Thymus vulgaris* (thyme). *Contact Dermatitis*, *56*(1), 49-50.
- 207.Martoja, R., & Martoja-Pierson, M. (1967). Initiation aux techniques de l'histologie animale.

208. Marzinke, M. A., & Dufour, D. R. (2020). Laboratory diagnosis of liver disease. In *Contemporary Practice in Clinical Chemistry* (pp. 545-559). Academic Press.
209. Masotti, V., Juteau, F., Bessière, J. M., & Viano, J. (2003). Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *Journal of agricultural and food chemistry*, *51*(24), 7115-7121.
210. Massaad, C. A., Portier, B. P., & Taglialatela, G. (2004). Inhibition of transcription factor activity by nuclear compartment-associated Bcl-2. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(52), 54470-54478.
211. Matkowski, A., Tasarz, P., & Szypua, E. (2008). Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from Lamiaceae, subfamily Lamioideae. *Journal of Medicinal Plants Research*, *2*(11), 321-330.
212. Mathur, V., John, P. J., Soni, I., & Bhatnagar, P. (2008). Blood levels of organochlorine pesticide residues and risk of reproductive tract cancer among women from Jaipur, India. In *Hormonal Carcinogenesis V* (pp. 387-394). Springer, New York, NY.
213. McCavera, S., Walsh, T. K., & Wolstenholme, A. J. (2007). Nematode ligand-gated chloride channels: an appraisal of their involvement in macrocyclic lactone resistance and prospects for developing molecular markers. *Parasitology*, *134*(8), 1111-1121.
214. Mebdoua, S. (2019). Pesticide residues in fruits and vegetables. *Bioactive molecules in food. Reference series in phytochemistry. Cham, Switzerland: Springer*.
215. Meddour, R. (2002). Bioclimats, étages et séries de végétation de l'Atlas Blidéen (Algérie). *Phytocoenologia*, 101-128.
216. Mefti Korteby, H. (2012). *Caracterisation zootechnique et genetique du lapain local* (Doctoral dissertation, Blida).
217. Meligi, N., & Hassan, H. (2017). Protective effects of *Eruca sativa* (rocket) on abamectin insecticide toxicity in male albino rats. *Environmental Science & Pollution Research*, *24*(10).
218. Mensah, G. A., Roth, G. A., & Fuster, V. (2019). The global burden of cardiovascular diseases and risk factors: 2020 and beyond.
219. Miguel, M. G., Costa, L. A., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., & Pedro, L. G. (2007). Assessment of the antioxidant ability of *Thymus albicans*, *T. mastichina*, *T. camphoratus* and *T. carnosus* essential oils by TBARS and micellar model systems. *Natural Product Communications*, *2*(4), 1934578X0700200410.

220. Mileski, K., Džamić, A. M., Ćirić, A., Grujić, S., Ristić, M., Matevski, V., & Marin, P. D. (2014). Radical scavenging and antimicrobial activity of essential oil and extracts of *Echinophora sibthorpiana* Guss. from Macedonia. *Archives of Biological Sciences*, 66(1), 401-413.
221. Millán, J., Pintó, X., Muñoz, A., Zúñiga, M., Rubiés-Prat, J., Pallardo, L. F., ... & Pedro-Botet, J. (2009). Lipoprotein ratios: physiological significance and clinical usefulness in cardiovascular prevention. *Vascular health and risk management*, 5, 757.
222. Miura, K., Kikuzaki, H., & Nakatani, N. (2002). Antioxidant activity of chemical components from sage (*Salvia officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) measured by the oil stability index method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(7), 1845-1851.
223. Miyajima, A., Yamamoto, Y., & Hirota, T. (2015). Effect of high fat intake on the pharmacokinetic profile of ivermectin in rabbits. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 30(3), 253-256.
224. Mizejewski, G. J. (2001). Alpha-fetoprotein structure and function: relevance to isoforms, epitopes, and conformational variants. *Experimental biology and medicine*, 226(5), 377-408.
225. Mizejewski, G. J. (2015). Alpha-fetoprotein (AFP) and inflammation: is AFP an acute and/or chronic phase reactant?. *Journal of Hematology & Thromboembolic Diseases*.
226. Mizejewski, G. J. (2016). The alpha-fetoprotein (AFP) third domain: a search for AFP interaction sites of cell cycle proteins. *Tumor Biology*, 37(9), 12697-12711.
227. Mobaiend, A., Ghassemifard, L., Kamali, K., & Khavasi, N. (2021). Therapeutic effect of thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil on patients with COVID19: a randomized clinical trial. *Journal of Advances in Medical and Biomedical Research*, 8-8.
228. Mohamed, M., Abdellatif, M. D., Sabar, A., & Elglammal, M. D. (2003). Sodium fluoride ion and renal function after prolonged sevoflurane or isoflurane anaesthesia. *Eng J Ana*, 19, 78-83.
229. Mohammed, Z., Akhtar, M. S., Said, S., Weli, A. M., Al-Sabahi, J. N., Al-Riyami, Q., & AlAbri, A. A. (2016). Composition of essential oil of *Thymus vulgaris* grown in Oman. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19(2), 475-478.
230. Moinuddin, Z., & Dhanda, R. (2015). Anatomy of the kidney and ureter. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 16(6), 247-252.

231. Mokrane, N., Kharoubi, O., Tahari, F. Z., Guenzet, A., & Aoues, A. (2020). The effect of *Thymus vulgaris* L. on renal and liver toxicity in wistar rats exposed to aluminum. *Journal of Medicinal Plants Research*, 14(1), 13-23.
232. Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. sci. technol*, 26(2), 211-219.
233. Mondal, A., Bose, S., Mazumder, K., & Khanra, R. (2021). Carvacrol: Therapeutic Properties and Molecular Mechanisms. In *Bioactive Natural Products for Pharmaceutical Applications* (pp. 437-462). Springer, Cham.
234. Morales, R. (2002). The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In *Thyme* (pp. 15-57). CRC Press.
235. Morinaga, T., Sakai, M., Wegmann, T. G., & Tamaoki, T. (1983). Primary structures of human alpha-fetoprotein and its mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(15), 4604-4608.
236. Nasr, H. M., El-Demerdash, F. M., & El-Nagar, W. A. (2016). Neuro and renal toxicity induced by chlorpyrifos and abamectin in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(2), 1852-1859.
237. National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 11271640, Chlorantraniliprole. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorantraniliprole>.
238. National Research Council, (2010). *Guide for the care and use of laboratory animals*: National Academies Press.
239. Nawaz, M., Cai, W., Jing, Z., Zhou, X., Mabubu, J. I., & Hua, H. (2017). Toxicity and sublethal effects of chlorantraniliprole on the development and fecundity of a non-specific predator, the multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis* (Pallas). *Chemosphere*, 178, 496-503.
240. NCBI Taxonomy Browser: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy> consulté le 05 octobre 2019.
241. Negroni, A., Cucchiara, S., & Stronati, L. (2015). Apoptosis, necrosis, and necroptosis in the gut and intestinal homeostasis. *Mediators of inflammation*, 2015.
242. Nicolopoulou-Stamati, P., Maipas, S., Kotampasi, C., Stamatis, P., & Hens, L. (2016). Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. *Frontiers in public health*, 4, 148.

243. Nikolić, M., Glamočlija, J., Ferreira, I. C., Calhelha, R. C., Fernandes, Â., Marković, T., ... & Soković, M. (2014). Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 52, 183-190.
244. Nikolić, M., Glamočlija, J., Ferreira, I. C., Calhelha, R. C., Fernandes, Â., Marković, T., et al. (2014). Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 52, 183-190.
245. Nishi, S., Watabe, H., & Hirai, H. (1975). Immunological and chemical correlation between alpha-fetoproteins from human and several mammalian species. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 259, 109-118.
246. Novelli, A., Vieira, B. H., Cordeiro, D., Cappelini, L. T. D., Vieira, E. M., & Espíndola, E. L. G. (2012). Lethal effects of abamectin on the aquatic organisms *Daphnia similis*, *Chironomus xanthus* and *Danio rerio*. *Chemosphere*, 86(1), 36-40.
247. OCDE, (2008). OECD Test Guideline for testing of chemicals, Section 4: Health Effects, OECD. Guideline 407, Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents.
248. Olisah, C., Okoh, O. O., & Okoh, A. I. (2020). Occurrence of organochlorine pesticide residues in biological and environmental matrices in Africa: A two-decade review. *Heliyon*, 6(3), e03518.
249. Omura, S. (2008). Ivermectin: 25 years and still going strong. *International journal of antimicrobial agents*, 31(2), 91-98.
250. Ontko, J. A. (1973). Effects of ethanol on the metabolism of free fatty acids in isolated liver cells. *Journal of lipid research*, 14(1), 78-86.
251. Orozco-Beltran, D., Gil-Guillen, V. F., Redon, J., Martin-Moreno, J. M., Pallares-Carratala, V., Navarro-Perez, J., ... & ESCARVAL Study Group. (2017). Lipid profile, cardiovascular disease and mortality in a Mediterranean high-risk population: The ESCARVAL-RISK study. *PLoS One*, 12(10), e0186196.
252. Osofsky, A., LeCouteur, R. A., & Vernau, K. M. (2007). Functional neuroanatomy of the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 10(3), 713-730.
253. Ovalle, W. K., & Nahirney, P. C. (2020). *Netter's Essential Histology E-Book: With Correlated Histopathology*. Elsevier Health Sciences.
254. Ozenda, P. (1977). Flora of the Sahara. *Flora of the Sahara.*, (ed. 2).

- 255.Pallepati, P., & Averill-Bates, D. A. (2012). Reactive oxygen species, cell death signaling and apoptosis. *Princ Free Rad Biomed*, 2, 513-546.
- 256.Pak, V. N. (2018). The use of alpha-fetoprotein for the treatment of autoimmune diseases and cancer. *Therapeutic delivery*, 9(1), 37-46.
- 257.Paolini, J., Costa, J., & Bernardini, A. F. (2005). Analysis of the essential oil from aerial parts of *Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* (L.) by gas chromatography with electron impact and chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1076(1-2), 170-178.
- 258.Patil, S. M., Ramu, R., Shirahatti, P. S., Shivamallu, C., & Amachawadi, R. G. (2021). A systematic review on ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacological aspects of *Thymus vulgaris* Linn. *Heliyon*, 7(5), e07054.
- 259.Pereira, L. C., de Souza, A. O., Bernardes, M. F. F., Pazin, M., Tasso, M. J., Pereira, P. H., & Dorta, D. J. (2015). A perspective on the potential risks of emerging contaminants to human and environmental health. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(18), 13800-13823.
- 260.Pignon, C., Donnelly, T. M., & Mayer, J. (2013). Hepatic lobe torsion in a rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie*, 48(3), 91-98.
- 261.Pinn, G. (2001). Herbal therapy in respiratory disease. *Australian family physician*, 30(8).
- 262.Pitterna, T., Cassayre, J., Hüter, O. F., Jung, P. M., Maienfisch, P., Kessabi, F. M., ... & Tobler, H. (2009). New ventures in the chemistry of avermectins. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(12), 4085-4095.
- 263.Pluot, M., Cahn, V., & Ducasse, A. (2006). L'immunohistochimie en anatomie pathologique ophtalmologique: intérêt et limites. *Journal français d'ophtalmologie*, 29(8), 946-956.
- 264.Poirot, T. (2016). *Bon usage des huiles essentielles, effets indésirables et toxicologie* (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).
- 265.Pothier, J., Galand, N., El Ouali, M., & Viel, C. (2001). Comparison of planar chromatographic methods (TLC, OPLC, AMD) applied to essential oils of wild thyme and seven chemotypes of thyme. *Il Farmaco*, 56(5-7), 505-511.
- 266.Prasanth Reddy, V., Ravi Vital, K., Varsha, P. V., & Satyam, S. (2014). Review on *Thymus vulgaris* traditional uses and pharmacological properties. *Med Aromat Plants*, 3(164), 2167-0412.

267. Pulce, C., de Lyon, C. A. P. T. V., Hermouet, C., & MSA, C. (2012). Abamectine: étude rétrospective des expositions aux produits phytopharmaceutiques à base d'abamectine. *Recueillies par les Centres Antipoison et de Toxicovigilance (CAPTV) et le Réseau Phyt'attitude de la Mutualité Sociale Agricole (MSA)*.
268. Qiao, D., Seidler, F. J., & Slotkin, T. A. (2005). Oxidative mechanisms contributing to the developmental neurotoxicity of nicotine and chlorpyrifos. *Toxicology and applied pharmacology*, 206(1), 17-26.
269. Quezel, P., & Santa, S. (1963). *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Tome I. Ed. du Centre National de la Recherche Scientifique. pp.178.
270. Racanelli, V., & Rehmann, B. (2006). The liver as an immunological organ. *Hepatology*, 43(S1), S54-S62.
271. Radi, A. M., Mohammed, E. T., Abushouk, A. I., Aleya, L., & Abdel-Daim, M. M. (2020). The effects of abamectin on oxidative stress and gene expression in rat liver and brain tissues: modulation by sesame oil and ascorbic acid. *Science of The Total Environment*, 701, 134882.
272. Raja, M., Al-Fatah, A., Ali, M., Afzal, M., Hassan, R. A. H., Menon, M., & Dhimi, M. I. (1992). Modification of liver and serum enzymes by paraquat treatment in rabbits. *Drug metabolism and drug interactions*, 10(4), 279-292.
273. Rajasekharan, S. K., Lee, J. H., Ravichandran, V., Kim, J. C., Park, J. G., & Lee, J. (2019). Nematicidal and insecticidal activities of halogenated indoles. *Scientific reports*, 9(1), 1-14.
274. Rani, L., Thapa, K., Kanojia, N., Sharma, N., Singh, S., Grewal, A. S., ... & Kaushal, J. (2021). An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. *Journal of Cleaner Production*, 124657.
275. Rasooli, I., Rezaei, M. B., & Allameh, A. (2006). Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *International journal of infectious diseases*, 10(3), 236-241.
276. Redza-Dutordoir, M., & Averill-Bates, D. A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1863(12), 2977-2992.
277. Rhind, J. P., & Pirie, D. (2012). *Essential oils: A Handbook for Aromatherapy Practice*. Singing Dragon.
278. Rizwan, B. (2021). Therapeutic potential of *Thymus vulgaris*: A Review.

279. Roeleveld, N., & Bretveld, R. (2008). The impact of pesticides on male fertility. *Current opinion in Obstetrics and Gynecology*, 20(3), 229-233.
280. Rojas-Armas, J., Arroyo-Acevedo, J., Ortiz-Sánchez, M., Palomino-Pacheco, M., Castro-Luna, A., Ramos-Cevallos, N., ... & Herrera-Calderón, O. (2019). Acute and repeated 28-day oral dose toxicity studies of *Thymus vulgaris* L. essential oil in rats. *Toxicological research*, 35(3), 225-232.
281. Roncero, C., Ventura, J. J., Sánchez, A., Bois-Joyeux, B., Mesa, M. L., Thomassin, H., ... & Fabregat, I. (1998). Phorbol esters down-regulate alpha-fetoprotein gene expression without affecting growth in fetal hepatocytes in primary culture. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1402(2), 151-164.
282. Rota, M. C., Herrera, A., Martínez, R. M., Sotomayor, J. A., & Jordán, M. J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food control*, 19(7), 681-687.
283. Rübensam, G., Barreto, F., Hoff, R. B., & Pizzolato, T. M. (2013). Determination of avermectin and milbemycin residues in bovine muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fluorescence detection using solvent extraction and low temperature cleanup. *Food Control*, 29(1), 55-60.
284. Ruberto, G., & Baratta, M. T. (2000). Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food chemistry*, 69(2), 167-174.
285. Saadi, H. S., & Abdollahi, M. (2012). Is there a link between human infertilities and exposure to pesticides?.
286. Saadi, R., Boukazouha A., Bouzenad, M., Dis, S., Meklati, F., Sid, S. (2014). Standard de la souche synthétique de lapin ITELV 2006. Norme algérienne. Edition : 01 NA : 19403 Alger 2014.
287. Safaei-Ghomi, J., Ebrahimabadi, A. H., Djafari-Bidgoli, Z., & Batooli, H. (2009). GC/MS analysis and in vitro antioxidant activity of essential oil and methanol extracts of *Thymus caramanicus* Jalas and its main constituent carvacrol. *Food Chemistry*, 115(4), 1524-1528.
288. Saldana, T. M., Basso, O., Hoppin, J. A., Baird, D. D., Knott, C., Blair, A., ... & Sandler, D. P. (2007). Pesticide exposure and self-reported gestational diabetes mellitus in the Agricultural Health Study. *Diabetes care*, 30(3), 529-534.

289. Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., & Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2), 270-276.
290. Sarikurkcu, C., Ozer, M. S., Eskici, M., Tepe, B., Can, Ş., & Mete, E. (2010). Essential oil composition and antioxidant activity of *Thymus longicaulis* C. Presl subsp. *longicaulis* var. *longicaulis*. *Food and Chemical Toxicology*, 48(7), 1801-1805.
291. Satyal, P., Murray, B. L., McFeeters, R. L., & Setzer, W. N. (2016). Essential oil characterization of *Thymus vulgaris* from various geographical locations. *Foods*, 5(4), 70.
292. Scherer, R., & Godoy, H. T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food chemistry*, 112(3), 654-658.
293. Schmidt, L. E., & Dalhoff, K. (2005). Alpha-fetoprotein is a predictor of outcome in acetaminophen-induced liver injury. *Hepatology*, 41(1), 26-31.
294. Seadawy, M. G., Gad, A. F., Shamel, M., Elharty, B., Mohamed, M. F., Elfiky, A. A., & Zekri, A. R. N. (2020). In vitro: natural compounds (Thymol, Carvacrol, Hesperidine, and Thymoquinone) against Sars-Cov2 strain isolated from Egyptian patients.
295. Sebbag L. (2011). Efficacité des avermectines contre les acarioses du chien : revue systématique. Thèse de doctorat en vétérinaire, université Paul-Sabatier de Toulouse, France.
296. Sekhotha, M. M., Monyeki, K. D., & Sibuyi, M. E. (2016). Exposure to agrochemicals and cardiovascular disease: a review. *International journal of environmental research and public health*, 13(2), 229.
297. Sell, S. (1980). Alphafetoprotein. *Cancer Markers*, 249-293.
298. Seol, G. H., Kang, P., Lee, H. S., & Seol, G. H. (2016). Antioxidant activity of linalool in patients with carpal tunnel syndrome. *BMC neurology*, 16(1), 1-6.
299. Seto, M., Jaeger, U., Hockett, R. D., Graninger, W., Bennett, S., Goldman, P., & Korsmeyer, S. J. (1988). Alternative promoters and exons, somatic mutation and deregulation of the Bcl-2-Ig fusion gene in lymphoma. *The EMBO journal*, 7(1), 123-131.
300. Shi, S. R., Cote, R. J., & Taylor, C. R. (2001). Antigen retrieval immunohistochemistry and molecular morphology in the year 2001. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 9(2), 107-116.
301. Shimizu, S., Eguchi, Y., Kosaka, H., Kamiike, W., Matsuda, H., & Tsujimoto, Y. (1995). Prevention of hypoxia-induced cell death by Bcl-2 and Bcl-xL. *Nature*, 374(6525), 811-813.

302. Shoop, W., & Soll, M. (2002). Ivermectin, abamectin and eprinomectin. In *Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy* (pp. 1-29). CABI Publishing Oxon, UK.
303. Siddiqui, W. A., Ahad, A., & Ahsan, H. (2015). The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Archives of toxicology*, 89(3), 289-317.
304. Singletary, K. (2016). Thyme: history, applications, and overview of potential health benefits. *Nutrition Today*, 51(1), 40-49.
305. Sousa, J. D. S., do Nascimento, H. O., Gomes, H. D. O., & do Nascimento, R. F. (2021). Pesticide residues in groundwater and surface water: Recent advances in solid-phase extraction and solid-phase microextraction sample preparation methods for multiclass analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 168.
306. Stahl-Biskup, E., & Sáez, F. (Eds.). (2002). *Thyme: the genus Thymus*. CRC Press.
307. Stahl-Biskup, E., & Venskutonis, R. P. (2012). Thyme. In *Handbook of herbs and spices* (pp. 499-525). Woodhead Publishing.
308. Stan, F. G. (2018). Comparative Study of the Liver Anatomy in the Rat, Rabbit, Guinea Pig and Chinchilla. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine*, 75(1).
309. Stankovic, M. (2020). Lamiaceae Species. *MDPI: Basel, Switzerland*.
310. Stevens, A., Lowe, J.S. (1997). *Histologie humaine*, De Boeck Université, 2^{ème} édition, Paris.
311. Sun, Y. J., Long, D. X., Li, W., Hou, W. Y., Wu, Y. J., & Shen, J. Z. (2010). Effects of avermectins on neurite outgrowth in differentiating mouse neuroblastoma N2a cells. *Toxicology letters*, 192(2), 206-211.
312. Szasz, G. (1969). A kinetic photometric method for serum γ -glutamyl transpeptidase. *Clinical chemistry*, 15(2), 124-136.
313. Thomaz, J. M., Martins, N. D., Monteiro, D. A., Rantin, F. T., & Kalinin, A. L. (2009). Cardio-respiratory function and oxidative stress biomarkers in Nile tilapia exposed to the organophosphate insecticide trichlorfon (NEGUVON®). *Ecotoxicology and environmental safety*, 72(5), 1413-1424.
314. Thompson, J. D., Chalchat, J. C., Michet, A., Linhart, Y. B., & Ehlers, B. (2003). Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *Journal of chemical ecology*, 29(4), 859-880.

315. Tišler, T., & Eržen, N. K. (2006). Abamectin in the aquatic environment. *Ecotoxicology*, 15(6), 495-502.
316. Tomasi Jr, T. B. (1977). Structure and function of alpha-fetoprotein. *Annual review of medicine*, 28(1), 453-465.
317. Torras, J., Grau, M. D., López, J. F., & de las Heras, F. X. C. (2007). Analysis of essential oils from chemotypes of *Thymus vulgaris* in Catalonia. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(12), 2327-2333.
318. Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2014). *Anatomy & Physiology*. Wiley India Pvt Limited.
319. Trinder, P. (1969). Enzymatic methods for glucose determination. *Ann Clin Biochem*, 6, 24-26.
320. Tripathi, S., & Srivastav, A. K. (2010). Nephrotoxicity induced by long-term oral administration of different doses of chlorpyrifos. *Toxicology and industrial health*, 26(7), 439-447.
321. Ündeğer, Ü., Başaran, A. R. İ. F., Degen, G. H., & Başaran, N. (2009). Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol. *Food and chemical toxicology*, 47(8), 2037-2043.
322. Vlachojannis, C., Chrubasik-Hausmann, S., Hellwig, E., & Al-Ahmad, A. (2015). A preliminary investigation on the antimicrobial activity of Listerine®, its components, and of mixtures thereof. *Phytotherapy Research*, 29(10), 1590-1594.
323. van Bommel, D. M., Visvanathan, K., Beane Freeman, L. E., Coble, J., Hoppin, J. A., & Alavanja, M. C. (2008). S-ethyl-N, N-dipropylthiocarbamate exposure and cancer incidence among male pesticide applicators in the Agricultural Health Study: a prospective cohort. *Environmental health perspectives*, 116(11), 1541-1546.
324. Van Tellingen, O. (2001). The importance of drug-transporting P-glycoproteins in toxicology. *Toxicology letters*, 120(1-3), 31-41.
325. Vigo, E., Cepeda, A., Perez-Fernandez, R., & Gualillo, O. (2004). In-vitro anti-inflammatory effect of *Eucalyptus globulus* and *Thymus vulgaris*: nitric oxide inhibition in J774A. 1 murine macrophages. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56(2), 257-263.
326. Viuda-Martos, M., Ruiz Navajas, Y., Sánchez Zapata, E., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2010). Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour and Fragrance journal*, 25(1), 13-19.

327. Vlachojannis, C., Chrubasik-Hausmann, S., Hellwig, E., & Al-Ahmad, A. (2015). A preliminary investigation on the antimicrobial activity of Listerine®, its components, and of mixtures thereof. *Phytotherapy Research*, 29(10), 1590-1594.
328. Vogel, H. (2009). Normal Anatomy and Histology of the CNS. In *Nervous system*. Cambridge University Press.
329. Wang, Q., Gao, F., May, W. S., Zhang, Y., Flagg, T., & Deng, X. (2008). Bcl2 negatively regulates DNA double-strand-break repair through a nonhomologous end-joining pathway. *Molecular cell*, 29(4), 488-498.
330. Warren, C. F., Wong-Brown, M. W., & Bowden, N. A. (2019). BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell death & disease*, 10(3), 1-12.
331. Wheater, P.R., & Young, B., Health, J. (2001). Histologie fonctionnelle. Quatrième édition. De Boeck, université s.a. Paris.
332. Wingerd, B. & Stein, G. (1985). Rabbit Dissection Manual. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
333. Wolstenholme, A. J., & Rogers, A. T. (2005). Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. *Parasitology*, 131(S1), S85-S95.
334. Yadav, I. C., Devi, N. L., Syed, J. H., Cheng, Z., Li, J., Zhang, G., & Jones, K. C. (2015). Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: A comprehensive review of India. *Science of the Total Environment*, 511, 123-137.
335. Yan, D., Zhang, Y., Liu, L., & Yan, H. (2016). Pesticide exposure and risk of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Scientific reports*, 6(1), 1-9.
336. Young, B., O'Dowd, G., & Woodford, P. (2015). *Atlas d'histologie fonctionnelle de Wheater*. De Boeck Supérieur.
337. Zanolli, J. C. C., Maioli, M. A., Medeiros, H. C., & Mingatto, F. E. (2012). Abamectin affects the bioenergetics of liver mitochondria: A potential mechanism of hepatotoxicity. *Toxicology in vitro*, 26(1), 51-56.
338. Zantar, S., Yedri, F., Mrabet, R., Laglaoui, A., Bakkali, M., & Zerrouk, M. H. (2014). Effect of *Thymus vulgaris* and *Origanum compactum* essential oils on the shelf life of fresh goat cheese. *Journal of Essential Oil Research*, 26(2), 76-84.

- 339.Zeghib, A. (2013). Etude phytochimique et activités antioxydante, antiproliférative, antibactérienne et antivirale d'extraits et d'huiles essentielles de quatre espèces endémiques du genre *Thymus*.
- 340.Zein, S., Awada, S., Rachidi, S., Hajj, A., Krivoruschko, E., & Kanaan, H. (2011). Chemical analysis of essential oil from Lebanese wild and cultivated *Origanum syriacum* L.(Lamiaceae) before and after flowering. *Journal of medicinal plants research*, 5(3), 379-387.
- 341.Zerrouki, N., Hanachi, R. H., Lebas, F., & Saoudi, A. (2007). Productivité des lapines d'une souche blanche de la région de Tizi-Ouzou en Algérie. *12èmes Journées de la Recherche Cunicole*, 27-28.
- 342.Zhang, H., Bai, Z., Chen, J., Wang, Z., & Li, J. (2007). Alpha-fetoprotein-specific transfer factors downregulate alpha-fetoprotein expression and specifically induce apoptosis in Bel7402 alpha-fetoprotein-positive hepatocarcinoma cells. *Hepatology Research*, 37(7), 557-567.
- 343.Zouari, N., Fakhfakh, N., Zouari, S., Bougatef, A., Karray, A., Neffati, M., & Ayadi, M. A. (2011). Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut.(Lamiaceae). *Food and bioproducts processing*, 89(4), 257-265.

ANNEXES

ANNEXE 1

Réactifs pour le dosage des paramètres biochimiques

REACTIFS

R1 CRE Réactif 1

Phosphate disodique	6,4 mmol/L
Hydroxyde de sodium	150 mmol/L

R2 CRE Réactif 2

Dodécylsulfate de sodium	0,75 mmol/L
Acide picrique	4,0 mmol/L

pH 4,0

Conformément au règlement 1272/2008/CE, ce réactif n'est pas classé comme dangereux.

REACTIFS

R1 TAMPON BUF UA

Tris pH 8,0 à 25°C	50 mmol/L
Dichlorohydroxybenzène sulfonate	3 mmol/L
Potassium hexacyanoferrate (II)	53 µmol/L
3-DDAPS	0,7 mmol/L
EDTA	2 mmol/L
Conservateur	

R2 ENZYMES ENZ UA

Péroxydase	≥ 2000 U/L
Amino-antipyrine	750 mmol/L
Uricase	≥ 500 U/L
Conservateur	

R3 ETALON STD

Acide Urique	100 mg/L
--------------	----------

1. Réactifs du dosage de la créatinine

2. Réactifs du dosage de l'acide urique

REACTIFS

flacon R1

REACTIF DE TRAVAIL

2-Oxoglutarate	15 mmol/L
L-Alanine	500 mmol/L
LDH	≥ 1600 UI/L
NADH	≤ 0,18 mmol/L
Tampon Tris	100 mmol/L
pH à 30°C	7,50 ± 0.1
Conservateur	

3. Réactifs du dosage de l'ALAT

REACTIFS

R1 REACTIF DE TRAVAIL

EDTA	5 mmol/L
2-Oxoglutarate	12 mmol/L
L-Aspartate	200 mmol/L
MDH	495 UI/L
LDH	820 UI/L
NADH	≤ 0,18 mmol/L
Tampon Tris	80 mmol/L
pH à 30°C	7,80 ± 0.1
Conservateur	

4. Réactifs du dosage de l'ASAT

REACTIFS

flacon R1	TAMPON	
Glycylglycine		100 mmol/L
TRIS pH 8,25		95 mmol/L
Conservateur		
flacon R2	SUBSTRAT	
L-G-glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide (GPNA carboxylé)		80 mmol/L

5. Réactifs du dosage de γ -GT**REACTIFS**

R1	REAGENT	REAG	TRI	
PIPES				100 mmol/L
Chlorure de magnésium				9,8 mmol/L
Chloro-4-phénol				3,5 mmol/L
Lipase				≥ 1000 UI/L
Péroxydase (POD)				≥ 1700 UI/L
Glycérol 3 phosphate oxydase (GPO)				≥ 2000 UI/L
Glycérol Kinase (GK)				≥ 1000 UI/L
4 - Amino – antipyrine (PAP)				0,5 mmol/L
Adénosine triphosphate Na (ATP)				1,3 mmol/L
Agent clarifiant				1,5 mmol/L
R2	ETALON	STD		
Triglycérides				2 g/L

7. Réactifs du dosage de triglycérides**REACTIFS**

R1	HDL	Réactif Accélérateur
Tampon de Good		
CO		< 1000 UI/L
POD		< 1300 ppg UI/L
DSBmT		< 1 mmol/L
AAO		< 3000 UI/L
Accélérateur		< 1 mmol/L
Conservateur		< 0,06 %
R2	HDL	Détergent Sélectif
Tampon de Good		
CE		< 1500 UI/L
4-AAP		< 1 mmol/L
Détergent		< 2 %
Stabilisant		< 0,15 %
Conservateur		< 0,06 %

EUIH210 Fiche de données de sécurité disponible sur demande
 EUIH208 Contient CO, POD, CE. Peut produire une réaction allergique
 Conformément à la réglementation 1272/2008, ces réactifs ne sont pas classés comme dangereux

9. Réactifs du dosage de HDL-C**REACTIFS**

flacon R1	TAMPON ENZYMES	
Tampon phosphate		150 mmol/L
Glucose oxydase (GOD)		$\geq 20\ 000$ UI/L
Péroxydase (POD)		≥ 1000 UI/L
4-Amino-antipyrine (PAP)		0,8 mmol/L
flacon R2	CHROMOGENE	
Chloro-4-phénol		2.1 mmol/L
flacon R3	ETALON	
Glucose		1 g/L (5,55 mmol/L)

6. Réactifs du dosage du glucose**REACTIFS**

R1	CHO	Réactif
Tampon phosphate		100 mmol/L
Chloro-4-phénol		5 mmol/L
Sodium Cholate		2,3 mmol/L
Triton x100		1,5 mL/L
Conservateur		
Cholestérol oxydase (CO)		≥ 100 UI/L
Cholestérol estérase (CE)		≥ 170 UI/L
Péroxydase (POD)		≥ 1200 UI/L
4 - Amino – antipyrine (PAP)		0,25 mmol/L
PEG 6000		167 μ mol/L

Conformément à la réglementation 1272/2008, ce réactif n'est pas classé comme dangereux.

8. Réactifs du dosage de cholestérol total**REACTIFS**

flacon R1	REACTIF ENZYMES
Tampon MES pH 6,3	Cholestérol oxydase
Acide ascorbique oxydase	Cholestérol estérase
4-amino-antipyrine	Détergent 1
Péroxydase	Conservateur
flacon R2	DETERGENT SPECIFIQUE
Tampon MES pH 6,3	Détergent 2
DSBmT	Conservateur

MES : acide morpholino-éthane-sulfonique
DSBmT : N,N-bis (4-sulphobutyl)-m-toluidine-disodium

10. Réactifs du dosage de LDL-C

ANNEXE 2

Tableau 1 : Effet des traitements sur les paramètres biochimiques de la fonction rénale.

Paramètres biochimiques	Témoin	VT	HET	VT + HET
Acide urique (mg/dl)	1.57 ± 0.37 ^a	2.70 ± 0.62^b	1.70 ± 0.20 ^a	1.86 ± 0.48 ^a
Créatinine (mg/dl)	1.15 ± 0.07 ^a	3.58 ± 0.82^b	1.28 ± 0.13 ^a	1.36 ± 0.17 ^a

Les résultats sont donnés en moyenne ± SD pour cinq lapins dans chaque groupe. Les moyennes au sein de la même ligne avec des exposants différents sont significatives à $p < 0,05$.

Tableau 2 : Effet des traitements sur les paramètres biochimiques de la fonction hépatique.

Paramètres biochimiques	Groupes			
	Témoin	VT	HET	VT + HET
ASAT (U/L)	31.14 ± 2.54 ^a	57.8.33 ± 3.65 ^b	30.4 ± 3.20 ^a	34.20 ± 1.15 ^a
ALAT (U/L)	25.80 ± 1.16 ^a	48.20 ± 6.18 ^b	24.00 ± 2.10 ^a	34.8 ± 2.41 ^a
γ-GT (U/L)	11.2 ± 1.61 ^a	27.80 ± 3.55 ^b	9.60 ± 1.21 ^a	13.80 ± 3.62 ^a
Glucose (mg/dl)	106.4 ± 8.06 ^a	145.00 ± 7.78 ^b	99.4 ± 8.48 ^a	127.60 ± 9.68 ^a

Les données sont représentées en moyenne ± écart-type (n=05). Les moyennes au sein de la même ligne, qui ne partagent pas le(s) même(s) symbole(s) en exposant, sont significativement différentes.

Tableau 3 : Effet du traitement sur les paramètres du bilan lipidique

Paramètres biochimiques	Groupes			
	Témoin	VT	HET	VT + HET
TC (g/l)	0.63 ± 0.07	0.35 ± 0.02^{a*,b*,c*}	0.55 ± 0.05	0.49 ± 0.07
TG (g/l)	0.66 ± 0.05	0.64 ± 0.04	0.52 ± 0.10	0.51 ± 0.04
HDL-c (g/l)	0.21 ± 0.03	0.17 ± 0.03	0.25 ± 0.03	0.19 ± 0.01
LDL-c (g/l)	0.29 ± 0.04	0.11 ± 0.01^{a*,b*,c*}	0.18 ± 0.04	0.21 ± 0.05
VLDL-c (g/l)	0.12 ± 0.01	0.07 ± 0.04	0.10 ± 0.02	0.06 ± 0.02
IAP	0.53 ± 0.07	0.60 ± 0.09	0.25 ± 0.02^{a*}	0.42 ± 0.06
LDL-c/HDLc	1.54 ± 0.09	0.73 ± 0.05^{a*,c*}	0.75 ± 0.05^{a*,c*}	1.04 ± 0.05
TC/HDL-c	3.27 ± 0.07	2.47 ± 0.04	2.19 ± 0.08	2.35 ± 0.03

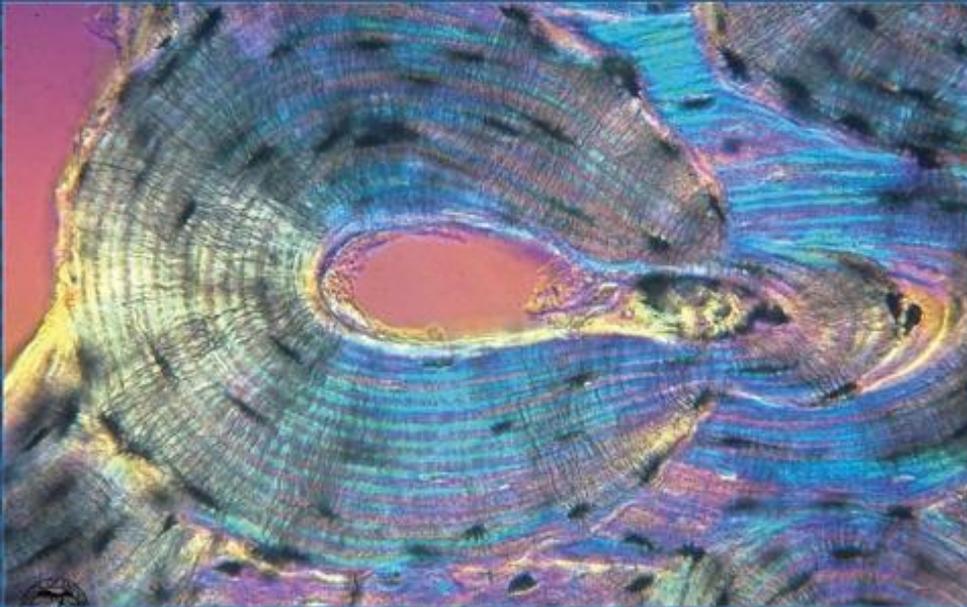
Les résultats sont donnés en moyenne ± SD (n=5). a* indique une différence significative par rapport au groupe témoin (p < 0,05), b* indique une différence significative par rapport au groupe HET (p < 0,05), c* indique une différence significative par rapport au groupe (VT + HET) (p < 0,05).

PUBLICATIONS



EGYPTIAN ACADEMIC JOURNAL OF
BIOLOGICAL SCIENCES
HISTOLOGY & HISTOCHEMISTRY

D



ISSN
2090-0775

WWW.EAJBS.EG.NET

Vol. 13 No. 1 (2021)



**Protective Effects of *Thymus vulgaris* Essential Oil Against Voliam Targo®
Induced Kidney and Brain Toxicity in Male Rabbits**

**Bokreta Soumya^{1,2}, Khaldoun-Oularbi Hassina^{1,2}, Ferhat Mohamed Amine³,
Makhlouf Chahrazed¹, Daoudi-Zerrouki Nacira²**

1-Departement of Biology, Faculty of Nature and Life Science, University Blida 1,
BP 270- Soumaa- Blida- Algeria

2-Natural Resources Laboratory, University Mouloud Mammeri, BP 15017. Tizi-
Ouzou. Algeria

3-Laboratory of Bioactive Substances and Valorisation of Biomasse. Ecole Normale
Supérieure. Vieux Kouba. P.O.Box 92, 16050 Alger, Algeria

E.Mail : bokretasoumya@gmail.com - khaldounhassina@hotmail.fr-
ferhatamine@hotmail.com -makhloufchahrazed@gmail.com-
naciradaoudi@hotmail.com

ARTICLE INFO

Article History

Received:28/2/2021

Accepted:19/4/2021

Keywords:

Voliam
Targo®, *Thymus
vulgaris*,
Essential Oil,
Biochemical
Parameters,
Histopathology

ABSTRACT

The present study was designed to investigate the protective effects of *Thymus vulgaris* essential oil against kidney and brain toxicity induced by an abamectin-based insecticide Voliam targo® (VT) in male rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). The extraction of the essential oil from *T. vulgaris* (TEO) by hydrodistillation allowed us to obtain an essential oil with a yield of 0.30 and the characterization of this essential oil by GC / MS indicates that the major component is carvacrol (86.25%). Twenty rabbits were randomly allocated to four equal groups and treated for 21 consecutive days: Control group, VT-group (4 mg ABA kg⁻¹ body weight), TEO-group (0.5 mg kg⁻¹ body weight), and VT + TEO-group (0.5 mg kg⁻¹ body weight of TEO plus the same dose of VT). Our results revealed that the administration of VT resulted in a statistically significant (p < 0.05) increase in serum creatinine and uric acid levels as compared to the control group. Voliam targo® was found to induce histopathological alterations in the kidney, namely dilatation and congestion of blood vessels, dilatation of proximal and distal tubules and lymphocytes infiltration within the renal cortical interstitium. Furthermore, the subacute exposure to VT resulted in neurotoxic effects on the cerebral cortex, the hippocampus and the cerebellum of treated rabbits. However, co-administration of *Thymus vulgaris* essential oil significantly reversed renal function biomarkers to near normal levels and improved morphological changes of the kidney and brain tissues. The present results indicate that carvacrol-rich thyme essential oil exerts protective effects against VT-induced renal and neuro-toxicity.

INTRODUCTION

Over the last two decades, pesticides have become an important component of global agricultural systems, allowing for a substantial improvement in crop yields and reducing spoilage rates (Carvalho, 2017). Nevertheless, the extensive application of pesticides leads to their accumulations in different biological matrices which can result in serious health hazards, including cardiovascular diseases, liver and kidney damage, cancers, reproductive difficulties and neurological effects (Pereira *et al.*, 2015; Nicolopoulou-Stamati *et al.*, 2016). "Voliam Targo® 063SCe" (VT) is a broad-spectrum insecticide and acaricide recently marketed in Algeria. It is a combination of two insecticides: abamectin and chlorantraniliprole, belonging to two different chemical families (avermectins and anthranilic diamides respectively). This biopesticide is effective on several key pests of fruits and vegetables. The synergy of its two active ingredients offers better efficiency in insects due to its action on ryanodine receptors and chloride channels (Diaz-Fleischer *et al.*, 2016).

Abamectin (ABA) is a macrocyclic lactone disaccharide; a mixture of avermectins containing more than 80% of avermectin B_{1a} and less than 20% of avermectin B_{1b}. Avermectins are widely used throughout the world in veterinary and human medicine to protect against a broad spectrum of parasitic infections and in agriculture for pest control. Avermectins are generated as fermentation products by the soil-dwelling actinomycete *Streptomyces avermitilis* (Fent, 2014). Abamectin exerts its effect through high-affinity binding to glutamate-gated chloride channels (Kolar *et al.*, 2008); it is considered very toxic to insects and fishes and may be highly toxic to mammals as well (Lankas and Gordon,

1989; Jenčič *et al.*, 2006). In addition, previous studies demonstrated that abamectin can harm kidney function (Eissa and Zidan, 2010; El-Shafey *et al.*, 2011; Magdy *et al.*, 2016; Khaldoun-Oularbi *et al.*, 2017). Besides, histological examination of the renal tissue from male albino rats exposed to abamectin orally revealed severe tubular cell necrosis, atrophy of the glomeruli with hemorrhage (Abd-Elhady and Abou-Elghar, 2013). Kidneys are the main dynamic organs responsible for maintaining the body's homeostasis; they play a key role in the filtration, biotransformation, and elimination of xenobiotics and their metabolites, and thus, are one of the most frequent sites for toxicity (Maliakel *et al.*, 2008). The P-glycoprotein (P-gp) efflux pump has been evidenced to affect abamectin biodistribution in the host while cytochromes P450 is responsible for its biotransformation (Albérich *et al.*, 2014). P-gp is known to limit the penetration of toxic compounds across the blood-brain barrier and thus prevents brain toxicity (Roulet *et al.*, 2003). Additionally, it mediates the intestinal excretion of abamectin (Ballent *et al.*, 2006).

Chlorantraniliprole is a novel anthranilic diamide insecticide, effective in controlling lepidopteran pests, and some species in Coleoptera, Diptera and Hemiptera orders (He *et al.*, 2019). This insecticide has a unique mode of action; it selectively binds to and activates the ryanodine receptors of insects which stimulate the release and depletion of internal calcium stores from the sarcoplasmic reticulum in muscles, causing an impaired regulation of muscle, paralysis and ultimately death of sensitive species (Lai and Su, 2011). Chlorantraniliprole is non-polluting and is considered a valuable alternative as compared to more toxic conventional insecticides because its toxicity to non-target animals is

relatively very low (Han *et al.*, 2012, Nawaz *et al.*, 2017).

It has long been recognized that the toxicity of pesticides is correlated with the increased generation of reactive oxygen species (ROS) (Bagchi *et al.*, 1995; Verma *et al.*, 2007). Moreover, the production of ROS has been postulated as one of the main mechanisms by which xenobiotics and pathological conditions may generate oxidative stress and cause diverse tissue damages (Yu *et al.*, 2008). In addition, oxidative stress has recently been shown to be a key factor in abamectin-induced cytotoxicity (Liang *et al.*, 2020). Therefore, the use of antioxidants to alleviate the toxic hazards of abamectin insecticides is a logical approach.

Recently, there has been a growing interest in using natural resources, which are culturally acceptable and economically viable. Thyme (*Thymus vulgaris* L.) is a perennial aromatic herb of the Lamiaceae family, native to the Mediterranean region (Domaracký *et al.*, 2007). The leafy parts of thyme and its essential oil are commonly utilized in foods as culinary herb spices, natural food preservatives and also in traditional medicines. Moreover, it has been reported that Thyme possesses numerous interesting bioactivities, including antimicrobial, antiseptic, antifungal, antioxidant properties and it has also been suggested as a natural replacement for synthetic antioxidants (Rasooli *et al.*, 2006). The therapeutic potential of thyme is based on its contents of flavonoids, thymol, carvacrol, eugenol, aliphatic phenols as well as saponins, luteolin and tetramethoxylated flavones (Dorman and Deans, 2000). It must be noted that the information about the impact of *Thymus vulgaris* essential oil on the toxicity of abamectin-based insecticides in literature is relatively rare.

Accordingly, the aim of the present work is to investigate the potentially toxic effects of Voliam

targo® on kidney function biomarkers and histological changes in renal and brain tissues and to evaluate the protective role of *Thymus vulgaris* essential oil against Voliam targo® induced toxicity in male rabbits (*Oryctolagus cuniculus*).

MATERIALS AND METHODS

Chemicals:

The tested molecule “Voliam Targo® 063SC” (VT) in the current study is a new insecticide formulation containing abamectin 1.8% and chlorantraniliprole 4.5%. It is marketed by SYNGENTA Crop Protection Agrochemicals, Greensboro, USA. All other chemicals and biochemical reagents used in the present study were purchased from commercial sources (BIOLABO SA, France).

Plant Materials and Essential Oil

Extraction:

T. vulgaris samples were collected in July 2019 during the flowering period, from the Blida region at Hammam Melouane (North-Algeria) (36°29' N, 2°50' E, Altitude: 200 m). The botanical identification of the species was performed at the Department of Botany, National Higher School of Agronomy, Algiers. The air-dried aerial parts of the plant were subjected to hydrodistillation using a Clevenger-type apparatus according to the European Pharmacopoeia 5.0. The extracted essential oil was dried over anhydrous sodium sulfate and stored in darkness at 4°C until analysis.

Gas Chromatography-Mass Spectrometry Identification:

The composition of thyme essential oil was identified by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) analysis on an HP6890 instrument coupled to a 5973A mass spectrometer, using two fused-silica-capillary columns with different stationary phases. The polar column was a Stabilwax™ consisting of Carbowax™-PEG (60 m × 0.2 mm i.d., 0.25 µm film thickness) and the non-polar one was an HP5MS™ (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness).

GC–MS spectra were acquired under the following conditions: carrier gas helium; flow rate 0.3 ml/min; mode split-less; injection volume 1 μ l; injection temperature 250 °C; oven temperature program 60 °C for 8 min, then increased at 2 °C/min to 250 °C and held at 250 °C for 15 min. The ionization mode used was an electronic impact at 70 eV.

Constituents' identification was based on a comparison of their GC Kováts retention index (RI) determined with respect to a homologous series of n-alkanes (C5–C28) and with those of corresponding reference standards available in the authors' laboratory. Identification was confirmed by comparing their mass spectral fragmentation patterns with those reported in the literature data and stored in MS database [National Institute of Standards and Technology (NIST) and Wiley libraries] (Adams, 2007).

Gas Chromatography-FID Quantification:

The percent composition of the identified compounds was electronically calculated from GC–FID peak areas. Gas chromatography analysis was carried out using a Hewlett-Packard 6890 GC–FID system, fitted with a fused-silica-capillary column with a non-polar stationary phase HP5MS™ (30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μ m film thickness). The column temperature program was 60 °C for 8 min, then increased at 2 °C/min to 250 °C and kept at 250 °C for 15 min. The injection was performed at 250 °C in the split-less mode with an injection volume of 1 μ l. The carrier gas was nitrogen at a flow of 0.3 ml/min with flame ionization detection at 320°C.

Animals and Experimental Procedure:

A total of 20 male rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), aged 3 to 4 months and weighing between 2.5 kg to 2.6 kg each, were used in this experiment. They were procured from the Technical Breeding Institute (ITELV, Baba-Ali) and kept for

experimentation in the CRD Saidal Algeria. The rabbits were acclimatized for 3 weeks prior to the experiment in standard cages at 25 ± 3 °C under a 12h/12h light/dark cycle and received a standard commercial pellet diet and water *ad libitum*. The experimental procedure followed the National Guidelines on the care and use of animals in laboratory research (National Research Council, 2010).

Animals were randomly divided into four groups (n=5): (1) control group; (2) VT-treated group received Voliam targo® alone (4 mg kg⁻¹ ABA body weight); (3) TEO-treated group, rabbits were treated with thyme essential oil alone (0.5 mg kg⁻¹ body weight); (4) VT + TEO-treated group, rabbits received 0.5 mg kg⁻¹ body weight of TEO plus the same dose of VT as in VT-treated group. The treatments were administered once daily orally by gavage for 21 consecutive days. Voliam targo® was dissolved in distilled water. The rabbits were weighed daily early in the morning before feeding throughout the acclimation (3 weeks) and experimental (3 weeks) periods. Feed and water intakes were recorded daily.

Blood Sampling:

At the end of the experimental period, the animals of all groups were sacrificed and blood samples were collected from the rabbit ear vein into dry clean tubes containing EDTA as an anticoagulant. Then, plasma was obtained by centrifugation at 3000 r/min for 20 min and kept at -20 °C for further biochemical analysis.

Biochemical Analysis:

Plasma levels of uric acid and creatinine were determined by standardized enzymatic procedures using commercial diagnostic kits (Biolabo, Maizy, France) on an auto-analyzer (Hitachi 912) instrument (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Histological Examination:

The effects of VT on the histopathology of the kidney and brain

were investigated. At the time of sacrifice, kidney and brain tissues were removed, trimmed from excess fat, fixed in a 10% neutral buffer formalin solution and then dehydrated with different ethanol solutions and embedded in paraffin. The paraffin blocks were cut into serial histological sections of 2 μ m thickness using Leica rotary microtome. The sections were stained with Hematoxylin-Eosin (H&E) and Masson's trichrome and then examined using an Olympus microscope (Zeiss, Axiostar plus, Oberkochen, Germany).

Statistical Analysis:

Data analyses were carried out by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests using Statistica version 10.0 (Stat Soft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA).

Results were expressed as means \pm SD. P-value < 0.05 was considered to

be statistically significant.

RESULTS

Analytical Study of *T. vulgaris*

Essential Oil:

The extraction of the essential oil (EO) from *T. vulgaris* by hydrodistillation allowed us to obtain an EO with a yield of 0.30% v/w. GC-MS analysis of the TEO identified 13 volatile compounds representing 99.73% of the total detected constituents. The chemical composition of TEO is given in Table 1. Carvacrol (86.25%) was identified as the major constituent. The amount of the other components varies between (0.03 - 1.70%) except for linalool with (3.00%), and alpha-Humelene with (3.90%). Thereby, based on the analysis results, our *Thymus vulgaris* EO can be considered as a carvacrol chemotype.

Table 1: Chemical composition of *T. vulgaris* essential oil.

Nº	Compound	Area %	Retention time (min)
Monoterpenes			
1	Alpha Terpinene	0,28	1.019
2	<i>para</i> -Cymene	0,67	1.028
3	<i>trans</i> -Ocimene	0,40	1.052
4	<i>gamma</i> -Terpinene	0,13	1.065
Oxygenated monoterpenes			
5	Linalool	3,00	1.123
6	Terpin-4-ol	0,05	1.179
7	Thymol	0,54	1.302
8	Carvacrol	86,25	1.318
Sesquiterpenes			
9	Aromadendrene	1,15	1.439
10	<i>alpha</i> -Humelene	3,90	1.454
11	<i>gamma</i> -Cadinene	1,70	1.513
12	<i>delta</i> -Cadinene	0,03	1.542
Other oxygenates			
13	Carvacrol methyl ether	1,63	1.282

Results of the Toxicological Study: Effects of Treatments on Body and Kidney weights, Food Intake and Water Consumption:

No mortality occurred during the experimental period, some clinical signs of toxicity were observed in animals treated with VT, namely decreased activity and tremors. The mean body weight, absolute and relative

kidney weights, the average feed and water consumption are summarized in Table 2.

There was a homogeneous weight gain in the control rabbits, those treated with TEO and those treated with VT + TEO during the experimental period (21 days). However, a significant decrease ($p < 0.05$) in the average body weight of rabbits treated with VT

compared with all other groups was observed. Also, there was a significant reduction in food consumption and water intake in the VT group during the experimental period compared to the other three groups. In contrast, the sub-acute exposure to VT resulted in a

significant increase in absolute and relative kidney weights in VT-treated rabbits compared to control rabbits. While co-administration of thyme essential oil to VT-intoxicated rabbits caused a significant improvement of the altered weights.

Table 2: Effects of treatments on body weight, absolute and relative kidney weights, average Feed and Water consumption in rabbits at the acclimation (21 days) and experimental (21 days) periods.

	Period		Control	TEO	VT	VT + TEO
Body weight (kg)	Acclimation	Week 1	2.49 ± 0.02	2.50 ± 0.03	2.60 ± 0.04	2.57 ± 0.03
		Week 2	2.53 ± 0.03	2.67 ± 0.03	2.66 ± 0.05	2.62 ± 0.05
		Week 3	2.71 ± 0.03	2.84 ± 0.07	2.81 ± 0.06	2.76 ± 0.09
	Expérimentation	Week 1	2.88 ± 0.02	2.93 ± 0.03	2.84 ± 0.07	2.91 ± 0.09
		Week 2	2.93 ± 0.03	3.05 ± 0.04	2.82 ± 0.08^{b*,c*}	3.08 ± 0.06
		Week 3	3.12 ± 0.01	3.11 ± 0.03	2.85 ± 0.11^{a*,b*,c*}	3.12 ± 0.08
Average feed intake (g / rabbit)	Acclimation	Week 1	91.91 ± 5.62	120.11 ± 12.46^a	84.88 ± 9.72^{b*}	107.94 ± 9.37
		Week 2	130.51 ± 1.11	171.34 ± 6.50^{a**}	156.56 ± 10.55^a	145.43 ± 6.51^b
		Week 3	159.56 ± 5.28	183.33 ± 6.88	177.90 ± 9.17	176.46 ± 6.23
	Expérimentation	Week 1	138.60 ± 4.69	141.70 ± 4.17	127.75 ± 6.71	135.05 ± 4.66
		Week 2	163.00 ± 5.93	155.10 ± 3.04	113.73 ± 6.97^{a**,b}	136.63 ± 4.76^{a*}
		Week 3	188.80 ± 5.02	163.00 ± 2.10	86.55 ± 9.21^{a**,b**,c**}	143.75 ± 3.19^{a**}
Average water consumption (ml / rabbit)	Acclimation	Week 1	32.06 ± 0.55	73.28 ± 5.45^{a*}	47.74 ± 3.74	36.68 ± 1.25^{b*}
		Week 2	75.18 ± 14.13	101.77 ± 6.05	102.77 ± 7.58	97.17 ± 7.69
		Week 3	129.50 ± 4.09	141.20 ± 5.80	118.56 ± 5.98	128.33 ± 9.55
	Expérimentation	Week 1	138.05 ± 7.57	148.30 ± 19.72	147.75 ± 17.85	135.10 ± 14.70
		Week 2	133.10 ± 04.28	141.83 ± 12.24	117.77 ± 8.80	143.67 ± 13.59
		Week 3	135.60 ± 2.75	139.55 ± 12.37	107.46 ± 8.00^{a,b,c}	127.50 ± 15.64
Kidney weight (g)	Right Kidney	Absolute	7.01 ± 0.18	7.15 ± 0.52	7.78 ± 0.18^a	6.95 ± 0.18
		Relative	0.23 ± 0.005	0.24 ± 0.004	0.25 ± 0.002^a	0.24 ± 0.007
	Left Kidney	Absolute	6.65 ± 0.34	7.41 ± 0.40	7.86 ± 0.18^a	7.06 ± 0.08
		Relative	0.22 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.26 ± 0.002^{a*}	0.23 ± 0.01

Results are given as a mean ± SD for five rabbits in each group. **a** indicates significantly different from control group ($p < 0.05$), **a*** indicates highly significantly different from control group ($p < 0.01$), **a**** indicates very highly significantly different from control group ($p < 0.001$). **b** indicates significantly different from TEO group ($p < 0.05$), **b*** indicates highly significantly different from TEO group ($p < 0.01$), **b**** indicates very highly significantly different from TEO group ($p < 0.001$). **c** indicates significantly different from (VT + TEO) group ($p < 0.05$), **c*** indicates highly significantly different from (VT + TEO) group ($p < 0.01$), **c**** indicates very highly significantly different from (VT + TEO) group ($p < 0.001$).

Biochemical Parameters:

The effect of VT treatment on kidney function indicators in rabbits is displayed in Table 3. The administration of Voliam targo[®] caused kidney dysfunction in the treated rabbits as evidenced by the significant increase

($p < 0.05$) in plasmatic uric acid and creatinine levels relative to the control. Whereas, co-administration of thyme essential oil with VT restored the elevated levels of kidney function biomarkers towards the normal range.

Table 3: Effects of treatments on kidney function biomarkers in experimental rabbits.

Parameters/Groups	Control	TEO	VT	VT + TEO
Uric acid (mg/dl)	1.57 ± 0.37 ^a	1.70 ± 0.20 ^a	2.70 ± 0.62^b	1.86 ± 0.48 ^a
Creatinine (mg/dl)	1.15 ± 0.07 ^a	1.28 ± 0.13 ^a	3.58 ± 0.82^b	1.36 ± 0.17 ^a

Results are given as a mean ± SD for five rabbits in each group. VT: Voliam targo ; TEO: Thyme essential oil; VT + TEO: Voliam targo + Thyme essential oil. Means within the same row with different superscripts are significant at $p < 0.05$

Histological Results:

Histological examination of kidney and brain tissues of male rabbits is illustrated in Figures 1-6.

The histological analysis of kidney sections of the control and TEO-treated rabbits revealed normal morphological structures of the glomeruli as well as proximal and distal

convoluted tubules (Figure 1 A-H). However, the treatment with Voliam targo® caused histopathological changes in renal tissues when compared to control, namely dilatation and congestion of blood vessels, dilatation of proximal and distal tubules and lymphocytes infiltration within the renal cortical interstitium. Intertubular and glomerular congestion were also observed. While co-administration of *Thymus vulgaris* essential oil revealed significant improvement in morphological alterations of the kidney of (VT + TEO)-treated animals (Figure 2 A-I).

Light microscopic observation of sections of the cerebral cortex from the control group and TEO group were similar and revealed the well-known normal histological structure of the cerebral cortex, and most neurons appear intact (Figure 3 A-B, Figure 4 A-B). Sections of the cerebral cortex of rabbits treated with VT exhibited structural alterations in the form of pericellular edema and vacuolation. Dilatation and congestion of some blood vessels were also noticed (Figure 5 A-C). Cerebral cortex sections of (VT + TEO) treated-rabbits showed less histopathological changes (Figure 6A).

Sections of the hippocampus of control rabbits and those treated with TEO showed normal architecture of the hippocampal tissue with normal small pyramidal cells, arranged nerve fibers and small glial cells forming the

molecular layer (Figure 3 C, Figure 4 C). Histological sections of the hippocampus after administration of VT revealed marked structural changes. The hippocampal tissue was the site of significant edema and disorganization of the architecture of nerve cells; the latter appear retracted and present clear pericellular halots and picnotic nuclei (Figure 5 D-E). Thyme essential oil co-administration with VT treatment showed a prominent decrease in histomorphological damage of hippocampus tissue; CA1 region appeared nearly similar to that of the control group (Figure 6 B-C).

Histological examination of cerebellum sections of control rabbits and those treated with TEO showed normal histoarchitecture of the cerebellar cortex with three normal layers; a molecular layer, Purkinje cell layer, and a granular layer with a homogeneous cell distribution (Figure 3 D-E, Figure 4D). Whereas, microscopic examination of the cerebellar sections of rabbits treated with VT showed marked histopathological changes, namely neuronal degenerative changes and extensive neuropil vacuolation. Purkinje cells layer showed atrophy and degeneration of Purkinje cells (Figure 5 F-H). The co-administration of *Thymus vulgaris* essential oil to the VT-treated rabbits showed improvement in morphological alterations of the cerebellum with the presence of few neuropil vacuolations (Figure 6 D-E).

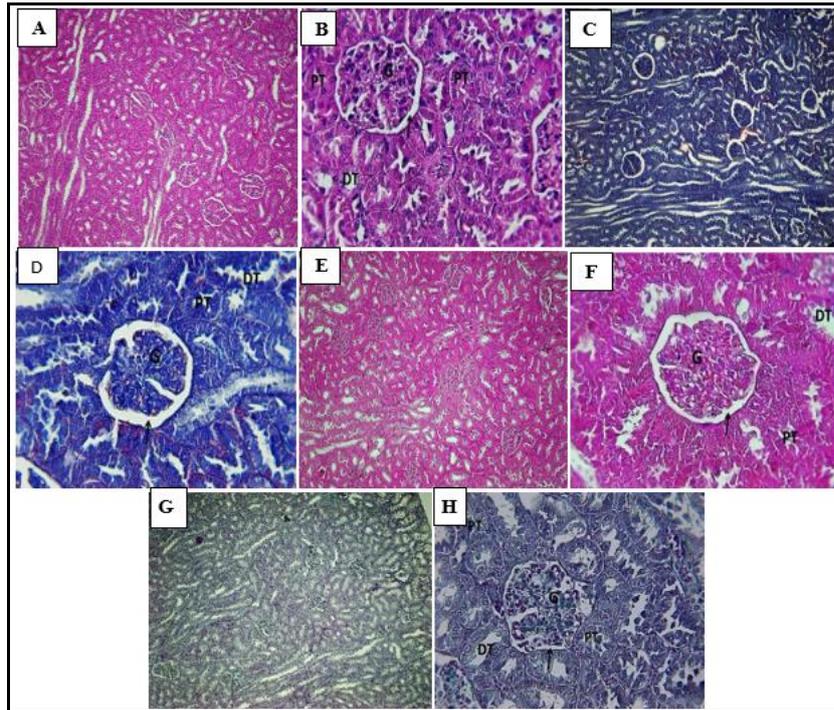


Fig. 1: Photomicrographs of rabbit kidney sections of control and TEO groups. A, B, C and D: Control group; E, F, G and H: TEO group. Kidney sections from control and TEO-treated rabbits showed normal morphology of renal tissue, proximal and distal tubules and glomerular capsule are intact and no tissue damages were observed. G: Glomerulus. PT: Proximal convoluted tubule. DT: Distal convoluted tubule. Black arrow: Bowman's space. H&E staining and Masson's Trichrome staining: $\times 100$; $\times 400$.

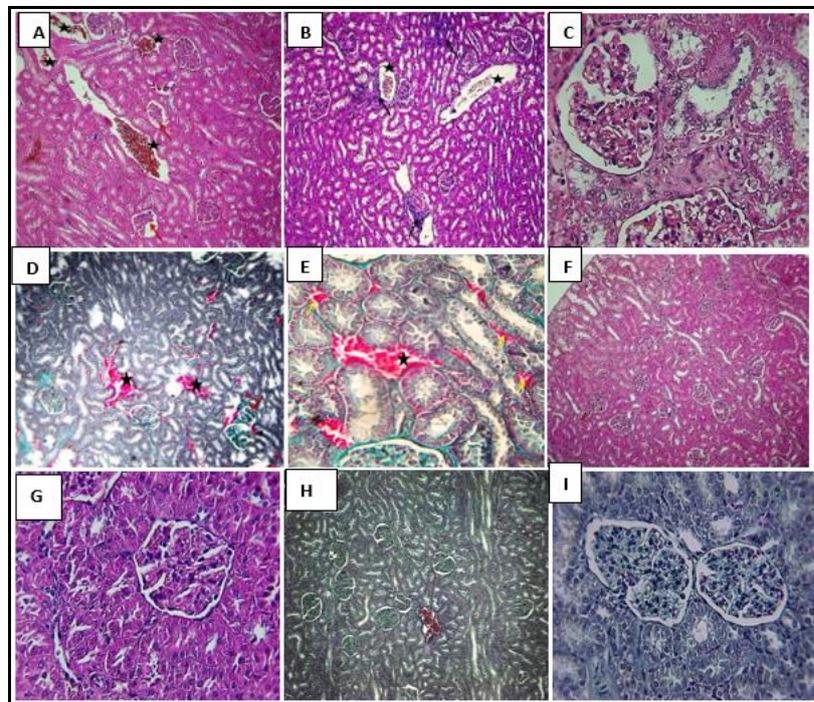


Fig. 2: Photomicrographs of kidney sections of VT-treated group and VT+ TEO group. A, B, C, D and E: VT group; F, G, H and I: (VT+ TEO) group. VT group sections showed dilatation and congestion of blood vessels (asterisk), leucocytes infiltration (black arrow), dilatation of proximal and distal tubules, shrinkage and fragmentation of some glomeruli (red arrow), and intertubular and glomerular congestion (yellow arrow). Kidney sections from (VT+ TEO) group showed protective changes in most renal tubules and glomeruli structures. H&E staining and Masson's Trichrome staining: $\times 100$; $\times 400$.

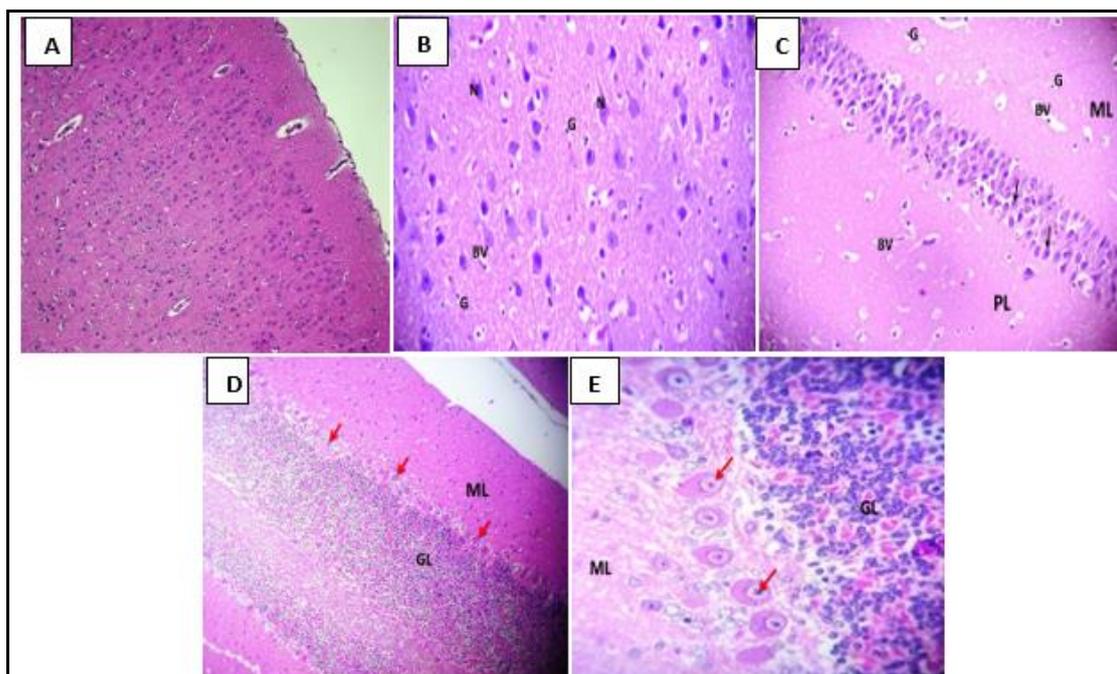


Fig. 3: Photomicrographs of brain sections of control rabbits stained with H&E. Sections of cerebral cortex (A and B), Hippocampus (C) and cerebellum (D and E) from Control rabbits showing normal histological structure. N: neurons; G: glial cells; BV: blood vessel. ML: molecular layer; PL: polymorphic layer; Black arrows: pyramidal cells; GL: granular layer; Red arrows: Purkinje cells. x 100 , x400.

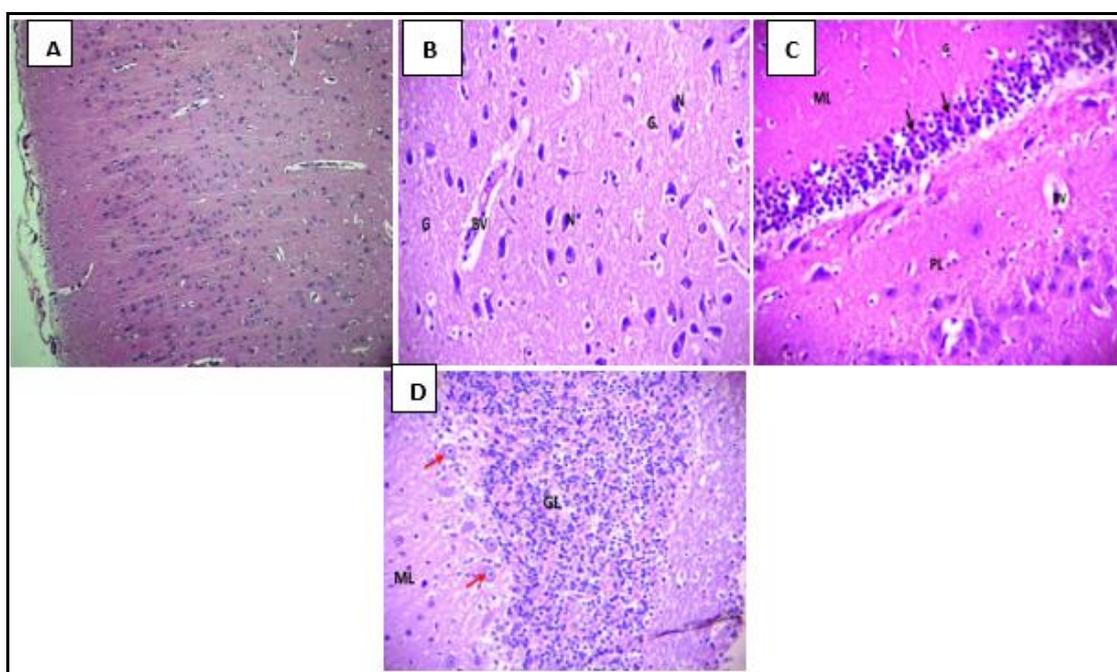


Fig. 4: Photomicrographs of brain sections of rabbit treated with TEO alone, stained with H&E. TEO group showing nearly normal histological architecture of the cerebral cortex (A and B), the hippocampus (C) and the cerebellum (D). N: neurons; G: glial cells; BV: blood vessel. ML: molecular layer; PL: polymorphic layer; Black arrows: pyramidal cells; GL: granular layer; Red arrows: Purkinje cells. x 100 and x 400.

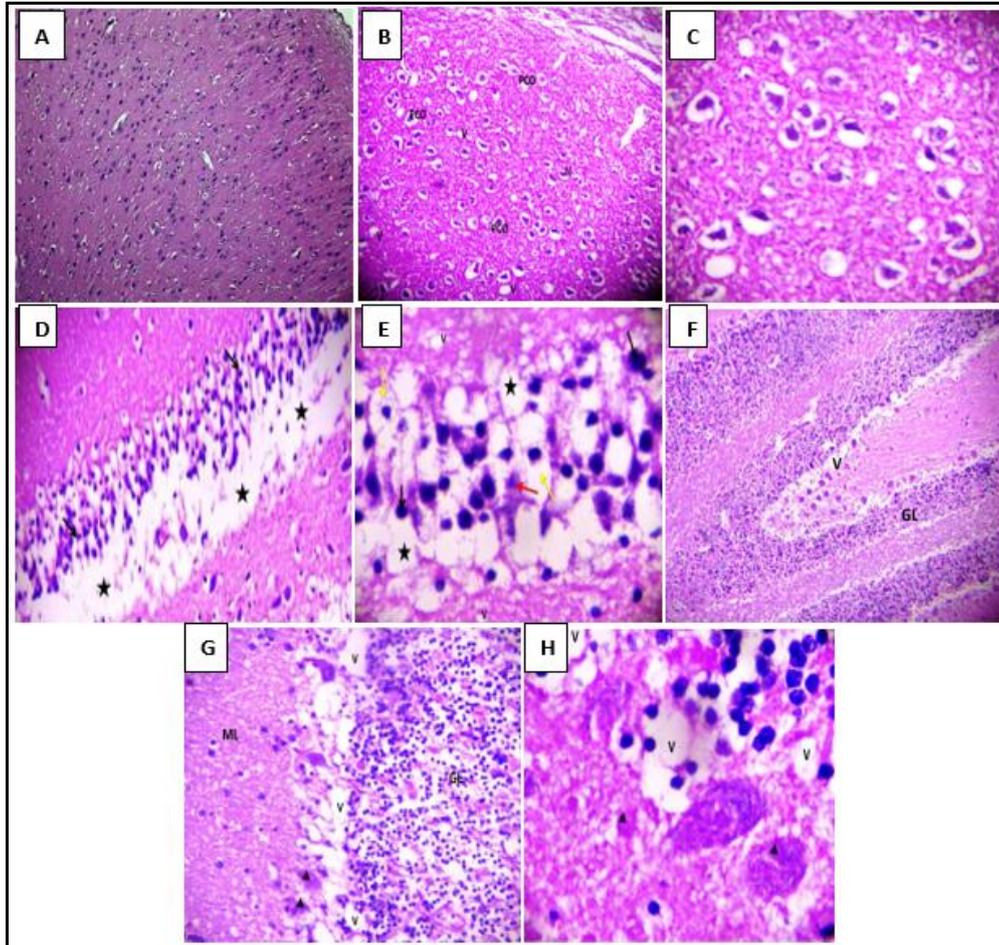


Fig. 5: Photomicrographs of brain sections of VT-treated rabbits stained with H&E. VT-treated group showing neuronal degenerative changes; pericellular oedema (PCO) and neuropil vacuolation (V) in the cerebral cortex (A, B and C). The hippocampal tissue was the site of significant oedema (asterisk) and disorganization of the architecture of nerve cells; shrunken pyramidal cells (red arrow), clear pericellular halots (yellow arrows) and picnotic nuclei (Black arrows) were observed (D and E). Purkinje cell layer showed atrophy and degeneration of Purkinje cells (arrowheads) and vacuolation (V) (F, G and H). x 100, x 400

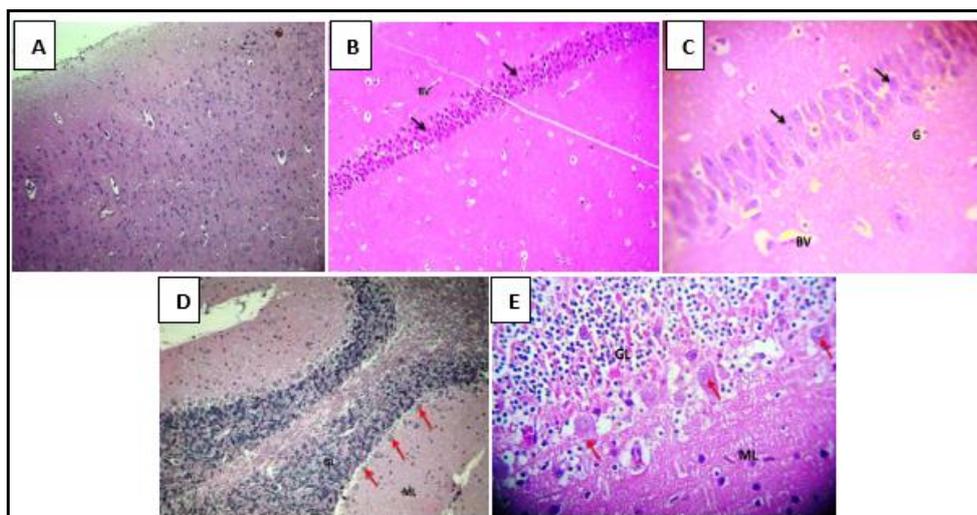


Fig. 6: Photomicrographs of brain sections of rabbit treated with (VT+TEO) stained with H&E. (VT+TEO)-treated rabbits showing a more preserved architecture of the cerebral cortex (A), the hippocampus (B and C) and the cerebellum (D and E). G: glial cells; BV: blood vessel; Black arrows: pyramidal cells; GL: granular layer; ML: molecular layer; Red arrows: Purkinje cells. x 100 , x 400.

DISCUSSION

In recent years, pesticides have been an essential part of our environment due to their increased use in agriculture and in public health programs. Nevertheless, widespread exposure to pesticides can cause serious toxicological hazards to humans and threaten ecosystems. Indeed, numerous studies have shown the role of pesticides in the occurrence of various diseases (Pereira *et al.*, 2015). Therefore, it's important to search for new strategies to reduce or even prevent the impact of these xenobiotics.

In our study, the focus of attention was on Voliam Targo® which is a broad-spectrum insecticide and acaricide. Our work aimed to evaluate the toxic effects of Voliam Targo® on kidney function markers, renal and brain tissues, and to investigate the protective effect of a co-administration of the *Thymus vulgaris* essential oil in male rabbits.

Thyme essential oil was obtained in 0.30% v/w yield. This result is agreed with those of Atti-Santos *et al.*, (2004) (0.25%); Abbassy and Marei, (2013) (0.30%) and Alsaraf *et al.*, (2020) (0.44%). On the other hand, this yield is lower than that obtained in a study previously done in Algeria (1.58%) (Bouguerra *et al.*, 2017) and that in Morocco (1%) (Imelouane *et al.*, 2009). This difference may be due to various factors including climate and geographical conditions, period of collection and cultivation practices (Hudaib and Aburjai, 2007).

GC-MS analysis of *Thymus vulgaris* essential oil revealed the presence of 13 volatile compounds. The phenolic component carvacrol (86.25%) was found to be the major constituent, which suggests that the studied EO belongs to the carvacrol chemotype. The predominance of carvacrol also was reported by Alsaraf *et al.*, (2013) and El-Nekeety *et al.*, (2011). On the other hand, other studies reported different major compounds and diverse chemical compositions for the same species in

different geographical regions (Atti-Santos *et al.*, 2004; Benabed *et al.*, 2017; Bouguerra *et al.*, 2017; Wesolowska and Jadczyk, 2019; Alsaraf *et al.*, 2020). Antioxidants play an important role in maintaining an optimum person's health and well-being. There is a crucial defense against the harmful free radicals that cause several age-related diseases. It is considered that oxygenated monoterpenes and/or sesquiterpenes are the components responsible for the antioxidant potential of essential oils. Additionally, it has been found that the phenolic chemotype possesses a potent free-radicals-scavenging activity (Schelz *et al.*, 2006).

Analyses of body and organ weights are important criteria for toxicity evaluation in toxicological studies. In the present study, the mean body weight of rabbits treated with VT was significantly ($p < 0.05$) lower than that in the other three groups after 21 days of treatment. Besides, it has been found that the average feed intake and the average water consumption of VT-treated animals were significantly decreased during the experimental period compared to other groups. Therefore, the decrease in body weight of rabbits treated with VT seems to be due to the less food intake as a result of anorexia or food avoidance and decreased water consumption due to treatment-related toxicity (Mansour and Mossa, 2010). Our findings are in agreement with our previous studies in rats, showing that exposure to avermectin insecticide (abamectin or Emamectin benzoate), significantly reduced body weight gain (Khalidoun-Oularbi *et al.*, 2015; Khalidoun-Oularbi *et al.*, 2017). Results revealed that VT caused a significant increase in the kidney relative weight as compared to control. The increase in the relative weight of kidneys in rabbits exposed to VT may be attributed to pesticide toxic potential or to the bodyweight reduction of experimental animals.

Supplementation of thyme essential oil to VT-treated male rabbits restored the body weight gain and the relative and absolute weights of the kidney to normal weights.

The current study demonstrated that VT significantly increased the plasma levels of uric acid and creatinine. This rise of kidney biomarkers may be attributed to the decline in the renal glomerular filtration and demonstrated impaired kidney function. These results were confirmed by the renal morphological analysis which showed marked histopathological alterations in kidney tissue caused by VT including dilation of proximal and distal tubules, congestion of blood vessels and lymphocytes infiltration within the renal cortical interstitium. These findings concur with earlier studies that have documented similar results in male albino rats exposed to avermectin insecticides (Eissa and Zidan, 2010; Khaldoun-Oularbi *et al.*, 2015; Magdy *et al.*, 2016; Nasr *et al.*, 2016).

Our results indicated that subacute exposure to VT resulted in neurotoxic effects on the cerebral cortex, the hippocampus and the cerebellum of treated rabbits. Oxidative stress is considered a primary mechanism for neuronal cell damage involved in pesticide-induced neurotoxicity (Qiao *et al.*, 2005). Insecticides act as pro-oxidants and trigger oxidative damage in brain tissue (Limón-Pacheco and Gonsebatt, 2009). Avermectins are among the most widely used compounds for insect control today. Due to their physicochemical properties of lipophilicity and water insolubility, avermectins can cross the blood-brain barrier and elicit harmful effects to brain tissue (Tišler and Eržen, 2006). In addition, brain tissue is especially vulnerable to oxidative damage due to its high content of polyunsaturated fatty acids and its high oxygen consumption (Dringen, 2000; Lukaszewicz-Hussain, 2010).

The leaves and flowers of aromatic plants are rich sources of bioactive compounds, mainly phenols. Phenolic compounds are thought to have potential health beneficial effects via their antioxidant and free radicals scavenging capacities thereby protecting cell components against oxidative damage. Nevertheless, they are likely to possess different antioxidant activities because of their various chemical structures (Ferguson, 2001; Dapkevicius *et al.*, 2002). Our study revealed that *Thymus vulgaris* essential oil is rich in phenolic constituent carvacrol. In addition, combined treatment of Voliam targo[®] and *Thymus vulgaris* EO in the current study evidenced a significant improvement in body weight, food intake, water consumption, kidney function biomarkers and histological alterations of the kidney and the brain. Thus, *Thymus vulgaris* essential oil may have a protective effect against VT-mediated kidney injury and neurotoxicity probably via its antioxidant and free radical scavenging capacities. The antioxidant activity of thyme oil has been documented by previous works applying different methods. The antioxidant properties of thyme extracts are mainly due to the presence of phenolic constituents, particularly thymol and carvacrol (Lee and Shibamoto, 2002; Miura *et al.*, 2002). Besides, Ünde_ger *et al.*, (2009) have proved that carvacrol revealed a potent antioxidant activity compared to that of the standard antioxidant Trolox[®] in the cell-free assay.

It should be noted that rabbits treated with 0.5 mg/kg per day of *Thymus vulgaris* essential oil alone did not reveal any significant changes in body weight, relative kidney weight, biochemical parameters, or histological structure of the kidney and the brain as compared to control. Furthermore, Domaracky *et al.*, (2007) reported that thyme essential oil did not affect mouse embryo development when was added to a commercial diet at a concentration

of 0.25% which suggested the safety of this oil. Recently, a repeated dose 28-day oral toxicity study of *Thymus vulgaris* essential oil showed no significant changes in the kidney relative weights and the levels of creatinine and urea in the treated groups with doses of 100, 250 and 500 mg/kg/day in rats. While thyme essential oil decreased significantly rat body weights but only with the 500 mg/kg dose. Furthermore, histopathological examination of the kidney and the brain from rats sacrificed after the 28-day treatment period revealed no alteration for all three dose levels. It has been suggested that the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) of *Thymus vulgaris* essential oil is greater than 250 mg/kg/day in rats (Rojas-Armas *et al.*, 2019). Although there are few studies on the toxic effects of thyme active components, our results reinforce the view that the use of thyme does not cause negative influences.

CONCLUSION

In conclusion, the present data demonstrate the adverse effects of Voliam targo® on the kidney and brain. Interestingly, the co-administration of carvacrol-rich *T. vulgaris* essential oil improves these harmful effects and may have healing and protective properties. However, further studies are required to elucidate the molecular mechanism by which TEO may exert its protective action.

Acknowledgement: The authors are grateful to the staff of the Laboratory of Anatomy-Pathology of Nafissa Hammoud University Hospital Center (Algiers, Algeria) for providing technical assistance in histopathological analysis.

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

Ethical approval: This study was approved by the Scientific Council of Biotechnology Laboratory of Animal Reproduction, Institute of Veterinary

Sciences, University of Saad Dahlab Blida 1 (Algeria).

REFERENCES

- Abbassy, M. A. and Marei, G. I. (2013). Antifungal and chemical composition of essential oils of *Juniperus communis* L. and *Thymus vulgaris* L. against two phytopathogenic fungi. *Journal of Applied Science Research*, 9(8) 4584-4588.
- Abd-Elhady, H. K. and Abou-Elghar, G. E. (2013). Abamectin induced biochemical and histopathological changes in the albino rat, *Rattus norvegicus*. *Journal of Plant Protection Research*, 53(3): 263–14.
- Adams, R. P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy, fourth ed. Carol Stream, IL: Allured publishing corporation.
- Albérich, M.; Ménez, C.; Sutra, J. F. and Lespine, A. (2014). Ivermectin exposure leads to up-regulation of detoxification genes in vitro and in vivo in mice. *Eur Journal of Pharmacology*, 740: 428-435.
- Alsaraf, S.; Hadi, Z.; Al-Lawati, W. M.; Al Lawati, A. A. and Khan, S. A. (2020). Chemical composition, in vitro antibacterial and antioxidant potential of Omani Thyme essential oil along with in silico studies of its major constituent. *Journal of King Saud University-Science*, 32(1): 1021-1028.
- Atti-Santos, A.; Pansera, M.; Paroul, N.; Atti-Serafini, L. and Moyna, P. (2004). Seasonal variation of essential oil yield and composition of *Thymus vulgaris* L.(Lamiaceae) from South Brazil. *Journal of Essential Oil Research*, 16(4): 294-295.
- Bagchi, D.; Bagchi, M.; Hassoun, E. and Stohs, S. J. (1995). In vitro and in vivo generation of

- reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology*, 104(1-3): 129-140.
- Ballent, M.; Lifschitz, A.; Virkel, G.; Sallovitz, J. and Lanusse, C. (2006). Modulation of the P-glycoprotein-mediated intestinal secretion of ivermectin: in vitro and in vivo assessments. *Drug metabolism and Disposition*, 34(3): 457-463.
- Benabed, H. K.; Gourine, N.; Ouinten, M.; Bombarda, I. and Yousfi, M. (2017). Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Essential Oils of Three Algerian *Lamiaceae* Species. *Current Nutrition & Food Science*, 13(2): 97-109.
- Bouguerra, N.; Tine-Djebbar, F. and Soltani, N. (2017). Algerian *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and larvicidal activity against the mosquito *Culex pipiens*. *International Journal of Mosquito Research*, 4(1): 37-42.
- Carvalho, F. P. (2017). Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security*, 6(2): 48-60.
- Dapkevicius, A.; van Beek, T. A.; Lelyveld, G. P.; van Veldhuizen, A.; de Groot, A.; Linssen, J. P. and Venskutonis, R. (2002). Isolation and Structure Elucidation of Radical Scavengers from *Thymus vulgaris* Leaves. *Journal of Natural Products*, 65(6): 892-896.
- Díaz-Fleischer, F.; Pérez-Staples, D.; Valle-Mora, J. and Antonio García-Pérez, J. (2016). Laboratory evaluation of two commercial abamectin-based insecticides against *Anastrepha Ludens* (Diptera: Tephritidae): lethal and sublethal effects. *Journal of economic entomology*, 109(6): 2472-2478.
- Domaracký, M.; Rehak, P.; Juhás, Š. and Koppel, J. (2007). Effects of selected plant essential oils on the growth and development of mouse preimplantation embryos in vivo. *Physiological research*, 56(1).
- Dorman, H. and Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2): 308-316.
- Dringen, R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in neurobiology*. 62(6): 649-671.
- Eissa, F. and Zidan N. (2010). Haematological, biochemical and histopathological alterations induced by abamectin and *Bacillus thuringiensis* in male albino rats. *Acta Biologica Hungarica*, 61(1): 33-44.
- El-Nekeety, A. A.; Mohamed, S. R.; Hathout, A. S.; Hassan, N. S.; Aly, S. E. and Abdel-Wahhab, M. A. (2011). Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induced oxidative stress in male rats. *Toxicol*, 57(7-8): 984-991.
- El-Shafey, A. A. M.; Seliem, M. M. E.; El-Mahrouky, F.; Gabr, W. M. and Kandil, R. A. (2011). Some physiological and biochemical effects of oshar extract and abamectin biocide on male albino rats. *Journal of American Science*, 7(12): 254-261.
- Fent, G. M. (2014). Avermectin. In: "Encyclopedia of Toxicology". Third Edition. Academic Press, Oxford, pp. 342-344.
- Ferguson, L. R. (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 475(1-2): 89-111.

- Han, W.; Zhang, S.; Shen, F.; Liu, M.; Ren, C. and Gao, X. (2012). Residual toxicity and sublethal effects of chlorantraniliprole on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Pest management science*, 68(8): 1184-1190.
- He, F.; Sun, S.; Tan, H.; Sun, X.; Qin, C.; Ji, S. and Jiang, X. (2019). Chlorantraniliprole against the black cutworm *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae): From biochemical/physiological to demographic responses. *Scientific reports*, 9(1): 1-17.
- Hudaib, M. and Aburjai, T. (2007). Volatile components of *Thymus vulgaris* L. from wild-growing and cultivated plants in Jordan. *Flavour and fragrance journal*, 22(4): 322-327.
- Imelouane, B.; Amhamdi, H.; Wathelet, J. P.; Ankit, M.; Khedid, K. and El Bachiri, A. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. *International Journal of Agricultural Biology*, 11(2): 205-208.
- Jenčič, V.; Černe, M.; Eržen, N. K.; Kobal, S. and Cerkvencik-Fais V. (2006). Abamectin effects on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicology*, 15(3): 249-257.
- Khaldoun-Oularbi, H.; Allorge, D.; Richeval, C.; Lhermitte, M. and Djenas, N. (2015). Emamectin benzoate (Proclaim®) mediates biochemical changes and histopathological damage in the kidney of male Wistar rats (*Rattus norvegicus*). *Toxicologie Analytique et Clinique*, 27(2): 72-80.
- Khaldoun-Oularbi, H.; Zerrouki, N.; Richeval, C.; Aissani, H.; Elemdani, M. R. and Djenas, N. (2017). Vertimec® mediates plasma biochemical changes and histopathological damage in the kidney of rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of International Scientific Publications: Agriculture & Food*, 5: 622-630.
- Kolar, L.; Eržen, N. K.; Hogerwerf, L. and van Gestel, C. A. (2008). Toxicity of abamectin and doramectin to soil invertebrates. *Environmental Pollution*, 151(1): 182-189.
- Lai, T. and Su, J. (2011). Effects of chlorantraniliprole on development and reproduction of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner). *Journal of Pest Science*, 84(3): 381.
- Lankas, G. and Gordon, L. (1989). Ivermectin and abamectin. *Toxicology*, 13 10-142.
- Lee, K. G. and Shibamoto, T. (2002). Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(17): 4947-4952.
- Liang, Y.; Dong, B.; Pang, N. and Hu, J. (2020). Abamectin induces cytotoxicity via the ROS, JNK, and ATM/ATR pathways. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-9.
- Limón-Pacheco, J. and Gonsebatt, M. E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 674(1-2): 137-147.
- Lukaszewicz-Hussain, A. (2010). Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity—Short review. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 98(2): 145-150.
- Magdy, B. W.; Mohamed, F. E. S.; Amin, A. S. and Rana, S. S. (2016). Ameliorative effect of antioxidants (vitamins C and E) against abamectin toxicity in liver, kidney and testis of male

- albino rats. *The Journal of Basic & Applied Zoology*. 77: 69-82.
- Maliakel, D. M.; Kagiya, T. V. and Nair, C. K. K. (2008). Prevention of cisplatin-induced nephrotoxicity by glucosides of ascorbic acid and α -tocopherol. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 60(6):521-527.
- Mansour, S. A. and Mossa, A. T. H. (2010). Oxidative damage, biochemical and histopathological alterations in rats exposed to chlorpyrifos and the antioxidant role of zinc. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 96(1):14-23.
- Miura, K.; Kikuzaki, H. and Nakatani, N. (2002). Antioxidant activity of chemical components from sage (*Salvia officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) measured by the oil stability index method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(7):1845-1851.
- Nasr, H. M.; El-Demerdash, F. M. and El-Nagar, W.A. (2016). Neuro and renal toxicity induced by chlorpyrifos and abamectin in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(2):1852-1859.
- National Research Council. (2010). Guide for the care and use of laboratory animals. The National Academies Press, Washington, D.C., pp 208.
- Nawaz, M.; Cai, W.; Jing, Z.; Zhou, X.; Mabubu, J. I. and Hua, H. (2017). Toxicity and sublethal effects of chlorantraniliprole on the development and fecundity of a non-specific predator, the multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis* (Pallas). *Chemosphere*, 178: 496-503.
- Nicolopoulou-Stamati, P.; Maipas, S.; Kotampasi, C.; Stamatis, P. and Hens, L. (2016). Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. *Frontiers in public health*. 4:148.
- Pereira, L. C.; de Souza, A. O.; Bernardes, M. F. F.; Pazin, M.; Tasso, M. J.; Pereira, P. H. and Dorta, D. J. (2015). A perspective on the potential risks of emerging contaminants to human and environmental health. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(18):13800-13823.
- Qiao, D.; Seidler, F. J. and Slotkin, T. A. (2005). Oxidative mechanisms contributing to the developmental neurotoxicity of nicotine and chlorpyrifos. *Toxicology and applied pharmacology*. 206(1):17-26.
- Rasooli, I.; Rezaei, M. B. and Allameh, A. (2006). Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *International journal of infectious diseases*, 10(3): 236-241.
- Rojas-Armas, J.; Arroyo-Acevedo, J.; Ortiz-Sánchez, M.; Palomino-Pacheco, M.; Castro-Luna, A.; Ramos-Cevallos, N. and Herrera-Calderon, O. (2019). Acute and repeated 28-day oral dose toxicity studies of *Thymus vulgaris* L. essential oil in rats. *Toxicological research*, 35(3):225-232.
- Roulet, A.; Puel, O.; Gesta, S.; Lepage, J. F.; Drag, M.; Soll, M. and Pineau, T. (2003). MDR1-deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin. *European journal of pharmacology*, 460(2-3):85-91.
- Schelz, Z.; Molnar, J. and Hohmann, J. (2006). Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia*, 77(4):279-285.
- Tišler, T. and Eržen, N. K. 2006. Abamectin in the aquatic

- environment. *Ecotoxicology*, 15(6): 495-502.
- Ündeğer, Ü.; Başaran, A.; Degen, G. H. and Basaran, N. (2009). Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol. *Food and chemical toxicology*, 47(8):2037-2043.
- Verma, R. S.; Mehta, A. and Srivastava, N. (2007). In vivo chlorpyrifos induced oxidative stress: attenuation by antioxidant vitamins. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88(2):191-196.
- Wesolowska, A. and Jadczyk, D. (2019). Comparison of the Chemical Composition of Essential Oils Isolated from Two Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Cultivars. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(3):829-835.
- Yu, F.; Wang, Z.; Ju, B.; Wang, J. and Bai, D. (2008). Apoptotic effect of organophosphorus insecticide chlorpyrifos on mouse retina in vivo via oxidative stress and protection of combination of vitamins C and E. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 59(6):415-423.

THE POSSIBLE ALLEVIATING EFFECT OF *THYMUS VULGARIS* ESSENTIAL OIL AGAINST VOLIAM TARGO® INDUCED CARDIOTOXICITY IN RABBITS OF A LOCAL POPULATION (*ORYCTOLAGUS CUNICULUS*)

Bokreta S.^{1,2*}, **Khaldoun H.**^{1,2}, **Makhlouf C.**¹, **Daoudi-Zerrouki N.**²

¹Departement of Biology, Faculty of Nature and Life Science, University Blida 1, BP 270- Soumaa- Blida- Algeria

²Natural Resources Laboratory, University Mouloud Mammeri, BP 15017. Tizi-Ouzou. Algeria

*Correspondance Bokreta Soumya: e-mail: bokretasoumya@gmail.com

ABSTRACT

The aim of the present study is to evaluate the potential cardiotoxicity of Voliam Targo® (VT) and to investigate the protective effect of a co-administration of the *Thymus vulgaris* essential oil against heart histopathological alterations in male rabbits. Twenty adult rabbits were divided into four equal groups and treated for 21 consecutive days: control, voliam targo® (VT), thyme essential oil (TEO) and voliam targo® plus thyme essential oil (VT+TEO) groups. Subacute exposure to VT caused a significant decrease in mean body weight compared to control. Absolute and relative heart weights were significantly altered in VT group. The LDL-C/HDL-C ratio was found significantly reduced in VT-treated group compared to the other groups. The treatment with voliam targo® caused histopathological alterations in the myocardium such as congested blood capillaries, inflammatory cell infiltration, increased masses of collagen fibers around the congested blood vessels. While the co-administration of *Thymus vulgaris* essential oil showed significant improvement in morphological changes of the heart. In conclusion, exposure to VT induces toxic effect on heart tissue and the essential oil of *T. vulgaris* alleviates this deleterious effect and may have healing and protective effects.

Key words: Voliam Targo 063SCe, *Thymus vulgaris*, Essential Oil, Cardiotoxicity, Rabbit.

INTRODUCTION

Pesticides extensive use is currently one of the major and global health problem (Alarcan *et al.*, 2020). Scientifically, exposure to pesticides has been correlated with the appearance of several human pathologies including cardiovascular diseases (Georgiadis *et al.*, 2018). "Voliam Targo 063SCe" (VT) is a new commercial formulation of abamectin-based insecticide. This biocide contains two active ingredients, abametin and chlorantraniliprole belonging to two different families, the bisamide and the avermectin. It is effective on several key pests of fruits and vegetables. So far, many studies have revealed that pesticides have adverse effects in heart tissue (Thomaz *et al.*, 2009; Baş and Kalender, 2011, Ahmed *et al.*, 2016). However, to date, information on histopathological changes induced by exposure to abamectin-based insecticides in the heart is rare. Nowadays, a growing interest has been noted on the significance of natural resources that can be consumed in an individual's everyday diet. Among these, *Thymus vulgaris L* is an herbaceous, perennial aromatic plant, belonging to the Lamiaceae family and indigenous in the Mediterranean region (Ghavam, 2018). It is widely utilized in folk medicine due to its antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant potentials (Taghouti *et al.*, 2020). It has been postulated that a fraction of these properties is related to its essential oil (Fachini-Queiroz *et al.*, 2012). Within this context, the present study aimed to evaluate the effects of Voliam Targo® on histological changes of cardiac tissue and to investigate the possible protective role of *T. vulgaris* essential oil in male rabbit of (*Oryctolagus cuniculus*).

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

The molecule tested "Voliam Targo®063SCe" in the present study is a commercial formulation of an insecticide composed of two active ingredients: chlorantraniliprole 4,5% and abamectin, 1,8% marketed by SYNGENTA Crop Protection Agrochemicals, Greensboro, USA. All other chemicals and

biochemical reagents used in the current study were purchased from commercial sources (BIOLABO SA, France).

Animals and experimental procedure

Healthy adult male rabbits (*Oryctolagus cuniculus*, 2.5 ± 0.1 kg) were used in this experiment and divided into 4 groups (5 rabbits each). The rabbits were provided by the Technical Breeding Institute (ITELV, Baba-Ali) and kept for experimentation in the CRD Saida Algeria. They were acclimatized for 3 weeks prior to the experiment in standard cages at 25 ± 3 °C under a 12 h/12 h light/dark cycle. The rabbits received a standard commercial diet and water *ad libitum*.

Animals were randomly divided into four experimental groups as follows: Group 1 (C): control group. Group 2 (VT): rabbits were orally intoxicated with VT pesticide at a dose that containing 4mg/kg abamectin and 11 mg /kg chlorantraniliprole daily for 21 days. Group 3 (TEO): rabbits were treated with thyme essential oil alone at a concentration of 0.5 mg/kg per day for 21 days. Group 4 (VT + TEO): rabbits received 0.5 mg/kg b.w of *Thymus vulgaris* essential oil plus the same dose of VT as in VT-treated group. At the end of the experimental period, rabbits were sacrificed and heart tissues were collected for histopathological analysis.

Biochemical analysis

To better assess the cardiotoxicity of VT, some atherogenic indices were determined, namely atherogenic index of plasma (AIP), atherogenic index (LDL-C/HDL-C ratio) and coronary risk index (TC/HDL-C ratio). The atherogenic index of plasma (AIP) was calculated as $\text{Log}_{10} [\text{TGs}] / [\text{HDL-C}]$ according to **Króliczewska et al. (2018)**.

Histological examination

The specimens of the heart were isolated and immediately fixed in 10% neutral formalin saline. Dehydration was then carried out in ascending series of ethyl alcohol followed by clearing with xylene. The tissues were then embedded in paraffin wax and serial sections of 2 μm thickness were obtained with Leica rotatory microtome. The sections were then stained with haematoxylin-eosin stain and Masson's trichrome stain and examined under light microscope.

Statistical Analysis

Data were presented as means \pm the standard deviation of means. Statistical analyses were performed using Statistica version 10.0 (Stat Soft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA) and one-way ANOVA. Duncan's multiple-range test was used to determine differences among groups with significance set at $P < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Effects of treatments on heart and body weights

No deaths were observed in any of the experimental groups. There was a homogeneous weight gain in the control rabbits, those treated with TEO and those treated with VT + TEO. However, VT treatment resulted in a significant decrease ($p < 0.05$) in the average body weight and body weight gain. Similarly, absolute and relative heart weights were significantly reduced in VT treated group (Table 1). The decrease in body weight of rabbits treated with VT may be attributed to lower intake of food and drink due to treatment-related toxicity (**Mansour and Mossa, 2010**). Our results agreed with our previous studies in rats, showing that exposure to avermectin insecticide (abamectin or Emamectin benzoate) significantly reduced body weight gain (**Khaldoun Oularbi et al., 2013 ; Khaldoun Oularbi et al., 2015**).

Table 1: Effect of Voliam targo® and/or TEO treatment on body weight, absolute and relative heart weights

Groups	Control	VT	TEO	VT + TEO
Initial BW (kg)	2.81 ± 0.01 ^a	2.79 ± 0.06 ^a	2.86 ± 0.02 ^a	2.92 ± 0.04 ^a
Final BW (kg)	3.14 ± 0.03 ^a	2.94 ± 0.07^b	3.17 ± 0.02 ^a	3.20 ± 0.05 ^a
% BWG	11.7	5.4	10.8	9.6
Absolute heart weight (g)	7.67 ± 0.02 ^a	6.84 ± 0.22^b	6.95 ± 0.32 ^a	7.39 ± 0.27 ^a
Relative heart weight	0.25 ± 0.00 ^a	0.22 ± 0.00^b	0.24 ± 0.03 ^a	0.25 ± 0.01 ^a

Data are represented as Mean ± SD (n=05). Means within the same row, which do not share the same superscript symbol(s), are significantly different at p < 0.05. AIP: Atherogenic Index of Plasma, VT Voliam Targo®, TEO *Thymus vulgaris* essential oil

Effects of treatments on atherogenic indices

In comparison with control data, the atherogenic index (LDL-C/HDL-C) of VT-treated rabbits was statistically decreased (Table 2). This is probably related to the plasma elimination of Voliam targo® in the treated rabbits, which is supported by **Khaldoun et al. (2015)** who have demonstrated that avermectins can be simply eliminated from the plasma

after cessation of treatment whereas their accumulation occurs in other biological matrices or organs due to its lipophilicity which is at the origin of their toxicity. Avermectins xenobiotics are very hydrophobic molecules which are distributed in plasma via the LDLc, HDLc and VLDL plasma lipoprotein particles. Thus, the pharmacokinetic of avermectins is influenced by plasma lipoprotein levels (**Bassissi et al., 2004**).

Table 2: Effect of Voliam targo® and/or TEO treatment on atherogenic indices

Groups	Control	TEO	VT	VT + TEO
AIP	0.53 ± 0.07 ^a	0.25 ± 0.02 ^b	0.60 ± 0.09 ^a	0.42 ± 0.06 ^a
LDL-C/HDL-C	1.54 ± 0.09 ^a	0.75 ± 0.05 ^b	0.73 ± 0.05^b	1.04 ± 0.05 ^a
TC/HDLc	3.27 ± 0.07 ^a	2.19 ± 0.08 ^a	2.47 ± 0.04 ^a	2.35 ± 0.03 ^a

Data are represented as Mean ± SD (n=05). Means within the same row, which do not share the same superscript symbol(s), are significantly different at p < 0.05. AIP: Atherogenic Index of Plasma, VT Voliam Targo®, TEO *Thymus vulgaris* essential oil

Effects of treatments on heart histological structure

Histomicrographs of hematoxylin and eosin (H&E) and Masson's trichrome stained sections of the heart specimen from different treatment groups are shown in Figure 1. The cardiac sections of the control and TEO-treated

rabbits showed the same normal histoarchitecture of cardiac tissue, which was formed of normal typical cardiac muscle fibers with several small blood vessels and myofibrillar structure with striations. The five rabbits treated with VT alone displayed the same histopathological changes of cardiac tissue, namely congested blood capillaries, inflammatory cell infiltration, increased masses of collagen fibers among the cardiac muscle fibers and around the congested blood vessels. Focal parts of extensive collagen fiber deposition were also noticed. While the co-administration of *Thymus vulgaris* essential oil showed significant improvement in morphological alterations of the heart. Thus, this essential oil may play a protective role against VT mediated cardiotoxicity through its antioxidant and free radical scavenging properties.

CONCLUSIONS

In conclusion, the findings of this study indicate that sub-acute exposure to Voliam targo® may induce toxic effect to cardiac tissues. This deleterious effect could be ameliorated by *T. vulgaris* essential oil which has healing and protective properties probably through its antioxidant potential and free radical-scavenging activity.

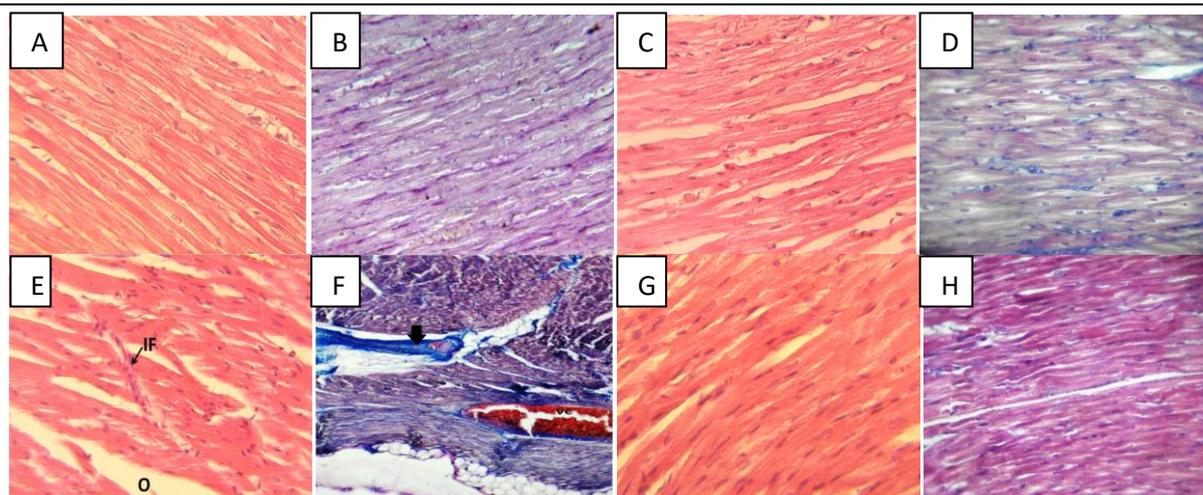


Figure 1: Photomicrographs of rabbit heart sections stained with H&E and Masson's trichrome. Sections of control (A and B) and TEO (C and D) treated rabbits showing normal cardiac histoarchitecture. Section of rabbits treated with VT (E and F) showing vascular congestion (VC), extensive amounts of collagen fibers among the cardiac muscle fibers and around the congested dilated blood vessels (bleu color) and cell infiltration (IF). Cardiac sections from VT+TEO treated rabbits (G and H) showing few collagen fibers with a nearly normal histologic pattern. (X100, X400).

REFERENCES

- Alarcan J., Waizenegger J., Solano M. d. L. M., Lichtenstein D., Luckert C., Peijnenburg N. et al. 2020. Hepatotoxicity of the pesticides imazalil, thiacloprid and clothianidin–Individual and mixture effects in a 28-day study in female Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology.*, 111306.
- Georgiadis N., Tsarouhas K., Tsitsimpikou C., Vardavas A., Rezaee R., Germanakis I., et al. 2018. Pesticides and cardiotoxicity. Where do we stand? *Toxicology and applied pharmacology.*, 353, 1-14.
- Khaldoun Oularbi H., Zerrouki N., Richeval C., Aissani H., Elemdani M. R., Djennas N. 2013. VERTIMEC® MEDIATES PLASMA BIOCHEMICAL CHANGES AND HISTOPATHOLOGICAL DAMAGE IN THE KIDNEY OF RATS (*RATTUS NORVEGICUS*). *Agriculture & Food.*, 5, 622-630.
- Thomaz J. M., Martins N. D., Monteiro D. A., Rantin F. T., & Kalinin A. L. 2009. Cardio-respiratory function and oxidative stress biomarkers in Nile tilapia exposed to the organophosphate insecticide trichlorfon (NEGUVON®). *Ecotoxicology and environmental safety.*, 72(5), 1413-1424.
- Bas H., & Kalender Y. 2011. Chlorpyrifos induced cardiotoxicity in rats and the protective role of quercetin and catechin. *Gazi University Journal of Science.*, 24(3), 387-395.
- Ahmed O. M., Fahim H. I., Boules M. W., & Ahmed H. Y. 2016. Cardiac and testicular toxicity effects of the latex and ethanolic leaf extract of *Calotropis procera* on male albino rats in comparison to abamectin. *SpringerPlus.*, 5(1), 1644.
- Ghavam M. 2018. Effect of silver nanoparticles on seed germination and seedling growth in *Thymus vulgaris L.* and *Thymus daenensis* Celak under salinity stress. *Journal of Rangeland Science.*, 8(1), 93-100.
- Taghouti M., Martins-Gomes C., Félix L. M., Schäfer J., Santos J. A., Bunzel M., et al. 2020. Polyphenol composition and biological activity of *Thymus citriodorus* and *Thymus vulgaris*: Comparison with endemic Iberian *Thymus* species. *Food Chemistry.*, 331, 127362.
- Fachini-Queiroz F. C., Kummer R., Estevao-Silva C. F., Carvalho M. D. d. B., Cunha J. M., Grespan R., et al. 2012. Effects of thymol and carvacrol, constituents of *Thymus vulgaris L.* essential oil, on the inflammatory response. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
- Króliczewska B., Mišta D., Ziarnik A., Žuk M., Szopa J., Pecka-Kiełb .E, et al. 2018. The effects of seed from *Linum usitatissimum* cultivar with increased phenylpropanoid compounds and hydrolysable tannin in a high cholesterol-fed rabbit. *Lipids in health and disease.*, 17(1), 76.
- Mansour S. A., & Mossa A.T. H. 2010. Oxidative damage, biochemical and histopathological alterations in rats exposed to chlorpyrifos and the antioxidant role of zinc. *Pesticide Biochemistry and Physiology.*, 96(1), 14-23.
- Khaldoun Oularbi H., Allorge D., Richeval C. 2015. Emamectin benzoate (Proclaim®) mediates biochemical changes and histopathological damage in the kidney of male Wistar rats (*Rattus norvegicus*). *Toxicol Anal Clin.*, 27, 72–80.
- Bassissi M. F., Alvinerie M., & Lespine A. 2004. Macrocyclic lactones: distribution in plasma lipoproteins of several animal species including humans. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology.*, 138(4), 437-444.

REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1
PESTICIDES
&
VOLIAM TARGO®

CHAPITRE 2

THYM « THYMUS VULGARIS »

&

HUILE ESSENTIELLE

CHAPITRE 3
RAPPELS ANATOMO-
HISTOLOGIQUES
DES
ORGANES CIBLES

CHAPITRE 4
MARQUEURS DE
PROLIFÉRATION CELLULAIRE

*ETUDE
EXPERIMENTALE*

CHAPITRE 1

*MATÉRIEL
&
MÉTHODES*

CHAPITRE 2

RÉSULTATS

CHAPITRE 3

DISCUSSION GÉNÉRALE

*CONCLUSION
GÉNÉRALE
&
PERSPECTIVES*

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

